

**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA INTEGRADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
TROPICAL E RECURSOS NATURAIS**

**GENÉTICA, DISTRIBUIÇÃO E CONSERVAÇÃO
DO GAVIÃO-REAL (*Harpia harpyja*) NO BRASIL**

AUREO BANHOS

Manaus, Amazonas

Maio de 2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

AUREO BANHOS

**GENÉTICA, DISTRIBUIÇÃO E CONSERVAÇÃO
DO GAVIÃO-REAL (*Harpia harpyja*) NO BRASIL**

Orientadora: Dr^a. Izeni Pires Farias

Co-orientadora: Dr^a. Tânia M. Sanaiotti

Tese apresentada ao Programa Integrado de Pós-graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

Manaus, Amazonas

Mai de 2009

FICHA CATALOGRÁFICA

B216 Banhos, Aureo
Genética, distribuição e conservação do gavião-real (*Harpia harpyja*) no Brasil / [Aureo Banhos dos Santos]. --- Manaus : [s.n.], 2009.
XXIII, 163 f. : il.

Tese (doutorado)-- INPA/UFAM, Manaus, 2008
Orientador: Izeni Pires Farias
Co-Orientador: Tânia M. Sanaiotti
Área de concentração: Genética, Conservação e Biologia Evolutiva

1. Marcadores Moleculares. 2. Genética de Populações.
3. Fluxo Gênico. 4. Diversidade Genética. 5. Falconiformes.
I. Título.

CDD 19. ed. 598.9160415

SINOPSE

No presente estudo, marcadores moleculares de DNA mitocondrial, microssatélites nucleares e de identificação de sexo foram utilizados para investigar a distribuição da variabilidade genética do gavião-real no Brasil, bem como os fatores históricos e atuais que determinaram essa distribuição. Os dados e os resultados levantados podem servir como ferramenta na conservação da espécie.

Dedico esta Tese, em especial, ao meu pai, o Sr. Antônio Bispo dos Santos († 09/04/2009), que foi o meu amigo mais antigo, conselheiro mais importante e exemplo de vida mais relevante. Dedico aos meus ancestrais paternos que foram trazidos da África para o Brasil como escravos, que atravessaram várias gerações nessa condição e todo o século XX à margem da dignidade. Sou fruto da resistência desses negros, sem a mesma eu não existiria, hoje parte de um novo momento no espaço e no tempo do difícil curso dessa linhagem. Dedico também a minha avó materna, a Sra. Izabel de Jesus († 06/02/2006), que ao contar fabulosas estórias, dentre elas sobre o “temido gavião pega neném” das florestas do município de Linhares - ES, no caso, o formidável gavião-real, trouxe-me inspiração a presente pesquisa.

Aureo Banhos dos Santos

AGRADECIMENTOS

À minha Orientadora, Dra. Izeni, pelos valiosos ensinamentos em minha pós-graduação, pela oportunidade de fazer parte de seu excelente grupo de pesquisa e por todo apoio técnico e intelectual nos procedimentos de coleta e análises dos dados genéticos desta Tese;

À minha Co-orientadora, Dra. Tânia, por viabilizar a pesquisa com o gavião-real, pelas ótimas conversas, grande atenção a este trabalho e todo apoio logístico para o desenho amostral desta Tese;

Ao Dr. Tomas Hrbek, por sua co-orientação adicional em minha pós-graduação, pelas ótimas aulas, atenção e apoio técnico e intelectual nos procedimentos laboratoriais e nos tratamentos estatísticos dos dados desta Tese;

Aos revisores da minha proposta de mestrado: os Doutores Mario Conh-Haft, Leonora Pires Costa e Tomas Hrbek. Aos membros da banca de minha aula para qualificação de mestrado: as Doutoradas Maria das Neves Viana, Gislene Carvalho e Vera Scarpassa. Aos revisores da minha proposta de mudança de nível para o doutorado: os Doutores Cristina Miyaki, Alexandre Aleixo e Nuno Ferrand. Aos membros da banca de minha aula para qualificação de doutorado: os Doutores Charles Clement, Vera Scarpassa, Joselita Maria Mendes dos Santos, Ronis da Silveira e Renato Cintra. Aos revisores da presente Tese de doutorado: os Doutores Alexandre Aleixo, Jaime Garcia-Moreno, Manuel Ruiz-Garcia, Jorge Albuquerque, Marina Anciães, Fábio Raposo do Amaral e Roberto Cavalcanti.

Ao Laboratório de Evolução e Genética Animal – LEGAL/UFAM, onde a maior parte da etapa laboratorial deste estudo foi desenvolvida. Às pessoas que tive oportunidade de conhecer no LEGAL e que contribuíram muito para esta empreitada: Daniel, William, Edvaldo, Mário, Adan, Eduardo, Pedro Ivo, Andréia, Cleiton, Natasha, Maria das Neves, Rafaela, Yane, Alexandre, Adriano, Cíntia, Carla, Maria da Conceição, Themis, Marina, Valéria, Jaqueline, Daniela, Fabinho, Kelmer, Nicole, Elizabeth, Deila, Luciana, Artur, Maria Doris, Fabiola e Patrícia. Em especial, agradeço a Waleska Gravena, por ter colaborado na determinação dos sexos das amostras geneticamente;

Ao Projeto Gavião-real do INPA, cuja a presente pesquisa foi vinculada como um sub-projeto para a conservação do gavião-real. A todos do Projeto Gavião-real que contribuíram muito com este estudo: Edilene, Hádamo, Júlio do Vale, Zé Ribeiro, Iza, Adnes, Dr. Eduardo Mantovani, Dr. Pires e Almério Câmara. Em especial a Helena Aguiar e Benjamim da Luz pelos seus trabalhos prévios em Ecologia que trouxeram maior conhecimento sobre a espécie de estudo e possibilitaram a coleta de muitas das amostras de gavião-real obtidas na natureza;

À Pós-graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva do INPA, bem como a todos os seus Coordenadores, Conselheiros e Secretárias. Aos alunos que ingressaram no curso comigo, ainda no mestrado, em especial: Fátima, Luciano, Raimundo, Tatiana e Eduardo;

As 67 organizações e instituições que cederam amostras e informações para este trabalho, todas citadas no Anexo I e II;

Ao Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Renováveis – IBAMA, especialmente à Superintendência do Amazonas. Aos servidores dessa instituição que deram apoio a minha empreitada: Eremita, Lúcio, Mourão, Adarciline, Professor Henrique, João Alfredo, Diogo e Carlos Abraão;

Ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, que prestou grande apoio a esse estudo e onde tive o prazer de atuar profissionalmente como Analista Ambiental. Aos colegas de trabalho no Amazonas: Monea, Adriana, Helem, Jussara, Manuel, Rose, Valdênia, Marcelo, Flávio, James, Rafaela e Reinaldo.

Ao Laboratório Temático de Genética do INPA, ao Centro de Apoio Multidisciplinar da UFAM e ao Laboratório de Evolução e Genética Animal da Universidade de Porto Rico, onde parte da etapa laboratorial deste estudo foi desenvolvida;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM, ao Programa BECA do Instituto Internacional de Educação do Brasil – IEB e a Red de Genética de la Conservación - Regenec, pelas concessões das bolsas e capacitação que recebi ainda durante o mestrado;

Aos importantes financiadores: Fundação O Boticário de Proteção à Natureza e ao Cleveland Metroparks Zoo;

Aos meus amigos, Gary, Gerly, Carlos Mario, Tânia, Hildelfonso, Tárík, Flávio Simões, Priscila, Samir, Taís, Eduardo Farina, André Melhem, Janaína Seixas, Marcus, Lesley, Alexandre Carleto, Agis, Manuel, Tatiana, André, Badi, Márcia, Samira, Silvia, Malu, Katiúcia Ahnert, Ygo, Rafael, Valdemir, Ana, Dona Raí, Marisa, Net, Vilas, Ana Rosanas, Albert, Fábio Sole, Carol e Hebert pelo imenso apoio;

Ao meu pai, Antônio Bispo dos Santos, a minha mãe, Eliana Paixão Banhos, e aos meus irmãos, Diego, Poliana, César, Célia, Sílvio e Suely, pelo imenso apoio e carinho. Aos meus familiares de sobrenome Banhos, pela torcida;

À Stella Lira, minha esposa, pelo imenso apoio, carinho e companheirismo na minha busca pelo mérito do título acadêmico de Doutor.

Aureo Banhos dos Santos

“Para dar dois passos à frente
Nem sempre é preciso dar um passo atrás”

Zé Geraldo

RESUMO

O gavião-real ocorre nas florestas da região Neotropical e sua distribuição é ampla no Brasil, onde existem registros principalmente na Amazônia e Mata Atlântica. Entre esses biomas existe um corredor de vegetação aberta com conexões florestais, onde também existem alguns registros da espécie. As florestas brasileiras têm sido drasticamente reduzidas pela ação antrópica, o que tem promovido a perda de habitat para o gavião-real. Agravando ainda mais a situação, muitos indivíduos da espécie têm sido removidos da natureza. Esse intenso processo antrópico faz do gavião-real uma espécie vulnerável que ainda não teve seu status modificado na lista das espécies ameaçadas do Brasil e da IUCN, onde consta como quase ameaçada. O objetivo principal deste estudo foi determinar e avaliar a distribuição da variabilidade genética do gavião-real no Brasil. Assim, inferir sobre quais fatores históricos e atuais que determinaram essa distribuição. Para isso foi realizada uma análise conjunta dos dados genéticos da região controle do DNAm e microssatélites nuclear em uma amostragem extensiva do gavião-real, com sexo determinado geneticamente. Uma série de análises que exploraram diferentes atributos dos marcadores moleculares foi realizada. Para os marcadores DNAm foi encontrado diferenciação genética significativa entre as amostras de gavião-real da Amazônia e Mata Atlântica, enquanto que os microssatélites mostram alto nível de mistura populacional, indicando panmixia entre as regiões. Ambos os marcadores apresentaram altas taxas de fluxo gênico entre as regiões. Entretanto, o fluxo gênico com base nos dados de DNAm foi unidirecional da Mata Atlântica para Amazônia, enquanto que os microssatélites foi bi-direcional, embora com maior taxa na direção da Amazônia. A diferença nos resultados dos marcadores sugerem uma maior dispersão dos machos e residência das fêmeas. Esse padrão de dispersão parcial pelos machos também foi corroborado por outras análises. As análises sugerem que o fluxo gênico entre a Amazônia e Mata Atlântica seja principalmente pelo leste da Amazônia. Os resultados das análises de coalescência evidenciaram que durante o Pleistoceno o gavião-real passou por longo período de redução populacional, seguido de um forte evento de expansão. Esses resultados foram

corroborados pelos resultados de análises convencionais e filogeográfica. A diversidade genética encontrada para o gavião-real foi similar à reportada para espécies de aves ameaçadas, incluindo outros Falconiformes. Houve uma tendência forte de diminuição da diversidade genética do gavião-real ao longo do tempo, com grande redução da diversidade genética entre o passado e um período mais recente da Mata Atlântica. O fluxo gênico do gavião-real entre a Mata Atlântica e Amazônia na atualidade foi mais limitado, provavelmente devido à diminuição das conexões de floresta no corredor de vegetação aberta do Brasil entre esses dois biomas. As informações da presente tese podem servir como ferramenta para o refinamento de estratégias de conservação da espécie, especialmente no Brasil onde a distribuição da espécie é mais ampla.

ABSTRACT

The harpy eagle occurs in the forests of the Neotropical region; it is widely distributed in Brazil where its occurrence has been principally registered in the Amazonian and Atlantic rainforests. Between these two biomes exists a corridor of open vegetation with forest connections where this species has also been registered. Brazilian forests have been drastically reduced by anthropogenic action which has resulted in the loss of habitat for the harpy eagle. Still further aggravating this situation, a large number of individuals have been removed from nature. These processes have resulted in the harpy eagle being a vulnerable species which, however, has not had yet its status changed on the Brazilian list of threatened species, and in IUCN where it is listed as near threatened. The principal goal of this study was to determine and evaluate the distribution of genetic variability of the harpy eagle in Brazil. To this effect, I carried out a joint analysis of mtDNA control region and nuclear microsatellite data obtained from an extensive sampling of the harpy eagle and with genetically determined sex. I then carried out a series of analyses that explores different attributes of the molecular markers. With the mtDNA markers I found significant genetic differentiation between samples of the harpy eagle from the Amazonian and Atlantic rainforests, while microsatellite markers showed high levels of population admixture indicating a panmixia of the regions. Both markers indicated high levels of gene flow between the regions. However, gene flow estimates based on mtDNA was unidirectional from the Atlantic rainforest to the Amazonia rainforest, while with microsatellite markers it was bidirectional, but with a higher migration rate in the direction of the Amazon rainforest. Differences in the results obtained from the two types of markers suggests higher rate of dispersal of males and more sedentary behavior of the females. This pattern of partial dispersal of males was also corroborated in other analyses. The analyses suggest that geneflow between the Amazonian and Atlantic rainforests is primarily via the eastern Amazon. The results of coalescent analyses demonstrated that during the Pleistocene the harpy eagle underwent a long period of a reduced population size followed by a strong expansion event. This result was corroborated by conventional and phylogeographic analyses. Genetic diversity encountered in the harpy eagle was similar to that reported in other

threatened bird species, including other Falconiformes. There was a strong tendency of decrease of genetic diversity of the harpy eagle with time, with a large reduction in genetic diversity between now and the recent past in the Atlantic rainforest. Gene flow between harpy eagles of the Amazonian and Atlantic rainforests is currently more limited, most likely due to the diminishment of the forest corridors in open vegetation between the two biomes. The results and the information of this thesis can serve as instruments for the refinement of conservation strategies for this species, especially in Brazil where the distribution of this species is the greatest.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	IV
RESUMO	VIII
ABSTRACT	X
LISTA DE TABELAS	XVI
LISTA DE FIGURAS	XVIII
1. INTRODUÇÃO	1
2. ESTADO DA ARTE	3
2.1. DISTRIBUIÇÃO HISTÓRICA E ATUAL DO GAVIÃO-REAL NO BRASIL	3
2.1.1. Distribuição do gavião-real e o corredor de vegetação aberta do Brasil	4
2.1.2. Hipóteses de populações e migração do gavião-real	7
2.2. SERIA O GAVIÃO-REAL UMA ESPÉCIE VULNERÁVEL?	10
2.2.1. Critérios para a avaliação do status de conservação	11
2.2.2. Dados suficientes ou deficientes para avaliação?	12
2.2.3. Delicada vulnerabilidade	15
2.2.4. Considerações sobre o status de conservação do gavião-real	18
2.3. GENÉTICA E CONSERVAÇÃO	18
2.3.1. Diversidade genética em pequenas populações ameaçadas	19
2.3.2. Importância dos estudos genéticos	21
2.3.1. Estudos genéticos realizados para o gavião-real	22
3. OBJETIVOS	24

3.1. OBJETIVO GERAL	24
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
4. MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1. COLETA DAS AMOSTRAS E FONTE DE DNA	25
4.2. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DAS AMOSTRAS	27
4.3. EXTRAÇÃO DE DNA	28
4.4. COLETA DE DADOS GENÉTICOS	30
4.4.1. Identificação do sexo	30
4.4.2. Seqüenciamento do DNA mitocondrial	33
4.4.3. Genotipagens	35
4.5. ANÁLISES DOS DADOS	37
4.5.1. Definição dos grupos para análises	38
4.5.2. Distribuição da variabilidade genética	46
4.5.3. Demografia e migração	51
4.5.4. Razão sexual e dispersão parcial entre os sexos	55
4.5.5. Variabilidade genética por tempo e qualidade de habitat	57
5. RESULTADOS	59
5.1. DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL E ESTRUTURA DA VARIABILIDADE GENÉTICA	59
5.1.1. DNAm	59
5.1.2. Microssatélites	64
5.2. DEMOGRAFIA HISTÓRICA E MIGRAÇÃO	71
5.2.1. DNAm	71

5.2.2. Microsatélites	76
5.3. RAZÃO SEXUAL E DISPERSÃO PARCIAL ENTRE OS SEXOS	77
5.3.1. Razão sexual da amostragem	77
5.3.2. Dispersão baseada no sexo	78
5.4. DISTRIBUIÇÃO DA VARIABILIDADE E DESMATAMENTO	80
6. DISCUSSÃO	83
6.1. DIVERSIDADE GENÉTICA	83
6.2. DISTRIBUIÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA	84
6.2.1. DNAm	86
6.2.2. Microsatélites	88
6.3. DEMOGRAFIA HISTÓRICA	89
6.3.1. DNAm	89
6.3.2. Microsatélites	95
6.4. MIGRAÇÃO	97
6.4.1. DNAm	97
6.4.2. Microsatélites	98
6.5. FÊMEAS VS MACHOS	99
6.5.1. Viés das fêmeas na razão sexual	99
6.5.2. Viés dos machos na dispersão	100
6.6. VULNERABILIDADE GENÉTICA NO CENÁRIO DO DESMATAMENTO	102
6.6.1. Mata Atlântica	102

6.6.2. Amazônia	103
6.6.3. Mata Atlântica e Amazônia	104
7. CONCLUSÃO	106
7.1. IMPLICAÇÕES PARA A CONSERVAÇÃO DO GAVIÃO-REAL	107
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109
ANEXO I	129
ANEXO II	142
ANEXO III	154

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Resumo dos critérios das categorias de ameaça da IUCN (2001). 13**
- Tabela 2. Conjunto de *primers* utilizados para a indentificação do sexo. 32**
- Tabela 3. Distribuição dos 20 haplótipos encontrados para os 200pb da região controle do DNAm_t em 151 indivíduos de gavião-real no Brasil. Distribuição de 11 haplótipos encontrados para 19 sequências de DNAm_t de gavião-real depositadas no GenBank. 60**
- Tabela 4. Valores de índices de diversidade genética com 200pb da região controle do DNAm_t do gavião-real das regiões e sub-regiões geográficas amostradas. 61**
- Tabela 5. Valores de Φ_{ST} par a par e sua probabilidade entre sub-regiões geográficas com dados de 200pb da região controle do DNAm_t. Na diagonal inferior esquerda os valores de F_{ST} e na superior direita valores de probabilidade +- desvio padrão. 61**
- Tabela 6. Resultado do teste de Mantel para correlação entre as distâncias genéticas (Φ_{ST} , com dados DNAm_t) e as geográficas de acordo com os modelos de 1 a 7. Apresenta os modelos e seus coeficientes de correlação (r) e probabilidade (p). 62**
- Tabela 7. Número de alelos (k), riqueza de alelos (AR), Alelos privados, heterozigosidades observada (H_O) e esperada (H_E) dos locos microssatélites para o gavião-real das regiões e sub-regiões geográficas amostradas. 66**
- Tabela 8. Valores de F_{ST} par a par e sua probabilidade entre sub-regiões geográficas com dados microssatélites. Na diagonal inferior esquerda os valores de F_{ST} e na superior direita valores de probabilidade +- desvio padrão. Nenhuma diferença foi significativa. 66**

- Tabela 9. Resultado do teste de Mantel para correlação entre as 67**
distâncias genéticas (F_{ST} , com dados microssatélites) e as
geográficas de acordo com os modelos de 1 a 7. Apresenta os
modelos e seus coeficientes de correlação (r) e probabilidade (p).
- Tabela 10. Valores de Φ_{ST} e F_{ST} par a par com dados de 200pb da região 79**
controle DNAm (diagonal inferior) e microssatélites (diagonal
superior) respectivamente entre os diferentes sexos e região.
- Tabela 11. Valores de índices de diversidade genética com 200pb da 81**
região controle do DNAm e com nove locos microssatélites (Mst)
para amostras de diferentes períodos de tempo e regiões. O número
de haplótipos, diversidades haplotípicas (h) e nucleotídica (π) para
os dados de DNAm e número de alelos (k), riqueza de alelos (AR) e
as heterozigosidades observadas (H_O) e esperadas (H_E) para os
dados de microssatélites.
- Tabela 12. Valores de Φ_{ST} e F_{ST} par a par com dados de 200pb da região 82**
controle DNAm (diagonal inferior) e microssatélites (diagonal
superior) respectivamente entre as diferentes regiões e/ou períodos
de tempo.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Gavião-real adulto em uma árvore com seu ninho. Autor da foto: João Marcos Rosa. 2**
- Figura 2. Localidades com dados de ocorrência de gavião-real no Brasil compilados no decorrer deste estudo. A área aberta entre Amazônia e Mata Atlântica é a Caatinga o Cerrado, ambos formam o corredor de vegetação aberta do Brasil. Fonte de dados utilizados no mapa: World Wild Life - WWF, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE e Environmental Systems Research Institute - ESRI. 6**
- Figura 3. Coleta de amostra de um exemplar taxidermizado artisticamente. Autor da foto: João Marcos Rosa. 26**
- Figura 4. Distribuição geográfica das amostras de gavião-real. 28**
- Figura 5. (A) Vista geral de uma pena típica de vôo. (B) Detalhe de uma vista posterior da base da pena: Duas áreas diferentes de amostragem para obtenção de DNA de penas são mostradas: (1) ponta basal do calamus (umbílico inferior) e (2) ponto de coágulo de sangue do umbílico superior. (C) Material retirado para a extração de DNA do umbílico superior. 29**
- Figura 6. Visualização em gel de agarose de um teste de identificação do sexo. Ao todo, nove amostras foram utilizadas: cinco amostras são de fêmeas (♀; duas bandas) (1, 2, 3, 7 e o controle positivo, 9), duas amostras são de machos (♂; uma banda) (4 e 8), uma não pode ser determinada (5) e uma não amplificou (6). 32**
- Figura 7. Localização geográfica das amostras que foram separadas formando os grupos para as análises. Os sub-grupos foram formados para minimizar o efeito dos tamanhos amostrais desiguais entre a Amazônia e Mata Atlântica e para verificar onde existem maiores conexões para o fluxo gênico do gavião-real entre as duas regiões. Os sub-grupos não foram formados para teste de hipótese 39**

de populações diferenciadas dentro da Amazônia. Os sub-grupos da Mata Atlântica foram formados para teste de diferenciação populacional dentro da região. A amostragem total da Mata Atlântica também foi tomado como grupo para comparação com os sub-grupos (sub-regiões) da Amazônia

- Figura 8. Modelo 1:** sugere que quanto maior à distância, menor o fluxo gênico entre as sub-regiões; e que o fluxo gênico entre Amazônia e Mata Atlântica ocorre uniformemente pelo corredor de vegetação aberta 41
- Figura 9. Modelo 2:** sugere que o fluxo gênico está correlacionado com a distância; e que a conexão para o fluxo gênico entre a Amazônia e Mata Atlântica ocorre principalmente pelo centro-oeste do corredor de vegetação aberta entre as regiões. 42
- Figura 10. Modelo 3:** sugere que o fluxo gênico está correlacionado com a distância; e que a conexão para o fluxo gênico entre a Amazônia e Mata Atlântica ocorre principalmente pelo centro-leste do corredor de vegetação aberta entre as regiões. 42
- Figura 11. Modelo 4:** sugere que o fluxo gênico está correlacionado com a distância; e que a conexão para o fluxo gênico entre a Amazônia e Mata Atlântica ocorre principalmente no sentido sudeste-noroeste (em vice-versa) pelo corredor de vegetação aberta entre as regiões. 43
- Figura 12. Modelo 5:** sugere que o fluxo gênico está correlacionado com a distância; e que a conexão para o fluxo gênico entre a Amazônia e Mata Atlântica ocorre principalmente pelo oeste do corredor de vegetação aberta entre as regiões. 43
- Figura 13. Modelo 6:** que o fluxo gênico está correlacionado com a distância; e que a conexão para o fluxo gênico entre a Amazônia e Mata Atlântica ocorre principalmente pelo leste do corredor de vegetação aberta entre as regiões. 44
- Figura 14. Modelo 7:** sugere que o fluxo gênico está correlacionado com a 44

distância; e que a conexão para o fluxo gênico entre a Amazônia e Mata Atlântica ocorre principalmente no sentido nordeste-sudoeste (vice-versa) do corredor de vegetação aberta entre as regiões.

Figura 15. Amazônia desmatada e remanescente. Localização das amostras separadas em grupos para análise. 45

Figura 16. Mata Atlântica original e remanescente. Localização das amostras separadas em grupos de período de tempo para análise 46

Figura 17. Rede de relacionamento de haplótipos da região controle de 200pb do DNAm das amostras de gavião-real de localidades geográficas conhecida. Os círculos representam os haplótipos seguidos de sua identificação (Id+número). A cor verde escuro representa a proporção relativa de amostras da Amazônia brasileira para o haplótipo. A cor azul representa a proporção relativa de amostras da Mata Atlântica para o haplótipo. As cores verde claro e amarelo representam a proporção relativa de seqüências do GenBank da Amazônia não brasileira e América central respectivamente e para o haplótipo. As linhas representam a ligação dos haplótipos por um passo mutacional. A linha transversal à linha que liga os haplótipos representa um passo mutacional adicional ou haplótipo não encontrado. Os polígonos representam os clados identificados pela NCPA 63

Figura 18. Distribuição dos clados de nível 2 da análise de NCPA. Para os clados 2-1 e 2-3 a hipótese nula não pode ser rejeitada. Para o clado 2-2 a associação entre a variabilidade genética e a distribuição geográfica foi significativa, a inferência é de expansão contígua da distribuição geográfica. Para o clado total a associação foi significativa, a inferência também é de expansão contígua da distribuição geográfica. 64

Figura 19. Valores de probabilidade posteriores (p) Bayesiana dos grupos (K) testados com oito locos microssatélites. A maior probabilidade é 67

para $K=1$, sugerindo um grupo (panmixia) explica melhor os dados.

Figura 20. Valores de probabilidade posteriores (p) Bayesiana dos grupos (K) testados com nove locos microssatélites, incluindo o loco AA47. A maior probabilidade é para $K=3$, sugerindo que três grupos explicam melhor os dados. 68

Figura 21. Relacionamento das amostras aos grupos representados pelos vértices do triângulo. Os círculos em azuis representam as amostras da Mata Atlântica, verdes da Amazônia e vermelhos as amostras com região geográfica desconhecida. 69

Figura 22. Composição do relacionamento genético entre as amostras de acordo com os três grupos determinados pela análise Bayesiana. Cada barra representa uma amostra da Amazônia, Mata Atlântica ou de região desconhecida (RD). Cada cor representa um grupo entre os três grupos ($K = 3$) com maior valor de probabilidade para explicar os dados. O eixo vertical mostra o coeficiente de relacionamento (q) da amostra aos grupos definidos. 69

Figura 23. Distribuição das amostras que apresentaram coeficiente de relacionamento (q) $> 0,8$ para um dos três grupos sugeridos pela análise Bayesiana. No grupo 1 predomina amostras da Mata Atlântica e nos grupos 2 e 3 amostras da Amazônia. 70

Figura 24. Distribuição das amostras com coeficiente de relacionamento (q) $>0,5$ para um dos grupos e $q<0,5$ para todos os três grupos sugeridos pela análise Bayesiana. No grupo 1 predomina amostras da Mata Atlântica e nos grupos 2 e 3 amostras da Amazônia. As amostras com $q<0,5$ se concentram mais no leste da Amazônia. 70

Figura 25. Distribuição *mismatch* para haplótipos encontrados em amostras de gavião-real (A) Amazônia e (B) Mata Atlântica. A distribuição esperada de diferenças par a par de acordo com um modelo de expansão populacional súbita é mostrada pela linha contínua azul (Exp) e a distância observada pela linha pontilhada 71

vermelha (Obs).

Figura 26. Resultados dos parâmetros da análise Bayesiana do programa 72
Beast convertidos. Dinâmica do tamanho efetivo populacional de
fêmeas (N_{ef}) no tempo. Um forte sinal de expansão populacional
pode ser visualizado.

Figura 27. Escalada do tempo (em anos) de divergência para os dados de 73
seqüência da região controle do DNAmT do gavião-real na análise de
IMA. O sinal forte de divergência tempo de divergência de foi 9.898
anos (7.522 – 18.707, 90%CI), onde ocorre uma elevada densidade de
valores de probabilidade, e 77.700 anos (5.920 – 86.400, 90% CI),
onde ocorre maior variância nos valores de probabilidade.

Figura 28. Estimativas de probabilidade de máxima verossimilhança (p) 74
para tamanho efetivo da população ancestral entre Amazônia e Mata
Atlântica (amarelo), da Amazônia (vermelho) e da Mata Atlântica
(azul). O número efetivo de fêmeas (N_{ef}) com maior probabilidade
para a população ancestral foi 363, para a Amazônia foi 1.845 e para
a Mata Atlântica foi 540 indivíduos de gavião-real.

Figura 29. Probabilidades de máxima verossimilhança (p) para as taxa de 74
migração (m) do gavião-real para a Amazônia (vermelho) e Mata
Atlântica (azul). A taxa de migração com maior p para a Amazônia foi
 $m = 3,23 \times 10^{-3}$ e para a Mata Atlântica foi $m = 2,46 \times 10^{-6}$ (não aparece
no gráfico). A taxa migração é praticamente unidirecional da Mata
Atlântica para a Amazônia.

Figura 30. Taxa de migração (m), os valores de θ e o número de fêmeas 75
migrantes (Nm_f) direcional de gavião-real entre as regiões e sub-
regiões com dados DNAmT. A migração é unidirecional da Mata
Atlântica para o leste da Amazônia (AL) e da porção central para
sudeste da Amazônia (AC). O leste e sudoeste da Amazônia não
trocaram migrantes diretos.

Figura 31. Taxa de migração (m), os valores de θ e o número de migrantes 77

(Nm) direcional de gavião-real entre as regiões e sub-regiões com dados microssatélites. A migração se apresenta como sendo altamente dinâmica entre as sub-regiões da Amazônia e a Mata Atlântica, mas com pequenas quantidades de migrantes.

Figura 32. Distribuição da freqüência do índice correto de relacionamento (Alc) indivíduos de gavião-real da Amazônia. A. Valores de Alc obtidos com oito locos; B. Valores de Alc obtidos com nove locos, incluindo o locus AA43. 79

Figura 32. Relação com tendência na diminuição da heterozigosidade observada (H_o) do gavião-real ao longo do tempo na Mata Atlântica. 81

1. INTRODUÇÃO

O gavião-real (Figura 1) é cientificamente conhecido como *Harpia harpyja* (Linnaeus, 1758), nome dado em homenagem às guerreiras aladas da mitologia grega, as harpias. Essa ave é o Falconiforme com maior força de empuxo existente no mundo (Brown & Amadon, 1968), pertence à família Accipitridae e é a maior águia das Américas (Colar, 1989). O gavião-real ocorre na região Neotropical desde o sul do México até o nordeste da Argentina (Bierregaard, 1995; Ferguson-Lees & Christie, 2001; Vargas *et al.*, 2006) e possui distribuição mais ampla no Brasil.

O gavião-real pode ser considerado de suma importância em estratégias de conservação de ecossistema. Alguns dos motivos para sua inclusão em projetos de conservação são: seu papel como espécie “guarda-chuva”, pois necessita de grandes áreas de vida para sua conservação, o que provavelmente beneficiaria grande parte dos organismos presentes na mesma região; como espécie “bandeira”, podendo ser utilizado como símbolo de projetos de conservação por ser um animal “bonito” e “imponente”; como bio-indicador de alterações ambientais e/ou da qualidade do hábitat, pois sua presença está associada à floresta com baixa degradação; e seu papel-chave nos ecossistemas, atuando principalmente na regulação de outros predadores e presas, desta forma contribuindo com a manutenção de uma gama de espécies (e.g. Begon *et al.*, 1996; Bildstein *et al.*, 1998).

O grande tamanho e beleza do gavião-real traz a essa ave status de símbolo de várias regiões, por exemplo, do Panamá. A Venezuela homenageou a espécie estampando-a nas notas de 10 bolívares fortes, a moeda desse País. No Brasil, o gavião-real é apresentado no brasão do Estado do Paraná e também é considerada a ave símbolo do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA. Todo esse contexto de simbolismo e importância sugere que o gavião-real seja uma espécie bem estudada e com muitas ações para sua conservação. Entretanto, são poucos os resultados de pesquisas envolvendo essa espécie e as ações para sua conservação ainda estão em fase inicial em alguns países, como no Panamá, Equador, Venezuela e Brasil. Na verdade, justamente pelo seu simbolismo, beleza e mitos, há muitos anos

essa águia é bastante cobiçada como troféu de caça e vitimada por várias outras ações criminosas (Sick, 1997; Muñiz-López, 2008; Trinca *et al.*, 2008). Possivelmente o gavião-real entre em um ciclo crítico de vulnerabilidade em toda sua distribuição antes mesmo que se levante conhecimento suficiente para a sua conservação.

O atual estado do conhecimento científico e as questões que tangem a conservação do gavião-real foram discutidos previamente, com foco principal em sua distribuição no Brasil (veja abaixo). Algumas hipóteses lançadas com base nesse conhecimento foram testadas usando marcadores moleculares. Os importantes resultados dessa abordagem para a conservação da espécie foram discutidos e podem ser apreciados mais adiante.



Figura 1. Gavião-real adulto em uma árvore com seu ninho. Autor da foto: João Marcos Rosa

2. ESTADO DA ARTE

2.1. DISTRIBUIÇÃO HISTÓRICA E ATUAL DO GAVIÃO-REAL NO BRASIL

Habitando as florestas úmidas da região neotropical, o gavião-real ocorre em países das Américas Central e Sul: México, Guatemala, Belize, Honduras, Nicarágua, Costa Rica, Panamá, Colômbia, Venezuela, Guiana, Guiana Francesa, Suriname, Equador, Peru, Bolívia, Paraguai, Argentina e Brasil (Bierregaard, 1995; Stotz *et al.*, 1996; Ferguson-Lees & Christie, 2001; Vargas *et al.*, 2006). O gavião-real ocorre em baixas densidades e é difícil de ser detectado nas florestas densas (Bierregaard, 1995; Stotz *et al.*, 1996), por isso é difícil também de ser estudado. Pouco se conhece sobre a distribuição dessa espécie dentro dos países onde ocorrem (Vargas *et al.*, 2006). No Brasil, o gavião-real ocorre em grande parte do território, com registros em várias localidades e Estados, sobre tudo, nas florestas da Amazônia e Mata Atlântica.

Para a Mata Atlântica existem algumas compilações de registros da espécie (Albuquerque, 1995; Galetti *et al.*, 1997; Pacheco *et al.*, 2003; Srbek-Araujo & Chiarello, 2006). Publicações como essas não foram realizadas exclusivamente para a Amazônia. Entretanto, compilações mais amplas e recentes trazem registros para todo Brasil. Por exemplo, Vargas *et al.* (2006) em compilação de registros para toda distribuição da espécie mostra 25 registros para o Brasil, mas apenas dois registros na Amazônia. Soares *et al.* (2008) mostra 29 localidades com registro de gavião-real nos últimos 20 anos, sendo que 23 são Unidades de Conservação e que apenas 12 localidades se referem à Amazônia. Mesmo assim, esses autores afirmam que a grande maioria dos registros recentes concentra-se em áreas preservadas na Amazônia.

Os registros de gavião-real no Brasil, em geral, são de avistamentos, fotografias, nidificações e predação (Bond, 1927; Ruschi, 1979; Peres, 1990; Galetti *et al.*, 1997; Galetti & Carvalho, 2000; Borges & Carvalhaes, 2000; Silveira & d'Horta, 2002; Henriques *et al.*, 2003; Ferrari & Port-Carvalho, 2003; Pacheco *et al.*, 2003; Martins *et al.*, 2005; Silveira *et al.*, 2005; Oliveira & Silva, 2006; Olmos *et al.*, 2006; Pereira & Salzo, 2006; Pivatto *et al.* 2006; Srbek-Araujo & Chiarello, 2006; Rodrigues 2008). Entre

as publicações, o registro mais antigo encontrado de uma nidificação de gavião-real se dá para o leste da Amazônia (Bond, 1927). Nenhuma publicação apresenta registro de gavião-real na Caatinga e poucas publicações apresentam registro de gavião-real no Cerrado, ambas as áreas de domínio de vegetação seca e aberta localizadas entre a Amazônia e Mata Atlântica. Rodrigues (2008) relata a coleta de um exemplar, entre os anos de 1847 e 1855, no Cerrado. Alguns registros recentes são para localidades na transição do Cerrado com Amazônia (Silveira & d’Horta, 2002) ou com a Mata Atlântica (Oliveira & Silva, 2006; Pivatto *et al.* 2006; Pereira & Salzo, 2006). Isso levanta dúvidas se essa espécie habita o interior do Cerrado e da Caatinga e/ou se utiliza esses biomas como passagem entre a Amazônia e a Mata Atlântica. Também, se os registros de gavião-real na transição do Cerrado com as florestas úmidas seriam indivíduos migrando (ou dispersando) naturalmente ou se refugiando das condições de ameaça nos biomas florestais.

No presente estudo, levantar previamente esses dados foi muito importante para a elaboração das hipóteses a serem testadas. Entretanto, somente os registros publicados não foram suficientes para o delineamento dessas questões. Por isso, vários tipos de evidências da ocorrência de gavião-real por localidade foram compilados na etapa de coleta de amostras, considerando tanto os dados históricos quanto os atuais. Isso envolve, além das publicações, os dados de exemplares depositados em museus, de evidências de indivíduos na natureza e as informações de indivíduos removidos da natureza pela caça, bem como aqueles resgatados em condições de ameaça e destinados a criadouros legalizados. Grande parte desses registros foi tomada como fonte de amostras para o presente estudo. Além disso, previamente auxiliaram a revelar a distribuição da espécie no país de forma mais completa.

2.1.1. Distribuição do gavião-real e o corredor de vegetação aberta do Brasil

Os dados de localidades com ocorrência de gavião-real foram sumarizados no mapa da Figura 2 e na tabela do Anexo I. Ao todo, 148 localidades foram apresentadas com dados sobre a ocorrência da espécie, sendo que 31 são Unidades de Conservação e as demais são municípios e rios. No mapa (Figura 2), 84 localidades apresentam-se

na Amazônia, 52 na Mata Atlântica e apenas 12 são consideradas como pertencendo ao corredor de vegetação aberta do centro do Brasil. Uma dessas localidades, ao sul do Maranhão (Localidade 31 na Figura 2 e Anexo I), as evidências são de ninhos ativos do gavião-real onde foram coletadas amostras de penas e cedidas para este estudo pela organização não governamental Nordeste. Três localidades são apontadas no Mato Grosso do Sul, uma onde foi realizado um registro de uma nidificação (Localidade 113), uma de um avistamento (Localidade 114) e a outra de um avistamento e onde também foi encontrada uma pena no Parque Nacional da Serra da Bodoquena (Localidade 115), pena essa cedida para esse estudo pela Administração do próprio Parque. Ao sul do Mato Grosso três localidades são apresentadas, na mais a oeste ocorreu um avistamento (Localidade 34), e na mais central se trata de um ninho (Localidade 32) onde foram coletadas penas pelo Projeto Gavião-real em 2004 e cedidas para este estudo. A terceira localidade, mais a leste (Localidade 37), trata-se de um exemplar depositado no Museu de Zoologia Professor José Hidas, é o registro mais ao centro do Brasil e é datado de 1952. No Estado de Tocantins, trata-se de um registro fotográfico realizado por Silva em 2008 (Localidade 89). Na localidade do sudoeste de Minas Gerais (Localidade 118) está um registro fotográfico realizado por Oliveira & Silva (2006). Mais ao centro do estado de Minas Gerais está a localidade de Lagoa Santa (Localidade 119) do relato de Rodrigues (2008) sobre a coleta realizada pelo naturalista J.T. Reinhardt, entre 1847 e 1855. Este é o registro mais antigo entre os dados compilados. Duas localidades são do norte de São Paulo (Localidades 147 e 148) referentes a exemplares depositados em museus, um datado de 1911 do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo e o outro com data aproximada de 1972-1974 no Museu Didático Luiz Dino Vizotto. Uma localidade está situada na porção mais central da Bahia (Localidade 98), município de Mundo Novo, o registro é de uma garra guardada no Museu do Mosteiro Jequitibá, com data aproximada de 1955-1965. Esse indivíduo pode ser atribuído a uma região de transição entre os biomas Cerrado, Caatinga e Mata Atlântica, região conhecida como Chapada Diamantina, onde está localizado o município.

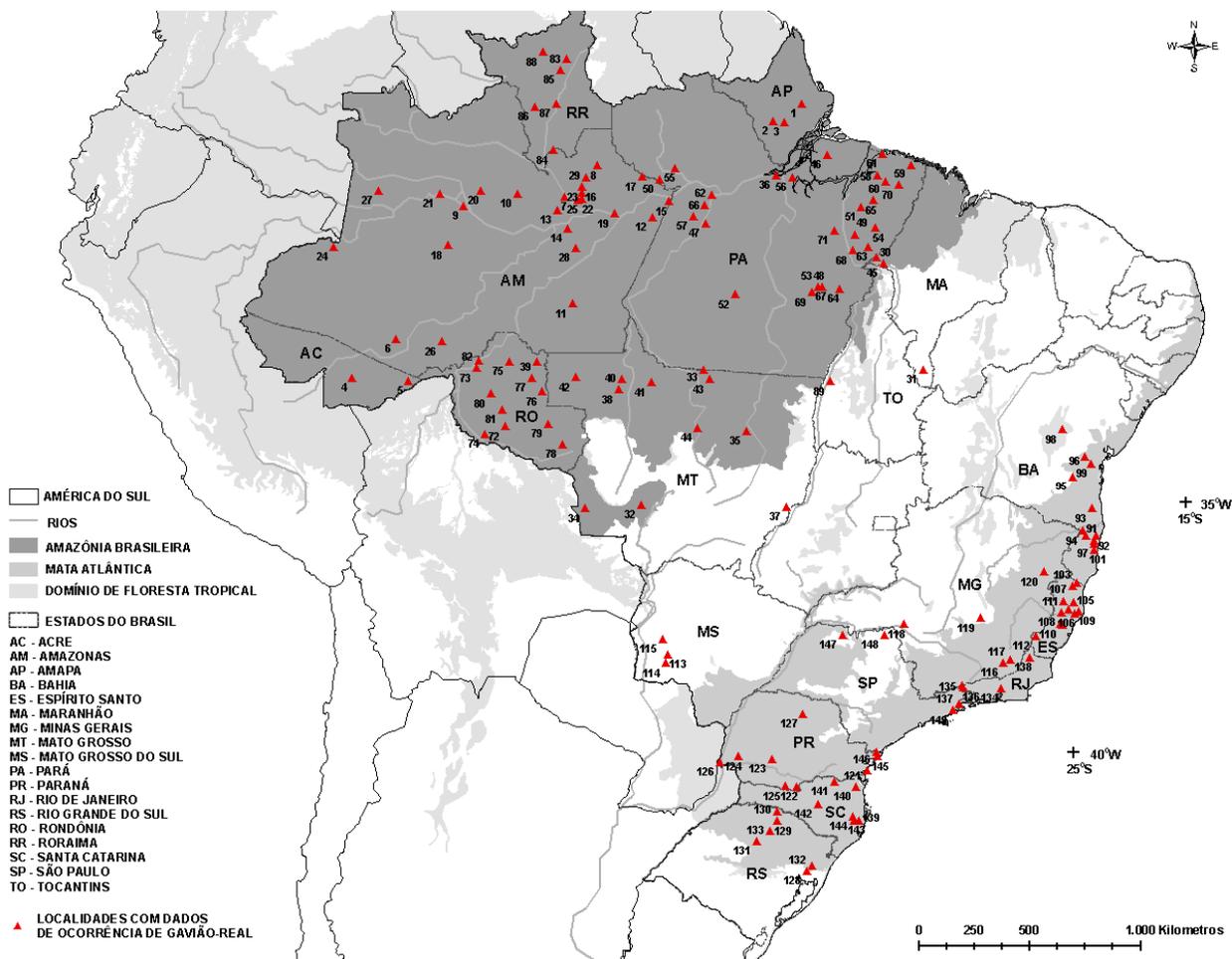


Figura 2. Localidades com dados de ocorrência de gavião-real no Brasil compilados no decorrer deste estudo. A área aberta entre Amazônia e Mata Atlântica é a Caatinga o Cerrado, ambos formam o corredor de vegetação aberta do Brasil. Fonte de dados utilizados no mapa: World Wild Life - WWF, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE e Environmental Systems Research Institute - ESRI.

Os dados compilados revelam que no corredor de vegetação aberta do Brasil, o gavião-real é muito mais raro que nas regiões de florestas úmidas. Possivelmente as condições de habitat representam limitações para a ocorrência do gavião-real nesse corredor. Entretanto, a presença de ninhos é uma evidência forte que a espécie ocupa a periferia do corredor na transição com os biomas florestais. Mas, será que o gavião-real sempre ocupou essas áreas ou estaria se refugiando? Os registros históricos e recentes mostram que no passado e na atualidade essa ave está presente nesse ambiente. Entretanto, esses registros seriam de indivíduos migrando? Oliveira & Silva

(2006) sugerem, sem evidências claras, que o registro que realizaram no Cerrado em Minas Gerais (Localidade 118, Figura 1 e Anexo I) se tratava de um indivíduo migrante associado com o desmatamento. Entretanto, próximo da localidade desse registro existem mais outras duas localidades com registros históricos do gavião-real (Localidades 147 e 148). O rio Grande, entre os Estados de Minas Gerais e São Paulo, parece fazer uma ligação entre as localidades desses três registros. A mata ciliar ou vale desse rio pode funcionar como uma conexão de floresta capaz de promover condições de rota para o deslocamento do gavião-real e talvez até mesmo para nidificação. Assim, o registro de Oliveira & Silva (2006) pode não estar associado com o desmatamento, mas sim com um deslocamento normal que existe nas proximidades e/ou a um sítio onde a espécie é residente. Galetti *et al.* (1997) sugerem que o gavião-real possa migrar por vales de rios, como do rio Paranapanema entre os Estados de São Paulo e Paraná. Possivelmente, no passado os vales dos rios possuíam melhores condições de floresta que nas últimas décadas e a ocorrência da espécie no entorno dos rios poderia ser mais comum no passado e menos evidente nas últimas décadas.

2.1.2. Hipóteses de populações e migração do gavião-real

Os termos migração e dispersão são confundidos entre a ecologia e a genética de populações (Allendorf & Luikart, 2007). Na literatura de ecologia, a migração é referida para o movimento de indivíduos de uma região para outra durante seu tempo de vida (movimento sazonal). Para a genética, a migração se refere ao movimento dos indivíduos de uma população genética para outra, ou seja, fluxo gênico entre grupos reprodutivos. Essa troca genética, por sua vez, é vista pela ecologia como dispersão. Todas as hipóteses publicadas de populações e migrações do gavião-real são com base no conceito ecológico. Mas, foram transformadas em hipóteses passivas de serem testadas com base nos termos empregados na genética.

No contexto da Mata Atlântica, algumas hipóteses de existência de diferentes populações e de migração (sentido ecológico) têm sido levantadas para o gavião-real junto aos registros publicados. Para Albuquerque (1995), por exemplo, os registros realizados no Estado de Santa Catarina sugerem que há duas populações distintas,

uma entre a região do Parque Nacional de Foz do Iguaçu (Estado do Paraná) e Misiones (Argentina) e outra na Serra do Tabuleiro (Estado de Santa Catarina). Para Galetti *et al.* (1997), existiria uma população de indivíduos residentes no sul e norte dos Estados da Bahia e Espírito Santo respectivamente e outra de indivíduos migratórios no sul do Brasil (São Paulo, Paraná e Santa Catarina) se reproduzindo em Misiones. O fundamento de Galetti *et al.* (1997) para sua hipótese é que existe conhecimento de nidificação da espécie para esses dois Estados do norte da Mata Atlântica (e.g. Ruschi, 1979; Pacheco *et al.*, 2003; Silveira *et al.*, 2005) e também em Misiones, na Argentina (e.g. Chebez *et al.*, 1990; Anfuso *et al.*, 2008). Pereira & Salzo (2006), ao registrar o ninho de gavião-real e outros avistamentos para o Mato Grosso do Sul, sugerem uma terceira população no cone sul da América do Sul, considerando as outras duas de Albuquerque (1995). Para os autores essa população pode ser resultado da fragmentação florestal do cone sul.

Como hipótese de migração, Sick (1997) sugere que os indivíduos registrados no Estado do Rio Grande do Sul até 1958 seriam migrantes sazonais no verão. Galetti *et al.* (1997) também sugerem que a população de gavião-real que habita a floresta do sul do Brasil seria composta de indivíduos migratórios, mas, com ocorrência durante o inverno. Em ambas as publicações, essas aves migrantes supostamente procriariam em Misiones. No entanto, Bencke *et al.* (2003) alerta que os poucos registros históricos do Rio Grande do Sul com data conhecida indicam que a espécie podia ser encontrada no inverno e no verão. Esses autores complementam argumentando que a população de Misiones tem sido tomada como residente e uma migração dificilmente seria possível para essas aves, pois o longo período de dependência dos filhotes obriga os adultos a permanecerem na área de reprodução o ano todo. Para Bencke *et al.* (2003), o aparecimento desses indivíduos resultaria antes de deslocamentos locais do que migração de longas distâncias, mas, que é possível que indivíduos isolados tivessem sido atraídos para a região quando muitas presas potenciais encontram-se concentradas em locais fartos de alimento (pinhões de araucária, em outubro), como proposto por Albuquerque (1995).

Nenhuma hipótese de existência de diferentes populações e migração entre as florestas úmidas Amazônica e Atlântica foi registrada para o gavião-real. Entretanto, o corredor seco de vegetação aberta foi considerado como limitação importante à migração de espécies entre essas duas regiões de floresta tropical (Rizzini, 1979; Mori *et al.*, 1981; Por, 1992). Esse corredor também pode ser uma limitação para o gavião-real, mesmo sendo uma espécie com grande potencial de dispersão. No entanto, a Figura 2 mostra claramente que as florestas Amazônica e Atlântica não estão extensamente isoladas, pois existem formações de florestas, como florestas de galeria e mata ciliar que constituem uma rede de florestas interconectadas com a paisagem aberta (e.g. Oliveira-Filho & Ratter, 1995; Vivo, 1997; Costa, 2003). Os raros registros históricos e atuais de gavião-real no corredor de vegetação aberta do Brasil sugerem que talvez essa região possa ser um limitante para dispersão dessa ave entre as florestas Amazônica e Atlântica, mas não uma barreira. Por outro lado, o desmatamento das conexões de floresta desse corredor pode ter criado uma limitação onde não existia. Essa limitação pode ser ainda maior considerando que devido ao desmatamento restam menos de 7% de floresta remanescente na Mata Atlântica (Myers *et al.*, 2000; SOS Mata Atlântica & Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais - INPE, 2008) e que a Amazônia brasileira perdeu mais 18% de sua área (Fearnside, 2005; Fearnside, 2008; INPE, 2008).

Por fim, tem sido documentado que os períodos glaciais e interglaciais do Pleistoceno causaram um forte impacto no clima e conseqüentemente na vegetação da América do Sul (Ledru *et al.* 1996; Behling & Lichte, 1997). Estudos sugerem que no passado Pleistocênico a Amazônia e a Mata Atlântica foram contínuas (Bigarella *et al.*, 1975; Ledru, 1993) e depois foram separadas pela formação de vegetação aberta (Prado & Gibbs, 1993). Assim, surge mais uma pergunta, esses eventos históricos Pleistocênicos influenciaram a dinâmica populacional e a distribuição do gavião-real?

Fundamentada nos dados citados acima três diferentes hipóteses nulas podem ser resumidas como: (1) não existem populações diferenciadas de gavião-real na Mata Atlântica; (2) histórica e/ou recentemente o corredor de vegetação não é um limitante para fluxo gênico do gavião-real entre a Amazônia e a Mata Atlântica; e (3) o

Pleistoceno não influenciou a dinâmica populacional do gavião-real.

As hipóteses formuladas (1, 2 e 3) foram testadas neste estudo com marcadores moleculares e os resultados podem ser apreciados mais adiante.

2.2. SERIA O GAVIÃO-REAL UMA ESPÉCIE VULNERÁVEL?

As principais ameaças ao gavião-real são a perda de habitat, caça, criação ilegal e tráfico de animais silvestres. Segundo o relatório da Rede Nacional de Combate ao Tráfico de Animais Silvestres – RENCTAS (2001), o gavião-real é uma das espécies do Brasil mais cobiçadas no tráfico de animais silvestres, valendo 20 mil dólares. Seu alto valor no tráfico certamente estimula alguns dos crimes contra essa espécie. O gavião-real está listado no Apêndice I da *Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora* – CITES (2008), o que só permite a comercialização internacional da espécie em condições excepcionais. Em seu Apêndice I, a CITES lista as espécies consideradas globalmente mais ameaçadas de extinção para protegê-las do comércio internacional. Entretanto, o gavião-real não é considerado uma espécie globalmente ameaçada de extinção. A BirdLife e a *International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources* – IUCN classificam essa espécie como quase ameaçada de extinção (BirdLife, 2008). O fato de ser uma espécie com status apenas de quase ameaçada e mesmo assim estar listada no Apêndice I da CITES sugere que o tráfico é uma ameaça muito relevante para a conservação da espécie. Mas, apesar de não ser considerada globalmente ameaçada, a maioria dos países onde a espécie ocorre e que possuem lista de espécies ameaçadas de extinção classifica o gavião-real como ameaçado, por exemplo, Venezuela (Rodríguez & Rojas-Suárez, 1995), Bolívia (Ergueta & Morales, 1996) e Equador (Granizo, 2002).

No Brasil, o gavião-real foi considerado como ameaçado nas três primeiras versões da lista nacional oficial de espécies ameaçadas de extinção, 1968, 1973 e 1989, mas, foi retirado da lista na revisão atual de 2003 (Machado *et al.*, 2008). Machado *et al.* (2005), inclui a lista das espécies quase ameaçadas, na qual o gavião-real está citado. No entanto, todas as recentes listas de espécies ameaçadas dos

Estados na região da Mata Atlântica classificam o gavião-real como ameaçado, por exemplo, na categoria de “criticamente em perigo”, o Espírito Santo (Instituto de Pesquisas da Mata Atlântica, 2005), Paraná (Miklich & Bérnils, 2004) e São Paulo (Secretaria de Meio Ambiente do Estado de São Paulo, 2008), de “em perigo”, o Rio de Janeiro (Alves *et al.*, 2000), e no caso Rio Grande do Sul, como “provavelmente extinto na natureza” (Bencke *et al.*, 2003). Segundo Soares *et al.* (2008) se observado apenas o bioma Mata Atlântica, o gavião-real poderia ser considerado nacionalmente ameaçado devido às baixas populações ali existentes.

2.2.1. Critérios para a avaliação do status de conservação

Na última revisão da lista de espécies ameaçadas, o Brasil seguiu como parâmetros de avaliação do status de conservação das espécies os critérios e as categorias adotadas pela IUCN (2001). Pela IUCN (2001), existem oito categorias, sendo que uma é para espécies deficientes em dados (*data deficient* - DD) e sete são para espécies com dados adequados: menor risco ou não ameaçada (*least concern* - LC), quase ameaçada (*near threatened* - NT), extinta na natureza (*extinct in the wild* - EW), extinta (*extinct* - EX) e as três categorias de ameaça, vulnerável (*vulnerable* - VU), em perigo (*endangered* - EN) e criticamente em perigo (*critically endangered* - CR). Todas as espécies nas três categorias de ameaça são consideradas vulneráveis. No entanto, a classificação do status VU, EN e CR depende do nível de risco sofrido por uma espécie, sendo o status CR o maior nível de ameaça. Para verificar se um táxon pertence a uma categoria de ameaça são utilizados cinco critérios de A a E (resumo na Tabela 1) e vários sub-critérios. Para a IUCN (2001), as espécies com dados adequados são passivas de serem avaliadas em pelo menos um dos critérios e se a espécie se apresentar vulnerável em um deles é suficiente para considerar a espécie ameaçada.

Segundo Machado *et al.* (2005), na revisão da lista em 2003, foi verificado se as espécies se enquadrariam primeiramente na categoria de VU e as conclusões muitas vezes foram rápidas utilizando as duas variáveis quantitativas em que se baseiam os critérios: o declínio de populações das espécies e o tamanho de sua área de

distribuição. Na ausência de dados para o declínio populacional, o critério B foi o mais utilizado, considerando que a distribuição de uma espécie pode ser avaliada em termos de área de ocupação ou extensão de ocorrência.

Nas publicações de Machado *et al.* (2005; 2008), os critérios avaliados para enquadrar uma espécie como ameaçada estão especificados na lista. Entretanto, para as espécies consideradas quase ameaçadas trazidas no anexo em Machado *et al.* (2005), como o gavião-real, os critérios avaliados não estão explícitos. Não há como saber quais os critérios foram utilizados pelos avaliadores para classificar o gavião-real como uma espécie quase ameaçada. Aparentemente a avaliação nacional que enquadra essa espécie como quase ameaçada tenha sido mesmo subjetiva ou não criteriosa. Entretanto, a BirdLife (2008) na avaliação global considera o gavião-real como quase ameaçado porque se suspeita haver um declínio moderado na população devido à caça e à perda do habitat. Soares *et al.* (2008) sugerem que devido às condições da espécie na Amazônia, o gavião-real não pode ser classificado como ameaçado no Brasil, mas, que será em breve caso os níveis de desmatamento desse bioma se mantenha no ritmo atual.

2.2.2. Dados suficientes ou deficientes para avaliação?

A justificativa para retirada do gavião-real e outras espécies da lista brasileira é que os novos critérios adotados estão mais restritivos (Machado *et al.*, 2005) e estudos mostram que a distribuição da espécie é maior que se pensava (Machado *et al.*, 2008). Para o gavião-real essa justificativa parece estar pouco embasada, uma vez que 2003 existiam poucas publicações sobre a distribuição do gavião-real no Brasil e todas as que existiam eram para a Mata Atlântica. Entretanto, os avaliadores do status de conservação do gavião-real podem ter utilizado adicionalmente dados que estão disponíveis em fontes além da literatura. Mesmo assim não parece um caso de melhor conhecimento, uma vez que em 2003 não havia informações acessíveis ao público e as compilações específicas de dados sobre a distribuição do gavião-real em estudos posteriores trazem poucos registros na Amazônia, justamente onde se acredita que a

espécie se encontra em melhores condições. Na verdade os dados podem ter sido deficientes para a avaliação naquele momento.

Tabela 1. Resumo dos critérios das categorias de ameaça da IUCN (2001).

Critérios (A a E)	Vulnerável	Em perigo	Criticamente em perigo
A. Redução populacional atual ou projetado	30% de declínio em dez anos ou três gerações	50%	80%
B. Extensão de ocorrência ou (área de ocupação)	< 20.000 (2000) km ² e dois dos seguintes itens: (1) Distribuição geográfica altamente fragmentada (2) Diminuição contínua em (3) Flutuações Extremas	< 5.000 (500) km ²	< 100 (10) km ²
C. Tamanho populacional reduzido e em declínio	< 10.000 com declínio de 10% em 10 anos ou 3 gerações	< 2.500	< 250
D. Tamanho populacional reduzido e restrito	< 1.000	< 250	< 50
E. Análise quantitativa mostrando que a probabilidade de extinção na natureza	10% em 100 anos	20% em 20 anos ou em cinco gerações	50% em 10 anos ou em três gerações

Como na maioria das regiões fora da Amazônia brasileira o gavião-real é considerado ameaçado, a título de ilustração segue a seguinte simulação de avaliação do status de conservação do gavião-real da Amazônia brasileira com base nos critérios da IUCN:

i) Considerando que o gavião-real é uma espécie dependente de floresta (Bierregaard, 1995; Stotz *et al.*, 1996; Vargas *et al.*, 2006; Muñoz-López, 2008) e assumindo que a mesma se distribui em toda área de floresta disponível atualmente na Amazônia brasileira, que é de aproximadamente de 3,2 x 10⁶ km² (Fearnside, 2005;

INPE, 2008) a espécie não poderia ser enquadrada como VU através do critério B, pois, sua distribuição é muito maior que $2 \times 10^4 \text{ km}^2$ estabelecido pelo como limite para o critério. A extensão de $2 \times 10^4 \text{ km}^2$ é aproximadamente o tamanho do Estado do Acre, o menor dos nove Estados que compõe a Amazônia brasileira, uma área extremamente pequena para comportar uma população viável de uma espécie de vertebrado de grande porte, de ampla distribuição na região Neotropical, que ocorre em baixa densidade e requer grandes áreas para sua manutenção. A BirdLife (2008) estima que a distribuição global do gavião-real seja de $7,4 \times 10^6 \text{ km}^2$, mas parece considerar também dentro dessa extensão as áreas sem florestas e/ou onde atualmente não existe mais cobertura florestal.

ii) Considerando a estimativa de área requerida para uso por casal de gavião-real seja de 100 km^2 (Thiollay, 1989) e assumindo que as florestas da Amazônia brasileira são homogeneamente ocupadas por casais da espécie, a estimativa seria em torno de 64.000 indivíduos de gavião-real em toda sua extensão. Um número muito maior que o limite estabelecido no critério C (população menor que 10.000 e em declínio) ou do critério D (população menor que 1.000) para enquadrar a espécie como VU. Ferguson-Lees & Christie (2001), por exemplo, estimaram que a população de gavião-real seja de 10.000 a 100.000 indivíduos em toda extensão de sua distribuição.

iii) Seguindo a mesma lógica, considerando que nos últimos 40 anos a Amazônia brasileira perdeu entre 18 a 20% de cobertura florestal (Fearnside, 2005; Fearnside, 2008; INPE, 2008), a população de gavião-real teria reduzido também próximo de 18 a 20% de seu tamanho. Se a taxa de desmatamento da Amazônia se mantiver constante, nos próximos pelo menos 40 anos haverá aproximadamente mais 20% de perda de floresta, conseqüentemente mais 20% de redução da população de gavião-real. O tempo de geração de uma espécie é a média de sua idade reprodutiva (Allendorf & Luikart, 2007). Assumindo que o gavião-real inicie sua reprodução em torno de cinco anos (tempo que leva para adquirir penas na coloração de adulto, Fowler & Cupe, 1964) e se reproduza para mais de 30-35 anos (observado na natureza; Fowler & Cupe, 1964), o intervalo de geração do gavião-real pode ser maior que 15 anos. O intervalo de geração para águias, em geral, é alto. Para *Aquila adalberti* e *A. heliaca*, por exemplo, a

estimativa é de 16,4 anos (Ferrer & Calderón, 1990) e para *Haliaeetus albicilla* é 17 anos (e.g. Hailer *et al.*, 2006), todas espécies da mesma família do gavião-real consideradas ameaçadas (BirdLife, 2008). Assumindo então um intervalo de geração de 15 a 17 anos para o gavião-real, 40 anos de desmatamento da Amazônia equivalem a aproximadamente duas gerações de gavião-real. Se passados 40 anos, a espécie perdeu aproximadamente 20% de sua população na Amazônia e perderá mais 20% nos próximos 40 anos. Esses 80 anos equivaleriam a mais de quatro gerações de gavião-real e aproximadamente 40% de diminuição populacional, então a espécie terá perdido 30% da sua população em três gerações. Assim, a espécie pode ser considerada vulnerável sob critério A (população em declínio de 30%), sub-critério 4-c (4 - redução já ocorrida e projetada envolvendo período de 10 anos ou três gerações; c – por declínio na área de ocupação extensão da ocorrência e/ou qualidade do habitat) (IUCN, 2001). Considerando toda a distribuição da espécie no Brasil ou na região neotropical, as estimativas de redução na população seriam ainda maiores.

Considerar que a espécie ocupa homoganeamente a área disponível de floresta na Amazônia pode não ser adequado. Mas, as recomendações da IUCN (2008) comportam esse tipo de aproximação rápida. A IUCN (2008) também recomenda utilizar o tempo de geração de espécies proximamente relacionadas quando não existe esse conhecimento para a espécie avaliada. Por essa ótica o gavião-real seria considerado uma espécie ameaçada na Amazônia brasileira em um dos cinco critérios da IUCN.

2.2.3. Delicada vulnerabilidade

O pouco que se conhece sobre a ecologia do gavião-real indica que é uma espécie monogâmica, cria um filhote em média a cada dois a três anos e após os jovens adquirirem independência (dois a três anos) o casal normalmente reutiliza a mesma árvore para novas nidificações (Fowler & Cupe, 1964; Rettig, 1978; Álvarez 1996). Segundo da Luz (2005), na Amazônia brasileira o gavião-real nidifica preferencialmente em árvores emergentes ao dossel das florestas. O autor destaca que em 16 ninhos estudados oito espécies de árvores foram identificadas como sendo utilizadas pelo gavião-real, sendo que sete possuem importância madeireira. Uma

dessas espécies é considerada como ameaçada de extinção, a castanheira do Pará (do Brasil) (*Bertholletia excelsa*) (Ministério do Meio Ambiente, 2008). O gavião-real é um especialista em se alimentar de presas arborícolas, como preguiças e macacos (Aguilar, 2007) e em alguns países suas presas também são espécies ameaçadas de extinção (Muñiz-López, 2008), o mesmo ocorre em Estados da Mata Atlântica.

O desmatamento da Amazônia brasileira concentra-se principalmente ao sul da Amazônia, onde se localiza o chamado “arco do desmatamento”. O desmatamento facilita as ações ilegais contra o gavião-real. Além de perda de habitat, muitos indivíduos estão sendo removidos ou caçados na região. Na tabela do Anexo I são identificadas 46 localidades onde 63 indivíduos de gavião-real foram removidos da natureza, a maioria indivíduos removidos recentemente na Amazônia. Existem mais de 70 indivíduos de gavião-real em criadouros legalizados no Brasil, somente nesse estudo 58 desses indivíduos foram amostrados (Anexo II), a maioria indivíduos que foram resgatados em condições de ameaça nos Estados do Pará (PA), Mato Grosso – (MT) e Rondônia (RO) e destinados aos criadouros legais pelo Instituto Brasileiro de Meio Ambiente - IBAMA. Esses três Estados são os que possuem as maiores taxas de desmatamento anual no chamado arco do desmatamento da Amazônia (INPE, 2008). No Estado do PA, no ano de 2006 foram resgatados ou apreendidos pelo IBAMA cinco indivíduos de gavião-real, dos quais um foi devolvido à natureza (soltura) e o restante foi destinado a criadouros (IBAMA - PA, comunicação pessoal). Somente nos três primeiros meses de 2009 dois indivíduos foram resgatados pelo IBAMA no Pará. Também no início de 2009, entorno do Parque Municipal de Pimenta Bueno - RO região onde a presença da do gavião-real tem sido estudada, uma árvore cerejeira com um ninho ativo de gavião-real foi derrubada a mando de um fazendeiro local, o filhote foi capturado (Almério Câmara, comunicação pessoal). Ainda, um indivíduo foi baleado com arma de fogo no município de Rodolândia - RO e encontra-se em um cativeiro irregular (Almério Câmara, comunicação pessoal). Trinca *et al.* (2008) mostraram que muitos espécimes de gavião-real no MT têm sido caçados indiscriminadamente, apresentando uma série de 12 animais caçados entre 2000 a 2007. Nos anos de 2007 e 2009, ainda em MT, dois indivíduos foram mortos com arma de fogo, um desses no

município de Aripuanã (SOS Falconiformes, comunicação pessoal). No Estado do Acre, em 2006, uma árvore sumaúma foi derrubada com um ninho e um filhote de gavião-real em uma área legalizada para o manejo florestal no município de Senador Guiomar. O filhote foi destinado ao Zoológico Chico Mendes (Zoológico Chico Mendes, comunicação pessoal). Em 2008, ainda no Acre, outro indivíduo chegou ferido ao Zoológico Chico Mendes. Entre 2006 e 2008, cinco indivíduos chegaram feridos ao IBAMA do Estado do Amazonas, dois desses feridos a bala de arma de fogo morreram, os outros foram devolvidos a natureza próximo do local onde foram resgatados. No início do ano de 2009 um indivíduo foi morto com arma de fogo em Manaus, no Amazonas. Entre 2006 e 2007, dois indivíduos foram encontrados feridos no Estado do Amapá, um está em um criadouro e outro morreu, sendo depositado no Museu do Instituto Estadual de Pesquisas do Amapá. Grande parte dos exemplares de gavião-real de Museus foi depositada reaproveitada após essas aves terem sido vítimas da caça, por exemplo, a maioria dos indivíduos depositados na Coleção de Aves do INPA. Essas informações mostram que a ação antrópica está trazendo ameaças diretas à conservação do gavião-real. A população de gavião-real pode estar reduzindo mais rápido considerando essas ações criminosas diretas do que somente a perda de habitat.

A Amazônia é uma das poucas áreas capazes de comportar populações de grandes vertebrados em condições de persistirem por dezenas de gerações (Reed *et al.*, 2003). O cenário ideal para a conservação do gavião-real seria que as florestas da Amazônia fossem mantidas por um longo futuro com suas características ecológicas. No entanto, as modelagens de cenários para a Amazônia nas próximas décadas predizem que o “arco do desmatamento” irá aumentar consideravelmente devido às políticas de desenvolvimento para Amazônia (Laurance *et al.*, 2001) e que grande parte das florestas da Amazônia virará savana devido às mudanças climáticas globais (Salazar *et al.*, 2007). Isso provavelmente ocasionará conseqüências às populações silvestres, incluindo a do gavião-real, tornando-as ainda mais vulneráveis.

2.2.4. Considerações sobre o status de conservação do gavião-real

O objetivo da Biologia da Conservação não é de alocar esforços para colocar uma espécie vulnerável em uma lista de espécies ameaçadas, mas sim promover ações que visem melhorar o status de conservação das espécies ameaçadas. Para o gavião-real as ações para sua conservação têm sido iniciadas por organizações em alguns países. Entretanto, no Brasil não foram os esforços aplicados em estratégias e ações de conservação que promoveram a melhoria do status de conservação do gavião-real e sua retirada das listas de espécies ameaçadas. O gavião-real foi retirado da lista nacional em função dos novos critérios empregados e porque se acredita ter melhor conhecimento atual sobre sua distribuição. Entretanto, os dados apresentados aqui sugerem que o gavião-real é uma espécie vulnerável, mesmo na Amazônia, apesar de não ser considerado como tal pela Lista Nacional ou da IUCN.

Contudo, uma das metas do presente estudo foi detectar se essas ameaças se refletem no nível da variabilidade genética da espécie, veja mais adiante.

2.3. GENÉTICA E CONSERVAÇÃO

A biodiversidade é a variedade de ecossistemas, espécies, populações dentro das espécies, bem como a diversidade genética que existe dentro e entre essas populações. A IUCN reconhece a necessidade de conservar a diversidade genética como uma das prioridades globais de conservação (McNeely *et al.*, 1990). A diversidade biológica do planeta está sendo rapidamente reduzida como consequência direta e indireta das atividades humanas. Embora não conhecido, um grande número de espécies já foi extinto, enquanto outras têm tamanhos populacionais reduzidos. As populações com as quais os conservacionistas estão mais preocupados são pequenas e/ou em declínio de tamanho. Essas populações são mais sujeitas aos fatores estocásticos ambientais, demográficos, catastróficos e genéticos (endogamia e deriva genética) (Gilpin & Soulé, 1986). Esses fatores atuam nas populações pequenas, acentuando ainda mais a redução das populações, tornando-as mais vulneráveis aos

próprios fatores estocásticos e dirigindo as populações à extinção, entrando em um ciclo conhecido com vórtex da extinção (Gilpin & Soulé, 1986).

Em resposta a crise em que as espécies atualmente têm passado, a Biologia da Conservação foi criada, uma disciplina que envolve várias outras disciplinas, dentre elas a Genética da Conservação. Assim como todas as outras disciplinas da Biologia da Conservação, a Genética da Conservação é motivada pela necessidade de reduzir as taxas atuais de extinção e preservar a biodiversidade (Frankhan *et al.*, 2002).

A Genética da Conservação é o uso da teoria da genética para reduzir o risco de extinção das espécies ameaçadas (Frankhan *et al.*, 2002). Seu objetivo em longo prazo é preservar espécies como entidades dinâmicas capazes de se adaptarem às mudanças ambientais (Frankhan *et al.*, 2002). A Genética da Conservação foca nas conseqüências que surgem da redução de uma população, uma vez grande e exogâmicas, para pequenas populações onde os efeitos da endogamia e da diminuição da diversidade genética são críticos para sua sobrevivência. O campo da Genética da Conservação também inclui o uso das análises genéticas moleculares para elucidar aspectos da biologia da espécie relevante para o seu manejo e conservação.

2.3.1. Diversidade genética em pequenas populações ameaçadas

A diversidade genética depende do tamanho da população. Processos evolutivos como mutação, deriva genética, seleção natural e migração determinam a diversidade genética em grandes e pequenas populações. Mas, em pequenas populações a deriva genética e a endogamia têm maior impacto e a seleção natural é menos efetiva (Frankhan *et al.*, 2002, Allendorf & Luikart, 2007).

Em populações pequenas e isoladas o cruzamento entre indivíduos aparentados é inevitável. Com o tempo, todos os indivíduos tornam-se relacionados de tal maneira que os acasalamentos entre indivíduos não relacionados são impossíveis. A endogamia leva a redução da heterozigosidade através da alteração da freqüência genotípica. Uma grande conseqüência da endogamia é que os homozigotos para alelos deletérios tornam-se mais freqüentes do que em uma população com reprodução ao acaso. Em geral, indivíduos com esses genótipos possuem sobrevivência e sucesso reprodutivos

reduzidos (depressão endogâmica) (Frankhan *et al.*, 2002).

A deriva genética é a flutuação da frequência dos alelos de geração para geração. Em populações sexuais, após a reprodução, a geração seguinte é derivada de uma amostra de gametas parentais. Em pequenas populações alguns alelos, especialmente aqueles raros, podem não ser transmitidos devido apenas ao acaso. A frequência dos alelos que são transmitidos para as gerações seguintes provavelmente irá diferir dos parentais. Isso leva a fixação de alelos (incluindo alelos deletérios) e redução da diversidade genética, com conseqüente redução do potencial evolutivo. Populações constantes diminuem sua diversidade genética a taxa de $1/2Ne$ de uma geração para outra, onde Ne é tamanho efetivo populacional (Frankhan *et al.*, 2002; Allendorf & Luikart, 2007). A diversidade genética é necessária para as populações evoluírem e se adaptarem a tais mudanças. A perda de diversidade genética poderia ser pouco preocupante se ela fosse recuperada pela mutação. Entretanto as taxas de mutação são muito baixas e em pequenas populações a grande maioria das mutações gera novos alelos que são perdidos pela deriva genética. Quanto menor a frequência do alelo, maior a chance de ser perdido. Assim, como os alelos novos possuem baixa frequência ao surgir, são rapidamente perdidos. Se o alelo novo for vantajoso pode ser mantido na população por seleção natural em detrimento da deriva genética. Para a seleção natural sobrepor a deriva genética, o coeficiente de seleção (s) do alelo deve ser superior a taxa de perda por deriva ($1/2Ne$). Quando $s < 1/2Ne$, a deriva genética sobrepõe a seleção natural. Então em populações extremamente pequenas, para que um alelo novo seja mantido, seu “ s ” tem que ser muito alto. Entretanto, um valor alto de “ s ” para um alelo é difícil de serem alcançado. O fluxo gênico também é um fator capaz de promover a introdução e a manutenção de variabilidade entre populações. Mas, em geral as populações pequenas, sob ameaça, possuem o fluxo gênico interrompido (isoladas) ou limitado pela ação antrópica e a deriva genética leva a diversificação entre as populações e a perda da diversidade genética.

Muitos autores sugeriram que as espécies se dirigem para extinção antes que fatores genéticos tenham tempo de atingi-las (Lande, 1995; Pimm, 1991; Caro & Laurenson, 1994; Elgar & Clode, 2001). Entretanto, Spielman *et al.* (2004) refutaram

essa hipótese mostrando que mais de 77% de uma série de 170 espécies ameaçadas de vários táxons de animais e plantas apresentam em média 35% menos diversidade genética (heterozigosidade média, com base em marcadores moleculares co-dominantes hiper-variáveis) quando comparada a espécies relacionadas não ameaçadas. Simon & Sheldon (2008) utilizaram dados microssatélites de 194 espécies de aves para examinar a correção da diversidade genética com o status de conservação e tamanho da população. Os autores encontraram uma diminuição significativa da heterozigosidade média com o aumento do risco de extinção. Ainda, sugerem que essa diminuição se deve aos pequenos tamanhos das populações de espécies ameaçadas, visto que encontraram uma correlação positiva significativa entre os valores de heterozigosidade e o tamanho populacional dessas espécies.

A baixa diversidade genética das espécies ameaçadas não é a causa da ameaça de extinção. Entretanto, a redução da diversidade genética pode ser um marcador de ameaça no nível genético, como depressão endogâmica, acúmulo de mutações e diminuição do potencial evolutivo.

2.3.2. Importância dos estudos genéticos

Os estudos genéticos de espécies podem ser úteis na sugestão de políticas de preservação nos seus estágios iniciais (Frankhan *et al.*, 2002). A compreensão das características genéticas de uma espécie é importante para o sucesso de programas de conservação *in situ* e *ex situ*.

Projetos de pesquisa que visam planejar estratégias de conservação e de gerenciamento adequadas para uma espécie posta em perigo, necessitam incorporar a compreensão da sua estrutura, história populacional, existência de divisórias demográficas em toda sua escala geográfica, e a caracterização da distribuição de sua diversidade genética (Awise, 2000). O corrente padrão genético das espécies é definido por fatores históricos e contemporâneos que afetam sua biogeografia e demografia. A relativa contribuição dos fatores históricos e contemporâneos não é facilmente distinguível, mas várias estratégias têm sido propostas (Templeton, 2006). A combinação de uma série de marcadores moleculares e análises de diferentes escalas

temporais, incluindo história demográfica e genética de populações pode ser necessária para descrever não só a estrutura geográfica, mas também para investigar os processos históricos e contemporâneos que a originou (Awise, 2000; Awise, 2004; Templeton, 2006; Allendorf & Luikart, 2007). Compreender tais características permite definir as unidades de manejo para minimizar a perda da diversidade genética preservando ao mesmo tempo a estrutura genética que possa existir na espécie (Haig, 1998; Hedrick, 2001).

O conhecimento da biologia de espécies é de considerável interesse para a conservação (Frankham *et al.*, 2002), mas muito difícil de ser obtido, principalmente para espécies ameaçadas. O padrão de dispersão de muitas espécies, por exemplo, não é bem conhecido. Dados sobre o viés do sexo na magnitude e direção da dispersão são limitados, pois é muito difícil estimar taxas de dispersão seguindo animais individuais para medir o viés do sexo nessas taxas (e.g Slatkin 1985, Baker *et al.* 1995; Koenig *et al.* 1996). Entretanto, a genética molecular pode ser utilizada como ferramenta para métodos indiretos de inferir taxas específicas de dispersão, incluindo o viés do sexo para essa dispersão.

2.3.1. Estudos genéticos realizados para o gavião-real

Como em muitas águias ameaçadas, o gavião-real é muito difícil de estudar, machos e fêmeas não são facilmente distinguíveis visualmente (eles são sexualmente dimórficos somente em tamanho, com fêmeas maiores que os machos, não em plumagem), adultos são muito difíceis de capturar e marcar, e os indivíduos podem se deslocar por longas distâncias. Com auxílio de estudos genéticos, com uso de marcadores moleculares e amostras não invasivas, essas dificuldades podem ser minimizadas (Awise, 2004).

Em sua recente tese de doutorado, de Lerner (2007) testou se existe diferenciação genética entre o gavião-real da América do Central e Sul através de marcadores de DNAm. Os resultados são interessantes, a autora detecta fluxo gênico restrito entre as regiões, unidirecional da América Central para a América Sul e sinais de expansão populacional histórica para a América do Sul. No entanto, a autora usa

somente três amostras do Brasil, o que naturalmente não representa bem a distribuição da espécie no país.

Um outro trabalho genético existente para o gavião-real foi gerado no decorrer desta tese (Banhos *et al.*, 2008; Anexo III); o trabalho apresenta os marcadores moleculares que foram empregados no presente estudo. O trabalho mostra previamente que a diversidade genética do gavião-real, com base em 24 marcadores microssatélites e 17 amostras, é similar a de outras espécies de águias consideradas ameaçadas.

A presente tese forma o terceiro trabalho de genética molecular que pode ser aplicado na conservação do gavião-real, especialmente no Brasil onde a distribuição da espécie é mais ampla.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Determinar e avaliar a distribuição da variabilidade genética do gavião-real no Brasil.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estimar os níveis de diversidade genética do gavião-real;
- Determinar se existem populações do gavião-real geneticamente diferenciadas;
- Descrever como está distribuída a variabilidade genética do gavião-real ao longo de sua distribuição geográfica;
- Avaliar se o corredor de vegetação aberta no centro do Brasil permite o fluxo gênico do gavião-real entre a Amazônia e a Mata Atlântica;
- Inferir sobre passado histórico demográfico do gavião-real;
- Estimar a taxa de migração e o tamanho efetivo do gavião-real;
- Determinar se houve flutuação da diversidade genética do gavião-real ao longo do tempo;
- Determinar se nos cenários de desmatamento o gavião-real possui baixa diversidade genética comparada aos cenários com melhores condições de floresta;
- Determinar se existe dispersão parcial entre machos e fêmeas do gavião-real.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. COLETA DAS AMOSTRAS E FONTE DE DNA

A utilização de amostras não invasivas para acesso ao DNA é extremamente indicada em estudos com espécies de predadores e/ou ameaçadas. Além de não causar dano ou estresse aos animais, esta metodologia exige menor esforço para que as amostras sejam obtidas na natureza se comparada a outros métodos (Taberlet *et al.*, 1999; Pearce *et al.*, 1997; Segelbacher, 2002; Horváth *et al.*, 2005). Também importantes são as amostras de exemplares depositados em Museus, pois, permitem obter informação sobre a variabilidade genética histórica da espécie (Wandeler *et al.*, 2007). Essas amostras são valiosas em se tratando de uma espécie que voa, habita o dossel de floresta e de difícil detecção, como o gavião-real.

Para o presente estudo, amostras de gavião-real foram coletadas de exemplares de museus (coleções zoológicas científicas e educacionais), criadouros (zoológicos e criadouros conservacionistas) e natureza (animais em ninhos, resgatados, reabilitados e caçados). Ao todo foram coletadas 166 amostras, sendo 44 da natureza, 60 de museus e 62 de criadouros (Anexo II). Dos museus as amostras coletadas foram provenientes do umbílico superior da pena, região que contém um coágulo vestigial de um vaso que irriga o folículo durante o desenvolvimento da pena. Isso permitiu amostrar o exemplar sem danificá-lo, o que facilitou o acesso a algumas coleções, principalmente aquelas que possuem os exemplares taxidermizados artisticamente (Figura 3). Nos criadouros, foram coletadas penas caídas dentro dos viveiros, esse material é fácil de adquirir uma vez que a espécie realiza muda de pena o ano inteiro. Da natureza, a maioria das amostras obtidas foram penas, principalmente caídas na base de árvores com ninho ativo da espécie. Essas amostras foram possíveis graças, principalmente, ao Projeto de Gavião-real do INPA que mapeou e monitora mais de 40 ninhos da espécie no Brasil. À medida que as atividades da equipe do Projeto em campo para monitoramento da espécie foram transcorrendo, as penas foram sendo coletadas. Com isso o Projeto possui um acervo de oito anos de amostras coletadas que foram cedidas para serem

utilizadas nesse estudo. Outras organizações também cederam penas encontradas na natureza a esse estudo (Anexo II). Para evitar repetição do mesmo indivíduo na amostragem de ninhos foi utilizada apenas uma pena por ninho como fonte de DNA. Em alguns casos, foram utilizados como amostra o sangue coletado diretamente da ave precedente de resgate e levado para procedimentos clínicos veterinários ou reabilitação. Somente nesses casos as amostras utilizadas foram invasivas, mesmo assim, foram sub-amostras de coletas realizadas com outras finalidades clínicas e de pesquisa. Outras fontes de amostras consideradas da natureza foram os tecidos de partes de animais mortos ou caçados. Em geral, esses materiais foram encontrados por pessoas e organizações, destinados ao Projeto Gavião-real e posteriormente acessados neste estudo. As partes do animal morto são distinguíveis de outros táxons relacionados, em geral grandes penas, asas e garras. Muitas vezes o exemplar inteiro morto foi acessado para coletar a amostra.



Figura 3. Coleta de amostra de um exemplar taxidermizado artisticamente. Autor da foto: João Marcos Rosa

As amostras foram acondicionadas em microtubos de 0,5 a 2mL secos no caso de amostras de museus e com álcool 70% no caso de sangue e tecido da natureza. As penas foram acondicionadas em sacos plásticos ou envelopes de papel. Todas as amostras foram devidamente identificadas, etiquetadas, catalogadas e depositadas na Coleção de Tecidos de Genética Animal – CGTA/UFAM.

4.2. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DAS AMOSTRAS

A informação da origem geográfica da fonte das amostras é um requisito básico para estudo de genética populacional, justamente para testar as hipóteses e modelos levantados. Essa informação foi o dado mais difícil de ser obtido para este estudo. Muitas amostras exigiram investigação junto às organizações cedentes e pessoas que tiveram contato antigo com a fonte da amostra. Em muitos casos não foi possível chegar à conclusão alguma. As amostras com informações mais problemáticas são as amostras de criadouro. Em geral, os animais depositados nessas organizações são destinados após resgate, apreensão ou recebimento pelas Instituições de fiscalização ambiental Estadual e/ou Federal. Pouca informação é confiável nessas condições. Na maioria das vezes as fichas dos animais estavam sem essa informação, pouco acessíveis ou inexistentes. Exemplares depositados em museus também são passivos de dúvidas sobre as informações de origem. Entretanto, todos os exemplares com informação sobre sua origem tiveram a informação geográfica considerada e avaliada no conjunto de amostras. Os exemplares sem informação geográfica foram utilizados em algumas análises, considerando que todos são do Brasil e possuem origem na natureza antes de serem destinados aos criadouros e museus.

Das 166 amostras, cento e doze amostras obtidas possuem informação sobre localidade, 23 possuem informação sobre Estado, uma sobre a região geográfica (Figura 4) e 30 não possuem informação geográfica especificada (Anexo II).

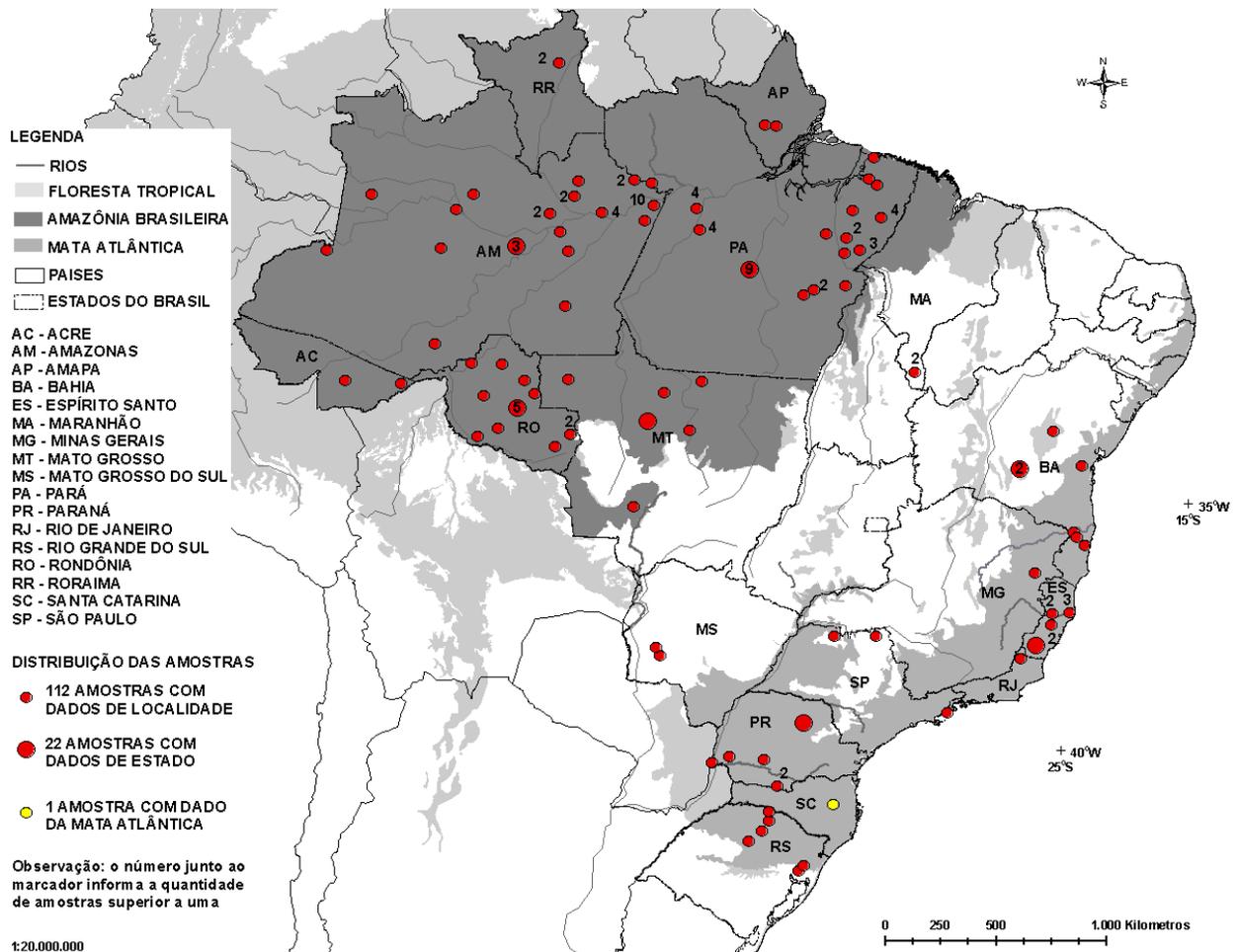


Figura 4. Distribuição geográfica das amostras de gavião-real.

4.3. EXTRAÇÃO DE DNA

As amostras não invasivas e de museus são promissoras, mas exigem cuidados na manipulação e extração de DNA, pois, naturalmente estão expostas a constantes condições de contaminação (Wandeler *et al.*, 2007).

Em laboratório, as penas de indivíduos de gavião-real coletadas na natureza e em criadouros (Figura 5, A) tiveram recortadas a ponta basal do calamus (umbílico inferior) (Figura 5, B 1), região que fica em contato com a pele do animal; ou o coágulo de sangue do umbílico superior (Figura 5, B 2), vestígio de um vaso que irriga de sangue a pena quando a mesma está se desenvolvendo. Esta foi preferida (Figura 5,

C), pois apresenta melhor desempenho nas quantidades e qualidade do DNA (Horváth *et al.*, 2005). Dessas amostras e das amostras de museus foram realizadas as extrações de DNA. Para isso, as amostras foram submetidas à digestão pela solução de Proteinase K, seguindo o protocolo do Kit de extração de DNA da Qiagen®, adicionando-se 30µl de dithiothreitol (DTT) (concentração de 100mg/ml) para degradar a queratina da pena. O DNA concentrado, assim extraído, foi diluído em 50µl de solução tampão do Kit de extração. O protocolo da Qiagen® foi utilizado porque se mostrou mais eficiente para extração de DNA neste estudo do que outros protocolos previamente testados. Para extração de amostras de sangue tecido o mesmo protocolo foi utilizado, nesses casos o DTT não foi empregado e a diluição do DNA concentrado foi em 100µl a 150µl de solução tampão.

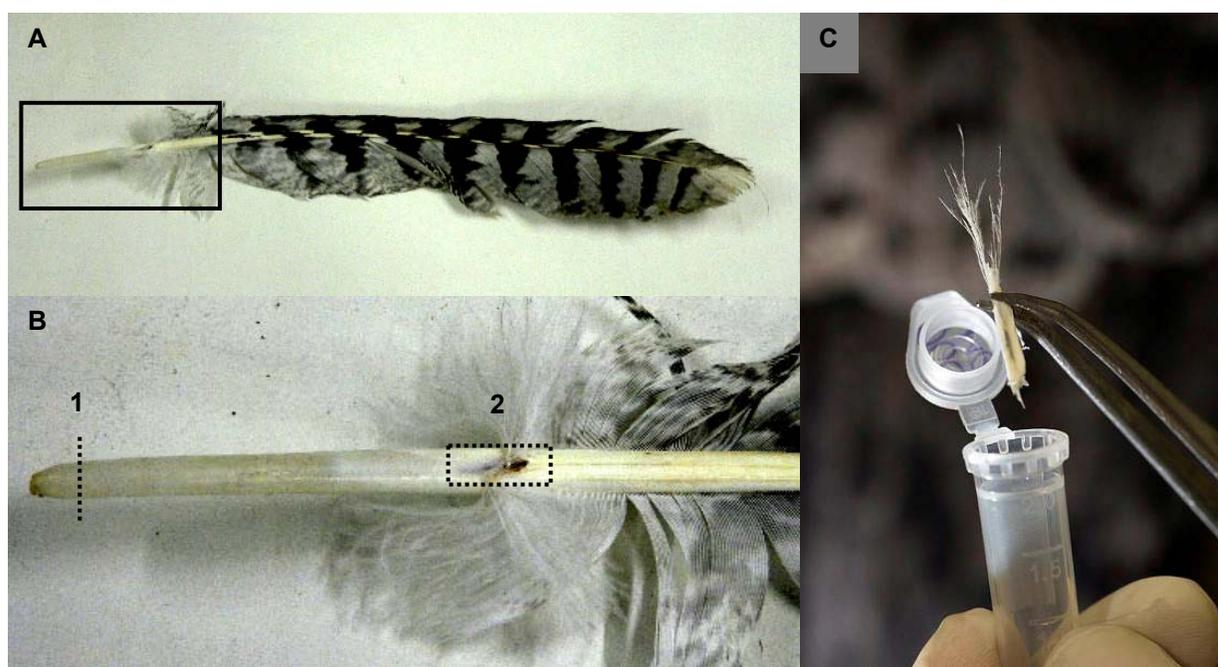


Figura 5. (A) Vista geral de uma pena típica de vôo. (B) Detalhe de uma vista posterior da base da pena: Duas áreas diferentes de amostragem para obtenção de DNA de penas são mostradas: (1) ponta basal do calamus (umbílico inferior) e (2) ponto de coágulo de sangue do umbílico superior. (C) Material retirado para a extração de DNA do umbílico superior.

Os produtos das extrações de DNA foram checados em gel de agarose 1% em corrida de eletroforese. A maioria das extrações não apresentou banda de DNA em gel para que o sucesso das extrações fosse avaliado e o DNA extraído pudesse ser quantificado através da comparação com DNA de concentração conhecida, exceto nos casos de amostras de sangue e tecido. Isso se deve ao fato das extrações de DNA de amostras de museus e não invasivas gerarem produtos com baixa quantidade e concentração de DNA. O método de quantificação de DNA por espectrofotômetro não foi utilizado porque o processo gasta muita quantidade do DNA. Nesses casos, o sucesso da extração foi verificado através da amplificação com os próprios marcadores moleculares conforme descrito abaixo. Como os marcadores moleculares que foram utilizados podem ser amplificados com baixa concentração de DNA (veja abaixo), a quantidade de DNA extraído não foi um grande problema para o desenvolvimento deste projeto. Porém, muitas tentativas de extração de DNA não funcionaram e re-extrações de réplicas foram necessárias. Regularmente, controles positivos e negativos foram envolvidos no processo de extração para monitorar possível contaminação e o sucesso da extração. Algumas vezes os controles negativos foram testados se amplificavam com os marcadores moleculares, considerando que a amplificação é sinal de contaminação. Os poucos problemas detectados foram contornados com novas extrações.

4.4. COLETA DE DADOS GENÉTICOS

4.4.1. Identificação do sexo

Um importante marcador molecular para a Genética da Conservação é o de identificação do sexo, principalmente para espécie que não possui um dimorfismo sexual muito evidente no estágio juvenil ou adulto, como é o caso do gavião-real, mesmo as fêmeas sendo aproximadamente 1/3 maior que os machos em tamanho. Em ninhos e viveiros de casais de gavião-real, as penas se encontram misturadas e não há possibilidade de determinação visual de qual indivíduo do casal cada amostra pertence. Assim, a identificação do sexo para as amostras coletadas nesses locais foi muito

importante. No caso de penas de casal de cativeiro, com as amostras identificadas pelo sexo, ambos os indivíduos do casal e suas respectivas procedências puderam ser utilizados nas análises. A identificação do sexo também foi importante para verificar a razão macho e fêmea na amostragem e para os testes de dispersão baseada no sexo (veja adiante).

Nas aves, as fêmeas apresentam sexo heterogamético (*WZ*) e os machos homogamético (*ZZ*). Os métodos moleculares de determinação de sexo são baseados na amplificação de cópias parálogas do gene codificador da proteína Chromo-helicase-DNA (*CHD1*) presentes nos cromossomos sexuais de muitos vertebrados, inclusive de aves. Para isso, utilizam-se pares de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) que se alinham à região do gene nos cromossomos gerando diferentes tamanhos de fragmento de DNA para *W* e *Z* em uma Reação da Polimerase em Cadeia (*PCR*). Entretanto, os marcadores moleculares originais desenvolvidos para aves (Griffiths *et al.*, 1998) têm aplicação limitada em Falconiformes devido ao fato da diferenciação dos fragmentos amplificados de *CHD1W* e *CHD1Z* não ser facilmente distinguível, ambos os fragmentos são grandes e similares em tamanho. Recentemente, Ito *et al.* (2003) apresentaram uma solução que parece ser aplicável a todos Falconiformes e aumenta a diferença dos tamanhos de *CHD1W* e *CHD1Z*. Essa solução foi testada previamente para o gavião-real no desenvolvimento deste estudo, os resultados foram publicados em Banhos *et al.* (2008) (Anexo III). A solução de Ito *et al.* (2003) funciona, porém, o tamanho do fragmento amplificado por PCR apresentou dificuldades para ser aplicada à amostra não invasivas e de museus, pois essas possuem naturalmente DNA muito degradado e fragmentado. Para minimizar esse problema foram desenhados novos primers que substituem dois dos três propostos por Ito *et al.* (2003) (Tabela 2; Anexo III). Esses novos *primers* diminuem o tamanho dos fragmentos amplificados em quase 100 pares de base (pb).

A identificação do sexo foi realizada para a maioria das amostras seguindo o seguinte protocolo: para cada PCR por amostra foi utilizado apenas 1 µL da solução de DNA em um total de 25 µL de volume final de reação, com 11,8 µL de água *milli Q*, 2,5 µL de MgCl₂ (25 mM), 2,0 µL de dNTP (10 mM), 2,5 µL de *Buffer* 10X (Tris-KCL

200mM pH 8.5) , 2,5 µL de *primer* NP (2 µM), 1,3 µL *primer* MP (2 µM), 1,3 µL de *primer* P2 (2 µM), 0,2 µL de *Taq* DNA polimerase (5U/ µL). O termociclador foi programado para uma desnaturação inicial de 68°C por 1 minuto; seguido de 35 ciclos (para desnaturação, 93°C por 10 segundos; para pareamento dos *primers*, 52°C por 35 segundos; e para extensão, 68°C por 30 segundos); e uma extensão final de 68 °C por 7 minutos. A verificação do produto das PCRs e do sexo foi realizada em corrida de eletroforese em gel de agarose 3% por 90 minutos a 100 V (Figura 6). Muitas amostras tiveram PCR's e/ou o seu produto repetido até 4 vezes para se conseguir um resultado conclusivo. Os resultados foram adicionados a Tabela de Amostras (Anexo I).

Tabela 2. Conjunto de *primers* utilizados para a indentificação de sexo.

Primer	Seqüência (5' – 3')	Autor
<i>CHD1Wr</i> 5'	GCTGATCTGGTTTCAGATTAA	Banhos <i>et al.</i> (2008)
<i>CHD1Zr</i> 5'	AGTCACTATCAGATCCAGAG	Banhos <i>et al.</i> (2008)
<i>NP/CHD1f</i>	GAGAAACTGTGCAAAACAG	Ito <i>et al.</i> (2003)

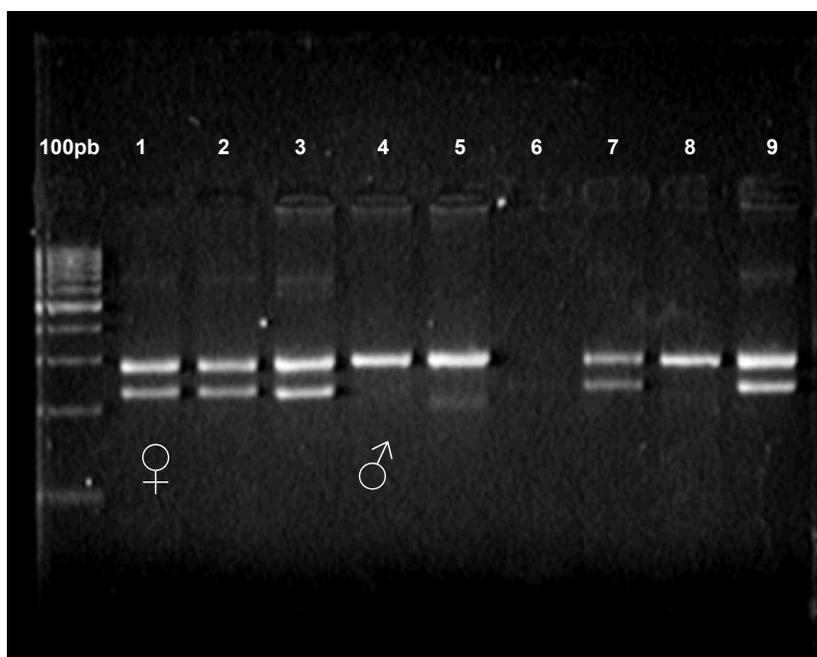


Figura 6. Visualização em gel de agarose de um teste de identificação do sexo. Ao todo, nove amostras foram utilizadas: cinco amostras são de fêmeas (♀; duas bandas) (1, 2, 3, 7 e o controle positivo, 9), duas amostras são de machos (♂; uma banda) (4 e 8), uma não pode ser determinada (5) e uma não amplificou (6).

4.4.2. Seqüenciamento do DNA mitocondrial

DNA mitocondrial (DNAMt) tem sido amplamente utilizado como uma ferramenta valiosa para avaliar a variabilidade genética, estrutura genética, padrão filogeográfico e filogenia em diferentes grupos de vertebrados, incluindo aves (e.g. Avise 2000; Wink 2000). O DNA mitocondrial (DNAMt) é um marcador de herança predominantemente materna e raramente sofre recombinação, por se tratar de um DNA haplóide (Avise, 2004). Assim, todas as mutações que ocorrem nas mitocôndrias das células germinativas (óvulo) da fêmea são herdadas por seus descendentes. O DNAMt é relativamente abundante, uma vez que existem muitas mitocôndrias por célula, e é de fácil amplificação. O seqüenciamento do DNAMt tem inúmeras vantagens sobre outras técnicas, como o fato de poder ser utilizado para amostras não invasivas, apresentar uma alta taxa de mutação e ser altamente variável, e poder rastrear linhagens femininas dos descendentes ou dos padrões de migração (Frankham *et al.*, 2002). O DNAMt possui um segmento chamado de região controle que é referido como a parte mais variável do DNAMt, com taxa evolutiva de três a cinco vezes mais rápida que do que o restante do DNAMt (Baker & Marshall 1997). Como uma região não codificante, a região controle não é limitada pela expressão gênica, embora contenha várias blocos de seqüências curtas conservadas, necessários para a replicação e transcrição de DNAMt (L'Abbé *et al.* 1991; Clayton 1992). Sua base organizacional engloba dois domínios altamente polimórficos (I e III) e um mais conservado (domínio II) (Baker & Marshall 1997).

A região controle, especialmente o domínio I, é bastante utilizado em estudos filogeográficos e populacionais de Falconiformes (e.g. Godoy *et al.*, 2004; Martínez-Cruz *et al.*, 2004; Roques & Negro, 2005; Martínez-Cruz *et al.*, 2007; Brown *et al.*, 2007). Esses estudos têm amplificado fragmento de aproximadamente 200pb a 600pb dessa região, sendo que os menores tamanhos foram amplificados quando envolveram amostras de museu.

Considerando sua vantagem e seu tradicional emprego em Falconiformes, a região controle do DNAMt também foi utilizada nesse estudo. Alguns *primers* foram desenhados previamente no decorrer deste estudo para amplificar fragmentos de 400 a

500pb da região controle do DNAm_t do gavião-real, mas devido ao insucesso na aplicação em amostras de museus, uma pequena porção de 200pb hipervariável do domínio I da região controle do DNAm_t foi selecionada para estudo e *primers* foram desenhados para a amplificação por PCR (*DLf1* 5'-CGGGCATACTACTTGGGC-3'; *DLr1* 5'-CCTGACAGAGGAACCAGGA-3'). Para cada PCR por amostra foi utilizado apenas 1 µL da solução de DNA em um volume final de reação de 25 µL, onde foram utilizados 11,8 µL de água *milli Q*, 2,5 µL de MgCl₂ (25 mM), 2,0 µL de dNTP (10 mM), 2,5 µL de solução tampão 10X (Tris-KCL 200mM pH 8.5), 2,5 µL de *primer* (2 µM), 1,3 µL *primer* (2 µM), 0,2 µL de *Taq* DNA polimerase (5U/µL). O termociclador foi programado para uma desnaturação inicial de 94°C por 2 minutos; seguido de 35 ciclos (para desnaturação, 93°C por 30 segundos; para pareamento do *primers*, 52°C por 35 segundos; e para extensão, 72°C por 30 segundos); e uma extensão final de 72 °C por 7 minutos. A verificação do produto das PCRs foi realizada em corrida de eletroforese em gel de agarose 0,8% por 15 minutos a 80 V. Aqueles que apresentaram banda correspondente ao tamanho da porção alvo do seqüenciamento foram purificados utilizando o kit de purificação de PCR GFX da GE-Healthcare, seguindo instrução do fabricante. As reações de seqüenciamento foram realizadas usando-se o *Big Dye Kit* da Applied Biosystems, de acordo com as orientações dos fabricantes, e analisadas no seqüenciador automático ABI 3130xl. O seqüenciamento foi realizado utilizando apenas para uma das fitas do DNA, utilizando o *primer forward* (*DLr1*). As seqüências foram editadas no programa Bioedit (Hall, 1999) e alinhadas no programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994).

As amplificações foram acompanhadas de controle positivo e negativo para o monitoramento do sucesso das amplificações e possíveis contaminações. A maioria das amostras, em especial as de museus, foi amplificada e/ou seqüenciada pelo menos duas vezes para se confirmar às seqüências geradas. As seqüências foram comparadas com outras seqüências do banco de dados GenBank, todas sendo correspondentes ou similares as seqüências de gavião-real depositadas no GenBank por outros estudos.

Dezenove seqüências de DNAm_t de gavião-real depositadas por Lindsay *et al.* no banco de dados GenBank (identificação de AF487685 a AF487703) foram adicionadas a algumas análises. Uma das seqüências é de um indivíduo do México, uma do Panamá, duas da Guiana, duas da Colômbia, três da Venezuela, três do Peru, cinco do Equador e duas não possui informação de origem geográfica.

4.4.3. Genotipagens

Dentre os diversos tipos de marcadores moleculares disponíveis hoje, os microssatélites nucleares têm muitos atributos positivos incluindo hiper-variabilidade, abundância e facilidade de serem amplificados para amostras com baixa qualidade e quantidade de DNA (Awise, 2004), tal como de amostras de DNA extraídas de penas (Segelbacher, 2002; Horváth *et al.*, 2005). Loci microssatélites são repetições em tandem de pequenos motivos de DNA, que tipicamente apresentam 1 a 6pb encontrados com alta freqüência no genoma nuclear de muitos táxons. Microssatélites são marcadores co-dominantes com alta taxa de evolução (entre 10^{-2} a 10^{-6} por locos geração, com médias de 5×10^{-4}) que gera alto grau de diversidade alélica que pode ser utilizados para responder questões na escala de tempo ecológico (Schlotterer, 2000; Kimberly & Toonen, 2006). Os microssatélites são muito utilizados para responder questões relacionadas ao tamanho efetivo populacional, estrutura populacional, dispersão e taxas de colonização, sistema reprodutivo e conservação (e.g. Nesje *et al.*, 2000b; Martínez-Cruz *et al.*, 2004; Rudnick *et al.*, 2005). Sua principal desvantagem é a necessidade de caracterizar locos espécie-específicos. O caro e laborioso procedimento de isolamento e de caracterização limitam o número de espécies estudadas com esse tipo de marcador. Embora mutações nas regiões flangeadoras possam impedir a amplificação, muitos estudos mostram que microssatélites isolados para uma espécie podem amplificar produtos homólogos em espécies relacionadas (e.g. Martínez-Cruz *et al.*, 2002; Busch *et al.*, 2005). Esse atributo dos microssatélites é conhecido como transferibilidade ou amplificação entre espécies. A transferibilidade de microssatélites entre espécie de aves é muito vantajosa, pois, a freqüência dos microssatélites no genoma das aves é baixa. Essa

baixa frequência se deve ao pequeno tamanho desse genoma, um dos menores entre os táxons de vertebrados (Primmer *et al.*, 1997). Assim, o procedimento para a transferibilidade em aves é menos laborioso ainda e com custo muito menor se comparado com o procedimento de isolamento de microssatélites diretamente da espécie de estudo. Existem mais de 100 marcadores microssatélites isolados e caracterizados para outras aves Falconiformes. Desses, 45 microssatélites foram escolhidos dos trabalhos de Nesje & Røed (2000a), Martínez-Cruz *et al.* (2002), Busch *et al.* (2005), Johnson *et al.* (2005), Hailer *et al.* (2005) e Mira *et al.* (2005) para serem testados em gavião-real. Os resultados estão apresentados em Banhos *et al.* (2008) (Anexo III). Ao todo 40 locos amplificaram para o gavião-real, 30 foram caracterizados e 24 foram polimórficos.

Devido às limitações quanto a quantidade de DNA disponível somente nove locos polimórficos em equilíbrio de Hardy-Weinberg foram utilizados neste estudo. Os locos foram os seguintes: NVHfr206 (Nesje and Røed, 2000a), Aa43 (Martínez-Cruz *et al.*, 2002), IEAAAG15 (Busch *et al.*, 2005), HAL09 e HAL10 (Hailer *et al.*, 2005), BBU51 (Johnson *et al.*, 2005), HF-C1E8, HF-C1D2 e HF-C7G4 (Mira *et al.*, 2005).

Foram utilizados *primers* marcados. Os *primers* dos marcadores foram encomendados com a adição de uma seqüência de oligonucleotídeo de 18pb na extremidade 5', chamada de cauda M13. A adição desta cauda permitiu o pareamento de uma seqüência marcada com fluorescência (*primer* M13 – FAM-6) através do método econômico de genotipagem desenvolvido por Schuelke (2000). Para um produto final da PCR de 10 µL foi utilizado 4,3 µL de água milli Q, 0,7 µL de MgCl₂ (25 mM), 0,8 µL de dNTP (10 mM), 1,0 µL de solução tampão 10X (Tris-KCl 200mM pH 8.5), 0,5 µL de *primer forward*-M13 (2 µM), 0,5 µL *primer* M13 – FAM-6 (2 µM) (fluorescência; veja Schuelke, 2000), 1,0 µL de *primer reverse* (2 µM), 0,2 µL de *Taq* DNA polimerase (5U/ µL) e 1,0 µL de DNA. O termociclador foi programado para uma desnaturação inicial de 94°C por 1 minuto; 30 ciclos (para desnaturação, 94°C por 30 segundos; pareamento dos *primers*, 52-56°C por 30 segundos; e extensão, 72°C por 30 segundos) para amplificação dos *locos* de microssatélites pelos *primers* específicos; e 20 ciclos (para desnaturação, 94 °C por 30 segundos; pareamento dos *primers*, 53 °C

por 30 segundos; e extensão, 72°C por 30 segundos) para a fixação da fluorescência do *primer* M13-FAM; e uma extensão final de 68°C por 30 minutos para minimizar *stutter* devido a incorporação de adenina (Brownstein *et al.*, 1996). Os produtos das PCRs foram diluídos 10 X em sua concentração. Em 3µl de cada produto diluído foi adicionado 7µl de uma mistura de formamida e ET-400 Rox (marcador de tamanho) para análise no seqüenciador automático de DNA MegaBACE 1000 (GE-Healthcare) seguindo o protocolo do fabricante. Para a visualização das genotipagens foram utilizados os programas Fragment Profiler v1.2 (GE-Healthcare).

Como erros na genotipagem de amostras não invasivas e de museus são comuns (Segelbacher, 2002; Sefc *et al.*, 2003), aproximadamente 25% do número total de amostras foram selecionadas e repetidas de duas a cinco vezes a amplificação e/ou re-análise no seqüenciador. Dentre essas repetições, todas as amostras de museu com informação geográfica foram re-amplificadas pelo menos duas vezes. Aproximadamente, 38% das amostras repetidas apresentaram algum problema para a confirmação do genótipo. Esses problemas puderam ser contornados considerando os resultados que apareceram mais vezes nas repetições e com melhor qualidade para a visualização. Do total de amostras, 4% dos genótipos foram desconsiderados porque seus resultados foram inconclusivos, os mesmos não foram calculados na porcentagem de repetições.

4.5. ANÁLISES DOS DADOS

Estimativas adequadas de diversidade genética e de sinais de redução do tamanho efetivo populacional requerem que as populações estejam corretamente definidas. A definição das populações a serem testadas é um processo difícil em genética de populações. Assim, algumas formas de comparações de dados genéticos das amostras foram consideradas.

Algumas análises permitiram avaliar a distribuição da variabilidade genética sem definição de grupos previamente definidos (veja mais adiante). Essas análises permitiram também a utilização de amostras sem informação geográfica. Entretanto,

mesmo nessas análises, foi dada maior importância às amostras com localidade geográfica conhecida.

4.5.1. Definição dos grupos para análises

O número amostral e sua distribuição nos grupos são apresentados de acordo com todas amostras disponíveis. Entretanto, os valores e a distribuição variaram dependendo do marcador utilizado, pois para algumas amostras não foi possível obter dados para um ou outro marcador empregado nas análises.

Espacial

As amostras foram separadas em grupos considerando a informação geográfica dos dois grandes grupos regionais, regiões da Amazônia Brasileira (99 amostras) e Mata Atlântica (36 amostras) (Figura 7). Dentro das regiões, as mesmas foram divididas em cinco sub-regiões: Amazônia Central (AC; 36 amostras), Amazônia Sudoeste (AS; 25 amostras), Amazônia Leste (AL; 38 amostras), Mata Atlântica Norte (MN; 17 amostras) e Mata Atlântica Sul (MS; 19 amostras) (Figura 7). A amostragem total da Mata Atlântica também foi tomada como um grupo para comparação com a Amazônia. As subdivisões foram assim tomadas por cinco motivos: 1) para minimizar o efeito da diferença no tamanho amostral entre a Amazônia e a Mata Atlântica; 2) verificar onde pode haver conexões entre a Amazônia e a Mata Atlântica para o fluxo gênico do gavião-real, por isso, dois grupos na Amazônia (AL e AS) foram separados considerando diferentes possibilidades de conexão com a Mata Atlântica; 3) verificar o direcionamento do fluxo gênico entre as regiões e sub-regiões; 4) avaliar como está distribuída a variabilidade genética dentro das regiões; e 5) testar a hipótese de que existem duas populações diferenciadas geneticamente no sul e norte da Mata Atlântica. Entretanto, as sub-divisões da Amazônia não correspondem a uma hipótese a priori de populações diferenciadas dentro desse bioma.

As amostras da região de vegetação aberta fora do domínio da Amazônia ou Mata Atlântica foram consideradas como pertencentes ao grupo (sub-região ou região) mais próximo, pois, o número de amostras nessa região é pequeno para separá-lo em

único grupo e alguns mapas apresentam sua localidade dentro de um dos biomas (e.g. SOS Mata Atlântica & INPE, 2008). Todas as 30 amostras sem informação geográfica foram abreviadas como (RD).

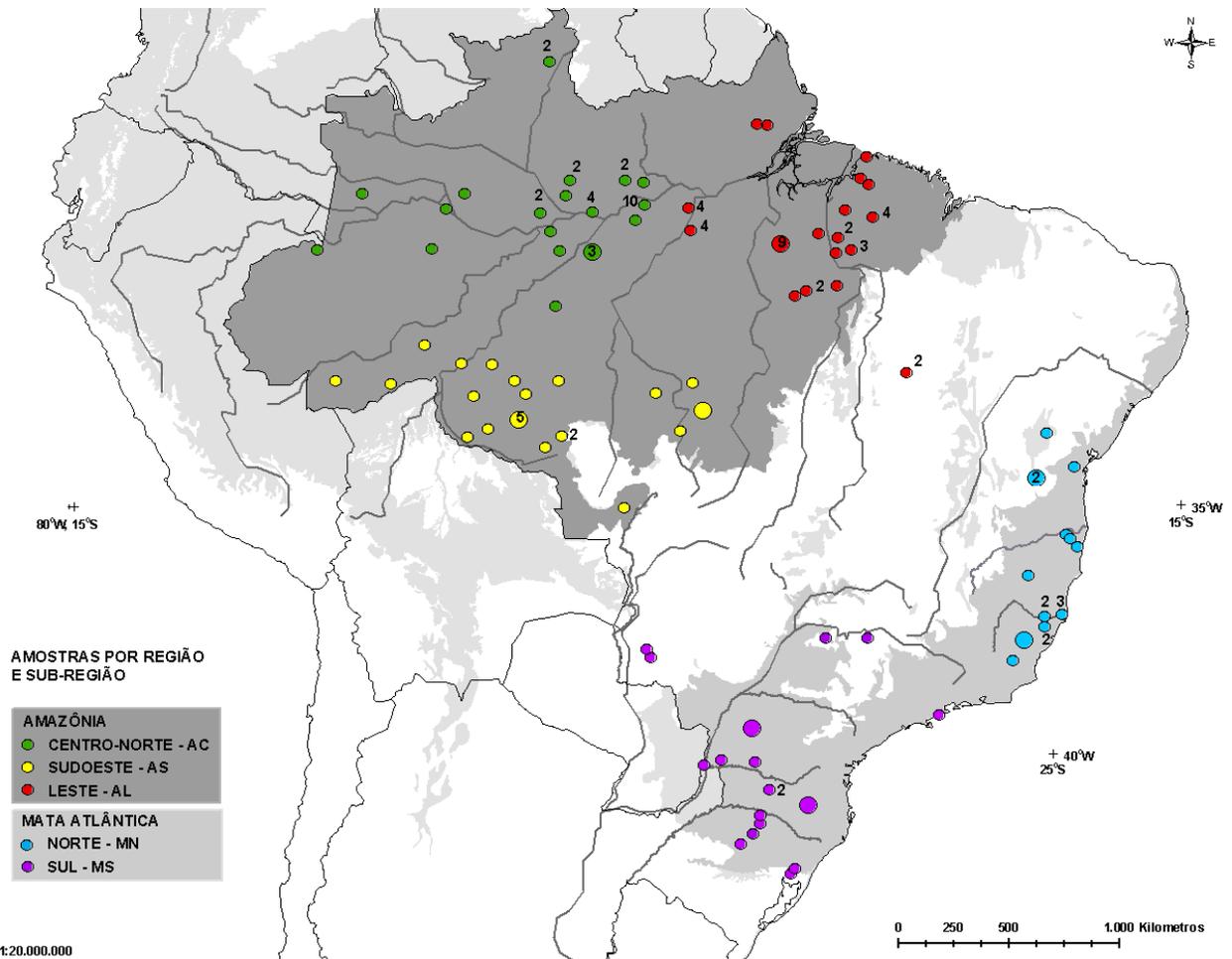


Figura 7. Localização geográfica das amostras que foram separadas formando os grupos para as análises. Os sub-grupos foram formados para minimizar o efeito dos tamanhos amostrais desiguais entre a Amazônia e Mata Atlântica e para verificar onde existem maiores conexões para o fluxo gênico do gavião-real entre as duas regiões. Os sub-grupos não foram formados para teste de hipótese de populações diferenciadas dentro da Amazônia. Os sub-grupos da Mata Atlântica foram formados para teste de diferenciação populacional dentro da região. A amostragem total da Mata Atlântica também foi tomado como grupo para comparação com os sub-grupos (sub-regiões) da Amazônia

Medidas de distâncias geográficas foram tomadas entre as sub-regiões para o teste de correlação com as distâncias genéticas, e dessa forma inferir onde existem maiores conexões entre a Amazônia e a Mata Atlântica para o fluxo gênico do gavião-real. Sete diferentes modelos foram desenhados para obter as distâncias geográficas. Os modelos de 2 a 7 é igual ao modelo 1 para as medidas de distância de sub-regiões dentro das regiões, mas apresentam diferenças entre eles para medidas de distâncias entre sub-regiões entre regiões. Modelo 1: as distâncias par a par entre todas as sub-regiões foram os menores comprimentos de distâncias medidos entre os centros da distribuição de suas amostras (Figura 8; o modelo sugere: que quanto maior à distância, menor o fluxo gênico entre as sub-regiões; e que o fluxo gênico entre Amazônia e Mata Atlântica ocorre uniformemente pelo corredor de vegetação aberta). Modelo 2: as medidas de distâncias entre as sub-regiões entre as regiões passam pelo centro da Amazônia Sudoeste (Figura 9; o modelo sugere: que o fluxo gênico está correlacionado com a distância; e que a conexão para o fluxo gênico entre a Amazônia e Mata Atlântica ocorre principalmente pelo centro-oeste do corredor de vegetação aberta entre as regiões). Modelo 3: as medidas de distâncias entre as sub-regiões entre regiões passam pelo centro da Amazônia Leste (Figura 10; o modelo sugere: que o fluxo gênico está correlacionado com a distância; e que a conexão para o fluxo gênico entre a Amazônia e Mata Atlântica ocorre principalmente pelo centro-leste do corredor de vegetação aberta entre as regiões). Modelo 4: as medidas de distâncias entre as sub-regiões entre regiões passam pelos centros da Amazônia Sudoeste e da Mata Atlântica Norte (Figura 11; o modelo sugere: que o fluxo gênico está correlacionado com a distância; e que a conexão para o fluxo gênico entre a Amazônia e Mata Atlântica ocorre principalmente no sentido sudeste-noroeste (em vice-versa) pelo corredor de vegetação aberta entre as regiões). Modelo 5: as medidas distâncias entre as sub-regiões entre regiões passam pelos centros da Amazônia Sudoeste e da Mata Atlântica Sul (Figura 12; o modelo sugere: que o fluxo gênico está correlacionado com a distância; e que a conexão para o fluxo gênico entre a Amazônia e Mata Atlântica ocorre principalmente pelo oeste do corredor de vegetação aberta entre as regiões). Modelo 6: as distâncias medidas entre as sub-regiões entre regiões passam pelos

centros da Amazônia Leste e da Mata Atlântica Norte (Figura 13; o modelo sugere: que o fluxo gênico está correlacionado com a distância; e que a conexão para o fluxo gênico entre a Amazônia e Mata Atlântica ocorre principalmente pelo leste do corredor de vegetação aberta entre as regiões). Modelo 7: as medidas de distâncias entre as sub-regiões entre regiões passam pelos centros da Amazônia Leste e da Mata Atlântica Sul (Figura 14; o modelo sugere: que o fluxo gênico está correlacionado com a distância; e que a conexão para o fluxo gênico entre a Amazônia e Mata Atlântica ocorre principalmente no sentido nordeste-sudoeste (vice-versa) do corredor de vegetação aberta entre as regiões). Existem outras possibilidades de arranjos para desenhar os modelos, mas os sete modelos definidos foram tidos como suficientes para verificar onde pode haver conexões para o fluxo gênico do gavião-real entre a Amazônia e a Mata Atlântica.

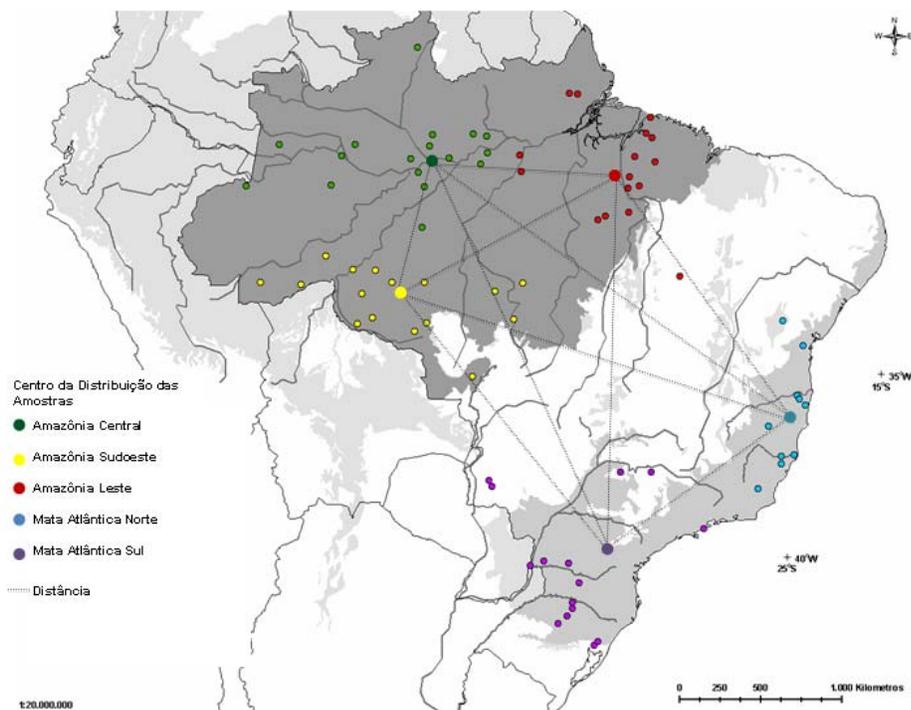


Figura 8. Modelo 1: sugere que quanto maior à distância, menor o fluxo gênico entre as sub-regiões; e que o fluxo gênico entre Amazônia e Mata Atlântica ocorre uniformemente pelo corredor de vegetação aberta.

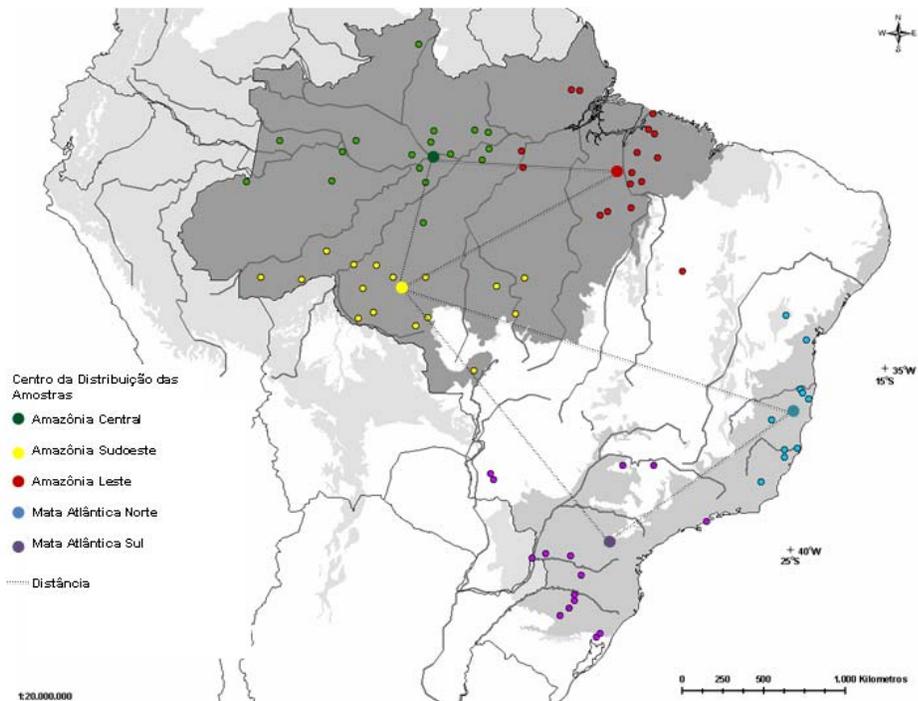


Figura 9. Modelo 2: sugere que o fluxo gênico está correlacionado com a distância; e que a conexão para o fluxo gênico entre a Amazônia e Mata Atlântica ocorre principalmente pelo centro-oeste do corredor de vegetação aberta entre as regiões.

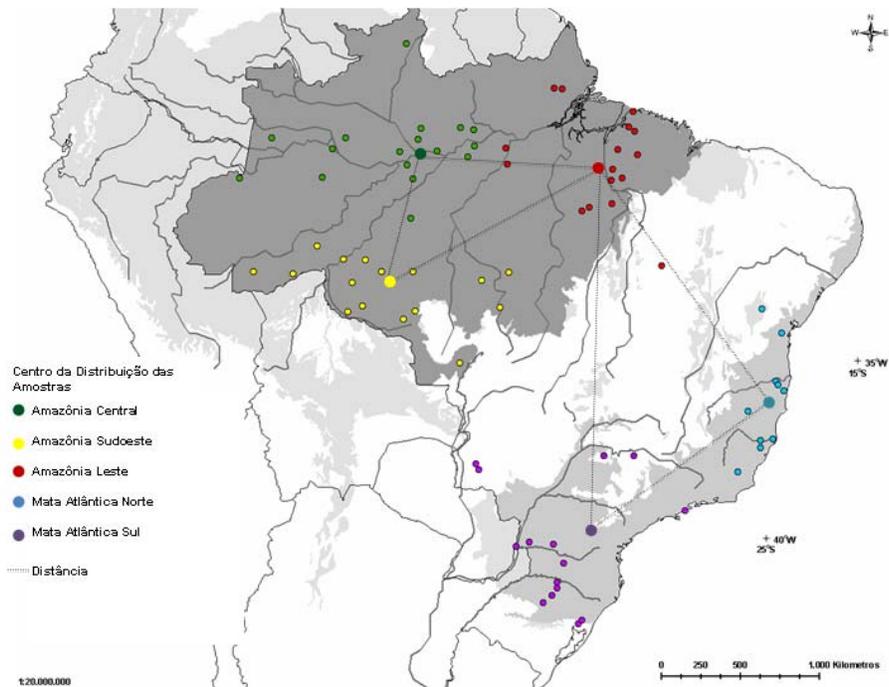


Figura 10. Modelo 3: sugere que o fluxo gênico está correlacionado com a distância; e que a conexão para o fluxo gênico entre a Amazônia e Mata Atlântica ocorre principalmente pelo centro-leste do corredor de vegetação aberta entre as regiões.

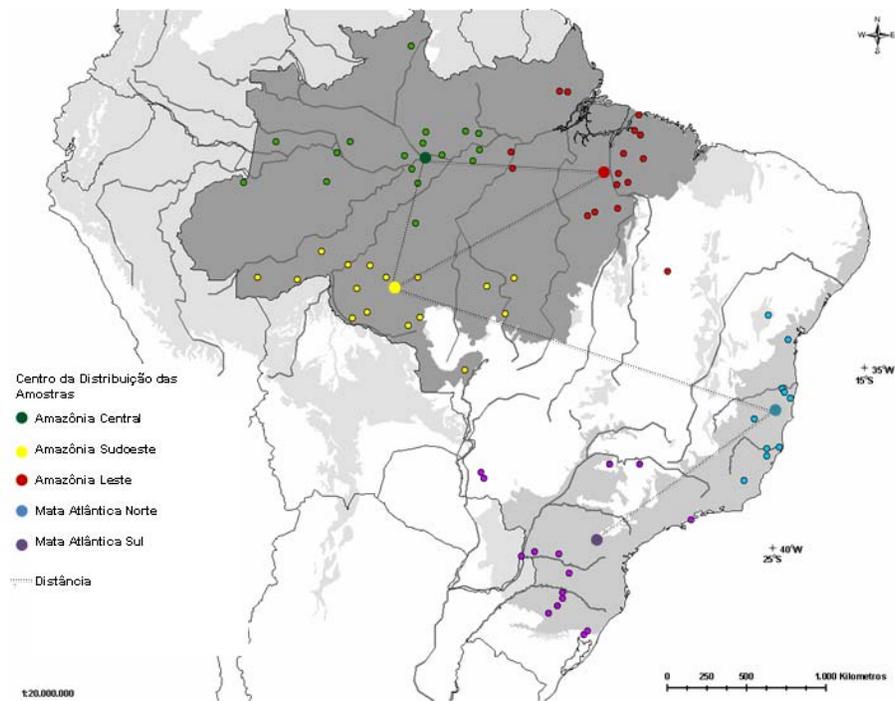


Figura 11. Modelo 4: sugere que o fluxo gênico está correlacionado com a distância; e que a conexão para o fluxo gênico entre a Amazônia e Mata Atlântica ocorre principalmente no sentido sudeste-noroeste (em vice-versa) pelo corredor de vegetação aberta entre as regiões.

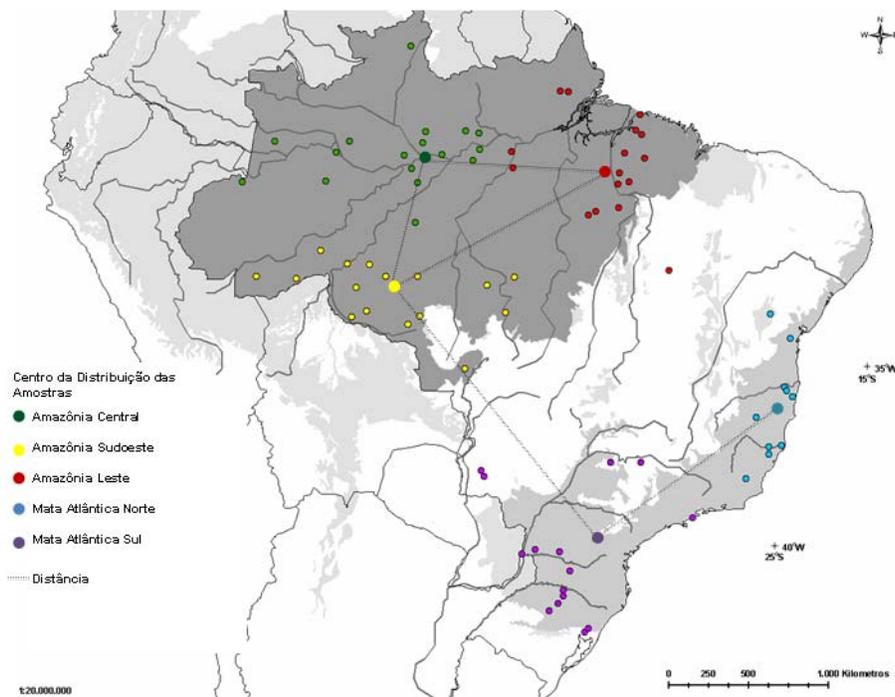


Figura 12. Modelo 5: sugere que o fluxo gênico está correlacionado com a distância; e que a conexão para o fluxo gênico entre a Amazônia e Mata Atlântica ocorre principalmente pelo oeste do corredor de vegetação aberta entre as regiões.

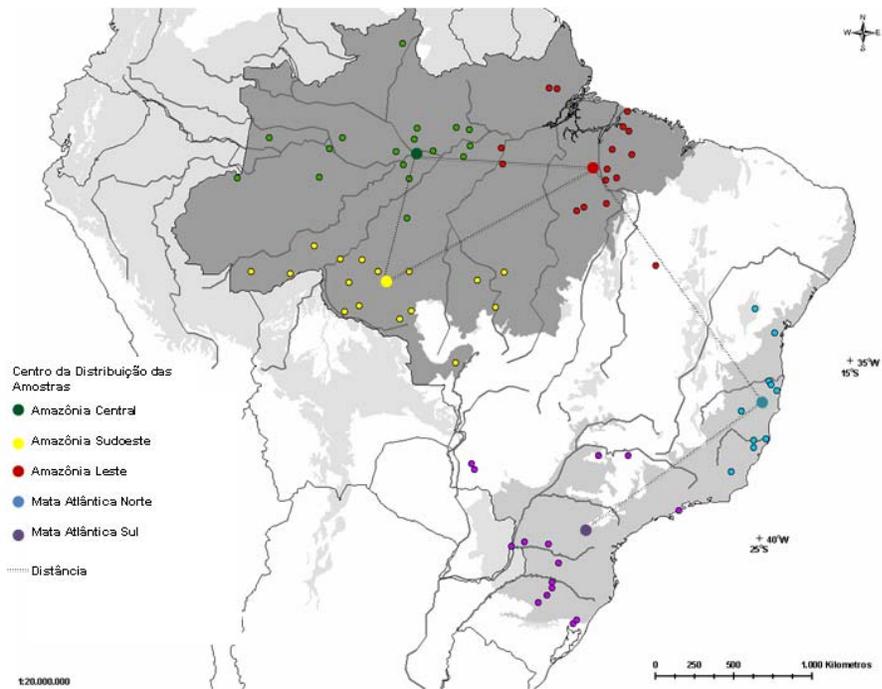


Figura 13. Modelo 6: que o fluxo gênico está correlacionado com a distância; e que a conexão para o fluxo gênico entre a Amazônia e Mata Atlântica ocorre principalmente pelo leste do corredor de vegetação aberta entre as regiões.

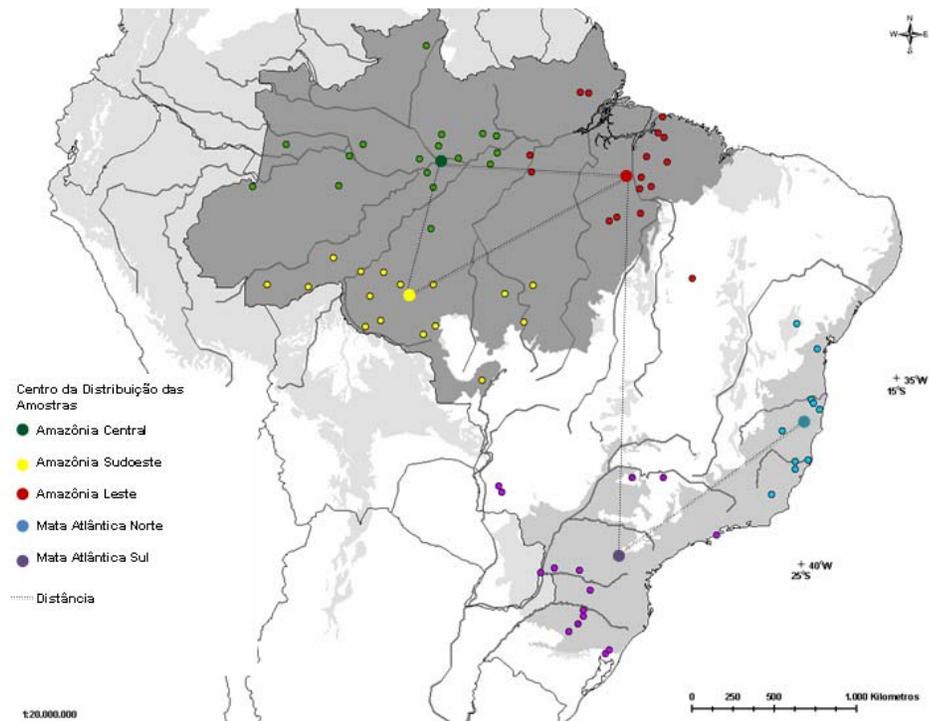


Figura 14. Modelo 7: sugere que o fluxo gênico está correlacionado com a distância; e que a conexão para o fluxo gênico entre a Amazônia e Mata Atlântica ocorre principalmente no sentido nordeste-sudoeste (vice-versa) do corredor de vegetação aberta entre as regiões.

Temporal e qualidade de floresta

As amostras atuais da Amazônia também foram divididas considerando duas regiões, uma região sendo o remanescente de floresta da Amazônia e outra desmatada (Figura 15). Os grupos foram chamados de Amazônia do Eixo Central (23 amostras) e Amazônia do Arco do Desmatamento (27 amostras). Como o acentuado desmatamento da Amazônia é muito atual, iniciado na década de 70, só foram consideradas amostras com datas após o ano de 2000.

As amostras foram separadas também por dois períodos de tempo para a Mata Atlântica, período de 1911-1953 (14 amostras) e 1967-2008 (16 amostras) (Figura 16). Essa divisão foi escolhida por apresentar amostras em uma distribuição de tempo aproximadamente iguais nos grupos (~40 anos) e estarem nos dois extremos da amostragem temporal para a Mata Atlântica, correspondendo a aproximadamente quatro intervalos de geração entre os inícios ou finais dos períodos (assumindo o tempo de geração em torno de 15 anos). Esses grupos foram analisados conjuntamente com os grupos Amazônia do Eixo Central e Amazônia do Arco do Desmatamento. Isso permitiu inferir sobre o impacto do desmatamento na diversidade genética da espécie no Brasil.

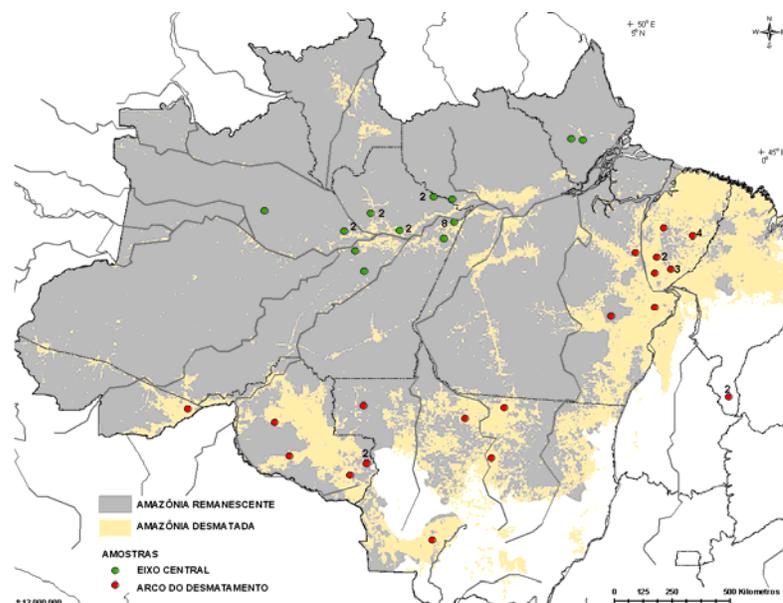


Figura 15. Amazônia desmatada e remanescente. Localização das amostras separadas em grupos para análise.

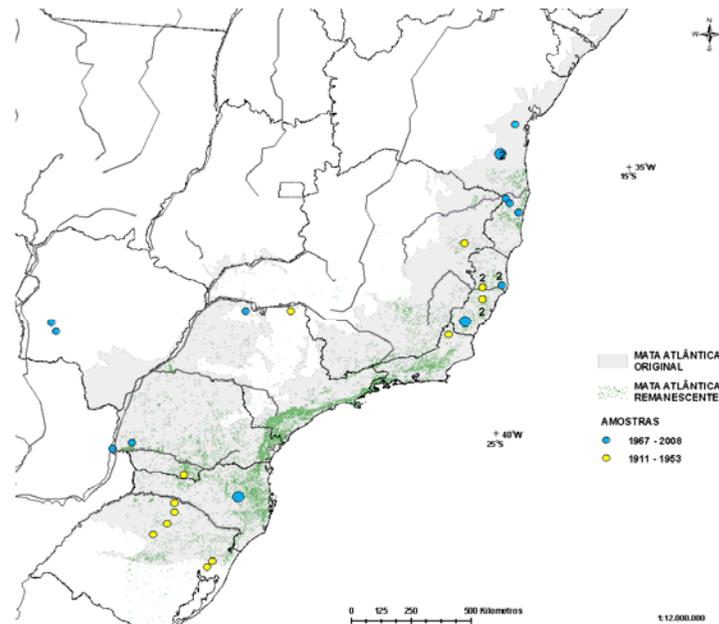


Figura 16. Mata Atlântica original e remanescente. Localização das amostras separadas em grupos de período de tempo para análise

Sexo e região

As amostras também foram divididas por sexo e por região. Entretanto, como os machos se concentraram nas amostras da Amazônia (veja os resultados), três grupos foram formados, dois de fêmeas, um para Amazônia (23 amostras) e outro para a Mata Atlântica (23 amostras), e um de machos para Amazônia (19 amostras).

4.5.2. Distribuição da variabilidade genética

Um dos interesses em se estimar os níveis de diversidade genética é para comparar a quantidade de variabilidade genética entre diferentes populações e espécies proximamente relacionadas.

Populações naturais de muitas espécies são subdivididas (ou seja, estruturadas ou diferenciadas) em unidades locais separadas com cruzamento ao acaso. Quando as espécies estão separadas em sub-populações, significa que a variação dentro da espécie existe em dois níveis primários: variação genética dentro das populações locais e variação genética entre populações. Na ausência de outras forças evolutivas, o fluxo

gênico entre populações pode torná-las homogênea. Mesmo um baixo fluxo gênico leva a homogeneização, nesse caso, apenas levará mais tempo para isso ocorrer. Entretanto, se as populações são isoladas a deriva genética pode criar populações distintas geneticamente. Então a quantidade de diferenciação entre as sub-populações nessas condições é um balanço entre a homogeneização pelo fluxo gênico e o efeito da deriva genética causando divergência entre as populações. Utiliza-se uma série de modelos diferentes para verificar o padrão de fluxo gênico e estrutura entre as populações (por exemplo, modelo de isolamento de ilha, distância geográfica ou passo a passo). Entretanto, todos os modelos podem ser mais simples do que o padrão de fluxo gênico real das populações na natureza (Allendorf & Luikart, 2007).

Os marcadores da região controle do DNAm e microssatélites, em geral, são considerados como neutros (não sujeitos a seleção natural), uma vez que estão localizados em regiões do DNA que não codificam proteínas (Avice, 2004). Sendo os marcadores neutros, a variação genética desses marcadores nas populações está sujeita ao balanço entre o fluxo e a deriva gênica, atendendo as premissas de algumas análises.

Análises com dados de DNAm

Com os 200pb da região controle do DNAm das amostras de gavião-real foram quantificados o número de sítios variáveis (posições nucleotídicas que varia entre as seqüências), o número observado de haplótipos (é a probabilidade de duas seqüências, escolhidas aleatoriamente em uma população, serem diferentes e a diversidade haplotípica (h) (descreve o número e a freqüência de haplótipos diferentes) e nucleotídica (π) (corresponde ao número de nucleotídeos diferentes por sítio entre seqüências escolhidas ao acaso em uma população) (Nei & Tajima, 1981; Nei, 1987) usando o programa Arlequin 3.1.1 (Excoffier *et al.*, 2005). Também foi observado o número de haplótipos restritos entre os grupos definidos. Foi verificado se os haplótipos encontrados são representados nas seqüências depositadas no GenBank.

Para examinar se há diferenças genéticas do gavião-real entre regiões e sub-regiões, estimativas de Φ_{ST} (análogo ao F_{ST} de Wright, 1951) foi calculada usando uma

análise de variância molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.* 1992). A AMOVA é baseada na análise de variação da frequência haplotípica, levando em consideração o número de mutações entre haplótipos. Uma análise hierárquica de variação divide a variação total em componentes covariantes devido a diferenças intraindividuais, interindividuais e/ou diferenças interpopulacionais. O Φ_{ST} par a par foi calculado usando 10^4 permutações para determinar os valores de probabilidade. O Φ_{ST} par a par foi usado como distâncias genéticas (e.g. Reynolds *et al.* 1983; Slatkin, 1995). Os testes foram realizados no programa Arlequin 3.1.1 e os valores de probabilidade foram ajustados pela correção de Bonferroni (Rice, 1989) para evitar o *erro do tipo 1* (rejeitar a hipótese nula sendo a mesma verdadeira), uma vez que várias comparações podem subestimar os valores de probabilidade.

O teste de Mantel (Mantel, 1967) foi aplicado para testar se existe correlação entre a distância genética (Φ_{ST}) e geográfica de acordo com os sete modelos definidos (Figuras 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14). Nessa análise, foram utilizadas 10^3 permutações para determinar os valores de probabilidade. Essa análise também foi realizada no programa Arlequin 3.1.1.

Como a distribuição da variabilidade genética de uma espécie depende do fluxo gênico e da sua história populacional, foi utilizada a análise *Nested Clade Phylogeographic Analysis (NCPA)* por ter o poder de discriminar entre padrões filogeográficos devido a fluxo gênico restrito vs eventos históricos operando em nível populacional (Templeton, 1998). O *NCPA* incorpora informações temporais na filogenia intraespecífica da rede dos haplótipos e usa uma abordagem permutacional para comparar padrões genéticos observados na distribuição espacial da variabilidade genética da espécie com aqueles determinados pelo fluxo gênico e eventos históricos. A hipótese nula é de uma não associação entre o padrão da variabilidade genética da espécie e a distribuição geográfica da mesma. Tal análise envolve uma série de passos que se inicia com a construção dos níveis hierárquicos na rede dos haplótipos a qual segue as regras estabelecidas por Templeton *et al.*, (1987) e Templeton & Sing (1993). Posteriormente, utiliza-se o programa GeoDis (Posada *et al.*, 2000) para testar a associação entre o resultado do agrupamento dos haplótipos e a distribuição geográfica

espacial da amostragem através de uma análise de contingência. A NCPA foi realizada automaticamente pelo programa ANeCA 1.2 (Panchal, 2008) que possui implementados os programas TCS 1.21. (Clement *et al.*, 2000) para construção da rede de haplótipos e o programa GeoDis 2.5 para o teste de associação entre a geografia e a variabilidade genética. As amostras sem informação e as seqüências depositadas pelo GenBank foram utilizadas adicionalmente para construir a rede de haplótipos. Isso permitiu resolver melhor o padrão da rede. Entretanto, somente os haplótipos com informação de localização geográfica foram utilizados como dados para a NCPA. Para os haplótipos do GenBank foram adicionadas as coordenadas geográficas de localidades que possuem registros de gavião-real dentro dos países, as hipotéticas localidades foram obtidas em Vargas *et al.* (2006).

Análises com dados de Microsatélites

Para os nove locos foram calculadas as heterozigosidades observada (H_O) e esperada (H_E), as mesmas são estimativas de diversidade genéticas e representam a proporção média de heterozigosidade por loco em uma população com reprodução ao acaso (Nei, 1978). O teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) entre as proporções da H_O e H_E para cada loco foi realizado para verificar se corresponde a uma população com reprodução ao acaso onde não existe fatores presentes causando mudanças de geração a geração. O resultado para o desvio do EHW permite também inferir sobre erros de genotipagens (como presença de alelos nulos) e mistura de populações diferentes na amostragem. As estimativas de heterozigosidades e o teste equilíbrio de EHW foram realizados no programa Micro-Checker (Van Oosterhout *et al.*, 2004), pois este faz inferências automáticas sobre possíveis erros quando os locos encontram-se em desvio EHW. Também foi testado se os locos estão em desequilíbrio de ligação, uma vez se muito próximos no mesmo cromossomo (ligados) podem gerar super ou sub-estimativas de heterozigosidades e enviesar o resultados dos testes subseqüentes. O número de alelos (k) e a riqueza de alelos (A_R) (número médio de alelos por loco) foram calculados para comparação entre os grupos. Todas essas medidas, incluindo as heterozigosidades e EHW, foram realizadas usando o programa Arlequin 3.1.1. Os

valores de probabilidade para desequilíbrio de EHW e de ligação foram ajustados pela correção de Bonferroni. As estimativas de diversidade foram realizadas considerando somente os locos em equilíbrio. O número de alelos restritos entre os grupos de amostras foi calculado usando o programa Convert (Glaubitz, 2004). Esse programa também foi utilizado para converter os dados dos genótipos em arquivos adequados a serem utilizados pelos programas, isso minimiza erros pelo manuseio dos dados.

A diferenciação genética entre os grupos foi testada através da AMOVA, assim como descrito para o DNAmT (veja acima). Entretanto, enquanto para seqüências de DNAmT a AMOVA usa a freqüência haplotípica, para dados diplóides, como os microssatélites, essa análise utiliza a freqüência gênica (freqüência dos alelos). Na comparação par a par o índice de distância genética utilizado calculado foi o F_{ST} através de 10^4 permutações.

Como com DNAmT, o teste de Mantel (Mantel, 1967) foi aplicado para testar se existe correlação entre a distância genética (F_{ST}) dos microssatélites e geográfica de acordo com os sete modelos definidos (Figuras 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14). Nessa análise também foram utilizados 10^3 permutações para determinar os valores de probabilidade.

Foi utilizada uma análise *Bayesiana* que compara as amostras para verificar se existem diferentes grupos genéticos (populações) na amostragem, através do programa Structure 2.2 (Pritchard *et al.*, 2000; Pritchard & Wen, 2003). O método assume equilíbrio de Hardy-Weinberg e de ligação dentro das populações para encontrar um número de grupos (K) que melhor se ajusta aos dados, atribuindo indivíduos ao número pré-específico de conjuntos que minimize o desvio do EHW e de ligação, usando freqüências dos alelos dos genótipos em uma amostragem da cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC). A vantagem deste método é que as populações não são definidas a priori, mas é identificada preferivelmente pelos dados e puderam ser corridas usando todas as amostras com dados microssatélites disponíveis. A análise foi corrida com 10^6 passos para MCMC, descartando 10^5 passos antes de iniciar a corrida, utilizando o modelo de mistura (onde cada amostra pode ter ancestrais de mais de uma população), freqüências gênicas correlacionadas e considerando a possibilidade de existência de um a cinco grupos. Foi verificado se a maior probabilidade posterior média para o valor

de K faz sentido biológico. Todas as amostras com dados microssatélites foram utilizadas nesta análise. Duas performances foram realizadas com essa análise uma envolvendo os nove locos microssatélites e outra com oito locos, removendo um loco que apresentou déficit de heterozigotos para as amostras da Amazônia.

4.5.3. Demografia e migração

Uma série de métodos convencionais e de coalescência foram utilizados para avaliar a história demográfica e a migração do gavião-real entre a Mata Atlântica e a Amazônia.

Análises com dados de DNAMt

O teste D de Tajima (Tajima, 1989) e o teste sensível de F_s de Fu (Fu, 1997) foram utilizados para examinar se as amostras das diferentes regiões se apresentam em equilíbrio. Tais testes são importantes considerando que um desvio significativo do equilíbrio genético do DNAMt é sinal de expansão ou redução do tamanho populacional recente nas situações onde nenhuma vantagem seletiva entre haplótipos existe. O teste de D de Tajima compara o número de sítios segregantes com a diversidade nucleotídica, enquanto que o teste do F_s de Fu quantifica a polaridade da mutação e faz uma estimativa de θ (parâmetro populacional) baseado no número de mutações únicas. Ambos os testes foram realizados utilizando o programa Arlequin 3.1.1.

A mudança na demografia histórica de cada região foi investigada também comparando o perfil das distribuições das diferenças par a par de indivíduos (*mismatch distribution*) de cada população com o esperado para populações estáveis e em expansão ou redução. A análise foi realizada no programa Arlequin 3.1.1. Para amostragem de populações que estão em equilíbrio demográfico (estáveis), a distribuição das diferenças são geralmente multimodais (Slatkin & Hudson, 1991). Já populações que tem passado por recente expansão ou redução, possuem tipicamente distribuição das diferenças unimodais. Nesse resultado é difícil distinguir redução e expansão populacional (Rogers & Harpending, 1992). A distribuição da soma dos quadrados das diferenças (SSD) entre a distribuição *mismatch* observada para cada

região e a distribuição estimada para um modelo de expansão é usado como teste estatístico onde valores significantes para *SSD* indicam desvio do modelo de expansão populacional (Schneider & Excoffier, 1999). Conjunto ao teste para *SSD* entre a distribuição *mismatch* observada e a esperada no modelo de expansão, foi realizado o teste de desigualdade de Harpending (r) com 10^3 replicações e um intervalo de confiança de 95%, para testar se as distribuições são multimodais, a hipótese nula é que distribuição não possui perfil unimodal.

Os métodos de coalescência trabalham voltando no tempo evolutivo e permitem que dimensões de tempo (gerações) sejam adicionadas às análises. Essas análises são mais poderosas que as análises convencionais para estimar tempo de divergência entre populações, migração e tamanhos efetivos populacionais (N_e ; número médio estimado de indivíduos se reproduzindo e contribuindo para próxima geração). Uma das análises utilizadas foi desenhada para um modelo de isolamento populacional com migração aos dados de haplótipos selecionados de duas populações estreitamente relacionadas, implementada no programa IMA (Hey & Nielsen, 2007). Seis parâmetros diferentes podem ser estimados neste modelo de coalescência, em que uma população ancestral de tamanho (N_{eA}) se separa no tempo (t) em duas populações do descendente (tamanhos N_{e1} e N_{e2}) que podem estabelecer subsequente fluxo gênico entre eles em taxas m_1 e m_2 (proporção das populações 1 e 2 que são substituídos por migrantes da outra população, respectivamente). O modelo supõe neutralidade seletiva e que não há subdivisão populacional dentro de cada população. Também supõe que o tamanho da população não muda no tempo após a separação. Estimativas de distribuição posterior dos parâmetros, $p(T, M, \theta | X)$, foram tomadas, onde T é o tempo de separação ($T = t/\theta$, onde t é o tempo de geração), M é a migração que pode ser assimétrica (isto é, $m_1 \neq m_2$) ($M = 2Nm$), θ é o parâmetro populacional $2N_e\mu$ (N_e é o número efetivo populacional) e X são os dados. Para isso, a máxima verossimilhança foi utilizada no programa com MCMC de 10^7 passos após 10^6 passos descartados e assumindo o modelo KHY de evolução molecular selecionado usando o *Modeltest* (Posada & Crandall, 1998). Foram realizadas três corridas independentes com diferentes pontos de início, cada corrida com 10 passos independentes que foram

misturados para verificar a convergência, o resultado é a média das três corridas independentes.

Para detectar as flutuações no tamanho da população ao longo do tempo, foi utilizada a análise Bayesiana no programa Beast (Drummond *et al.*, 2007). Nesse programa também foram utilizados valores para MCMC de 10^7 passos após 10^6 passos descartados e assumindo o modelo KHY de evolução. Foram realizadas 10 corridas independentes, o resultado é a média entre elas.

A terceira análise de coalescência utilizada foi a do programa Migrate 2.1 (Beerli & Felsenstein, 2001) para alternativamente estimar as taxas de migração históricas entre as regiões e o relativo tamanho efetivo populacional ($\theta = N_e\mu$). As estimativas dessa análise assumem uma matriz de modelo de migração com assimetria nas taxas de migração. Inferência de maximaverossilhança e Bayesiana foram utilizadas para estimar os parâmetros, θ e m . Duas corridas finais para cada inferência foram conduzidas para convergir em valores similares usando MCMC de 10 cadeias curtas de 10^5 passos e seis longas de 5×10^6 passos após 10^5 passos descartados. A convergência entre as inferências foram julgadas pela estatística Gelman-Rubin implementada no programa.

Para converter os resultados da análise de coalescência em informação biológica, foi necessário assumir uma taxa de evolução para a região controle do DNAm. Como não existe uma taxa calibrada para a *região controle* em Falconiformes, para converter μ foi utilizada a taxa de 7,23% por milhão de anos calibrada por Drovetski (2003) para a subfamília de aves Tetraoninae. Essa mesma taxa foi utilizada por Lerner (2007) para o gavião-real. Como não existe uma estimativa de tempo de geração para o gavião-real, para converter t foi assumido um intervalo de geração de 15 anos, valor próximo ao estimado para outras grandes águias (e.g. Ferrer & Calderón, 1990; Hailer *et al.*, 2006; veja seção 2).

Microsatélites

Populações que tenham experimentado uma recente redução no tamanho efetivo populacional (N_e) exibem uma redução do número de alelos e da heterozigosidade no

equilíbrio mutação deriva (H_{EQ}). O número de alelos é reduzido mais rapidamente do que a heterozigosidade esperada (H_E) no equilíbrio de Hardy-Weinberg (Yu *et al.*, 1999), isso porque os alelos raros são rapidamente perdidos por deriva genética durante uma redução do tamanho efetivo populacional e os mesmos contribuem pouco para a heterozigosidade esperada. Desse modo, a H_E torna-se maior do que H_{EQ} , pois, essa última é calculada a partir do número de alelos. Tanto a H_E quanto a H_{EQ} refere-se à heterozigosidade no sentido de diversidade gênica descrito por Nei (1987). Baseado nessa dinâmica das heterozigosidades e dos alelos existem duas análises utilizadas que podem detectar recente redução no tamanho efetivo populacional.

Uma análise utilizada está implementada no programa Bottleneck (Cornuet & Luikart 1996), esta detecta redução do N_e via presença de um excesso de H_E e relação a H_{EQ} e se baseia nos modelos evolutivos dos microsatélites, *Infinite Alleles Model* – IAM (Kimura & Crow, 1964), *stepwise mutation model* – SMM (Ohta & Kimura, 1973) e *Two-Phase Mutation Model* – TPM (di Rienzo *et al.*, 1994). Os três modelos foram usados independentemente para as análises, entretanto o modelo TPM foi considerado com 10% de IAM e 90% SMM. A diferença foi testada pelo *Signed test* e *Wilcoxon sign-rank test*.

A outra análise é o da taxa M implementada no programa M Value (Garza e Williamson, 2001). Essa análise detecta redução do N_e via redução do número de alelos, esse método baseia-se no cálculo da taxa do número total de alelos k , e na variação no tamanho dos alelos r , onde $r = S_{\max} - S_{\min} + 1$ (S_{\max} é o tamanho do maior alelo; S_{\min} é o tamanho do menor alelo na amostra). A perda de qualquer alelo contribuirá para a redução em k , enquanto que a perda do maior ou menor alelo contribuirá para a redução de (r) . Desta forma, espera-se que k seja reduzido mais rapidamente do que r em uma população em vias de diminuição no tamanho populacional. Assim, espera-se que a taxa $M = k/r$ seja menor em populações que sofreram recente redução no tamanho populacional. Garza e Williamson (2001) observaram que taxas de M menores ou iguais a 0,70 ocorrem em populações que sofreram uma redução no tamanho populacional. Para essa análise foi utilizado o parâmetro de proporção de mutações de um passo (p_s) o valor de ($p_s = 90\%$) e para a

média de tamanho de mutações de multipassos (Δg) o valor de ($\Delta g = 3,5$), como recomendado pelos autores. O programa assume uma taxa de mutação de 5×10^{-4} para os marcadores microsatélites.

A análise de Migrate também foi aplicada com os dados microsatélites para estimar o número de migrantes e o número efetivo populacional. No entanto, para dados diplóide $\theta = 4N_e\mu$. Foi utilizada inferência de maximaverossilhança e Bayesiana para estimar os parâmetros, θ e m . Duas corridas finais para cada inferência foram conduzidas para convergir em valores similares usando MCMC 10 cadeias curtas de 10^5 passos e seis longas de 5×10^6 passos após 10^5 passos descartados. A convergência entre as inferências foi julgada pela estatística Gelman-Rubin implementada no programa. Como não existe taxa de mutação calibrada para microsatélites de aves Accipitridae, para converter os valores para N_e , foi assumido $\mu = 5 \times 10^{-4}$ (taxa média de evolução dos microsatélites; di Rienzo *et al.*, 1994).

4.5.4. Razão sexual e dispersão parcial entre os sexos

Os estudos de razão sexual e dispersão com viés parcial para um dos sexos têm sido dois dos maiores tópicos em biologia evolutiva. Para verificar se existe esse viés entre os sexos no gavião-real, algumas análises foram realizadas.

Para teste de razão sexual desigual, foi verificada a proporção relativa de machos e fêmeas na amostragem total nas diferentes fontes (natureza, museus e cativeiros) e regiões de origem (Amazônia e Mata Atlântica) das amostras. O desvio da esperada razão 1:1 foi testado com Chi-quadrado (χ^2).

A diferenciação genética entre os grupos de sexo da Amazônia e Mata Atlântica foram testados com índice de distância genética F_{ST} par a par utilizando 10^4 permutações tanto para dados de DNAm quanto para microsatélites. O teste foi realizado no programa Arlequin 3.1.1 e os valores de probabilidade foram ajustados pela correção de Bonferroni (Rice, 1989). Espera-se que a distância genética entre sexo residente seja maior que a do sexo propenso a dispersão.

Foi utilizada a análise de índice de aproximação (AI) de Favre *et al.* (1997) modificado de Paetkau *et al.* (1995) implementada no Programa GenAlex 6 (Peakall &

Smouse, 2006). Nessa análise para cada indivíduo j na localidade k é calculado a probabilidade P_{kij} que o seu genótipo no loco i deve parecer com amostragem total da população, como sendo o quadrado frequência do alelo se o indivíduo é homocigoto, ou o dobro do produto das frequências de seus dois alelos se o indivíduo é heterocigoto. Na ausência de desequilíbrio de ligação, a probabilidade de ocorrências de um genótipo multilocos é o produto das probabilidades de cada um dos locos. Como as populações podem conter níveis muito diferentes de diversidade genética, as probabilidades multilocos dos indivíduos em diferentes populações não são diretamente comparáveis. Para remover este problema, a probabilidade média da amostragem é subtraída da probabilidade multilocos do indivíduo após uma log-transformação, isso evita erros com números muito pequenos e fornece um correto índice de aproximação (A/c). Retificado o índice de aproximação, os valores médios positivos são caracterizados como sendo de indivíduo com maior probabilidade de ocorrer na população (provável indivíduo residente) e os valores negativos sendo com menor probabilidade de pertencerem à população (potencial dispersor). Uma vez que os imigrantes tendem a ter valores de A/c mais baixos do que residentes, em termos de dispersão baseada no sexo espera-se o sexo que dispersa mais tenha médias menores de A/c (mA/c) do que o sexo mais residente. Ainda, uma vez que os membros do sexo que dispersa mais incluirá os residentes (com genótipos comum) e os imigrantes (com raras genótipos), espera-se que a variância de A/c (vA/c) seja maior para o sexo dispersa. Como somente a Amazônia possui um conjunto de machos e fêmeas, o teste foi realizado somente para essa região. Duas performances foram realizadas com essa análise uma envolvendo os nove locos microssatélites e outra com oito locos, removendo um loco que apresentou déficit de heterocigotos para as amostras da Amazônia. Duas performances foram realizadas com essa análise uma envolvendo os nove locos microssatélites e outra com oito locos, removendo um loco que apresentou déficit de heterocigotos para as amostras da Amazônia. Para verificar se as diferenças de mA/c entre os sexos são significativas foi utilizado o teste não paramétrico *Mann–Whitney U-test*. Para verificar se as diferenças de vA/c entre os sexos são significativas foi utilizado o *T-test*. Como o teste exige a amostragem dos dois sexos na população para análise e que as amostras

tenham genótipos para todos os locos, essa análise foi realizada para a Amazônia e com apenas 13 amostras para cada sexo.

Os resultados das análises acima foram discutidos considerando também os valores de F_{ST} obtidos com os diferentes marcadores moleculares das comparações de grupos com ambos os sexos entre a Amazônia e Mata Atlântica (descrito acima). Se a dispersão é baseada nos machos, espera-se que os F_{ST} do DNAm (marcador uniparental materno) seja muito maior que o estimado para microssatélites (marcadores bi-parental). Também foi verificado a dinâmica de migração e os tamanhos efetivos populacionais (N_e) entre a Amazônia e Mata Atlântica obtidos pelos diferentes marcadores nas análises de coalescência realizadas no programa Migrate.

4.5.5. Variabilidade genética por tempo e qualidade de habitat

Quantificar a variabilidade genética entre diferentes períodos de tempo e qualidade de habitat permite avaliar a diversidade genética que está sendo perdida ao longo do tempo devido a fatores antrópicos, como a remoção de indivíduos das populações sivistres e destruição de habitat. Populações pequenas e isoladas geralmente possuem níveis de diversidade genética reduzidos e limitado fluxo gênico limitado (Frankhan *et al.*, 2002).

Os índices de diversidade genética com dados de DNAm (número de haplótipos, diversidade haplotípica - h e nucleotídica - π) e de microssatélites (número de alelos - k , riqueza de alelos - A_R e heterozigosidades observada - H_O e esperada - H_E) foram calculados para os grupos temporais da Mata Atlântica e de diferentes condições de floresta da Amazônia.

A diferenciação genética entre os grupos foi testada com índice de distância genética (F_{ST} par a par) utilizando 10^4 permutações tanto para dados de DNAm quanto para microssatélites. O teste foi realizado no programa Arlequin 3.1.1 e os valores de probabilidade foram ajustados pela correção de Bonferroni (Rice, 1989).

Para os dados DNAm, o teste exato de diferenciação populacional (análogo ao teste de Fisher) foi utilizado para testar diferença na frequência dos haplótipos entre os grupos. Nessa análise foi utilizado 10^5 passos na cadeia de Markov e 10^4 passos antes

do início da corrida. Esse teste estima a probabilidade de se obter a distribuição observada dos haplótipos ao acaso. O teste foi realizado no programa Arlequin 3.1.1 e os valores de probabilidade foram ajustados pela correção de Bonferroni.

Para os dados microssatélites, foram realizadas comparações de diversidade genética entre grupos temporais e de diferentes condições de floresta. As diferenças dos índices de diversidade genética A_R e H_E por loco entre grupos foram testadas com o Wilcoxon *sign-rank test*. Os valores de H_O dos indivíduos foram inseridos em um gráfico de tendência pelo tempo.

Análises para detectar recente redução no N_e baseada na dinâmica das heterozigosidades e dos alelos com dados microssatélites também foram utilizando os programas Bottleneck (Cornuet & Luikart 1996) e M Value (Garza e Williamson, 2001) como descrito acima.

5. RESULTADOS

5.1. DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DA VARIABILIDADE GENÉTICA

5.1.1. DNAm_t

Os 200pb analisados para 151 amostras de gavião-real possuem 14 sítios variáveis e 11 informativos para parcimônia, sendo 12 transições e duas transversões, gerando 20 haplótipos (Tabela 3). Das 19 seqüências de gavião-real depositadas no GeneBank, foram identificados 11 haplótipos de 200pb (Tabela 3). Quatro desses haplótipos não foram encontrados na amostragem deste estudo. O haplótipo mais freqüente se apresentou em 81 amostras (53,64%), sendo bem distribuído entre todas as regiões (grupos) analisadas. Esse haplótipo não foi encontrado entre as seqüências do GeneBank. Foram encontrados seis haplótipos para 22 amostras de região desconhecida (*RD*), sendo que dois são restritos a essas amostras, também não encontrados entre as seqüências do GeneBank. A Amazônia e suas sub-regiões apresentaram maiores quantidades de haplótipos que a Mata Atlântica e suas sub-regiões (Tabela 3). A Mata Atlântica Sul foi à sub-região que apresentou o menor número de haplótipos, apenas quatro haplótipos. A Mata Atlântica Norte foi a sub-região com maior número de haplótipos restritos (quatro) (Tabela 4). Os valores de diversidades h e π foram maiores para sub-regiões Amazônicas quando comparados a Mata Atlântica e suas sub-regiões, sendo que a Amazônia Sudoeste (*AS*) apresentou maiores h e π valores entre todas as sub-regiões (Tabela 4).

A AMOVA apontou que na amostragem dividida em cinco sub-grupos regionais, 91,71% da variação é encontrada dentro das sub-regiões e delas 8,29% entre as sub-regiões, com $\Phi_{ST} = 0,08289$ significativo ($p = 0,0040+-0,00019$). Quando toda a Mata Atlântica (*MN* e *MS*) foi agrupada na comparação com sub-grupos da Amazônia, a variação entre as sub-regiões aumentou para 9,40%, com $\Phi_{ST} = 0,09422$ significativo ($p = 0,0020+-0,00014$). Nas comparações par a par não foi evidenciada diferenciação significativa entre sub-regiões dentro Mata Atlântica e entre sub-regiões dentro da Amazônia. Entre as sub-regiões da Amazônia com as da Mata Atlânticas as diferenças

foram significativas, exceto nas comparações com Amazônia Leste (AL) (Tabela 5). Entretanto, os valores de Φ_{ST} foram maiores e todos significativos comparando toda a Mata Atlântica com as sub-regiões da Amazônia, sendo que o Φ_{ST} foi menor na comparação com a AL (Tabela 5). O teste exato de diferenciação populacional foi significativo para todas as comparações ($p < 0,001$), mostrando que a frequência dos haplótipos é diferente entre regiões e entre sub-regiões.

Tabela 3. Distribuição dos 20 haplótipos encontrados para os 200pb da região controle do DNAmT em 151 indivíduos de gavião-real no Brasil. Distribuição de 11 haplótipos encontrados para 19 sequências de DNAmT de gavião-real depositadas no GenBank.

Haplótipos	Amazônia Brasileira						Brasil	GenBank							Sem procedência	Identificação na NCPA	
	AN	AS	AL	MN	MS	RD		Amazônia não Brasileira	América Central	Peru	Equador	Colômbia	Venezuela	Guiana			Panamá
1	12	8	26	11	11	13	81	1								1	id1
2	9	2	4			1	16					1	1				id0
3	1	2	2		2	3	10										id7
4	5	3					8										id4
5	1	1	2		1	1	6									1	id3
6	1	2	2				5						1				id6
7		2	2			1	5										id13
8			1	1	3		5										id5
9	1	1					2										id8
10				2			2										id9
11						2	2										ns
12						1	1										ns
13		1					1	1									id2
14		1					1										id11
15	1						1										id12
16	1						1										id14
17			1				1				2						id17
18				1			1										id10
19				1			1										id21
20				1			1	1	3	2							id16
21									1								ld20
22															1		id15
23									1								ld19
24														1			id18

AC - Amazônia Central; AS - Amazônia Sudoeste; AL - Amazônia Leste; MN - Mata Atlântica Norte; MS - Mata Atlântica Sul; RD - amostras sem informação geográfica; ns - sem identificação. *Nested Clade Phylogeographic Analysis (NCPA)*.

Tabela 4. Valores de índices de diversidade genética com 200pb da região controle do DNAmT do gavião-real das regiões e sub-regiões geográficas amostradas.

Região geográfica	Número de Amostras	Sítios variáveis\ Haplótipos	Haplótipos restritos	h +/- s.d.	π +/- s.d.
Brasil*	150	14\20	2**	0,688600 +/- 0,039900	0,007962 +/- 0,005266
Amazônia	95	14\12	8	0,731000 +/- 0,042300	0,08985 +/- 0,005799
<i>Central</i>	32	9\9	2	0,774200 +/- 0,048700	0,009587 +/- 0,006230
Sub-região Amazônia	23	9\10	2	0,861700 +/- 0,057300	0,011146 +/- 0,07110
<i>Leste</i>	40	8\8	1	0,570500 +/- 0,89700	0,006904 +/- 0,004822
Mata Atlântica	34	6\8	4	0,574000 +/- 0,096000	0,004358 +/- 0,003492
Sub-região Mata Atlântica	17	5\6	4	0,588200 +/- 0,134800	0,005221 +/- 0,004083
<i>Sul</i>	17	3\4	0	0,566200 +/- 0,122800	0,003676 +/- 0,003210

Diversidades haplotípica (h) e nucleotídica (π); desvio padrão (+/-s.d). *Apresenta também as amostras sem informação geográfica. ** Haplótipos restrito as amostras sem conhecimento da região geográfica.

Tabela 5. Valores de Φ_{ST} par a par e sua probabilidade entre sub-regiões geográficas com dados de 200pb da região controle do DNAmT. Na diagonal inferior esquerda os valores de F_{ST} e na superior direita valores de probabilidade +/- desvio padrão.

Região geográfica (número de amostras)	AC	AS	AL	MN	MS	MA
Central AC (32)	-	0,60727 +/-0,0042	0,02386 +/-0,0014	*0,00050 +/-0,0002	*0,00069 +/-0,0003	*0,00000 +/-0,0000
Amazônia	-0,01449	-	0,26106 +/-0,0049	*0,00356 +/-0,0006	*0,00238 +/-0,0005	*0,00000 +/-0,0000
Leste AL (40)	0,07061	0,00623	-	0,04336 +/-0,0024	0,05831 +/-0,0023	*0,00584 +/-0,0007
Mata Atlântica	0,20610	0,12246	0,05687	-	0,99990 +/-0,0000	-
Sul MS (17)	0,22730	0,13641	0,05364	-0,04099	-	-
Mata Atlântica Total – MA (34)	0,24926	0,16345	0,07185	-	-	-

Os valores de Φ_{ST} par a par de análises são apresentados: 1) para sub-regiões da Amazônia vs sub-regiões da Mata Atlântica; 2) sub-regiões da Amazônia vs Mata Atlântica. * Valores de probabilidade significativo após correção de Bonferroni para o número de comparação dentro de cada análise: 1) probabilidade significativa ($p < 0,0050$); 2) probabilidade significativa ($p < 0,0083$).

O teste de Mantel revelou uma significativa correlação positiva entre o Φ_{ST} e a distância geográfica de acordo com o Modelo 1, Modelo 3, Modelo 6 e Modelo 7 (Tabela 6). Nesses três modelos as distâncias par a par entre sub-regiões entre a Amazônia a Mata Atlântica, passam pelo leste da Amazônia (AL). O Modelo 3 (Figura 10) apresentou a maior correlação entre todos os modelos. Esse modelo sugere que o fluxo gênico está correlacionado com a distância, mas que a conexão para o fluxo gênico entre a Amazônia e Mata Atlântica ocorre principalmente pelo centro-leste do corredor de vegetação aberta entre as regiões.

Tabela 6. Resultado do teste de Mantel para correlação entre as distâncias genéticas (Φ_{ST} , com dados DNAm) e as geográficas de acordo com os modelos de 1 a 7. Apresenta os modelos e seus coeficientes de correlação (r) e probabilidade (p).

Correlação	Modelo 1 (Figura 8)	Modelo 2 (Figura 9)	Modelo 3 (Figura 10)	Modelo 4 (Figura 11)	Modelo 5 (Figura 12)	Modelo 6 (Figura 13)	Modelo 7 (Figura 14)
R	0,89673	0,60159	0,97788	0,74610	0,60246	0,96283	0,88815
P	0,03600*	0,13300	0,00900*	0,08300	0,13800	0,02200*	0,02200*

* valor de p significativo

Na NCPA, considerando 107 amostras com localidade geográfica conhecida no Brasil e 17 seqüências de gavião-real do GenBank para outros países, foram gerados três níveis de clados (Figura 17). Para o clado 1-8, a associação entre a variabilidade genética e a distribuição geográfica dos haplótipos foi significativa ($p < 0,05$). A inferência para o clado 1-8 aponta para restrição no fluxo gênico com isolamento por distância. Para os demais clados de nível 1, a hipótese nula de não associação da geografia com a distribuição da variabilidade genética não pode ser rejeitada. Dois dos três clados de nível 2 são exclusivos da Amazônia (clados 2-1 e 2-3; Figuras 17 e 18) e um possui ampla distribuição desde o sul da Mata Atlântica até a América Central (clado 2-2; Figuras 17 e 18). Entre esses clados, somente para o clado 2-2 a associação entre a variabilidade genética e a distribuição geográfica foi significativa ($p < 0,05$), a inferência aponta expansão contígua da distribuição geográfica. Para o clado total (Figura 17),

associação foi significativa ($p < 0,05$), a inferência também aponta para expansão contígua da distribuição geográfica.

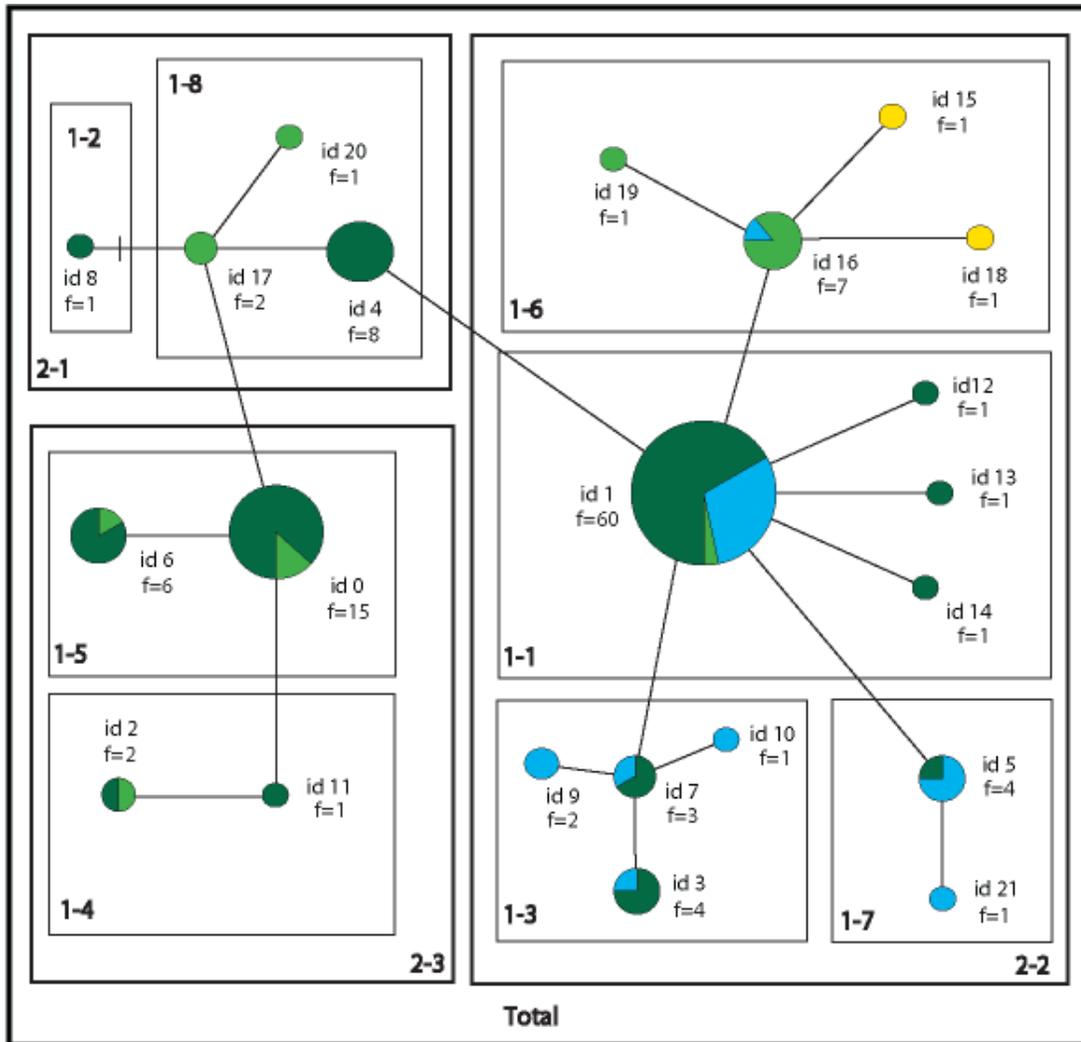


Figura 17. Rede de relacionamento de haplótipos da região controle de 200pb do DNAmT das amostras de gavião-real de localidades geográficas conhecida. Os círculos representam os haplótipos seguidos de sua identificação (Id+número). A cor verde escuro representa a proporção relativa de amostras da Amazônia brasileira para o haplótipo. A cor azul representa a proporção relativa de amostras da Mata Atlântica para o haplótipo. As cores verde claro e amarelo representam a proporção relativa de seqüências do GenBank da Amazônia não brasileira e América central respectivamente e para o haplótipo. As linhas representam a ligação dos haplótipos por um passo mutacional. A linha transversal à linha que liga os haplótipos representa um passo mutacional adicional ou haplótipo não encontrado. Os polígonos representam os clados identificados pela NCPA.

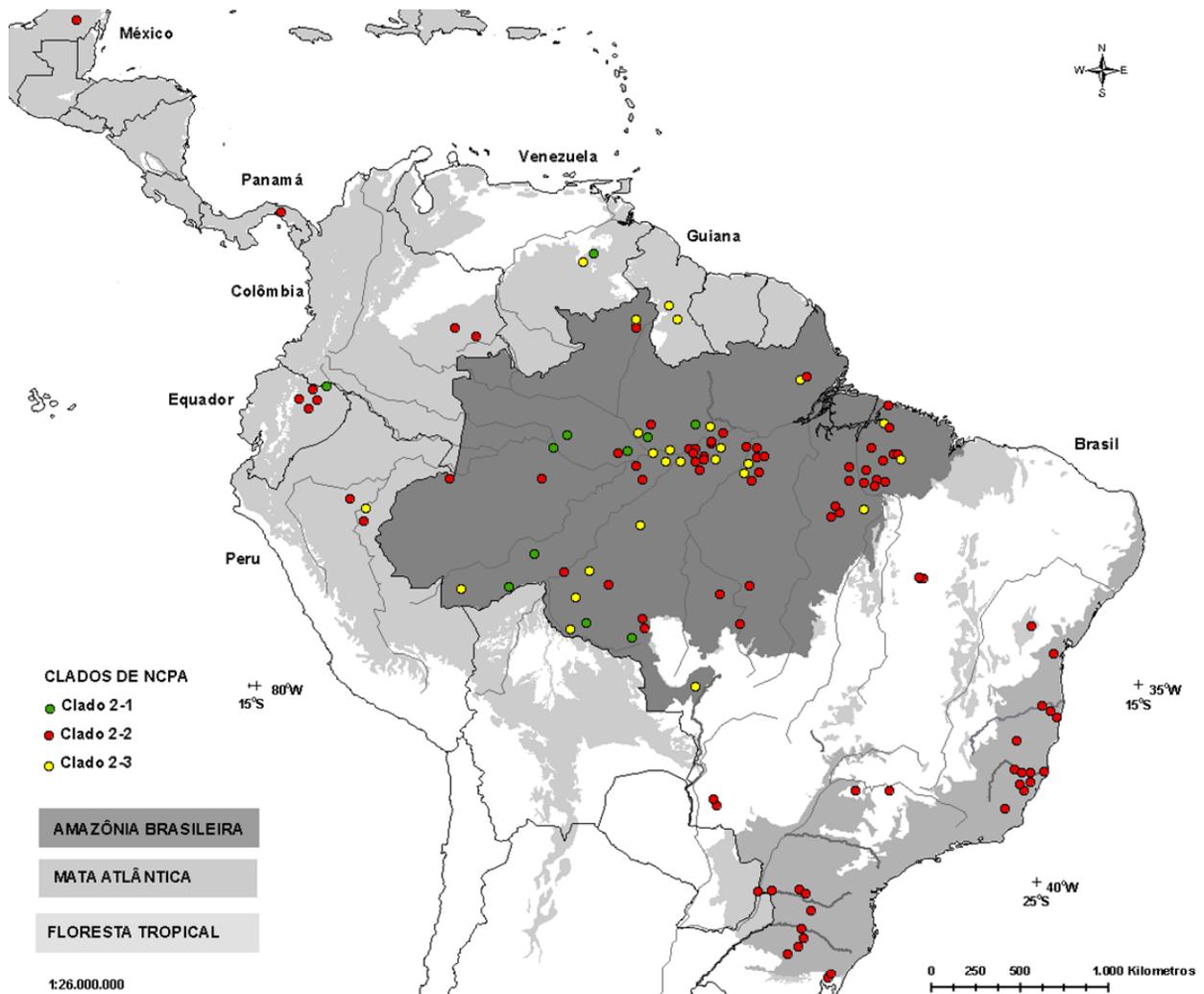


Figura 18. Distribuição dos clados de nível 2 da análise de NCPA. Para os clados 2-1 e 2-3 a hipótese nula não pode ser rejeitada. Para o clado 2-2 a associação entre a variabilidade genética e a distribuição geográfica foi significativa, a inferência é de expansão contígua da distribuição geográfica. Para o clado total a associação foi significativa, a inferência também é de expansão contígua da distribuição geográfica.

5.1.2. Microssatélites

Ao todo foram genotipadas 148 amostras de gavião-real do Brasil, 118 com informação geográfica e 30 de *RD*. Para todas as amostras, quatro locos se apresentaram em significativo desvio do EHW após a correção de *Bonferroni*, sendo três com déficit (NVHFR206, $p = 0,00166 \pm 0,00004$; HFC7G4, $p = 0,00000 \pm 0,00000$; AA43, $p = 0,01534 \pm 0,00011$) e um com excesso (HFC1D2, $p = 0,00009 \pm 0,00001$) de heterozigiosidade. Quando o teste foi aplicado às amostras da Mata Atlântica e

Amazônia separadamente, somente o loco AA43 apresentou desvio do EHW ($p=0,00010 \pm 0,00001$) para déficit de heterozigidade e apenas para Amazônia. Esse desvio também foi detectado pelo programa MicroChecker para a Amazônia e para a amostragem total, mas não para a Mata Atlântica. O programa sugere a presença de alelos nulos para o loco. Entretanto, outras explicações são possíveis, como que o loco pode estar sobre efeito *Wahlund*, mistura de populações diferentes na amostragem, ou sob seleção. Para as amostras separadas por sub-regiões nenhum loco apresentou desvio do EHW. Em nenhuma das combinações de amostras os locos se apresentaram em desequilíbrio de ligação após correção de Bonferroni. Considerando o desvio de EHW do loco AA43 para a amostragem da Amazônia e total, o loco foi excluído das análises de diversidade genética, baseadas no F_{ST} , demografia e migração.

Os índices de diversidade foram sumarizados na Tabela 7. Para os oito locos e 148 amostras foram encontrados 48 alelos. A Amazônia e a Mata Atlântica apresentaram sete e dois alelos restritos respectivamente. A Amazônia Central apresentou os maiores valores de k e de AR entre os sub-grupos. A Mata Atlântica Norte apresentou os menores valores de k e de AR . A Amazônia Central e a *MN* apresentaram os maiores valores para H_O , os valores foram similares entre esses dois sub-grupos. A Mata Atlântica apresentou maiores valores de H_O e H_E do que Amazônia.

A AMOVA não evidenciou diferença significativa entre os sub-grupos dentro da Amazônia e Mata Atlântica ou entre a Amazônia e Mata Atlântica ($F_{ST}= 0,00556$; $p= 0,84772 \pm 0,00336$). Entre a Mata Atlântica e os sub-grupos da Amazônia também não foi evidenciado diferenciação significativa ($F_{ST}=0,00760$; $p=0,56772 \pm 0,00499$). Os valores de F_{ST} e de probabilidade nas comparações par a par foram sumarizados na Tabela 8, nenhuma diferença foi significativa.

Tabela 7. Número de alelos (k), riqueza de alelos (AR), Alelos privados, heterozigosidades observada (H_O) e esperada (H_E) dos locos microssatélites para o gavião-real das regiões e sub-regiões geográficas amostradas.

Região Geográfica	Número de Amostras	k	AR	Alelos privados	H_O	H_E
Amazônia	86	46	5,750	7	0,46116	0,48349
Central - AC	25	40	5,000	1	0,53054	0,52378
Sudoeste - AS	21	37	4,625	1	0,45526	0,48793
Leste - AL	28	42	4,625	2	0,43740	0,45349
Mata Atlântica	34	40	5,000	2	0,48247	0,49136
Norte - MN	16	33	4,125	1	0,53854	0,48042
Sul - MS	18	34	4,250	0	0,43505	0,49827
Amazônia+Mata Atlântica	120	48	6,000	-	0,47181**	0,48742**
Brasil [#]	148	48	6,000	0*	0,45660	0,47772

[#]Considera as amostras não utilizadas nos grupos geográficos. Os valores de alelos privados são relativos a comparação entre Amazônia e Mata Atlântica, entre sub-regiões e entre Amazônia+Mata Atlântica e Brasil. *Alelos privados de amostras sem informação geográfica. **Médias entre as heterozigosidades da Amazônia e Mata Atlântica.

Tabela 8. Valores de F_{ST} par a par e sua probabilidade entre sub-regiões geográficas com dados microssatélites. Na diagonal inferior esquerda os valores de F_{ST} e na superior direita valores de probabilidade +- desvio padrão. Nenhuma diferença foi significativa.

Região geográfica (número de amostras)	AC	AS	AL	MN	MS	MA
Central AC (33)	-	0,14939 +-0,0036	0,25334 +-0,0039	0,15068 +-0,0035	0,13207 +-0,0033	0,04970 +-0,0022
Amazônia Sudoeste AS (20)	0,01067	-	0,82398 +-0,0037	0,15959 +-0,0035	0,21661 +-0,0037	0,06989 +-0,0023
Leste AL (23)	0,00431	-0,00977	-	0,18978 +-0,0036	0,30274 +-0,0045	0,13672 +-0,0035
Mata Atlântica Norte MN (14)	0,00729	0,00903	0,00637	-	0,60341 +-0,0048	-
Sul MS (15)	0,01122	0,00884	0,00395	-0,00911	-	-
Mata Atlântica Total MA (29)	0,01211	0,01194	0,00684	-	-	-

Os valores de F_{ST} par a par de análises são apresentados: 1) para sub-regiões da Amazônia vs sub-regiões da Mata Atlântica; 2) sub-regiões da Amazônia vs Mata Atlântica. Foram considerados valores de probabilidade significativo após correção de Bonferroni para o número de comparação dentro de cada análise: 1) probabilidade significativa ($p < 0,0050$); 2) probabilidade significativa ($p < 0,0083$).

O teste de Mantel não revelou uma significativa correlação entre as distâncias genéticas (F_{ST}) e as distâncias geográficas em nenhum dos modelos (Figura 12). Entretanto, foi possível detectar uma tendência quase significativa para uma pequena correlação positiva com os modelos 3, 6 e 7 (Figura 12), ou seja, uma tendência de conexão para o fluxo gênico do gavião-real da Mata Atlântica e Amazônia pelo leste da Amazônia.

Tabela 9. Resultado do teste de Mantel para correlação entre as distâncias genéticas (F_{ST} , com dados microssatélites) e as geográficas de acordo com os modelos de 1 a 7. Apresenta os modelos e seus coeficientes de correlação (r) e probabilidade (p).

Correlação	Modelo 1 (Figura 8)	Modelo 2 (Figura 9)	Modelo 3 (Figura 10)	Modelo 4 (Figura 11)	Modelo 5 (Figura 12)	Modelo 6 (Figura 13)	Modelo 7 (Figura 14)
R	0,403960	0,339567	0,506000	0,427055	0,353036	0,504756	0,516924
P	0,183000	0,225000	0,070000	0,172000	0,203000	0,076000	0,065000

Na análise Bayesiana no programa Structure, a primeira performance com oito locos, o número de grupos com maior probabilidade posterior média para explicar a relação dos genótipos encontrados foi $K = 1$ ($p = -23129,7$) (Figura 19).

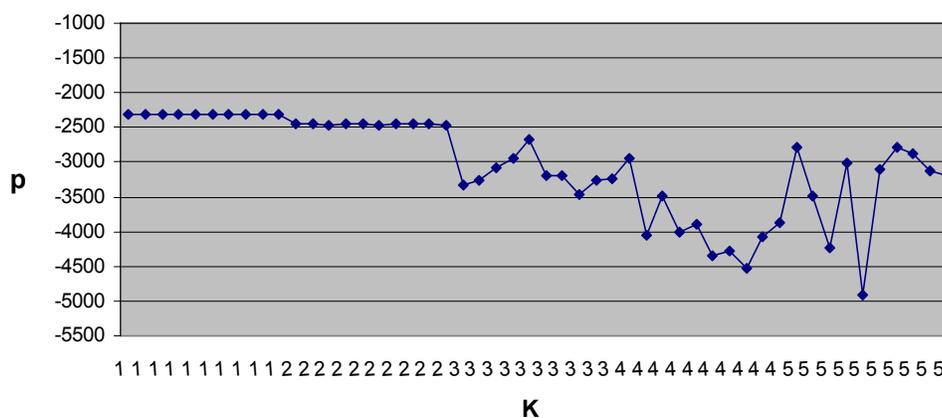


Figura 19. Valores de probabilidade posteriores (p) Bayesianos dos grupos (K) testados com oito locos microssatélites. A maior probabilidade é para $K=1$, sugerindo um grupo (panmixia) explica melhor os dados.

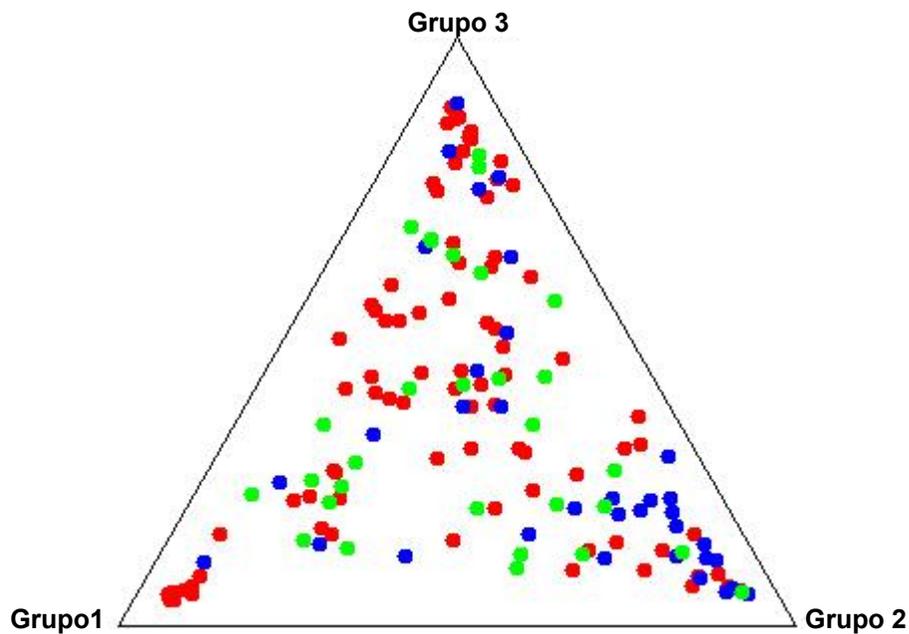


Figura 21. Relacionamento das amostras aos grupos representados pelos vértices do triângulo. Os círculos em azuis representam as amostras da Mata Atlântica, vermelhos da Amazônia e verdes as amostras com região geográfica desconhecida.

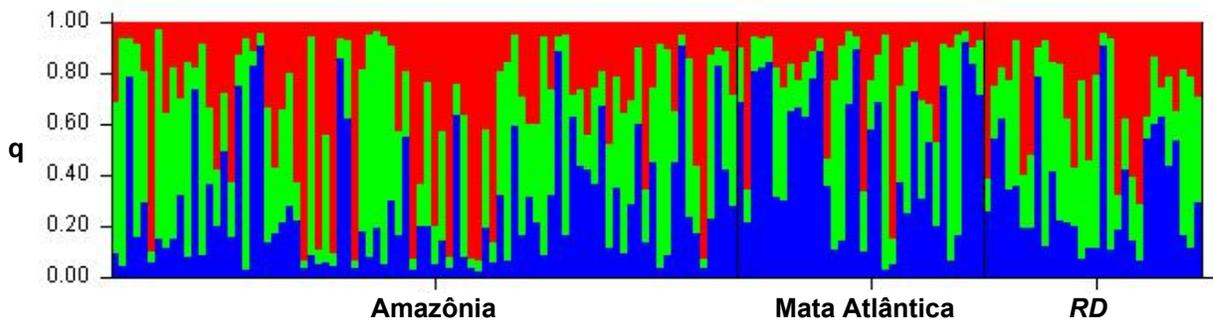


Figura 22. Composição do relacionamento genético entre as amostras de acordo com os três grupos determinados pela análise Bayesiana. Cada barra representa uma amostra da Amazônia, Mata Atlântica ou de região desconhecida (RD). Cada cor representa um grupo entre os três grupos ($K = 3$) com maior valor de probabilidade para explicar os dados. O eixo vertical mostra o coeficiente de relacionamento (q) da amostra aos grupos definidos.

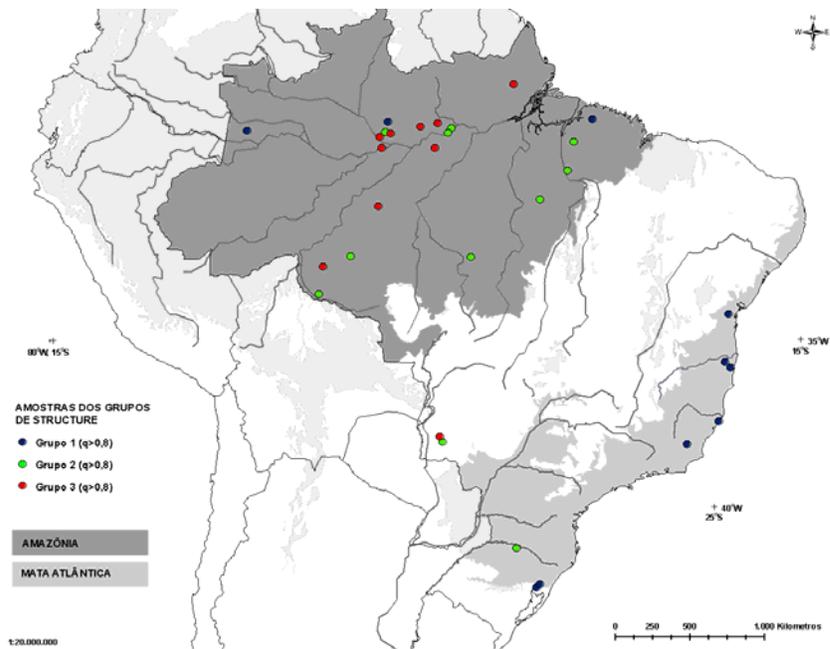


Figura 23. Distribuição das amostras que apresentaram coeficiente de relacionamento (q) $>0,8$ para um dos três grupos sugeridos pela análise Bayesiana. No grupo 1 predomina amostras da Mata Atlântica e nos grupos 2 e 3 amostras da Amazônia.

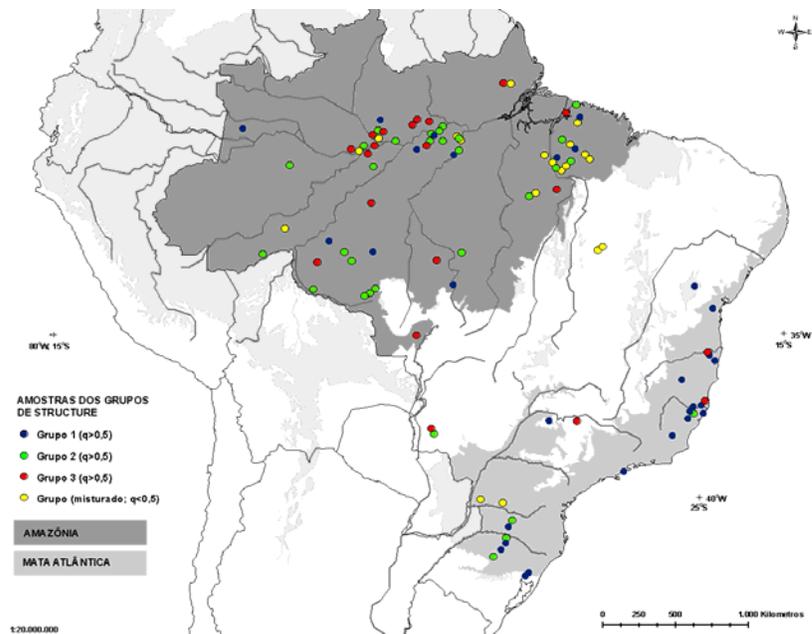


Figura 24. Distribuição das amostras com coeficiente de relacionamento (q) $>0,5$ para um dos grupos e $q < 0,5$ para todos os três grupos sugeridos pela análise Bayesiana. No grupo 1 predomina amostras da Mata Atlântica e nos grupos 2 e 3 amostras da Amazônia. As amostras com $q < 0,5$ se concentram mais no leste da Amazônia.

5.2. DEMOGRAFIA HISTÓRICA E MIGRAÇÃO

5.2.1. DNAm

Os valores do teste D de Tajima foram negativos para Amazônia e Mata Atlântica, $-0,58161$ e $-0,95259$ respectivamente, mas não foram significativos ($p > 0,05$). Entretanto, os valores do teste F_s de Fu foram negativos e significativos, $-4,31146$ ($p = 0,04200$) e $-3,48964$ ($p = 0,005$), para a Amazônia e Mata Atlântica respectivamente, sugerindo expansão populacional. A expansão também é suportada pelas curvas da distribuição das diferenças par a par (*mismatch*) tanto para Amazônia quanto para Mata Atlântica, ambas foram unimodais (Figura 25) e com $r = 0,02570$ ($p = 0,94$) e $r = 0,06349$ ($p = 0,79$) respectivamente, tais como encontrado em populações que tenham experimentado expansão populacional (Rogers & Harpending, 1992). Dado às distribuições *mismatch*, não foi possível rejeitar o modelo de expansão demográfica para Amazônia e Mata Atlântica, $SSD = 0,00583$ ($p = 0,71000$) e $SSD = 0,00487$ ($p = 0,57000$) respectivamente.

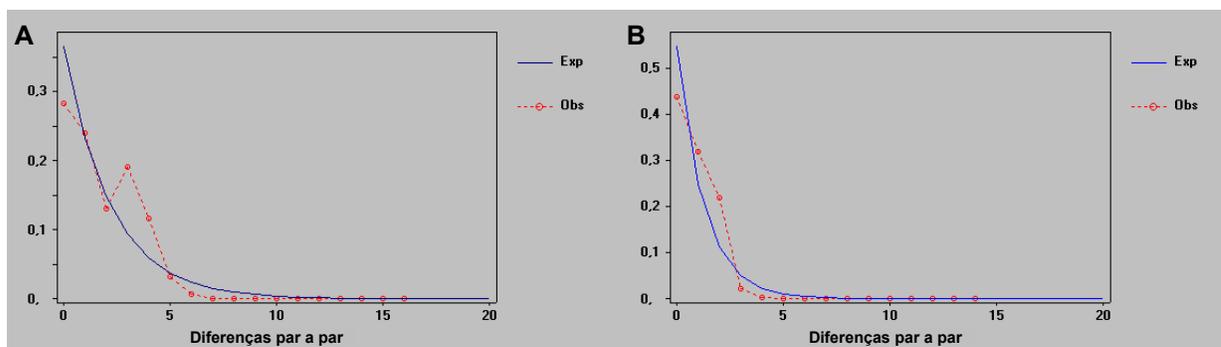


Figura 25. Distribuição *mismatch* para haplótipos encontrados em amostras de gavião-real (A) Amazônia e (B) Mata Atlântica. A distribuição esperada de diferenças par a par de acordo com um o modelo de expansão populacional súbita é mostrada pela linha contínua azul (Exp) e a distância observada pela linha pontilhada vermelha (Obs).

Os resultados da análise Bayesiana de coalescência realizada no programa Beast foram sumarizados no gráfico (Figura 26). A análise evidenciou um forte sinal expansão populacional para o gavião-real que se inicia lentamente há aproximadamente 18.000 anos, com tamanho populacional efetivo de fêmeas (N_{ef}) de pouco mais que 700 indivíduos. A expansão foi acentuada há 7.000 anos, quando N_{ef}

ultrapassa 1.500 indivíduos. O ápice da expansão ocorre há 1.132 anos, onde o N_{ef} atingiu aproximadamente 5.400 indivíduos. A partir desse ápice, os parâmetros convertidos no gráfico (Figura 26) apresentam uma tendência na redução da população, com declínio um pouco maior nos últimos 500 anos. Os resultados mostram uma estimativa de N_{ef} de 4.760 (3.520 – 7.250, 90% CI) indivíduos no tempo atual (tempo zero; Figura 26).

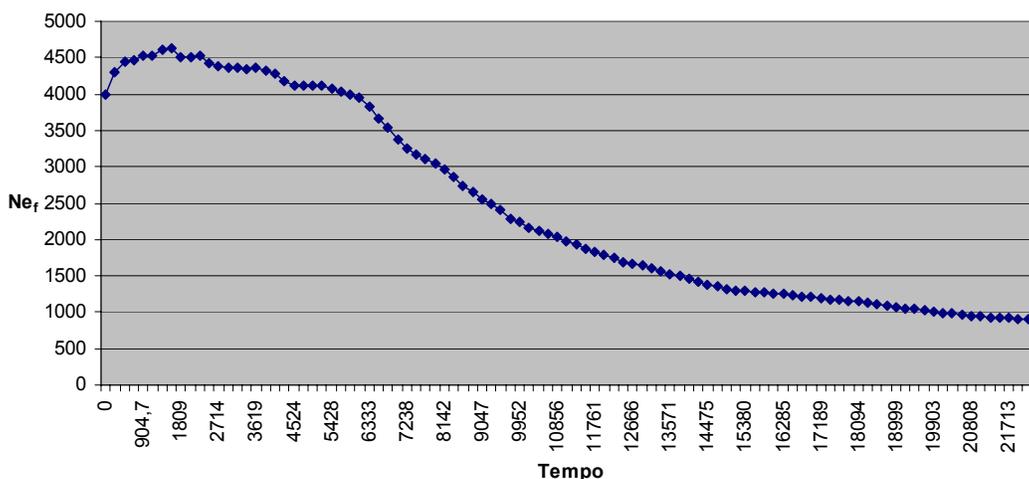


Figura 26. Resultados dos parâmetros da análise Bayesiana do programa Beast convertidos. Dinâmica do tamanho efetivo populacional de fêmeas (N_{ef}) no tempo. Um forte sinal de expansão populacional pode ser visualizado.

Na análise pelo programa IMA os valores de probabilidade máximas posteriores mostram sinal de recente separação entre as populações da Amazônia e Mata Atlântica. Os valores dos parâmetros convertidos trazem uma estimativa de tempo de divergência de 9.898 anos (7.522 – 18.707, 90%CI), onde ocorre uma elevada densidade de valores de probabilidade, e 77.700 anos (5.920 – 86.400, 90% CI), onde ocorre maior variância nos valores de probabilidade (Figura 27). O valor estimado do N_{ef} ancestral entre as duas populações (ou seja, antes da divergência) foi de 363 (2,275 – 4.110, 90%CI) (Figura 28). Os valores estimados de N_{ef} para a Amazônia após a divergência foi de 1.845 (885 – 460, 90%CI) e para a Mata Atlântica foi de 540 (175 – 1605, 90%CI) (Figura 27). A taxa de migração após divergência para a Amazônia foi m

= $3,23 \times 10^{-3}$ e para a Mata Atlântica foi $m = 2,46 \times 10^{-6}$ (Figura 29), o que corresponde a uma migração praticamente unidirecional entre as regiões, com $Nm_f=11,9348$ (1,113884 – 66,431835, 90%CI) migrantes da Mata Atlântica para a Amazônia e apenas $Nm_f=0,0026505$ (0,0008628 – 9,233875, 90%CI) no sentido inverso.

Um resultado similar ao de IMA para migração unidirecional também foi obtido na análise do programa Migrate. As estimativas de θ na análise foram de 0,01975 e 0,00525, e de m foram de 727,5 e 15,5 para a Amazônia e Mata Atlântica respectivamente. Isso corresponde a $Nm_f = 14,3681$ da Mata Atlântica para a Amazônia e $Nm_f = 0,081375$ no sentido inverso. Os valores de N_{ef} convertidos foram de 682 e 181 indivíduos para a Amazônia e Mata Atlântica respectivamente.

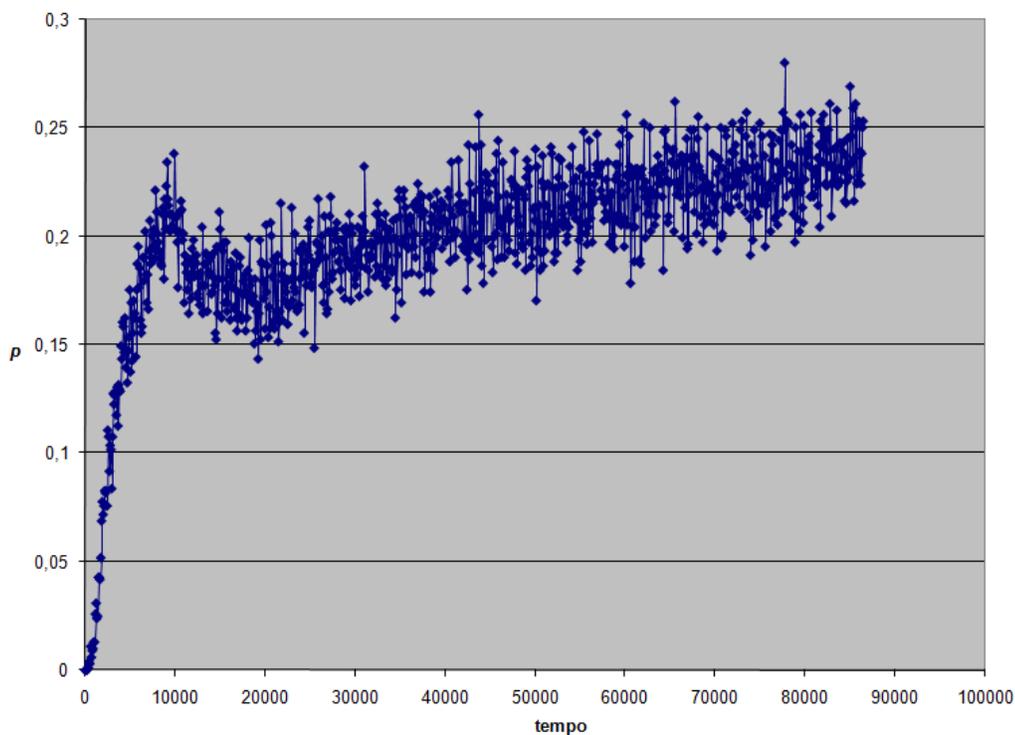


Figura 27. Escalada do tempo (em anos) de divergência para os dados de seqüência da região controle do DNAmT do gavião-real na análise de IMA. O sinal forte de divergência tempo de divergência de foi 9.898 anos (7.522 – 18.707, 90%CI), onde ocorre uma elevada densidade de valores de probabilidade, e 77.700 anos (5.920 – 86.400, 90% CI), onde ocorre maior variância nos valores de probabilidade.

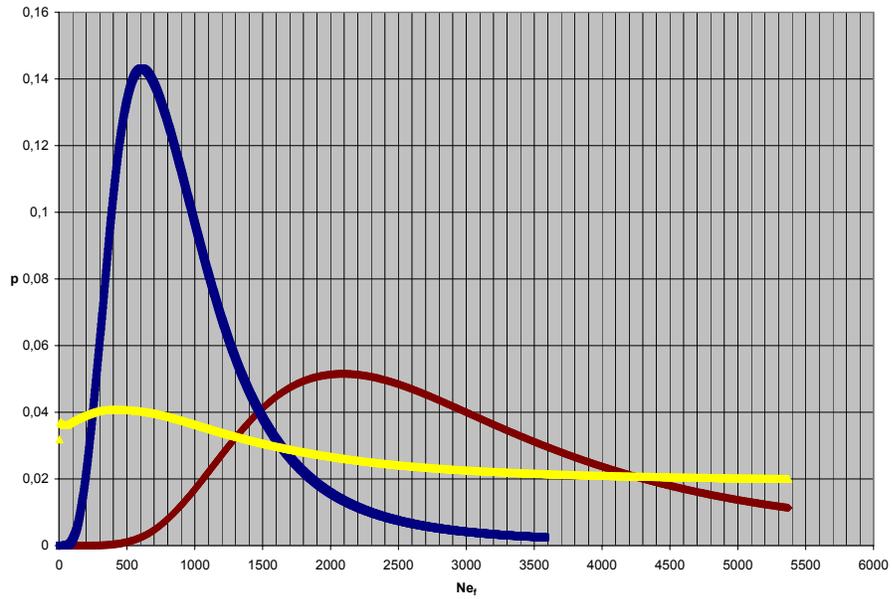


Figura 28. Estimativas de probabilidade de máxima verossimilhança (p) para tamanho efetivo da população ancestral entre Amazônia e Mata Atlântica (amarelo), da Amazônia (vermelho) e da Mata Atlântica (azul). O número efetivo de fêmeas (N_{ef}) com maior probabilidade para a população ancestral foi 363, para a Amazônia foi 1.845 e para a Mata Atlântica foi 540 indivíduos de gavião-real.

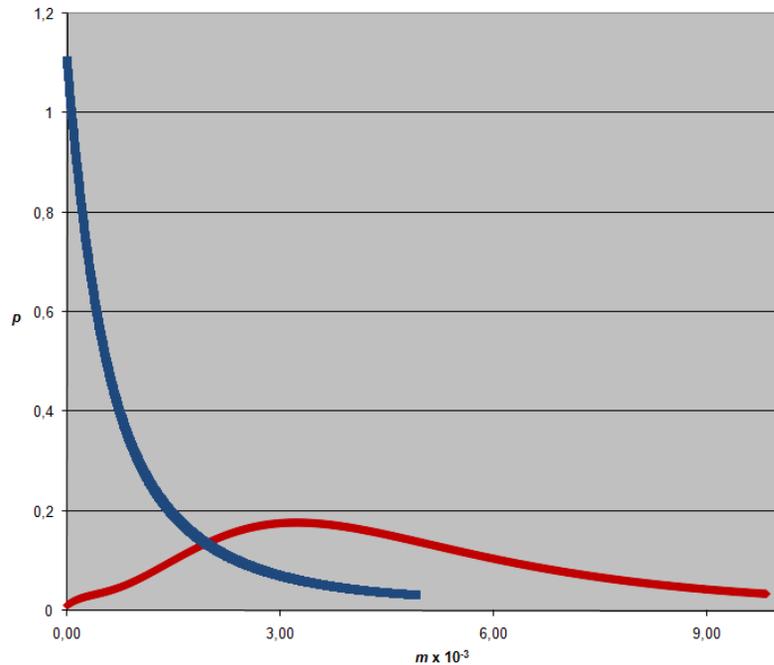


Figura 29. Probabilidades de máxima verossimilhança (p) para as taxa de migração (m) do gavião-real para a Amazônia (vermelho) e Mata Atlântica (azul). A taxa de migração com maior p para a Amazônia foi $m = 3,23 \times 10^{-3}$ e para a Mata Atlântica foi $m = 2,46 \times 10^{-6}$ (não aparece no gráfico). A taxa migração é praticamente unidirecional da Mata Atlântica para a Amazônia.

Na comparação entre sub-regiões da Amazônia com a Mata Atlântica na análise do programa Migrate, os resultados mostraram a migração unidirecional partindo da Mata Atlântica para o leste da Amazônia (AL; Figura 30). Dentro da Amazônia o fluxo gênico também não é igual entre as regiões, a migração não ocorre diretamente entre o sudoeste (AS) e leste (AL), é unidirecional entre o centro (AC) e o sudoeste e bi-direcional entre o centro e o leste (Figura 30).

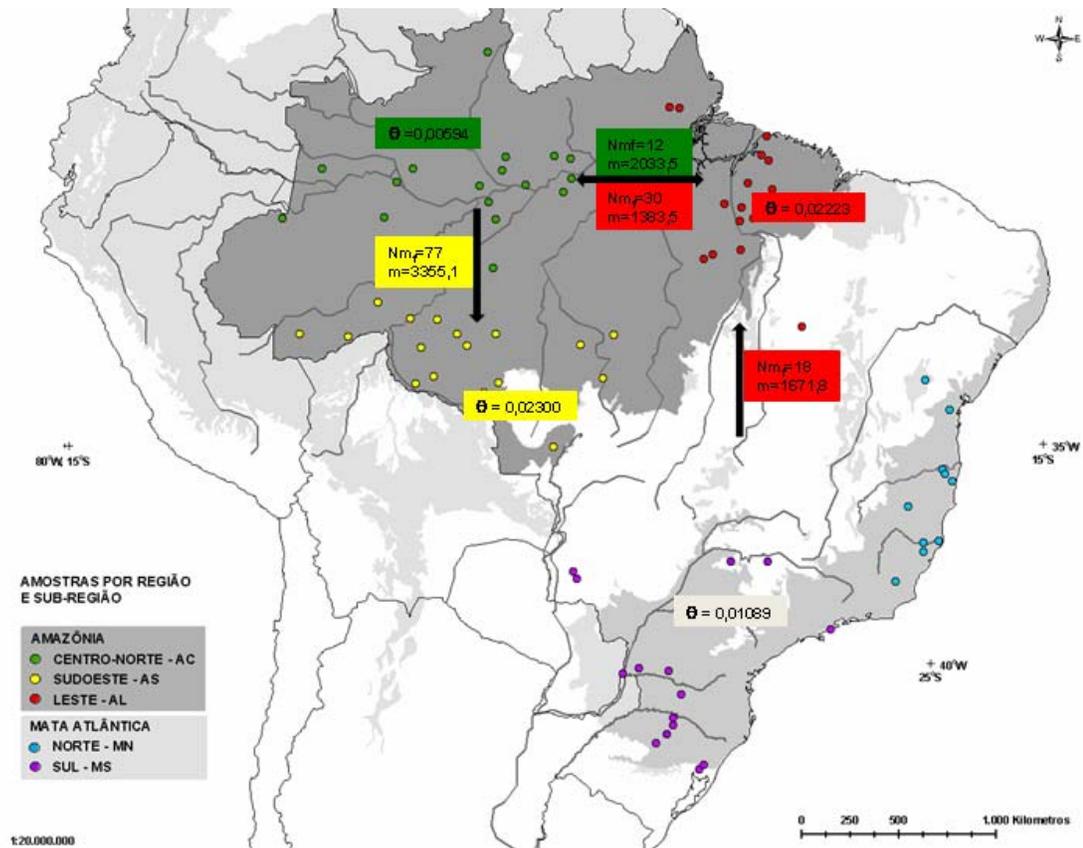


Figura 30. Taxa de migração (m), os valores de θ e o número de fêmeas migrantes (Nm_f) direcional de gavião-real entre as regiões e sub-regiões com dados DNAm. A migração é unidirecional da Mata Atlântica para o leste da Amazônia (AL) e da porção central para sudoeste da Amazônia (AC). O leste e sudoeste da Amazônia não trocam migrantes diretos.

5.2.2. Microssatélites

Nas análises de redução populacional recente no Programa Bottleneck para todas as amostras do Brasil, os oito locos se apresentaram com deficiência de heterozigotos de acordo com modelo evolutivo SMM ($p = 0,00076$). Para as amostras da Amazônia, os oito locos também se apresentaram com deficiência de heterozigotos de acordo com modelo evolutivo SMM ($p = 0,00081$). Em ambos os casos, para os outros dois modelos evolutivos (IAM e TPM) a heterozigosidade foi apresentada em equilíbrio. O resultado sugere expansão populacional ou introdução de alelos por migração, se os microssatélites evoluem segundo o modelo SMM. Para as amostras da Mata Atlântica o conjunto dos oito locos se apresentou em equilíbrio mutação e deriva, considerando qualquer um dos modelos evolutivos (IAM, TPM e SMM). Isso sugere uma estabilidade populacional para a Mata Atlântica.

Na análise de M Value para os locos microssatélites, não foi detectado redução populacional em nenhuma situação. Para a Amazônia o valor médio M foi 0,945238 (99,89% de taxa de equilíbrio), para a Mata Atlântica o valor médio de M foi 0,946429 (99,93% de taxa de equilíbrio) e para a amostragem total o valor médio de M foi 0,966071 (100% de taxa de equilíbrio).

Na análise de Migrate, os valores obtidos para θ foram 1,0262 e 0,9621 e para m foram 12,336 e 6,346 para a Amazônia e Mata Atlântica respectivamente. Esses valores convertidos correspondem a número de migrantes por geração ($Nm = M\theta/2$) de 6,110 da Mata Atlântica para a Amazônia e 3,753 no sentido inverso. Em termos de tamanho efetivo populacional ($N_e = \theta/4\mu$) os valores convertidos correspondem a 513 e 481 indivíduos na Amazônia e Mata Atlântica respectivamente.

Na comparação entre sub-regiões da Amazônia e Mata Atlântica, a migração se apresenta altamente dinâmica, mas com pequenas quantidades de migrantes por geração (Figura 31). A migração da Mata Atlântica para a Amazônia foi apresentada como ocorrendo tanto pelo leste quanto pelo sudoeste da Amazônia (AL e AS respectivamente), chegando também diretamente a Amazônia Central (Figura 31). Entretanto, o fluxo gênico foi maior entre a Mata Atlântica e o leste da Amazônia. O número de migrantes da Mata Atlântica para a Amazônia Central foi quase duas vezes

maior do que para as outras sub-regiões da Amazônia. Os resultados mostram que dentro da Amazônia a migração é limitada e mais alta partindo de AS para a AC, sendo a única comparação entre sub-regiões da Amazônia que apresenta $2Nm > 1$ (Figura 31).

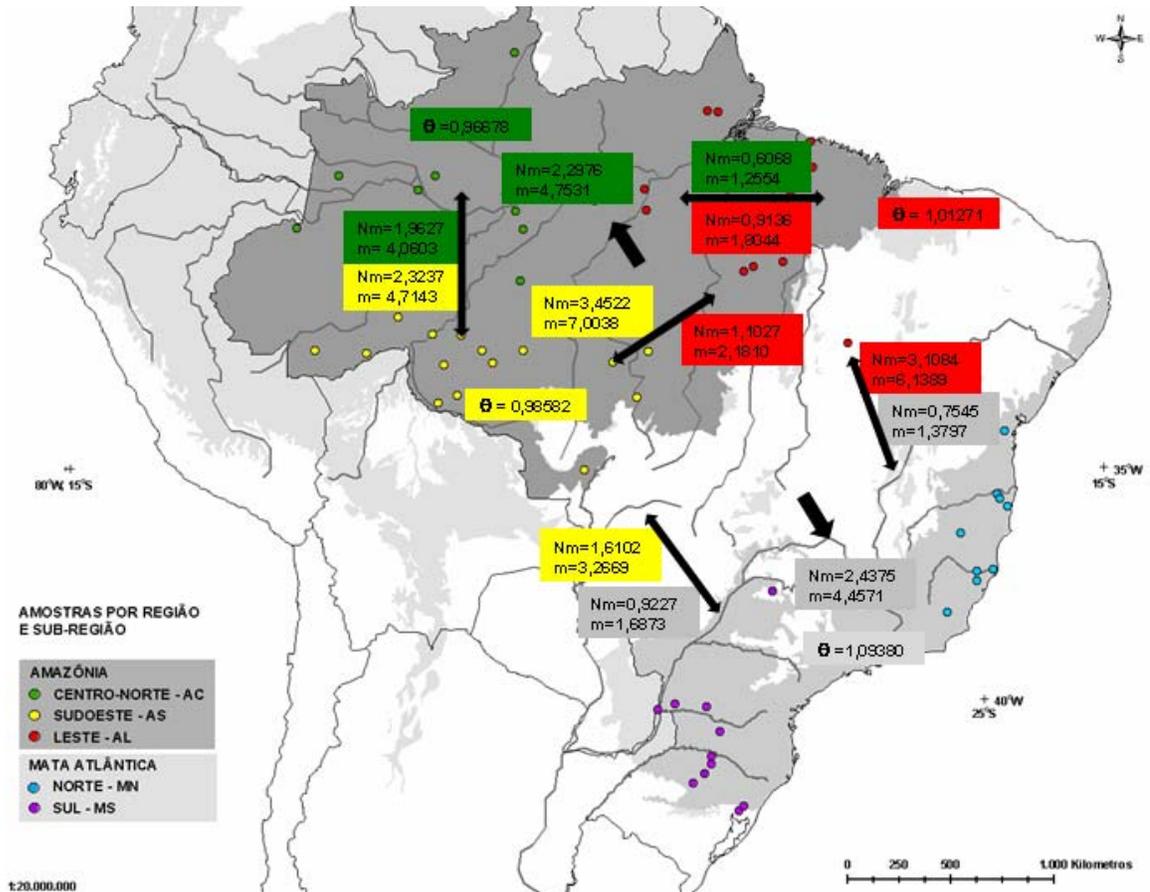


Figura 31. Taxa de migração (m), os valores de θ e o número de migrantes (Nm) direcional de gavião-real entre as regiões e sub-regiões com dados microssatélites. A migração se apresenta como sendo altamente dinâmica entre as sub-regiões da Amazônia e a Mata Atlântica, mas com pequenas quantidades de migrantes.

5.3. RAZÃO SEXUAL E DIPERSÃO PARCIAL ENTRE OS SEXOS

5.3.1. Razão sexual da amostragem

Das 166 amostras, 137 (82,5%) tiveram o sexo identificado geneticamente. Em todos tipos de origem das amostras a fêmea foi o sexo mais representado. Das 44

amostras da natureza, 34 tiveram o sexo identificado geneticamente, sendo que 26 (76,4%) foram fêmeas e oito (23,6%) machos. Das 60 amostras de museus, 43 tiveram o sexo identificado, sendo 31 (72,1%) foram fêmeas e 12 (27,9%) machos. Das 62 amostras de criadouros, 60 tiveram o sexo identificado, sendo que 38 (62,9%) foram fêmeas e 22 (37,1%) foram machos. Das 99 amostras da Amazônia, 84 tiveram o sexo identificado, 58 fêmeas (69%) e 26 machos (31%), com desvio significativo ($p = 0,00048$). Das 36 amostras da Mata Atlântica, 25 tiveram o sexo identificado, sendo 23 (92%) fêmeas e dois machos (8%), com desvio significativo ($p < 0,0001$). No total de amostras, 95 (69,3%) foram identificados geneticamente como fêmeas e 42 foram machos (30,7%), com desvio significativo ($p < 0,00001$). Assim, a razão sexual é aproximadamente 1 macho: 2,11 fêmeas na amostragem total, com desvio significativo do esperado 1:1.

5.3.2. Dispersão baseada no sexo

Na análise de F_{ST} par a par com dados de DNAmT, as fêmeas da Amazônia e Mata Atlântica apresentaram diferenciação genética significativa (Tabela 10). O Φ_{ST} entre machos da Amazônia e fêmeas da Amazônia também foi significativa (Tabela 10). Entretanto, o Φ_{ST} entre machos da Amazônia e fêmeas da Atlântica não foi significativo (Tabela 10).

Com os dados microssatélites nenhuma os valores de F_{ST} par a par não foram significativos. Entretanto, as fêmeas da Amazônia e Mata Atlântica apresentaram F_{ST} quase significativo ($p=0,01812+-0.0014$) após correção de Bonferroni (valores significativos $p<0,0167$).

Na análise de índice de aproximação (Ac) com dados de oitos locos microssatélites e amostragem da Amazônia (Figura 33, A.), os machos de gavião-real apresentaram a média de Ac mais baixa ($mAc=-0,143+-0,499$) que das fêmeas ($mAc=0,143+-0,449$) ($K=-12$; $p=0,44$). A variância de Ac dos machos ($vAc=5,341$) foi maior que das fêmeas ($vAc=4,327$), mas não foi significativa ($p > 0,05$). Com a adição do loco AA43 a análise, somando nove locos analisados, os machos também apresentaram mAc mais baixo ($mAc =-0,196+-0,483$) que as fêmeas ($mAc =0,196+-$

0,465) ($T=-12$; $p=0,46$) (Figura 33, B.). Com a adição do loco AA43 a variância de Ac dos machos ($vAc= 5,843$) foi maior que das fêmeas ($vAc= 4,403$), entretanto também não foi significativo ($p > 0,05$).

Tabela 10. Valores de Φ_{ST} e F_{ST} par a par com dados de 200pb da região controle DNAm (diagonal inferior) e microssatélites (diagonal superior) respectivamente entre os diferentes sexos e região.

Sexo Região (Amostras)	Machos da Amazônia	Fêmeas da Amazônia	Fêmeas da Mata Atlântica
Machos da Amazônia (19)	-	-0,00108	0,00813
Fêmeas da Amazônia (22)	0,12096*	-	0,01942
Fêmeas da Mata Atlântica (22)	0,05408	0,17883*	-

*Apresenta probabilidade significativa após a correção de Bonferroni ($p<0,0167$)

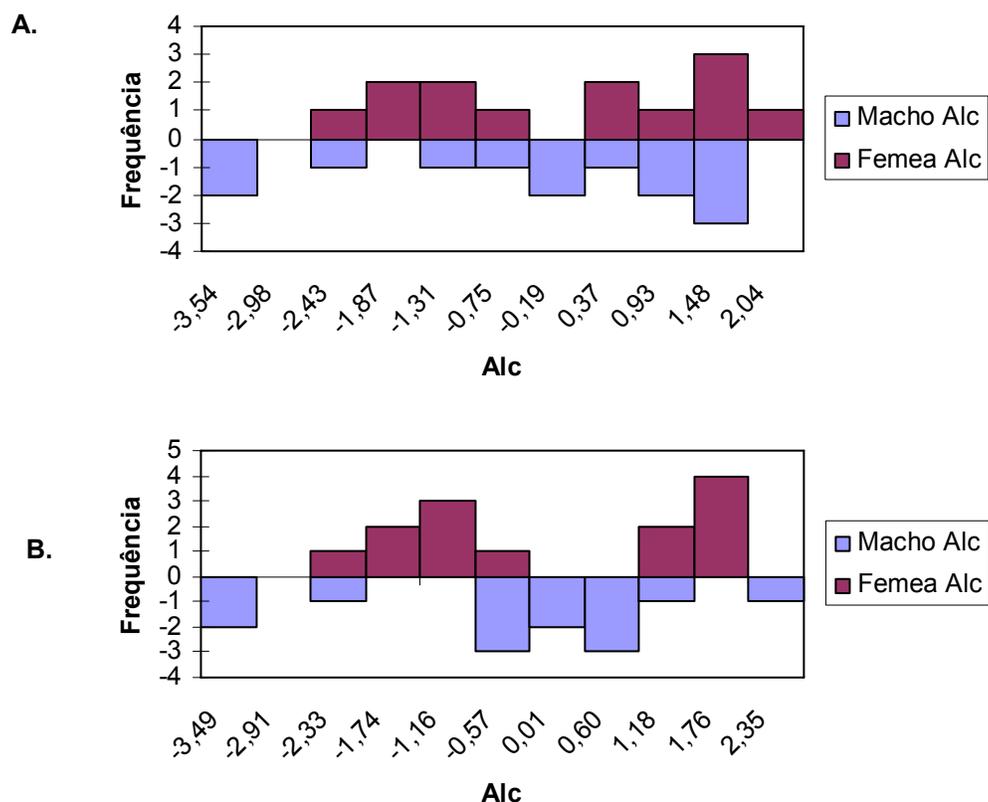


Figura 32. Distribuição da frequência do índice correto de relacionamento (Alc) indivíduos de gavião-real da Amazônia. A. Valores de Alc obtidos com oito locos; B. Valores de Alc obtidos com nove locos, incluindo o locus AA43.

5.4. DISTRIBUIÇÃO DA VARIABILIDADE E DESMATAMENTO

Na comparação de amostras de diferentes períodos e cenários da Mata Atlântica (1911-1953 e 1967-2008) e da Amazônia (Eixo Central e Arco do Desmatamento) respectivamente, o período de 1911-1953 apresentou os menores valores de índices de diversidade para o DNAmT (Tabela 11), somente quatro haplótipos foram detectados para esse período. Para os demais grupos os valores para os índices de diversidade de DNAmT são bastante similares. O teste exato de diferenciação populacional foi significativo para todas as comparações ($p < 0,008$) apontando diferenças nas frequências haplotípicas entre os grupos de amostras.

Com os oito locos microssatélites, a Mata Atlântica 1911-1953 apresentou os maiores valores de H_O e H_E , seguida pela Amazônia do Eixo Central (Tabela 11). Os valores de heterozigoidades para a Mata Atlântica 1967-2008 e Amazônia do Arco do desmatamento foram relativamente baixos e similares (Tabela 11). Comparando a heterozigoidade dos locos entre os dois períodos da Mata Atlântica, foi encontrado uma redução na H_O de 21% ($Z = -1,68$; $p = 0,09289$). A Amazônia Arco do Desmatamento apresentou 22%, 18% e 2,4% menor H_O que a Mata Atlântica 1911-1953 ($Z = 1,96$; $p = 0,04995$), Amazônia do Eixo Central ($Z = -1,40$; $p = 0,10974$) e Mata Atlântica 1967-2008 ($z = 0,84017$, $p = 0,4081$) respectivamente. A Mata Atlântica 1967-2008 apresentou 16,5% menor H_O que a Amazônia do Eixo Central ($Z = -1,40028$; $p = 0,1643$). A Amazônia do Eixo Central apresentou 4,7% menor H_O que a Mata Atlântica 1911-1953 ($Z = 0$; $p = 1$).

Uma tendência à diminuição da H_O ao longo dos anos foi detectada para a Mata Atlântica comparando todos os valores H_O encontrados nas amostras que possuem datas (Figura 32). A maior H_O encontrada foi 0,875 para uma amostra de 1953 do norte da Mata Atlântica (Estado do Espírito Santo). A menor H_O encontrada foi zero para uma amostra de 2006, da transição do Cerrado com o sul da Mata Atlântica.

A análise Φ_{ST} par a par revelou diferenças significativas com dados DNAmT para as comparações dos grupos de amostras de tempos da Mata Atlântica (1911-1953 e 1967-2008) com a Amazônia do Eixo Central (Tabela 12). Para os dados microssatélites a diferenciação não foi significativa nas comparações. Entretanto, entre

as amostras da Amazônia do Eixo Central com Mata Atlântica 1911-1953 o F_{ST} apresentou valor menor que na comparação com Mata Atlântica 1967-2008 (Tabela 12). Entretanto, o F_{ST} entre a Amazônia do Eixo Central e Mata Atlântica 1967-2008 foi quase significativa ($p=0,01505+0.0012$) após correção de Bonferroni (valor significativo $p<0,0086$).

Tabela 11. Valores de índices de diversidade genética com 200pb da região controle do DNAm e com nove locos microssatélites (Mst) para amostras de diferentes períodos de tempo e regiões. O número de haplótipos, diversidades haplotípicas (h) e nucleotídica (π) para os dados de DNAm e número de alelos (k), riqueza de alelos (AR) e as heterozigosidades observadas (H_o) e esperadas (H_E) para os dados de microssatélites.

Índices		Mata Atlântica 1911-1953	Mata Atlântica 1967 - 2008	Amazônia Eixo Central	Amazônia Arco do Desmatamento
Amostras DNAm\Mst		15\14	14\15	23\23	27\28
Haplótipos		4	7	7	8
DNAm	H	0,3714	0,7582	0,7747	0,6838
	π	0,002476	0,006868	0,008735	0,008376
	K	32	32	40	38
Microssatélites	AR	4,000	4,000	5,000	4,750
	H_o	0,53587	0,42619	0,51041	0,41595
	H_E	0,55413	0,44569	0,53313	0,44818

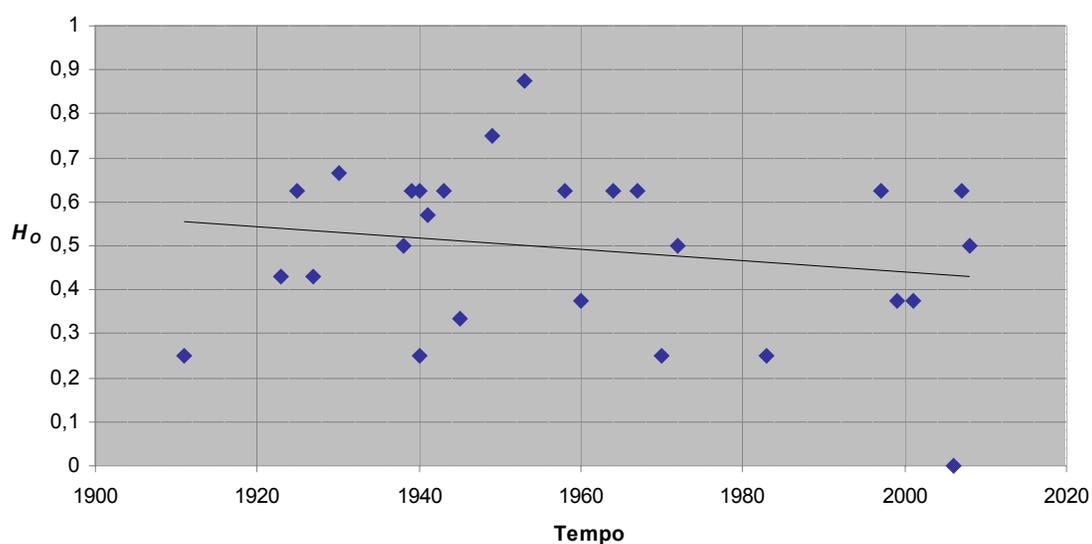


Figura 33. Relação com tendência na diminuição da heterozigosidade observada (H_o) do gavião-real ao longo do tempo na Mata Atlântica.

Tabela 12. Valores de Φ_{ST} e F_{ST} par a par com dados de 200pb da região controle DNAm_t (diagonal inferior) e microssatélites (diagonal superior) respectivamente entre as diferentes regiões e/ou períodos de tempo.

Região ou Período Tempo (DNAm _t \Mst)	Mata Atlântica 1911-1963	Mata Atlântica 1967 – 2008	Amazônia Eixo Central	Amazônia Arco do Desmatamento
Mata Atlântica 1911-1953 (15\14)	-	0,02368	0,00090	0,02022
Mata Atlântica 1967 – 2008 (14\15)	-0,01460	-	0,03444	0,00359
Amazônia Eixo Central (23\23)	0,18250*	0,15202*	-	0,02096
Amazônia Arco do Desmatamento (27\28)	0,07127	0,06702	-0,00708	-

*Valores de probabilidade significativa após a correção de Bonferroni ($p < 0,0083$).

Nas análises de redução populacional recente no programa Bottleneck, os locos microssatélites se apresentaram com déficit de heterozigotos para Amazônia Eixo Central e Amazônia Arco do Desmatamento para o modelo evolutivo SMM ($p = 0,01953$ e $p = 0,01367$) respectivamente, sugerindo expansão populacional ou introdução de alelos por migração para ambas amostragens se os microssatélites evoluem conforme o modelo SMM. Para as amostragens da Mata Atlântica 1911-1953 e Mata Atlântica 1967-2008 os resultados se apresentaram em equilíbrio mutação deriva para todos os três modelos evolutivos (IAM, SMM e TPM), sugerindo que a população está em equilíbrio na Mata Atlântica em ambos períodos de tempo

No teste de M Value, para o período de 1911-1953 o valor médio de M foi 0,918452 (99,9% de taxa de equilíbrio) e para o período de 1967-2008 o valor médio de M foi 0,880556 (99,5% de taxa de equilíbrio). Para Amazônia Eixo Central, o M foi 0,958333 (99,99% de taxa de equilíbrio) para a Amazônia Arco Desmatamento, o M foi 0,87381 (98,66% de taxa de equilíbrio). Esses resultados de M sugerem estabilidade populacional em todas as situações.

6. DISCUSSÃO

A análise conjunta dos dados genéticos da região controle do DNAm e microssatélites nuclear em uma amostragem extensiva da espécie, com sexo determinado geneticamente, permitiu caracterizar a composição genética atual e histórica do gavião-real em sua distribuição no Brasil. Os resultados da diferenciação genética, encenações demográficas e padrões genéticos na geografia foram discutidos para que a informação possa ser aplicada na conservação da espécie.

6.1. DIVERSIDADE GENÉTICA

Os valores médios dos índices de diversidade genética inferidos a partir da região controle do DNAm ($h = 0,688600 \pm 0,039900$; $\pi = 0,007962 \pm 0,005266$) com a amostragem do gavião-real do Brasil são relativamente baixos, como também tem sido reportado para outras espécies de Falconiformes. A baixa diversidade com base no DNAm geralmente tem sido reportada nos Falconiformes como associada com recente falhas na demografia, por exemplo, *Gypaetus barbatus* ($h = 0,9320 \pm 0,0120$; $\pi=0,02920 \pm 0,0153$; Godoy *et al.*, 2004), *Haliaeetus albicilla* ($h = 0,746$; $\pi= 0,00680 \pm 0,00012$; Hailer *et al.*, 2007) e a ameaçada *A. heliaca* ($h = 0,7790 \pm 0,0420$; $\pi= 0,00548 \pm 0,00068$) (Martinez-Cruz *et al.*, 2004). O longo período de redução populacional detectado para o gavião-real antes da expansão pode explicar a baixa diversidade encontrada com base no DNAm, a diversidade genética pode ter sido reduzida na pequena população pela deriva genética.

A diversidade genética do gavião-real com base nas heterozigosidades dos marcadores microssatélites ($H_E = 0,47772$; $H_O = 0,45660$; $AR = 6,000$) foi similar a das ameaçadas *A. adalberti* ($H_E = 0,549$; $H_O = 0,516$; $AR = 4,881$; Martínez-Cruz *et al.*, 2004) (*Wicoxon test*: $Z = 0,28$; $p=0,779$) e da *A. heliaca* ($H_E = 0,627$; $H_O = 0,563$; $AR = 5,211$; Martínez-Cruz *et al.*, 2004) ($Z = 1,12$; $p = 0,263$). Entretanto, valores de diversidade genética também similares são reportados para outros Falconiformes não

ameaçados, (Nesje *et al.*, 2000b; Kretzmann *et al.*, 2003; Rudnick *et al.*, 2005). Por outro lado, a H_E (índice de diversidade genética menos sensível a diferenças no tamanho amostral; Nei, 1978) do gavião-real está entre as médias de H_E encontradas para aves ameaçadas classificadas como “vulnerável” ($H_E = 0,572$), “em perigo” ($H_E = 0,406$) e “criticamente em perigo” ($H_E = 0,414$) na compilação de dados realizada por Evans & Sheldon (2008), incluindo accipitrídeos. A baixa diversidade dos microsatélites também é reportada nos estudos onde comparam o uso primers heterólogos com primers autólogos. Rachlow & Hicks (2004) compararam primers heterólogos e autólogos em várias espécies de mamíferos que a H_E foi em média 10% menor usando primers heterólogos. Como foram utilizados primers heterólogos para o gavião-real é possível que a diversidade genética foi subestimada. Entretanto, a H_E entorno de 10% maior que a encontrada para o gavião-real ainda está entre as médias de H_E de aves ameaçadas. Os primers heterólogos são comumente utilizados em espécies ameaçadas para diminuir os custos e acelerar os resultados, mas podem gerar sub-estimativas de diversidade genética para a comparação com espécies não ameaçadas. Entretanto, mesmo excluindo os dados de espécie com dados de primers heterólogos, Simon & Sheldon (2008) encontraram significativa redução da média H_E das aves com o aumento do risco de extinção (categorias de ameaças).

A baixa diversidade genética encontrada do gavião-real sugere que no nível genético essa espécie enfrenta condições de vulnerabilidade semelhantes à de aves ameaçadas, incluindo accipitrídeos. A diversidade genética é proporcional ao tamanho populacional, inversamente proporcional à endogamia, requerida para as populações e espécies se adaptarem as mudanças ambientais e reflete seu potencial evolutivo (Frankham *et al.*, 2002), conseqüentemente, a baixa diversidade genética é vista como um marcador de risco de extinção (Spielman *et al.*, 2004).

6.2. DISTRIBUIÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA

A hipótese de que não existem populações diferenciadas na Mata Atlântica não pode ser rejeitada. Os resultados dos marcadores moleculares mostram uma

população panmítica para a Mata Atlântica, apenas com uma tendência a maior diversidade genética em termos de diversidades haplotípicas, nucleotídicas (DNAmt) e heterozigosidades (microsatélites) no norte dessa região. Mesmo nas análises de NCPA e Bayesiana do Structure, para DNAmt e microsatélites respectivamente, nenhum padrão de populações diferenciadas para a Mata Atlântica é evidenciado. Assim, os registros relatados como possíveis movimentos sazonais do gavião-real no sul da Mata Atlântica podem ser de indivíduos machos ou fêmeas se dispersando para o norte da região, em vice versa, ou até mesmo movimentos relativamente curtos de indivíduos residentes.

Como previsto, as sub-regiões da Amazônia também não apresentaram diferenciação genética. Entretanto, os grupos não foram divididos para testar hipóteses que têm sido utilizadas para explicar a diversificação de populações e espécies na Amazônia, como por exemplo, refúgios pleistocênicos (Haffer, 1997), rios como barreiras (Ayres & Clutton-Brock, 1992) e transgressão marinha com efeito nos níveis dos rios criando refúgios de terra durante as flutuações climáticas do (Frailey *et al.*, 1988; Frailey, 2002). Como o gavião-real tem grande potencial de dispersão e a Amazônia moderna possui relativamente uma grande continuidade florestal com registros bem distribuídos do gavião-real, as barreiras existentes para o fluxo gênico relatados para algumas populações de espécies amazônicas, mesmo de aves (e.g. Aleixo, 2004), possivelmente podem ser transpostas pelo gavião-real e os eventuais sinais de divisão populacional que tenham ocorrido no passado para essa espécie podem ter sido difundidos na paisagem Amazônica. Testes realizados previamente mostraram que rio Amazonas não é uma barreira ao fluxo gênico do gavião-real entre o norte e o sul da Amazônia (resultados não apresentados).

As análises que não utilizaram agrupamentos prévios para teste de definição de estrutura populacional, a NCPA e Structure para DNAmt e microsatélites (nove locos), respectivamente, apresentaram grupos dentro da Amazônia que podem estar relacionados a populações ancestrais com distribuição de acordo com os hipotéticos cenários de diversificação de populações da Amazônia. Entretanto, se no passado haviam populações distintas na Amazônia, hoje encontram-se sobreposta e misturadas

como mostrado através das análises de distribuição haplótipos e clados de DNAm_t e o alto grau de mistura dos genótipos dos nove locos microssatélites dos grupos da Amazônia. Entretanto, seria interessante no futuro testar os cenários de hipóteses de diversificação existentes. No momento, o número e distribuição das amostras e o número de marcadores microssatélites empregados no presente estudo não são adequados para os testes. A princípio, o foco principal deste trabalho foi investigar descontinuidade parcial da distribuição do gavião-real entre a Amazônia e a Mata Atlântica. Os grupos definidos previamente contribuíram para essa investigação. A discussão sobre os resultados dessa abordagem segue separada por tipo de marcador molecular.

6.2.1. DNAm_t

As sub-regiões da Amazônia são diferenciadas da Mata Atlântica, mas a composição dos valores de Φ_{ST} sugere que a distribuição da variabilidade genética na geografia seja contínua, sendo maior quanto maior for à distância geográfica. De fato, modelos de isolamento com base na distância foram suportados pelo teste de Mantel. Os modelos testados com significativa correlação sugerem que o isolamento por distância para o gavião-real seja de acordo com as feições da paisagem, onde a conexão para o fluxo gênico do gavião-real entre a Amazônia e a Mata Atlântica ocorre pelo leste da Amazônia. No leste da Amazônia existem rios, como rio Tocantins e Xingu, formando vales de florestas que conecta essa região ao centro do Brasil, que por sua vez também é conectado à Mata Atlântica pelos rios, como Paraguai, São Francisco e Doce. Essas conexões devem ser importantes para o fluxo gênico do gavião-real.

O estudo realizado por Lerner (2007) testou a diferenciação genética para o gavião-real comparando três sub-grupos América do Sul (Colômbia, Equador e Peru; Venezuela, Suriname e Guayana; e Brasil e Bolívia) e dois da América Central (Panamá; e México, Costa Rica e Nicarágua). Entre os sub-grupos dentro América do Sul e entre sub-grupos da América do Sul e Central, a autora encontrou valores de Φ_{ST} significativo. Segundo Lerner (2007), os valores que encontrou para o Φ_{ST} sugerem um

padrão de isolamento por distância, pois o Φ_{ST} foi maior entre os grupos mais distantes. Essa relação da distância geográfica e genética é concordante com os resultados do presente estudo. Entretanto, Lerner (2007) não realizou um teste para verificar se a correlação entre distâncias genéticas e geográficas foi significativa.

Na distribuição da variabilidade genética observada sob a ótica filogeográfica (NCPA), o haplótipo ancestral comum mais recente (Id 1; Figura 18) foi altamente freqüente e bem distribuído em toda Mata Atlântica e Amazônia brasileira, chegando até o Peru. A alta freqüência desse haplótipo na Mata Atlântica e no leste da Amazônia sugere que muito provavelmente esse haplótipo tenha surgido em uma dessas regiões e sugerem também uma alta ligação entre essas regiões. O clado (clado 1-1; Figura 18) e seus derivados (clado 1-3, 1-6 e 1-7; Figura 18) possuem grandes distâncias geográficas e poucos passos mutacionais entre eles. Esses cladogramas em conjunto (clado 2-2; Figura 18) atingiram desde o sul da América do Sul até a América Central com perfil significativo de expansão contígua da distribuição geográfica. Dois cladogramas de nível 2 (clado 2-1 e clado 2-1 e clado 2-3; Figura 18) surgiram um do outro respectivamente, exclusivamente para Amazônia, a partir do clado 2-2 (Figura 18). Os haplótipos desses cladogramas possuem maior freqüência no centro e oeste da Amazônia, sugerindo uma forte expansão populacional na região. Os dois haplótipos encontrados na América Central (Id 15 e Id18; Figura 18) são derivados de um haplótipo (id 16; Figura 18) encontrado na América do Sul (Colômbia, Equador, Peru e norte da Mata Atlântica), sugerindo que os mesmos tenham surgido após colonização da região a partir da expansão iniciada no sudoeste-leste do Brasil e seguindo pela Amazônia Andina até a América Central.

As informações sobre a distribuição da variabilidade genética fora do Brasil no presente estudo foram coletadas de 17 diferentes seqüências diferentes depositadas no GenBank. As seqüências não possuem informação sobre a freqüência relativa dos haplótipos nos países, o que não representa adequadamente a distribuição da variabilidade genética para análise de NCPA e suas interpretações. Entretanto, as seqüências do GenBank foram substituídas por 56 seqüências de DNAm reconstruídas a partir da publicação de Lerner (2007) e analisadas na NCPA (dados não apresentados). O resultado foi similar ao obtido com as seqüências do GenBank,

evidenciando no cladograma total a expansão contígua da distribuição do gavião-real e a colonização da América Central a partir da expansão. A expansão sinalizada pela NCPA foi concordante com os sinais de expansão populacional de outras análises, e sugere que o período após a última glaciação tenha sido crucial para definir distribuição atual da variabilidade genética do gavião-real (veja discussão mais adiante).

6.2.2. Microssatélites

Com os dados de microssatélites, não foi encontrada diferenciação genética entre as sub-regiões da Amazônia a Mata Atlântica em termos de F_{ST} . Esse resultado foi divergente do encontrado para DNAmT. Considerando que os marcadores microssatélites são mais sensíveis para detectar estrutura de população que o marcador o DNAmT, esse resultado foi intrigante. Entretanto, considerando a possibilidade de taxas desiguais de dispersão entre machos e fêmeas, o resultado pode ser justificado. A diferença nos resultados com marcadores microssatélites e DNAmT foi evidenciada em muitas análises (veja a discussões mais adiante).

O teste de Mantel quase significativo para as medidas de distância geográfica que consideram a conexão da Mata Atlântica pelo leste da Amazônia, sugerem uma tendência do fluxo gênico nesse sentido. Esse resultado, apesar de fraco, corrobora com o encontrado para DNAmT.

Com oito locos microssatélites, a análise Bayesiana no programa Structure sugere que a distribuição da variabilidade genética do gavião-real seja panmítica. Essa análise tem dificuldades em definir populações quando as mesmas possuem distribuição genética contínua ou discreta, como por isolamento por distância, além de necessitar de muitas amostras para um resultado consistente (Allendorf & Luikart, 2007). Entretanto, ao incluir o loco com desvio de EHW para Amazônia e para a amostragem total, mas em equilíbrio para Mata Atlântica, três populações com alto nível de mistura são sugeridas. A variância para $K = 3$ foi alta e explica somente 1,7% melhor do que os dados comparado a $K = 1$, o que sugere que o resultado pode ser um artefato da análise e que estatisticamente uma única população seria a melhor explicação para os dados. A maior média de probabilidade para $K = 3$, somente foi evidente para as 148

amostras. Para performances retirando as 30 amostras sem conhecimento de origem geográfica (dados não apresentados), o resultado aponta melhor probabilidade média para $K = 1$. Assim, a presença do loco AA43 e maior quantidade de amostras foi a razão para encontrar três grupos com maior média de probabilidade para explicar os dados. Entretanto, esses grupos mostraram um padrão de distribuição que fazem sentido na geografia. Um dos grupos foi constituído predominantemente de amostras da Mata Atlântica. Os outros dois grupos foram constituídos predominantemente de amostras da Amazônia, sendo que um dos grupos mostra um padrão de distribuição que lembra o clado 2-2 da NCPA para dados de DNAm (considerando somente as amostras da Amazônia) e a distribuição do outro grupo lembra a distribuição dos clados 2-1 e 2-3. Isso sugere que o desvio do EHW encontrado para o loco AA43 para Amazônia seja devido à mistura de populações diferentes (efeito *Wahlund*) e/ou ao loco estar ligado aos cromossomos sexuais sob efeito da dispersão desigual entre os sexos. O padrão mais intrigante do resultado encontrado promovido pelo loco AA43 foi mostrar que as amostras com alto nível de mistura $q < 0,5$ para todos os grupos concentram-se no leste da Amazônia, sugerindo que o fluxo gênico entre os grupos seja mais intenso nessa região. Esse resultado é concordante com os outros resultados que apontaram a conexão para o fluxo gênico entre a Amazônia e Mata Atlântica ocorrendo pelo leste da Amazônia.

6.3. DEMOGRAFIA HISTÓRICA

6.3.1. DNAm

Todas as análises convencionais detectaram sinais que podem ser interpretados como expansão populacional para o gavião-real na Amazônia e Mata Atlântica, exceto o teste D de Tajima. O teste de D de Tajima é tomado como pouco sensível, sendo menos sensível que o teste F_u (Fu, 1997), por exemplo, isso explica seu resultado. Entretanto, os sinais de dinâmica populacional do gavião-real devem ser interpretados para o passado da espécie, uma vez que estão relacionados ao equilíbrio mutação-deriva na variabilidade genética das amostras datadas de 1909 a 2008. O tempo de

ação antrópica intenso sobre a natureza (aproximadamente 40 anos para a Amazônia e 100 para Mata Atlântica), mesmo sendo intenso, é provável ser curto para causar um efeito no sinal genético populacional que sobreponha o sinal genético do passado nas amostras de museu.

Existe um problema em converter os parâmetros obtidos das análises de coalescência em tempo absoluto e tamanho efetivo populacional. Neste estudo, foi assumido uma taxa de mutação para a região controle do DNAm de 7,23% por milhão de anos calibrada por Drovetski (2003) para uma sub-família de ave distante filogeneticamente da família Accipitridae. Dessa forma, essa taxa de mutação pode representar uma estimativa inadequada para o gavião-real. Quando uma taxa de evolução molecular baixa é utilizada para estimar eventos recentes, o evento pode ser sub-estimado (Ho *et al.*, 2005). Segundo Quinn (1992), de maneira geral, a taxa de evolução da região controle do DNAm é 10,4 vezes menor que a do genoma inteiro do DNAm, isso significa ~20% por milhão de anos. Essa taxa quando utilizada para converter os valores dos parâmetros encontrados, diminuem as estimativas. O tempo de divergência entre as populações de gavião-real da Amazônia e Mata Atlântica que seria a aproximadamente 9.000 ou 77.000 anos passa para 3.000 ou 28.000 anos, por exemplo. Por outro lado, a taxa de evolução molecular é mais lenta em espécie com longo tempo de geração (Drake *et al.*, 1998), assim, a taxa de mutação da região controle do DNAm do gavião-real pode ser baixa. Se for mais baixa que 7,23%, elevariam as estimativas convertidas. Por exemplo, utilizando a taxa de 4% encontrada recentemente para uma outra família de aves (Idaghdour *et al.*, 2004), o tempo de divergência entre as populações de gavião-real da Amazônia e Mata Atlântica seria aproximadamente há 17.000 ou 140.000 anos. Dentro da distribuição de taxas tidas como plausíveis (5 a 20%; Brito, 2005), a taxa de Drovetski (2003) é relativamente baixa, mas para Accipitridae ainda pode ser alta. Como não existe nenhuma calibração para Accipitridae, a taxa de Drovetski (2003) foi tomada com um ponto de partida e as estimativas poderão ser revista no futuro quando houver uma taxa calibrada adequada para Accipitridae. Entretanto, isso não diminui o valor da análise no momento, mas exige cuidados na interpretação biológica.

Hey (2005) sugere, para análises de IMA, que quando ocorrem estimativas de divergência com um pico menor apresentando uma elevada densidade de valores de probabilidade e um maior com variância maior de probabilidades, o pico menor se encaixa melhor com o modelo de expansão populacional. Assim, para os dados apresentados aqui, a estimativa de divergência de 9.898 anos pode ser mais adequada.

A análise Bayesiana de coalescência do programa Beast mostrou uma forte dinâmica histórica no tamanho populacional do gavião-real, onde a espécie passou por um longo tempo com baixo número populacional e expandiu subitamente (Figura 26). Aproximadamente no mesmo tempo do início da expansão populacional, ocorre a separação das duas populações, Amazônia e Mata Atlântica, conforme mostra os resultados das análises de máxima verossimilhança de IMA, no primeiro pico do gráfico (Figura 27). Muito provavelmente a dinâmica populacional do gavião-real detectada por essas análises está associada às condições de floresta, uma vez que sua ocorrência está relacionada às florestas úmidas (veja seção 2). Os períodos glaciais e interglaciais do Pleistoceno causaram um forte impacto no clima e conseqüentemente na vegetação da América do Sul (Ledru *et al.*, 1996; Behling & Lichte, 1997; Peterson & Nyári, 2007). A retração e expansão da floresta foi um processo periódico no Pleistoceno, alternando conforme o período glacial ou interglacial, respectivamente. O registro paleológico do Quaternário mostra que entre 33.000 e 25.000 anos atrás, a região central do Brasil era mais úmida que hoje e esteve coberta por florestas tropicais (Ledru, 1993), e durante o último período glacial essas florestas foram substituídas por vegetação aberta (Prado & Gibbs, 1993). Para a América do Sul o último período glacial é estimado ter sido entre 27.000 a 12.000 anos atrás e vários autores sugerem que grandes mudanças que diminuiriam a vegetação realmente ocorreram nesse período (Prado & Gibbs, 1993; Behling & Negrelle, 2001). O longo tempo que o gavião-real passou com baixo tamanho populacional ocorre no último período glacial, então pode ser resultado justamente da retração da floresta nesse período. Terminado o último período glacial, quando a floresta torna a expandir, ocorre o início do evento de expansão e de separação das populações de gavião-real (Amazônia e Mata Atlântica). Assim, os resultados são bem explicados pelo cenário pleistocênico e concordantes com a análise de NCPA. Os

resultados sugerem que o último período glacial foi severo sobre o gavião-real, a população antes da separação e da expansão populacional era extremamente menor do que em tempos posteriores. Uma taxa de evolução para a região controle do DNAm entre 4% a 6% deixa o longo período de redução populacional estimado calibrado com o final da última glaciação (aproximadamente 17.000 anos, com relatado acima), sugerindo que a taxa de evolução utilizada para esse segmento de DNA no gavião-real não seja tão discrepante.

No trabalho de Lerner 2007, foi estimado o tempo de divergência para o gavião-real entre a América Central e Sul como sendo de 24.700 anos. A autora detectou expansão populacional do gavião-real na América do Sul e estimou que esse evento tenha ocorrido a 60.000 anos, antes da última glaciação. Lerner (2007), também estimou os tamanhos efetivos das América Central e Sul como sendo de 9,4 fêmeas e 111,187 fêmeas respectivamente. Esses resultados de expansão e tamanho populacional foram discordantes do encontrado no presente estudo para a América do Sul. Entretanto, a autora utilizou apenas três amostras do Brasil, essa baixa amostragem pode ter diminuído o sinal para expansão e tamanho populacional, pois no Brasil a distribuição da espécie é mais ampla.

A análise de IMA não é uma análise para detecção de expansão populacional. Entretanto, os resultados de IMA mostram que depois da separação o tamanho da população da Amazônia e Mata Atlântica somam mais de cinco vezes o tamanho da população ancestral. Na análise do Beast, para teste de expansão, o tamanho populacional obtido após a expansão populacional também é próximo de cinco vezes maior que antes da expansão. Assim, esses resultados mostram-se relativamente concordantes. Os valores de tamanho populacional das duas análises são diferentes. Na análise do Beast, o tamanho de N_e da Amazônia e Mata Atlântica foram maiores que os estimados por IMA para após a separação populacional. Entretanto, comparando a soma das estimativas de N_e encontradas na análise de IMA para a Amazônia e Mata Atlântica com o valor obtido por Beast para amostragem total as diferenças são menos discrepantes. Uma possível explicação para as diferenças nos resultados é o fato dos dois grupos definidos previamente para as análises (Mata Atlântica e Amazônia)

constituírem duas populações parcialmente sobreposta, o que pode levar a superestimativas com valores menos precisos do tamanho efetivo da população. Nesse caso, valores mais precisos estariam entre a média e a soma do tamanho das duas populações.

O valor assumido para o intervalo de geração (15 anos), também influenciam as estimativas, quanto maior o intervalo, menor o número efetivo populacional. O tempo de geração do gavião-real pode ser maior que os 16 a 17 anos estimados para outras águias, como a *A. adalberti*, *A. heliaca* e *H. albicilla* (e.g. Ferrer & Calderón, 1990; Hailer *et al.*, 2006). Um tempo de geração mais alto diminui as estimativas de número efetivo populacional.

As estimativas de tamanho efetivo populacional de fêmeas (N_{ef}) da análise de Migrate (682,5 e 181,5 para a Amazônia e a Mata Atlântica, respectivamente) não assumem o tempo de geração e foram quase três vezes mais baixas que o obtido pelas análises de IMA. Entretanto, o N_{ef} da Amazônia é aproximadamente duas vezes maior que da Mata Atlântica em ambas as análises. Mais uma vez, as análises de coalescência se mostram concordantes, mas com escalas diferentes. Uma possível explicação, além da sobreposição de populações, é que IMA traz estimativas para após a separação e Migrate traz uma estimativa média histórica. Entretanto, deve ser considerado que os dados são de um século de amostragem (1904 a 2008) e somente se a população se manteve constante no último século o N_{ef} estimado por Migrate seria atual, o que obviamente não ocorreu. Na análise do Beast, por exemplo, foi apontado um leve declínio populacional recente, o que pode estar relacionado com a ação antrópica direta e indireta sobre a espécie nos últimos séculos.

O número efetivo populacional é observado como sendo 10% do número do tamanho do censo de indivíduos adultos encontrados na população (Frankham *et al.*, 2002). Se a razão sexual da população for de um macho para uma fêmea, o N_e é aproximadamente igual a duas vezes o N_{ef} estimado pelos dados de DNAm. Considerando as estimativas de N_{ef} obtidas pela análise de Migrate, para a Amazônia o N_e seria de 1.365 indivíduos, convertidos em tamanho do censo existiriam 13.650 indivíduos adultos, o que corresponde a 6.825 casais. Assumindo ainda que um casal

necessite de 100Km^2 de área de floresta (Thiollay, 1989), essa população precisaria de $6,825 \times 10^5 \text{ Km}^2$ de área de floresta na Amazônia. Seguindo o mesmo raciocínio, com um histórico N_e de 363, na Mata Atlântica existiriam 3.630 indivíduos, ou seja, 1.815 casais. Essa população necessitaria de $1,815 \times 10^5 \text{ km}^2$ de área de floresta na Mata Atlântica. Essas estimativas seriam bem comportadas pela área original de floresta da Amazônia ($5 \times 10^6 \text{ km}^2$; Fearnside, 2005; Fearnside, 2008) e Mata Atlântica ($1,36 \times 10^6 \text{ km}^2$; Myers *et al.*, 2000), respectivamente. As conversões das estimativas de IMa para Amazônia e Mata Atlântica também produzem valores de áreas requeridas ($1,845 \times 10^6$ e $5,4 \times 10^5 \text{ km}^2$ para Amazônia e Mata Atlântica, respectivamente) que seriam comportados nas áreas originais da regiões. A estimativa de N_{ef} igual a 4.760 indivíduos obtida na análise do Beast para a toda a amostragem, a área requerida seria igual a $4,76 \times 10^6 \text{ km}^2$ e seria bem comportada pela estimativa de distribuição global do gavião-real ($7,4 \times 10^6 \text{ km}^2$; BirdLife, 2008). Entretanto, em todos os casos o número de indivíduos é menor que a capacidade das áreas.

Somando as áreas da Amazônia e Mata Atlântica ($6,36 \times 10^6 \text{ km}^2$) e dividindo pelo soma das estimativas das populações de gavião-real dessas regiões, derivadas da análise de Migrate ($N_{ef} = 864$; $N_e = 1.728$; e $N = 17.280$), a taxa histórica de indivíduos por área seria de um casal por 736 Km^2 . Essa taxa também pode ser interpretada como sendo uma fêmea (ou ninho) por 736 Km^2 , caso o sistema de reprodução gavião-real não seja monogâmico.

Se a razão sexual for de um macho para uma fêmea de gavião-real, haveria aproximadamente 17.280 indivíduos históricos. Como existem indícios que a razão sexual seja desviada a favor das fêmeas (veja abaixo), o tamanho populacional histórico pode ser menor. Se a razão sexual for de um macho para duas fêmeas, o tamanho da população seria de 12.116 indivíduos. Considerando ambas as estimativas e que a população do gavião-real reduziu na mesma proporção da perda de floresta pela ação antrópica, o tamanho populacional atual seria inferior a 10.000 indivíduos. Com um tamanho populacional menor que 10.000 indivíduos e em declínio de mais de 10% em três gerações (45 anos; considerando tempo de geração de 15 anos para o

gavião-real), a espécie poderia ser considerada ameaçada de acordo com o critério C da IUCN (2001) (veja Tabela 1).

6.3.2. Microssatélites

As análises de dinâmica das heterozigosidades e frequência dos alelos (análises do Bottleneck e da taxa M , respectivamente) não detectaram redução populacional. Entretanto, o significativo déficit de heterozigotos em relação ao esperado no equilíbrio mutação-deriva assumindo o modelo evolutivo SMM (*stepwise mutation*) para os locos microssatélites para a amostragem total, especialmente a amostragem da Amazônia, sugere expansão populacional ou introdução de alelos por migração. Há uma grande controvérsia de qual modelo evolutivo seria adequado para explicar a evolução dos microssatélites. Entretanto, aparentemente o SMM é padrão que domina o aparecimento de novos alelos em alguns organismos modelos (Eisen, 1999; Ellegren, 2004). O resultado encontrado com o uso desse modelo para os microssatélites, sugerindo expansão populacional para o gavião-real, foi concordante com outros resultados encontrados com dados de DNAm.

Segundo Garza & Williamson (2001), as altas taxa de M e diversidade alélica são indicativos de populações que tenham passado longo tempo com tamanho populacional reduzido em contraste com populações que tenham reduzido de tamanho recentemente. Esse indicativo se aplica ao gavião-real, uma vez que as taxas M para todos os casos foram altas e sua diversidade alélica é maior que a de águias que possuem também alta diversidade alélica (e.g. *Aquila adalberti* e *A. heliaca*; Martínez-Cruz *et al.*, 2004). Esses resultados dos microssatélites trazem inferências que se mostram concordantes com os encontrados para com dados DNAm.

As estimativas de N_e da análise de Migrate a partir dos microssatélites são aproximadamente iguais para a Amazônia e a Mata Atlântica. Como não existe estrutura marcante entre as populações da Amazônia e Mata Atlântica, ambas as estimativas correspondem ao N_e da mesma população. O tamanho efetivo da população seria, portanto, aproximadamente a média entre os valores de θ entre a Amazônia e

Mata Atlântica, o que corresponde a $\theta = 0,9941$ e convertido para N_e corresponde a 497 indivíduos.

Geralmente, espera-se que o N_e obtido através dos microssatélites seja aproximadamente duas vezes maior que o N_{ef} obtido com dados DNAMt (soma da população da Amazônia e Mata Atlântica) (Avice, 2004). Entretanto, o tamanho efetivo populacional obtido através dos microssatélites (média entre a Mata Atlântica e Amazônia) foi aproximadamente 1,5 vezes menor que o N_{ef} obtido com dados DNAMt (soma da população da Amazônia e Mata Atlântica). Existem dois fatores que podem estar envolvidos nessa discrepância. Um dos fatores é a taxa de mutação assumida para os microssatélites, como não existe nenhuma taxa de mutação calibrada para a família Accipitridae foi utilizada uma taxa média geral ($\mu = 5 \times 10^{-4}$; di Rienzo *et al.*, 1994). Entretanto, se a taxa de mutação for uma ordem mais lenta (10^{-5}) a estimativa de tamanho da população seria uma ordem maior, assim, o resultado seria extremamente maior que o encontrado para N_{ef} dos dados de DNAMt.

Outro fator que pode ter causado a discrepância de N_e obtidos dos diferentes marcadores foi assumir que o N_e do sistema haplóide de herança uniparental é quatro vezes menor que o sistema diplóide de herança bi-parental, como de maneira geral tem sido proposto (e.g. Seielstad *et al.*, 1998). Chesses & Baker (1996), pontuaram que essa consideração é geralmente errada para populações na natureza devido à violação da reprodução ao acaso que é assumido no modelo. Assim, o N_e do DNAMt (haplóide) pode não ser menor que o equivalente para microssatélites (diplóides). O tamanho efetivo da população depende da distribuição da diversidade genética entre as subpopulações, que por sua vez é uma função do sistema reprodutivo da espécie (por exemplo: poligamia vs monogamia; tamanho do grupo reprodutivo), do número de descendentes sobreviventes e do relativo nível de dispersão parcial por sexo (Chesses & Baker, 1996; Prugnolle & Meeus, 2002). A diferença nos resultados de distância genética com base no F_{ST} entre os marcadores microssatélites e de DNAMt encontrados para o gavião-real sugerem que as fêmeas dispersam menos que machos. Outras análises também apresentam uma tendência de dispersão parcial pelos machos (veja discussão adiante). Então essa explicação para discrepância entre os resultados

de *Ne* dos diferentes marcadores parece mais adequada. Entretanto, a diferença nos resultados dos marcadores se deve a redução no tamanho efetivo do marcador nuclear (Chesses & Baker, 1996) (veja mais detalhada adiante).

6.4. MIGRAÇÃO

6.4.1. DNAm

A concordância das análises de IMA e Migrate com dados DNAm mostrando praticamente a mesma quantidade de migrantes unidirecional da Mata Atlântica para Amazônia traz maior credibilidade aos resultados, uma vez que essas análises exploram atributos diferentes da teoria da coalescência. O direcionamento dos migrantes para a Amazônia encontra explicação na expansão da distribuição geográfica e populacional do gavião-real partindo do leste do Brasil como detectado em outras análises. A intensa redução da floresta na Mata Atlântica a 7% de sua área original no século passado também pode ter contribuído para o direcionamento de indivíduos, se refugiando das condições de extrema ameaça, para a Amazônia. Entretanto, como já relatado, a amostragem se refere ao período de 1904 a 2008 e os efeitos do desmatamento sobre os sinais de migração podem ser baixos comparado ao sinal histórico, mas os sinais podem ter acentuado pelo desmatamento.

Lerner (2007), encontrou uma migração unidirecional para o gavião-real da América Central para a América do Sul e sugeriu que esse resultado se deva ao processo antrópico de fragmentação das florestas da América do Central. Entretanto, adicionando os dados de haplótipos reconstruídos de seu trabalho aos dados do presente estudo, um forte sinal de migração unidirecional foi detectado partindo da América do Sul para América Central (dados não apresentados). Esse resultado é discordante do resultado de Lerner (2007). A migração unidirecional para a América Central é concordante com o resultado da NCPA no presente estudo sugerindo expansão da distribuição a partir da América do Sul.

A análise de Migrate comparando as sub-regiões evidenciou que a migração do gavião-real entre a Mata Atlântica e a Amazônia se dá pelo leste da Amazônia, o que

corroborar com os resultados de outras análises que evidenciaram o fluxo gênico pela região. A comparação entre sub-regiões mostrou que o padrão de fluxo gênico seguiu um percurso passo a passo da Mata Atlântica, leste Amazônia, centro da Amazônia e sudoeste da Amazônia. O percurso parece seguir o curso de grandes rios, como rio Xingu e Tocantins, ligando ao rio Amazonas, que por sua vez, liga o leste ao centro da Amazônia, e através de seus tributários liga o centro ao sudoeste da região. Esse cenário mostra uma tendência ao padrão de estrutura populacional *stepping-stones* (Kimura & Weiss, 1964). Esse tipo de padrão geralmente ocorre ao longo de rios e vales (Allendorf & Luikart, 2007), tal como se apresenta para o gavião-real. Nesse modelo, as populações mais próximas têm mais chances de trocar migrantes (ou genes) do que com a mais distante, mas considera as feições da geografia nessa distância e a estrutura é direcionada pela paisagem. Nesse modelo, espera-se que a diferenciação genética não seja muito grande entre as populações próximas. Esse padrão é concordante com os resultados das outras análises que sugerem a conexão para o fluxo gênico entre a Mata Atlântica e Amazônia pelo leste da Amazônia.

6.4.2. Microssatélites

O resultado da análise de Migrate com dados de microssatélites mostra uma dinâmica bidirecional de migração do gavião-real entre a Mata Atlântica e a Amazônia. Entretanto, a Amazônia recebe mais de migrantes do que perde na troca com a Mata Atlântica. Os valores de número de migrantes encontrados entre a Mata Atlântica e a Amazônia com dados de microssatélites são menores que os encontrados com dados DNAm. Uma explicação para isso é que os modos de herança dos marcadores são distintos. Os microssatélites possuem herança bi-parental, se após dispersão houver reprodução, em poucas gerações o sinal de migração é difundido na população que recebeu o migrante (Prugnolle & Meeus, 2002). Já para DNAm a herança é uni-parental (através das fêmeas), se após dispersão houver reprodução o sinal de migração permanece em seus descendentes. Como a amostragem é do período entre 1904 a 2008, um intervalo de aproximadamente seis gerações, muitos migrantes podem ter surgido nas populações e se reproduzido difundindo o sinal de migração para os

dados microsatélites. Outra explicação seria o fato do fluxo gênico de fêmeas da Mata Atlântica para a Amazônia ter se intensificado no último século devido às condições devido à perda de habitat da Mata Atlântica.

Entre a Mata Atlântica e as sub-regiões da Amazônia a migração foi bi-direcional em todas as comparações. O cenário apresentado sugere uma alta capacidade de dispersão da espécie e difere do cenário de rotas específicas sugerido com dados DNAm. A explicação para essa diferença mais uma vez sugere a dispersão diferenciada entre os sexos, com os machos se dispersando mais que as fêmeas e por rotas menos limitadas. Entretanto, fluxo gênico foi maior da Mata Atlântica para o leste da Amazônia. Isso corrobora com as outras análises que apontam o leste da Amazônia como uma região com maior conexão com a Mata Atlântica para o fluxo gênico do gavião-real.

6.5. FÊMEAS VS MACHOS

6.5.1 Viés das fêmeas na razão sexual

Muitas populações silvestres tem revelado um excesso na quantidade de machos e fêmeas, as razões para isso não são bem conhecidas (Feeland, 2005). Existem duas sugestões encontradas para explicar a razão sexual da amostragem de um macho para duas fêmeas:

A teoria de Fischer (1930) prediz que as taxas sexuais serão iguais no final do cuidado parental, se os custos e benefícios para aumentar cada sexo são iguais. Entretanto, sob certas circunstâncias, um viés em relação ao sexo pode ocorrer favorecendo machos ou fêmeas dentro de uma população. Isso pode ocorrer antes da incubação ou depois da incubação como resultado de mortalidade diferencial do outro sexo. Em aves os possíveis motivos encontrados para um viés em relação ao sexo incluem as influências do ambiente, qualidade parental, ambiente social e dimorfismo sexual (Komdeur & Pen, 2002). Os Falconiformes que mostram diferentes graus de dimorfismo sexual, com fêmeas maiores que os machos, sugerem uma tendência a favor do sexo masculino, uma vez o investimento em fêmeas pode ser dispendioso,

considerando que exige mais investimento parental para alimentação dos filhotes (McDonald *et al.* 2005). Entretanto, viés para o sexo masculino raramente é encontrado (Brommer *et al.*, 2003; Rosenfield *et al.*, 1996), com taxa sexual geralmente em paridade (Negro & Hiraldo, 1992) ou mesmo tendenciosas para fêmea (Appleby *et al.*, 1997; Tella *et al.*, 1996). Uma explicação para esta discrepância é que o tamanho do corpo pode ser um mau indicador do custo parental (Komdeur & Pen, 2002). O aumento de o investimento alimentar para o sexo com tamanho maior é observado em alguns Falconiformes (Anderson *et al.*, 1993; Krijgsveld *et al.*, 1998; Riedstra *et al.*, 1998; Laaksonen *et al.*, 2004), mas também não é observado em outros (Boulet *et al.*, 2001; Brommer *et al.*, 2003; Collopy, 1986). A alocação de recurso parental parcial para um dos sexos tem sido um dos maiores tópicos de pesquisa na Biologia Evolutiva (Komdeur & Pen, 2002). Entretanto, requer que o estudo da razão sexual seja realizado antes dos ovos eclodirem ou quando os indivíduos são jovens. Pois, existem vários fatores que podem afetar parcialmente um dos sexos quando adulto e causar viés na razão sexual para o sexo menos afetado (Feeland, 2005). Entretanto, é possível que o viés encontrado para as fêmeas na amostragem seja devido à alocação de recurso parental maior nesse sexo, uma hipótese que merece ser investigada.

Alternativamente, a agregação espacial, a maior residência e o maior cuidado parental por parte das fêmeas nas regiões amostradas também pode explicar esse viés. Como diversas análises sugerem que as fêmeas são mais residentes, enquanto os machos dispersam mais, essa explicação pode ser mais facilmente aceita, uma vez que as tornam mais suscetíveis de serem amostradas. Isso sugere também uma extrema vulnerabilidade das fêmeas para as ameaças antrópicas, visto que a maioria das amostras foi obtida de indivíduos removidos da natureza (museus, criadouros e vestígios de caça).

6.5.2. Viés dos machos na dispersão

A diferenciação com base no F_{ST} entre a Amazônia e Mata Atlântica foi significativa com dados de DNAm_t, mas não com dados de microssatélites. Quando comparado os dados de DNAm_t dos machos da Amazônia com as fêmeas da Mata

Atlântica, nenhuma diferenciação é encontrada, enquanto que os machos da Amazônia e fêmeas da Amazônia apresentam uma diferenciação genética significativa. As fêmeas da Amazônia e Mata Atlântica são ainda mais diferenciadas. Com marcadores microssatélites a diferenciação entre fêmeas da Amazônia e Mata Atlântica foi quase significativa, enquanto que para os machos da Amazônia os valores de F_{ST} foram baixos na comparação com os grupos de fêmeas da Amazônia e fêmeas da Mata Atlântica. Isso sugere que os machos dispersam mais enquanto as fêmeas são mais residentes. Como o DNAm_t possui herança materna, a diferença observada favorecida sugerem uma maior residência das fêmeas às suas regiões de origem.

O fluxo gênico unidirecional entre o gavião-real da Amazônia e da Mata Atlântica e a migração passo a passo detectado pelos dados de DNAm_t, em contraste com o fluxo gênico bidirecional e a dinâmica do fluxo gênico detectada pelos dados de microssatélites nas análises de coalescência, fornecem mais evidências para uma dispersão diferenciada entre os sexos.

Com relação ao índice de aproximação (A/c) para os sexos na Amazônia, os valores de médias negativas e a maior variância para os machos, em contrastes com as médias positivas e menor variância para as fêmeas, sugerem uma tendência dos machos serem menos relacionados a Amazônia e dispersam mais que as fêmeas. A diferença das médias e variâncias de A/c entre machos e fêmeas aumentam quando incluído o loco AA43 que é suspeito de estar relacionado a Amazônia e/ou aos cromossomos sexuais. Isso reforça ainda mais essa suspeita. Entretanto, as diferenças entre machos e fêmeas para médias e variâncias de A/c não foram significativas. Alguns fatores da amostragem podem diminuir o poder do teste, como a amostragem de indivíduos pré-dispersão (jovens), que naturalmente são mais relacionados à região (Prugnolle & Meeus, 2002). Esse fator pode estar afetando a amostragem, pois para a não foi possível distinguir todos os adultos. Uma amostragem em menor escala e comparando sub-regiões seria o ideal, entretanto a amostragem disponível foi irregular quanto à distribuição das amostras e número de machos e fêmeas disponíveis.

A dispersão parcial baseada nos machos é esperada para um sistema de reprodução poligínico (onde um macho se reproduz com mais de uma fêmeas, mas as

fêmeas com apenas um macho) (Greenwood, 1980). Na poliginia, os machos dispersam mais e as fêmeas são mais residentes (filopátricas). Nesse cenário, o tamanho efetivo do marcador de herança materna pode ser mais que 1,5 vezes o tamanho do marcador de herança bi-parental (Chesses & Baker, 1996). Essa foi exatamente a relação encontrada entre os diferentes marcadores no presente estudo. Fêmeas mais residentes aumentam variância das frequências do DNAm entre os grupos e essa variância atrasa a taxa de perda de variação global do marcador DNAm (Chesses & Baker, 1996). Enquanto, o tamanho efetivo do DNAm altera pouco, a redução do número de machos reprodutores reduz o tamanho efetivo do marcador diplóide, assim a diferença nos resultados dos marcadores se deve a redução no tamanho efetivo do marcador nuclear (Chesses & Baker, 1996).

A alta taxa de dispersão dos machos não é comum em aves, bem como a poliginia (Greenwood, 1980). Para o gavião-real existem evidências sugeridas pelas observações em campo que o sistema de reprodução seja a monogamia (e.g. Fowler & Cope, 1964), mas não são conclusivas, podendo haver desvios. Entretanto, o sistema reprodutivo do gavião-real deve ser melhor investigado em campo e geneticamente para verificar se existe um desvio do modelo monogâmico, tal como, os dados do presente estudo sugerem.

6.6. VULNERABILIDADE GENÉTICA NO CENÁRIO DO DESMATAMENTO

6.6.1 Mata Atlântica

O período atual da Mata Atlântica (1967-2008) apresentou a maior diversidade genética para o gavião-real do que o passado (1911-1953) com dados de DNAm, apresentando significativa diferença na frequência dos haplótipos. A amostragem do período de 1967-2008 inclui amostras da região norte da Mata Atlântica, como o sul da Bahia e norte do Espírito Santo. Os haplótipos restritos a amostragem do tempo atual causaram a diferença no resultado e estão localizados nessa região. Esses haplótipos são jovens evolutivamente e surgiram durante a expansão populacional, como mostrou a análise de NCPA para a amostragem total. O norte da Mata Atlântica é uma região

distinta, com composição de floresta de tabuleiro, com árvores de grande porte e com várias presas potenciais para o gavião-real, sendo a única região totalmente dentro dos domínios da Mata Atlântica com registros de nidificação da espécie (Galetti *et al.*, 1997; Pacheco *et al.*, 2003; Srbek-Araujo & Chiarello, 2006). Esses fatores podem explicar a maior diversidade, com base no DNAm_t, encontrada no tempo atual comparada a amostragem do passado da Mata Atlântica.

A redução da diversidade genética dos locos microssatélites no período 1967-2008 comparado ao período de 1911-1953 da Mata Atlântica foi muito grande (21%) e quase significativa. Uma amostra do ano 2006 foi encontrada com todos os locos em homozigose, essa amostra é de uma pena encontrada no Parque Nacional da Bodoquena, Mato Grosso. Esse é um caso extremo de baixa diversidade e influencia negativamente a média da heteroziguidade. Entretanto, mesmo retirando essa amostra, o período de 1967-2008 apresenta diversidade genética mais baixa (dados não apresentados). A amostragem do período 1911-1953 envolve seis amostras do Estado do Rio Grande do Sul (RS), extremo sul da Mata Atlântica, onde a espécie é tida como provavelmente extinta na natureza desde a década de 1950 (Bencke *et al.*, 2003). Quatro dessas amostras do RS possuem heteroziguidade observada acima de (0,5). Assim, a baixa diversidade do período atual é passiva de ser consequência das ameaças à espécie na Mata Atlântica ao longo do tempo.

O F_{ST} não significativo, tanto de dados de DNAm_t quanto para os microssatélites, na comparação entre os períodos de 1911-1953 e 1967-2008, sugere que não houve mudança na composição genética do gavião-real ao longo do tempo na Mata Atlântica.

6.6.2 Amazônia

A diversidade genética obtida com os dados de DNAm_t e microssatélites foram mais baixas para a Amazônia do Arco do Desmatamento quando comparadas ao Amazônia do Eixo Central. Em termos de freqüências dos haplótipos de DNAm_t a diferença foi significativa entre as áreas. Entretanto, para as heteroziguidades observadas a diferença de 18% não foi significativa, apesar de grande. A baixa diversidade pode ser devido à localização periférica da região do arco do

desmatamento em relação à porção mais central da Amazônia. O centro da distribuição da espécie tende a ser mais diverso que a região mais periférica. Entretanto, é possível também que essa menor diversidade na região do arco tenha sido acentuada pela ação antrópica. A Amazônia do Arco do Desmatamento corresponde parcialmente à área da amostragem do Leste e Sudoeste da Amazônia, essas duas áreas possuem uma amostragem do período de 1909 a 2008 e exibem médias de diversidade genética maior quando comparadas a Amazônia do Arco do Desmatamento, que possui uma amostragem do período de 2000 a 2008. Então essa diferença pode ser atribuída à perda de habitat pela ação antrópica na Amazônia do Arco do Desmatamento. De fato, muitas ameaças diretas ao gavião-real, como caça e remoção de indivíduos da natureza, têm sido apontadas para essa região (veja seção 2).

O F_{ST} não significativo entre o gavião-real da Amazônia do Eixo Central e Amazônia do Arco do Desmatamento tanto dados de DNAm_t quanto para os microssatélites, sugere que não houve mudança na composição genética ao do gavião-real com as transformações da paisagem Amazônica.

6.6.3 Mata Atlântica e Amazônia

Na comparação da diversidade genética dos dois períodos de tempo da Mata Atlântica com as duas áreas de diferentes condições florestais na Amazônia, a diversidade genética do gavião-real do passado da Mata Atlântica foi similar a da porção de melhores condições de floresta da Amazônia. Entretanto, o tempo atual da Mata Atlântica foi similar ao da região de condições florestais piores da Amazônia. Isso sugere que em cenários com florestas mais afetadas antropicamente, o gavião-real tende a possuir menos diversidade genética.

Nas comparações através do Φ_{ST} par a par, o resultado com DNAm_t apresentou diferenciação significativa dos dois períodos da Mata Atlântica com a região do Eixo Central da Amazônia, os valores de Φ_{ST} foram similares entre os tempos, mostrando que essa diferenciação não mudou muito ao longo do tempo. Com os microssatélites, o F_{ST} quase significativo entre período atual da Mata Atlântica e a Amazônia do Eixo Central foi maior que o valor de F_{ST} encontrado entre passado da Mata Atlântica e a

Amazônia do Eixo Central. Essa condição sugere que o fluxo gênico tem se tornado mais limitada ao longo do tempo. Um fator que pode ter contribuído para esse resultado foi a diminuição da conectividade da Amazônia com a Mata Atlântica pelo corredor central do Brasil.

As análises de dinâmica na frequência dos alelos e heterozigosidades sugerem expansão populacional nos dois diferentes cenários de condições de floresta da Amazônia, após um longo tempo com tamanho populacional pequeno (como sugerido pelas altas taxas de M e riqueza de alelos). Entretanto, para a Mata atlântica os sinais são de estabilidade populacional. Evidentemente, esses resultados não condizem com as altas taxas de perda de habitat e de remoção de indivíduos de gavião-real da natureza. Uma explicação para essa discrepância está no longo tempo de geração do gavião-real. As análises de redução populacional do Bottleneck e M Value levam em consideração a diminuição na frequência e perda dos alelos, respectivamente, pela deriva genética no tempo de poucas gerações. Entretanto, o longo tempo de geração do gavião-real pode ter minimizado a deriva genética. Esse efeito tem sido constatado em estudo com outros falconiformes (e.g. Hailer, 2006; Poulakakis, 2008) e com outros táxons de vida longa, que possuem comprovada redução populacional e mesmo assim a diversidade genética tem sido retida nos indivíduos mais velhos da população (e.g. rinocerontes; Swart *et al.* 1994; Dinerstein & McCracken, 1990).

Em contraste com a estabilidade dos alelos, para o gavião-real o fluxo gênico apresenta-se limitado com o tempo e a heterozigosidade observada foi reduzida. Nas populações em regiões isoladas, as chances de cruzamento entre indivíduos relacionados aumentam (endogamia), causando diminuição do número de heterozigotos. Isso pode estar ocorrendo com o gavião-real, visto que na Mata Atlântica foi encontrado um indivíduo em homozigose total no tempo atual (2006) para os locos analisados.

As informações levantadas acima correspondem a uma amostragem dos últimos 40 anos para a Mata Atlântica e oito anos para a Amazônia, assim, no tempo realmente atual é possível que a composição da diversidade genética do gavião-real esteja em pior estado.

7. CONCLUSÃO

Os marcadores moleculares e as análises utilizadas revelaram que um conjunto de fatores determinou a distribuição da variabilidade genética do gavião-real no espaço e no tempo.

O nível de fluxo gênico do gavião-real foi alto entre as regiões, sugerindo que existe uma panmixia na distribuição do gavião-real. Entretanto, as análises sugerem que o fluxo gênico entre a Amazônia e Mata Atlântica ocorre principalmente pelo leste da Amazônia. Assim, não foi possível rejeitar a hipótese nula de que histórica e/ou recentemente o corredor de vegetação não é um limitante para fluxo gênico do gavião-real entre a Amazônia e a Mata Atlântica. Também não foi possível rejeitar a hipótese nula de que não existem populações diferenciadas de gavião-real na Mata Atlântica.

Os dados sugerem que o Pleistoceno, especialmente a última glaciação, promoveu um longo período de redução populacional, seguido por evento de recente expansão. Esse resultado refuta a hipótese nula de que o Pleistoceno não influenciou a dinâmica populacional do gavião-real.

As diferenças nos resultados dos marcadores de DNAm_t e microssatélites sugerem que a distribuição da variabilidade genética do gavião-real foi influenciada pelo padrão de dispersão parcial entre os sexos, sendo que os machos apresentaram maior dinâmica no fluxo gênico e equanto as fêmeas são mais residentes.

A maior dispersão dos machos e residência das fêmeas pode explicar discrepâncias entre os tamanhos efetivos dos marcadores de DNAm_t e nuclear, mas para isso sugere que o sistema reprodutivo do gavião-real seja poligínico. Entretanto, esse tópico merece maiores estudos e a genética pode contribuir nesse sentido.

A razão sexual da amostragem foi aproximadamente de um macho para duas fêmeas, sugerindo que possa existir algum mecanismo de alocação de recurso a favor das fêmeas ou que as mesmas são mais suscetíveis a serem amostradas devido a sua maior residência na sua área de origem. Esse tópico também merece mais estudos.

A diversidade genética do gavião-real é comparada ao de espécies de aves ameaçadas com tamanhos populacionais reduzidos e de aves que sofreram fortes efeitos das mudanças climáticas no passado sobre suas populações, incluindo Falconiformes. Houve uma tendência forte de diminuição da diversidade genética do gavião-real ao longo do tempo, com grande redução da diversidade genética na comparação de amostras de tempos diferentes da Mata Atlântica, sugerindo que a perda acentuada de habitat nessa região seja a razão para essa redução. A diversidade genética do gavião-real no arco do desmatamento da Amazônia é reduzida e comparada à diversidade encontrada atualmente na Mata Atlântica, o que também pode estar relacionado às altas taxas de perda de habitat e remoção de indivíduos da natureza. O fluxo gênico do gavião-real entre a Mata Atlântica e a porção central da Amazônia se tornou mais limitado com o tempo, provavelmente devido à diminuição das conexões de florestas no corredor de vegetação aberta entre esses dois biomas. Assim, as ameaças ao gavião-real se refletem no nível de sua diversidade genética.

7.1. IMPLICAÇÕES PARA A CONSERVAÇÃO DO GAVIÃO-REAL

O status de conservação do gavião-real tem sido muito discutido e motivo de controvérsias entre os conservacionistas. Os resultados desse estudo contribuem com a discussão, revelando sinais de vulnerabilidade do gavião-real. As ameaças percebidas para o gavião-real podem ser extendidas a toda distribuição da espécie, visto que é razoável extrapolar a baixa diversidade genética e sua associação com fatores antrópicos às outras áreas da região Neotropical, que em geral possuem piores condições de floresta que o Brasil. O corredor de vegetação aberta do centro do Brasil também deve ser incluído na quantificação da ameaça ao gavião-real, o mesmo é importante para a manutenção da espécie, pois apresenta registros de nidificações e permite o fluxo gênico do gavião-real entre os biomas florestais. O Cerrado, onde se concentra os registros de gavião-real no centro do Brasil, é um bioma extremamente ameaçado, isso ressalta ainda mais a vulnerabilidade da espécie em termos de sua distribuição e de distribuição sua variabilidade genética.

As informações da presente tese podem ser utilizadas para o refinamento de estratégias de conservação da espécie, especialmente no Brasil, onde a distribuição da espécie é mais ampla. As estratégias de manejo devem apresentar metas para preservar essa diversidade genética, visto que os fatores genéticos podem aumentar os riscos de extinção, reduzir o potencial adaptativo e potencial reprodutivo das espécies.

A recomendação mais urgente para a conservação do gavião-real é eliminar as ameaças, como a perda de habitat e a remoção de indivíduos da natureza. Quando possível, considerando também aspectos ecológicos e veterinários, recomenda-se devolver os indivíduos apreendidos após serem retirados da natureza nas localidades de onde foram removidos.

Para a manutenção da diversidade genética e do fluxo gênico, as recomendações são: proteger as localidades onde há tempos têm sido reportados registros da espécie, sobretudo de nidificação, visando resguardar os indivíduos mais velhos da população que podem estar matendo a diversidade genética ao longo do tempo; ampliar as florestas, restabelecer habitats adequados e proteger as áreas remanescentes de floresta na Mata Atlântica e no arco do desmatamento da Amazônia; restabelecer e proteger as conexões florestais do corredor de vegetação aberta (Cerrado e Caatinga) e do leste da Amazônia. Para as ações de manejo iniciadas na Mata Atlântica, deve-se tomar cuidado para não translocar indiscriminadamente indivíduos com ancestralidade materna exclusiva da Amazônia (ou de outras regiões) para essa região.

O monitoramento contínuo do efeito da mudança negativa da paisagem florestal sobre diversidade genética do gavião-real, utilizando dados extraídos de uma quantidade adequada de amostras atuais (que podem ser obtidos de forma não invasiva), pode gerar maior conhecimento sobre esse assunto e como se aplica aos Falconiformes da região Neotropical. Assim, recomenda-se que esse monitoramento seja estabelecido tendo o presente trabalho como marco inicial.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguiar, S.F.H. 2007. *Dieta do gavião-real Harpia harpyja (Aves: Accipitridae) em florestas de terra firme de Parintins, Amazonas, Brasil*. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisa na Amazônia e Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 87pp.
- Albuquerque, J.L.B. 1995. Observations of rare raptors in southern Atlantic rainforest of Brazil. *Journal of Field Ornithology*, 66: 363-369.
- Aleixo, 2004. Historical diversification of a Terra-firme forest bird superspecies: a phylogeographic perspective on the role of different hypotheses of Amazonian diversification. *Evolution*, 6: 1303–1317.
- Allendorf, F.W.; Luikart, G. 2007. *Conservation and the Genetics of Populations*. Blackwell Publishing, Oxford, UK, 642pp.
- Alvarez-Cordero, E.C. 1996. *Biology and conservation of the Harpy Eagle in Venezuela e Panamá*. Doctor's Thesis, University of Florida, USA. 228pp.
- Alves, M.A.S.; Pacheco J.F.; Gonzaga L.A.P.; Cavalcanti R.B.; Raposo M.A.; Yamashita, C.; Maciel, N.C.; Castanheira, M. 2000. In: Bergallo, H.G.; Rocha, C.F.D.; Alves, M.A.S.; Van Sluys M. (Eds.). *A Fauna Ameaçada de Extinção do Estado do Rio de Janeiro*. Rio de Janeiro, Editora da Universidade Estadual do Rio de Janeiro, 166pp.
- Anderson, D.J.; Reeve, J.; Gomez, J.E.M.; Weathers, W.W.; Hutson, S.; Cunningham, H.V.; Bird, D.M. 1993. Sexual size dimorphism and food requirements of nestling birds. *Canadian Journal of Zoology*, 71: 2541–2545.
- Anfuso, J.; Gil Suárez, M.V.; Chebez. J.C. 2008. Nuevo registro de nidificación de la Harpía (*Harpia harpyja*) en la provincia de Misiones, Argentina y consideraciones sobre su conservación. *Nótulas Faunísticas*, 21: 1-13.

- Appleby, B.M.; Petty, S.J.; Blakey, J.K.; Rainey, P.; MacDonald, D.W.; 1997. Does variation of sex ratio enhance reproductive success of offspring in tawny owls (*Strix aluco*)? *Proceedings of the Royal Society*, 264:1111–1116.
- Avise, J.C. 2000. *Phylogeography: the History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge, MA, 427pp.
- Avise, J.C. 2004. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Sinauer Associates, Sunderland, MA, 684pp.
- Ayres, J. M. C.; Clutton-Brock, T. H. 1992. River boundaries and species range size in Amazonian primates. *American Naturalist*, 140: 531–537.
- Baker, A.J.; Marshall, H.D. 1997. Mitochondrial control region sequences as tools for understanding evolution. In: Mindell, D.P. (Eds.). *Avian molecular evolution and systematics*. Academic Press, London, pp 51–82.
- Baker, M.; Nur, N.; Geupel, G.R. 1995. Correcting biased estimates of dispersal and survival due to limited study area: theory and an application using wrentits. *Condor*, 97: 663–674.
- Banhos, A.; Hrbek, T.; Gravena, W.; Sanaiotti, T.; Farias, I.P. 2008. Genomic resources for the conservation and management of the harpy eagle (*Harpia harpyja*, Falconiformes, Accipitridae). *Genetics and Molecular Biology*, 31: 146-154.
- Beerli, P.; Felsenstein, J. 2001. Maximum likelihood estimation of a migration matrix and effective population sizes in n subpopulations by using a coalescent approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98: 4563-4568.
- Begon, M.; Harper, J. L.; Townsend, C. R. 1996. *Ecology: individuals, populations and communities*. Blackwell Science, Oxford. 1068pp.
- Behling, H.; Lichte, M. 1997. Evidence of dry and cold climatic conditions at Glacial Times in tropical southeastern Brazil. *Quaternary Research*, 48: 348–358.

- Behling, H.; Negrelle, R.R.B. 2001. Tropical rain forest and climate dynamics of the Atlantic lowland, Southern Brazil, during the Late Quaternary. *Quaternary Research*, 56: 383–389.
- Bencke, G.A.; Fontana, C.S.; Dias, R.A.; Maurício, G.N.; Mähler Jr.J.K. 2003. Aves. In: Fontana, C. S.; Bencke, G. A.; Reis, R. E. (Eds.). *Livro Vermelho da Fauna Ameaçada de Extinção no Rio Grande do Sul*. Edipucrs, Porto Alegre, p. 189-479.
- Bierregaard, Jr., R. B. 1995. The biology and conservation status of Central and South American Falconiformes: a survey of current knowledge. *Bird Conservation International*, 5: 325 – 340.
- Bigarella, J.J.; Andrade-Lima, D.; Riehs, P.J. 1975. Considerações a respeito das mudanças paleoambientais na distribuição de algumas espécies vegetais e animais no Brasil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 47: 411–464.
- Bildstein, K.L.; Schelsky, W.; Zalles, J. 1998. Conservation status of tropical raptors. *Journal of Raptor Research*, 32: 3-18.
- BirdLife International 2008. *Harpia harpyja*. In: 2008 IUCN Red List of Threatened Species. Disponível em: www.iucnredlist.org. Acesso em 20 de dezembro de 2008.
- Bond, J. 1927. Nesting of the Harpy Eagle (*Thrasaetus harpyia*). *Auk*, 44: 562-563.
- Borges, S.H; Carvalhaes, A. 2000. Bird species of black water inundation forests in the Jaú National Park (Amazonas state, Brazil): their contribution to regional species richness. *Biodiversity and Conservation*, 9: 201–214.
- Boulet, M.; Olsen, P.D.; Cockburn, A.; Newgrain, K. 2001. Parental investment in male and female offspring by the peregrine falcon *Falco peregrinus*. *Emu - Austral Ornithology*, 101:95–103.
- Brito, P.H. 2005. The influence of Pleistocene glacial refugia on tawny owl genetic diversity and phylogeography in western Europe. *Molecular Ecology*, 14: 3077–3094.

- Brommer, J.E.; Karell, P.; Pihlaja, T.; Painter, J.N.; Primmer, C.R.; Pietiäinen H.; 2003. Ural owl sex allocation and parental investment under poor food conditions. *Oecologia*, 137: 140–147.
- Brown, J.W.; Groot, P.J.V.C.; Birt, T.P.; Seutin, G.; Boag, P.T.; Friesen, V.L. 2007. Appraisal of the consequences of the DDT-induced bottleneck on the level and geographic distribution of neutral genetic variation in Canadian peregrine falcons, *Falco peregrinus*. *Molecular Ecology*, 16: 327–343.
- Brown, L.; Amadon, D. 1968. *Eagles, hawks, and falcons of the world*. Mc Graw Hill, New York.
- Busch, J.D.; Katzner, T.E.; Bragin, E.; Keim, P. 2005. Tetranucleotide microsatellites for *aquila* and *haliaeetus* eagles. *Molecular Ecology*, 5: 39–41.
- Caro, T.M.; Laurenson, M.K. 1994. Ecological and genetic factors in conservation: A cautionary tale. *Science*, 263:485-486.
- Chebez, J. C.; Croome, M. S.; Serret, A.; Taborda, A. 1990. La nidificación de la Harpia (*Harpia harpyja*) em Argentina. *El Hornero*, 13: 155-158.
- Chesser, R.K.; Baker, R.J. 1996. Effective sizes and dynamics of uniparentally and diparentally inherited genes. *Genetics*, 144: 1225–1235.
- Clayton, D.A. 1992. Transcription and replication of animal mitochondrial DNAs. In: Wolstenholme, D.R; Jeon, K.W. (Eds.). *Mitochondrial genomes International review of cytology*. Academic Press, San Diego, pp 217–232.
- Clement, M.; Posada, D.; Crandall, K.A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9: 1657–1660.
- Collar, N. J. 1989. Harpy Eagle. *World Birdwatch*, 11: 5.
- Collopy, M.W. 1986. Food consumption and growth energetics of nestling golden eagles. *Wilson Bull*, 98:445–458.

- Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora – CITES. 2008. *Appendices I, II and III*. Disponível em: <http://www.cites.org/eng/app/index.shtml>. Acesso em 20 de dezembro de 2008.
- Cornuet, J.M.; Luikart, G. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, 144: 2001-2014.
- Costa, L.P. 2003. The molecular phylogeographic bridge between the Amazon and the Atlantic forest: a case study with small mammals. *Journal of Biogeography*, 30: 71–86.
- Crandall, K.A.; Bininda-Emonds, O.R.P.; Mace, G.M.; Wayne, R.K. 2000. Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends in Ecology & Evolution*, 15: 290–295.
- da Luz, B.B. 2005. *Arquitetura de árvores emergentes selecionadas por Gavião-real (Harpia harpyja) para nidificação no centro e leste da Amazônia Brasileira*. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisa na Amazônia e Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 74pp.
- di Rienzo, A.; Peterson, A.C.; Garza, J.C.; Valdes, A. M.; Slatkin, M.; Freimer, N. B. 1994. Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91: 3166-3170.
- Drake, J.W.; Charlesworth, B.; Charlesworth, D.; Crow, J.F. 1998. Rates of spontaneous mutation. *Genetics*, 148: 1667–1686.
- Drovetski, S.V. 2003. Plio-Pleistocene climatic oscillations, Holarctic biogeography and speciation in an avian subfamily. *Journal of Biogeography*, 30: 1173-1181.
- Drummond, A.J.; Ho, S.Y.W.; Rawlence, N.; Rambaut, A. 2007. *A Rough Guide to BEAST 1.4*. Auckland, New Zealand, 42 pp.

- Dinerstein, E. & McCracken, G. F. 1990 Endangered greater one-horned rhinoceros carry high levels of genetic-variation. *Conservation Biology*. 4: 417–422. (doi:10.1111/j.1523-1739.1990.tb00316.x)
- Eisen, J.A. 1999. Mechanistic basis for microsatellite instability. In: Goldstein, D.B.; Schlotterer, C. (Eds.). *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press, Oxford, UK, pp. 34–48.
- Elgar, M.A.; Clode, D. 2001. Inbreeding and extinction in island populations: a cautionary note. *Conservation Biology*, 14:284-286.
- Ellegren, H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics*, 5: 435–445.
- Ergueta-S, P.; de Morales, C. 1996. *Libro Rojo de los Vertebrados de Bolivia*. Bolivia: Centro de Datos para La Conservación, 448pp.
- Evans, S.R.; Sheldon, B.C. 2008. Interspecific Patterns of Genetic Diversity in Birds: Correlations with Extinction Risk. *Conservation Biology*, 22: 1016-1025.
- Excoffier, L.; Laval, G.; Schneider, S. 2005. Arlequin version 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1: 47-50.
- Excoffier, L.; Smouse, P.; Quattro, J. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- Favre, L; Balloux, F.; Goudet, J.; Perrin, N. 1997. Female-biased dispersal in the monogamous mammal *Crocidura russula*: evidence from field and microsatellite patterns. *Proceedings of the Royal Society*, 269: 127-132.
- Fearnside, P. M. 2005. Deforestation in Brazilian Amazonia: History, Rates, and Consequences. *Conservation Biology*, 19: 680-688.

- Fearnside, P.M. 2008. Amazonia, Deforestation of. In: A.S. Goudie & D.J. Cuff (Eds.) *Encyclopedia of Global Change: Environmental Change and Human Society*, 2nd ed. Oxford University Press, New York, U.S.A.
- Freeland, JR. 2005. *Molecular Ecology*. England: John Wiley & Sons.
- Ferguson-Lees, J.; Christie, D.A. 2001. *Raptors of the World*. Christopher Helm, London.
- Ferrari, S. F.; Port-Carvalho, M. 2003. Predation of an infant Collared Peccary by a Harpy Eagle in Eastern Amazonia. *Wilson Bulletin*, 115: 103-104.
- Ferrer, M.; Calderón, J. 1990. The Spanish imperial eagle *Aquila adalberti* in Doñana National Park: a study of population dynamics. *Biological Conservation*, 51:151-161.
- Fisher, R.A. 1930. *The genetical theory of natural selection*. Oxford: Oxford Clarendon.
- Fowler, M.J.; Cope, J.B. 1964. Notes on the Harpy eagle in British Guiana. *Auk*, 81: 257-273.
- Frailey, C.D. 2002. Neogene paleogeography of the Amazon Basin. *TER-QUA Symposium Series*, 3: 71–97.
- Frailey, C.D.; Lavina, E.L.; Rancy, A.; Pereira de Souza, J. 1988. A proposed Pleistocene/Holocene lake in the Amazon Basin and its significance to Amazonian geology and biogeography. *Acta Amazonica*, 18: 119–143.
- Frankham, R.; Ballou, J.R.; Briscoe, D.A. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge, England, 617 pp.
- Fu, Y-X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147: 915–925.
- Galetti, M.; Carvalho, O.Jr. 2000. Sloths in the diet of a harpy eagle nestling in Eastern Amazon. *Wilson Bulletin*, 112: 535-536.

- Galetti, M.; Martuscelli, P.; Pizo, M. A.; Simão, I. 1997. Records of Harpy and Crested Eagles in the Brazilian Atlantic forest. *Bulletin of The British Ornithological Club*, 117: 27–31.
- Garner A.; Rachlow J.L.; Hicks, J.F. 2005. Patterns of genetic diversity and its loss in mammalian populations. *Conservation Biology*, 4:1215–1221.
- Garza, J.C.; Williamson, E.G. 2001. Detection of reduction in population size using data from microsatellite *loci*. *Molecular Ecology*, 10: 305-318.
- Gilpin, M.E.; Soulé, M.E. 1986. Minimum viable populations: processes of species extinction. In: Soulé, M.E. (Eds.). *Conservation biology: the science of scarcity and diversity*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Glaubitz, J.C. 2004. CONVERT: A user-friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages. *Molecular Ecology Notes* 4: 309-310.
- Godoy, J.A., Negro, J.J., Hiraldo, F., Donázar, J.A. 2004. Phylogeography, genetic structure and diversity in the endangered bearded vulture (*Gypaetus barbatus*, L.) as revealed by mitochondrial DNA. *Molecular Ecology*, 13: 371-390.
- Granizo, T.; Pacheco, C.; Ribadeneira, M. B.; Guerrero, M.; Suárez, L. 2002. *Libro rojo de las aves del Ecuador*. Quito: SIMBIOE, Conservación Internacional, EcoCiencia, Ministerio del Ambiente, UICN, 462 pp.
- Greenwood, P.J. 1980. Mating systems, philopatry and dispersal in birds and mammals. *Animal Behaviour*, 28: 1140-1 162.
- Griffiths, R.; Double, M.C.; Orr, K.; Dawson, R.J.G. 1998. A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology*, 7, 1071 -1075.
- Haffer, J. 1997. Contact zones between birds of southern Amazonia. *Ornithological Monographs*. 48: 281–305.
- Haig, S.M. 1998. Molecular contributions to conservation. *Ecology*, 79, 413–425.

- Hailer, F.; Gautschi, B.; Helander, B. 2005. Development and multiplex PCR amplification of novel microsatellite markers in the White-tailed Sea Eagle, *Haliaeetus albicilla* (Aves: Falconiformes, Accipitridae). *Molecular Ecology Notes*, 5: 938–940.
- Hailer, F.; Helander, B.; Folkestad, A.O.; Ganusevich, S.A.; Garstad, S.; Hauff, P.; Koren, C.; Nygard, T.; Volke, V.; Vila, C.; Hans, E. 2006. Bottlenecked but long-lived: high genetic diversity retained in white-tailed eagles upon recovery from population decline. *Biology Letters*, 2: 316–319.
- Hailer, F.; Helander, B.; Folkestad, A.O.; Ganusevich, S.A.; Garstad, S.; Hauff, P.; Koren, C.; Masterov, V.B.; Nygård, T.; Rudnick, J.A.; Shiraki, S.; Skarphedinsson, K.; Volke, V.; Wille, F.; Vilà, C. 2007. Phylogeography of the white-tailed eagle, a generalist with large dispersal capacity. *Journal of Biogeography*, 34: 1193-1206.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 95: 95-8.
- Hedrick, P.W. 2001. Conservation genetics: where are we now? *Trends in Ecology and Evolution*, 16: 629–636.
- Henriques, L.M.P.; Wunderle Jr., J.M.; Willig, M.R. 2003. Birds of the Tapajos National Forest, Brazilian Amazon: A Preliminary Assessment. *Ornitologia Neotropical* 14: 307-338.
- Hey, J. 2005. On the Number of New World Founders: A Population Genetic Portrait of the Peopling of the Americas. *PLoS Biology*, 6: e193.
- Hey, J.; Nielsen, R. 2007. Integration within the Felsenstein equation for improved Markov chain Monte Carlo methods in population genetics. *PNAS*, 104: 2785–2790.
- Ho, S.Y.W.; Phillips, M. J.; Cooper, A.; Drummond, A.J. 2005. Time dependency of molecular rate estimates and systematic overestimation of recent divergence times. *Molecular Biology and Evolution*. 22: 1561-1568.

- Horváth, M.B.; Martínez-Cruz, B.; Negro, J.J.; Kalmár, L.; Godoy, J.A. 2005. An overlooked DNA source for non-invasive genetic analysis in birds. *Journal of Avian Biology*, 36: 84-88.
- Idaghdour, Y.; Broderick, D.; Korrida, A.; Chbel, F. 2004 Mitochondrial control region diversity of the houbara bustard *Chlamydotis undulata* complex and genetic structure along the Atlantic seaboard of North Africa. *Molecular Ecology*, 13: 43–54.
- Instituto de Pesquisa da Mata Atlântica – IPEMA 2005. *Lista de Espécies Ameaçada de Extinção do Espírito Santo*. Disponível em: <http://www.ipema-es.org.br>. Acesso em de 20 dezembro de 2008.
- Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais – INPE 2008. *Projeto Prodes: Monitoramento da Floresta Amazônica Brasileira por Satélite*. Disponível em: <http://www.obt.inpe.br/prodes/index.html>. Acesso em 20 de dezembro de 2008.
- International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources – IUCN 2001. *Categories and Criteria: version 3.1*. Disponível em: www.iucnredlist.org. Acesso em 20 de dezembro de 2008.
- International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources – IUCN 2008. *Guidelines for Using the IUCN Red List Categories and Criteries: Version 7.0*. Disponível em: www.iucnredlist.org. Acesso em 20 de dezembro de 2008.
- Ito, H.; Sudo-Yamaji, A.; Abe, M.; Murase, T.; Tsubota, T. 2003. Sex identification by alternative polymerase chain reaction methods in falconiformes. *Zoological Science*, 20: 339-44.
- Johnson, P.C.D.; Fowlie M.K.; Amos, W. 2005. Isolation of microsatellite *loci* from the common buzzard, *Buteo buteo* (Aves: Accipitridae). *Molecular Ecology Notes*, 5: 208–211.
- Kimura, M.; Crow, J.F. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*, 49: 725-738.

- Kimura, M.; Weiss, G. 1964. The stepping stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. *Genetics*, 49:561-576.
- Koenig, W.D.; Van Vuren, D.; Hooge, P.N. 1996. Detectability, philopatry, and the distribution of dispersal distances in vertebrates. *Trends in Ecology & Evolution* 11: 514–517.
- Komdeur, J.; Pen, I. 2002. Adaptive sex allocation in birds: the complexities of linking theory and practice. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 357: 373–380.
- Kretzmann, M.B.; Capote, N.; Gautschi, B.; Godoy, J.A.; Donazar, J.A.; Negro, J.J. 2003. Genetically distinct island populations of the Egyptian vulture (*Neophron percnopterus*). *Conservation Genetics*, 4: 697–706.
- Krijgsveld, K.L.; Dijkstra, C.; Visser, G.H.; Daan, S. 1998. Energy requirements for growth in relation to sexual size dimorphism in marsh harrier *Circus aeruginosus* nestlings. *Physiology Zoology*, 71: 693–702.
- L'Abbé, D.; Duhaime, J.F.; Lang, B.F., Morais, R. 1991. The transcription of DNA in chicken mitochondria initiates from one major bidirectional promoter. *Journal of Biological Chemistry*, 266: 10844–10850.
- Laaksonen, T.; Fargallo, J.A.; Korpimäki, E.; Lyytinen, S.; Valkama, J.; Poyri, V. 2004. Year- and sex-dependent effects of experimental brood sex ratio manipulation on fledging condition of Eurasian kestrels. *Journal of Animal Ecology*, 73: 342–352.
- Lande, R. 1995. Mutation and conservation. *Conservation Biology*, 9:782-791.
- Laurance, W.F.; Cochrane, M.A.; Bergen, S.; Fearnside, P.M.; Delamônica, P.; Barber, C.; D'Angelo, S.; Fernandes, T. 2001. The Future of the Brazilian Amazon. *Science Magazine*, 291: 438.
- Ledru, M.P. 1993. Late quaternary environmental and climatic changes in central Brazil. *Quaternary Research*, 39: 90–98.

- Ledru, M.P.; Braga, P.I.S.; Soubies, F.; Fournier, M.; Martin, L.; Suguio, K.; Turcq, B. 1996. The last 50 000 years in the Neotropics (Southern Brazil): evolution of vegetation and climate. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 123: 239–257.
- Lerner, H.R.L. 2007. *Molecular Phylogenetics of Diurnal Birds of Prey in the Avian Accipitridae Family*. Doctor's Thesis. University of Michigan, 125pp.
- Machado, A. B. M.; Martins, C. S.; Drummond, G. M. 2005. *Lista da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. Incluindo as Listas das Espécies Quase Ameaçadas e Deficientes em Dados*. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 160pp.
- Machado, A. B. M.; Martins, C. S.; Drummond, G. M. 2008. *Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção*. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2 volumes, 1420 pp.
- Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 27: 209-220.
- Martínez-Cruz, B.; David, V.A.; Godoy, J.A.; Negro, J.J.; O'Brien, S. J.; Johnson, W.E. 2002. Eighteen polymorphic microsatellite markers for the highly endangered Spanish imperial eagle (*Aquila adalberti*) and related species. *Molecular Ecology*, 2: 323-326.
- Martínez-Cruz, B.; Godoy, J.A.; Negro, J.J. 2004. Population genetics after fragmentation: the case of the endangered Spanish imperial eagle (*Aquila adalberti*). *Molecular Ecology*, 13: 2243-2255.
- Martínez-Cruz, B.; Godoy, J.A.; Negro, J.J. 2007. Population fragmentation leads to spatial and temporal genetic structure in the endangered Spanish imperial eagle. *Molecular Ecology*, 16: 477–486.
- Martins, S. S.; Lima, E.M.; Silva Jr., J. S. 2005. Predation of a Bearded Saki (*Chiropotes utahick*) by a Harpy Eagle (*Harpia harpyja*). *Neotropical Primates*, 13: 7-10.
- McDonald, P.G.; Olsen, P.D.; Cockburn, A. 2005. Sex allocation and nestling survival in a dimorphic raptor: does size matter? *Behavioral Ecology* 16: 922-930.

- McNeely, J. A.; Miller, K. R.; Reid, W. V.; Mittmeier, R. A.; Werner, T. B. 1990. *Conserving the world's biological diversity*. IUCN, Gland, Switzerland.
- Mikich, S.B.; Bérnils, R.S. 2004. *Livro Vermelho da Fauna Ameaçada no Estado do Paraná*. Disponível em: <http://www.pr.gov.br/iap>. Acesso em 20 de dezembro de 2008.
- Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal - MMA 2008. *Lista oficial de espécies da flora ameaçada de extinção*. Disponível em: www.mma.gov.br. Acesso em 20 de dezembro de 2008.
- Mira, S.; Wolff, K.; Cancela M.L. 2005. Isolation and characterization of microsatellite markers in Bonelli's eagle (*Hieraaetus fasciatus*). *Molecular Ecology*, 5: 493-495.
- Mori, S.A.; Boom, B.M.; Prance, G.T. 1981. Distribution patterns and conservation of eastern Brazilian coastal forest tree species. *Brittonia*, 33: 233-245.
- Muñiz-López, R. 2008. Revisión de la situación del Águila Harpía *Harpia harpyja* en Ecuador. *Cotinga* 29: 42–47.
- Myers, N.; Mittermeier, R.A.; Mittermeier, C.G.; Fonseca, G.A.B.; Kent, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403: 853-845.
- Negro, J.J.; Hiraldo, F. 1992. Sex ratios in broods of the lesser kestrel *Falco naumanni*. *Ibis*, 134:190-191.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89: 583–590.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, 512 pp.
- Nei, M.; Tajima, F. 1981. DNA polymorphism detectable by restriction Endonucleases. *Genetics*, 97: 145-163.
- Nesje, M.; Røed, K. H. 2000a. Microsatellite DNA markers from the gyrfalcon (*Falco rusticolus*) and their use in other raptor species. *Molecular Ecology*, 9: 1438-1440.

- Nesje, M.; Røed, K. H.; Lifjeld, J. T.; Lindberg, P.; Steen, O. F. 2000b. Genetic relationships in the peregrine falcon (*Falco peregrinus*) analysed by microsatellite DNA markers. *Molecular Ecology*, 9: 53–60.
- Ohta, T.; Kimura, M. 1973. A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. *Genetical Research*, 22: 201-204.
- Oliveira, A.L.; Silva, R.B. 2006. Registro de Harpia (*Harpia harpyja*) no cerrado de Tapira, Minas Gerais, Brasil. *Revista Brasileira de Ornitologia*, 14: 433-434.
- Oliveira-Filho, A.T.; Ratter, J.A. 1995. A study of the origin of central Brazilian forests by the analysis of plant species distribution patterns. *Edinburgh Journal of Botany*, 52: 141-194.
- Olmos, F.; Pacheco, J.F.; Silveira, L.F. 2006. Notas sobre aves de rapina (*Cathartidae*, *Acciptridae* e *Falconidae*) brasileiras. *Revista Brasileira de Ornitologia*, 14: 401-404.
- Pacheco, J.F.; Fonseca, P.S.M.; Parrini, R. 2003. Coletânea de registros recentes de *Harpia harpyja* (L.) para os estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo. *Atualidades Ornitológicas*, 111: 7 -10.
- Paetkau, D.; Calvert, W.; Stirling, I.; Strobeck, C. 1995. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology*, 4: 347-354.
- Panchal, M. 2008. The automation of nested clade phylogeographic analysis. *Bioinformatics* 23: 509-510.
- Peakall, R.; Smouse P.E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6: 288-295.
- Pearce, J. M.; Fields R. L.; Scribner, K. T. 1997. Nest materials as a source of genetic data for avian ecological studies. *Journal of Field Ornithology*, 68: 471–481.

- Pereira, A.M.; Salzo, M.I. 2006. Primeiro registro da nidificação de *Harpia harpyja* (Falconiformes, Accipitridae) na Serra da Bodoquena (Mato Grosso do Sul, Brasil). *Revista Brasileira de Ornitologia*, 14: 157-160.
- Peres, C.A. 1990. A Harpy Eagle successfully captures an adult male red howler monkey. *The Wilson Bulletin*, 102: 560-561.
- Peterson, A.T.; Nyári, A. 2007. Ecological niche conservatism and Pleistocene refugia in the thrush-like mourner, *Schiffornis* sp., in the Neotropics. *Evolution*, 62: 173-183.
- Pimm, S.L. 1991. *The Balance of Nature? Ecological Issues in the Conservation of Species and Communities*. University of Chicago Press.
- Pivatto, M.A.C; Manço, D.G.; Straube, F.C.; Urban-Filho, A.; Milano, M. 2006. Aves do Planalto da Bodoquena, Estado do Mato Grosso do Sul (Brasil). *Atualidades Onitológicas*, 129.
- Por, F.D. 1992. *Sooretama: the Atlantic rain forest of Brazil*. SPB Academic Publishing, The Hague. 130 pp.
- Posada, D.; Crandall, K.A. 1998. MODELTEST: Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14: 817-818.
- Posada, D.; Crandall, K.A.; Templeton, A.R. 2000. GeoDis: a program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. *Molecular Ecology*, 9: 487-488.
- Prado, D.E.; Gibbs, P.E. 1993. Patterns of species distributions in the dry seasonal forests of South America. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 80: 902-927.
- Primmer, C.R.; Raudsepp, T.; Chowdhary, B.P.; Moller, A.P.; Ellegren, H. 1997. Low frequency of microsatellites in the avian genome. *Genome Research*, 7: 471-482.
- Pritchard, J. K.; Stephens, M.; Donnelly, P. 2000. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*, 155: 945-959.
- Pritchard, J.K.; Wen, W. 2003. *Documentation for the Structure software, Version 2*. Department of Human Genetics, University of Chicago, USA.

- Prugnolle, F.; Meeus, T. 2002. Inferring sex-biased dispersal from population genetic tools: a review. *Heredity*, 88: 161–165.
- Quinn, T.W. 1992. The genetic legacy of Mother Goose – phylogeographic patterns of lesser snow goose *Chen caerulescens caerulescens* maternal lineages. *Molecular Ecology*, 1: 105-117.
- Rede Nacional de Combate ao Tráfico de Animais Silvestres – Renctas 2001. *1º Relatório Nacional sobre o Tráfico de Fauna Silvestre*. Disponível em: http://www.renctas.org.br/pt/trafico/rel_renctas.asp. Acesso em 20 de dezembro de 2008.
- Reed, D.H.; Lowe, E.; Briscoe, D.A.; Frankham, R. 2003. Estimates of minimum viable population sizes for vertebrates and factors influencing those estimates *Conservation Genetic*, 4: 405-410.
- Rettig, N. 1978. Breeding behavior of the harpy eagle (*Harpia harpyja*). *Auk*, 95:629-643.
- Rice, W.R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43: 223-225.
- Riedstra, B.; Dijkstra, C.; Daan, S. 1998. Daily energy expenditure of male and female marsh harrier nestlings. *Auk*, 115: 635–641.
- Rizzini, C.T. 1979. *Tratado de fitogeografia do Brasil*. Editora Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Rodrigues, M. 2008. Noteworthy bird records at Lagoa Santa, southeastern Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 25: 150–153.
- Rodríguez, J.P.; Rojas-Suárez, F. 1995. *El Libro Rojo de la fauna Venezolana*. Editorial Ex Libris. Venezuela: Provita y Fundacion Polar, 444 pp.
- Rogers, A. R.; Harpending, H. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, 9: 552–569.
- Roques, S.; Negro, J.J. 2005. MtDNA diversity and population history of a dwindling raptorial bird, the red kite (*Milvus milvus*). *Biological Conservation*, 126: 41–50.

- Rosenfield, R.N.; Bielefeldt, J.; Vos, S.M.; 1996. Skewed sex ratios in Cooper's hawk offspring. *Auk*, 113: 957–960.
- Rudnick, J.A.; Katzner, T.E.; Bragin, E.A.; Rhodes Jr, E.; Dewoody, J.A. 2005. Using naturally shed feathers for individual identification, genetic parentage analyses, and population monitoring in an endangered Eastern imperial eagle (*Aquila heliaca*) population from Kazakhstan. *Molecular Ecology*, 14: 2959-2967.
- Ruschi, A. 1979. *Aves do Brasil*. Editora Rios, São Paulo, 335 pp.
- Salazar, L.F.; Nobre, C.A.; & Oyama, M.D. 2007. Climate change consequences on the biome distribution in tropical South America. *Geophysical Research Letters*, 34: L09708, doi:10.1029/2007GL029695.
- Schlotterer, C. 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, 109: 365–371.
- Schneider, S.; Excoffier, L. 1999. Estimation of Past Demographic Parameters From the Distribution of Pairwise Differences When the Mutation Rates Vary Among Sites: Application to Human Mitochondrial DNA. *Genetics*, 152: 1079-1089.
- Schuelke, M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, 18: 233-234.
- Secretaria de Meio Ambiente do Estado de São Paulo 2008. *Lista de Animais Ameaçados de Extinção em São Paulo*. Disponível em: <http://www.ambiente.sp.gov.br/fauna.php>. Acesso em 20 de dezembro de 2008.
- Sefc, K.M.; Payne, R.B.; Sorenson, M.D. 2003. Microsatellite amplification from museum feather samples: Effects of fragment size and template concentration on genotyping errors. *The Auk*, 120: 982–989.
- Segelbacher, G. 2002. Noninvasive genetic analysis in birds: testing reliability of feather samples. *Molecular Ecology*, 2: 367–369.
- Seielstad, M.T.; Minch, E.; Cavalli-Sforza, L.L. 1998. Genetic evidence for a higher female migration rate in humans. *Nature Genetics*, 20: 278–280.

- Selkoe, K.A.; Toonen, R.J. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*, 9: 615–629.
- Sick, H. 1997. *Ornitologia Brasileira*. Editora Nova Fronteira, Rio de Janeiro, 912 pp.
- Silveira, L.F.; d’Horta, F.M. 2002; A Avifauna da Região de Vila Bela da Santíssima Trindade, Mato Grosso. *Papéis Avulsos de Zoologia*, 42:265-286.
- Silveira, L.F.; Develey, P.F.; Pacheco, J.F.; Whitney, B.M. 2005. Avifauna of the Serra das Lontras–Javi montane complex, Bahia, Brazil. *Cotinga*, 24: 45–54.
- Slatkin, M. 1985. Gene Flow in natural populations. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 16: 393–430.
- Slatkin, M.; Hudson, R.R. 1991. Pairwise Comparisons of Mitochondrial DNA Sequences in Stable and Exponentially Growing Populations. *Genetics*, 129: 555-562.
- Soares, E.S.; Amaral, F.S.R.; Carvalho-Filho, E.P.M.; Granzinoli, M.A; Albuquerque, J.L.B.; Lisboa, J.S.; Azevedo, M.A.G.; Moraes, W.; Sanaiotti, T.; Guimarães, I.G. 2008. *Plano de Ação Nacional para a Conservação de Aves de Rapina*. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, Brasília, 136 pp.
- SOS Mata Atlântica; Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais – INPE 2008. *Atlas dos Remanescentes Florestais da Mata Atlântica Período 2000-2005*. Disponível em: www.sosmatatlantica.org.br. Acesso em 20 de dezembro de 2008.
- Spielman, D.; Brook, B.W.; Frankham, R. 2004. Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them. *PNAS*, 42: 15261-15264.
- Srbek-Araujo, A. C.; Chiarello, A. G. 2006. Registro recente de Harpia, *Harpia harpyja* (Linnaeus) (Aves, Accipitridae), na Mata Atlântica da Reserva Natural Vale do Rio Doce, Linhares, Espírito Santo e implicações para a conservação regional da espécie. *Revista Brasileira de Zoologia*, 23: 1264-1267.
- Stotz, D.F.; Fitzpatrick, J.W.; Parker III, T. A.; Moskovits, D.K. 1996. *Neotropical Birds: Ecology and Conservation*. Chicago, University of Chicago Press, 502pp.

- Swart, M. K. J.; Ferguson, J. W.; H., Dutoit, R; Flamand, J. R. B. 1994. Substantial genetic variation in southern African Black Rhinoceros (*Diceros bicornis*). *Journal of Heredity*, 85: 261–266.
- Taberlet, P.; Waits, L.P.; Luikart, G. 1999. Non-invasive genetic sampling: Look before you leap. *Trends in Ecology and Evolution*, 14: 323-327.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123: 585-595.
- Tella, J.L.; Donazar, J.A.; Negro, J.J.; Hiraldo, F. 1996. Seasonal and interannual variations in the sex-ratio of lesser kestrel *Falco naumanni* broods. *Ibis*, 138: 342-345
- Templeton, A.R. 1998. Nested clade analyses of phylogeographic data: Testing hypotheses about gene flow and population history. *Molecular Ecology*, 7: 381-397.
- Templeton, A.R., 2006. *Population Genetics and Microevolutionary Theory*. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, USA.
- Templeton, A.R.; Boerwinkle, E.; Sing, C.F. 1987. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. I. Basic theory and an analysis of alcohol dehydrogenase activity in *Drosophila*. *Genetics*, 117: 343–351.
- Templeton, A.R.; Sing, C.F. 1993. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. IV. Nested analyses with cladogram uncertainty and recombination. *Genetics*, 134: 659–669.
- Thiollay, J. 1989. Area requirements for the conservation of rain forest raptors and game birds in French Guyana. *Conservation Biology*, 3: 128-137.
- Thompson, J. D.; Higgins, D. G.; Gibson, T. J. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Resesarch*, 22: 4673-4680.

- Trinca, C.T.; Ferrari, S.F.; Lees, A.C. 2008. Curiosity killed the bird: arbitrary hunting of Harpy Eagles *Harpia harpyja* on an agricultural frontier in southern Brazilian Amazonia. *Cotinga* 30: 12–15.
- Van Oosterhout, C.; Hutchinson, W.F.; Wills, D.P.M.; Shipley, P. 2004. Microchecker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4: 535-538.
- Vargas, G.J.J.; Whitacre, D.; Mosquera, R.; Albuquerque, J.; Piana R.; Thiollay, J.M.; Márquez, C.; Sánchez, J. E.; López, M. L.; Midence, S.; Matola, S.; Aguilar, S.; Rettig, N.; Sanaiotti, T. 2006. Estado y Distribución Actual del Águila Arpía (*Harpia Harpyja*) en Centro y Sur América. *Ornitología Neotropical*, 17: 39–55.
- Vivo, M. 1997. Mammalian evidence of historical ecological change in the Caatinga semiarid vegetation of northeastern Brazil. *Journal of Comparative Biology*, 2: 65–73.
- Wandeler, P.; Hoeck, P.E.A.; Keller, L.F. 2007. Back to the Future: Museum Specimens in Population Genetics. *Trends in Ecology and Evolution*, 22: 634-642
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, 15: 323-354.
- Yu, Y.; Nie, L.; He, Z.Q.; Wen, J. K.; Jian, C.S.; Zhang, Y.P. 1999. Mitochondrial DNA variation in cattle of South China: Origin and introgression. *Animal Genetics*, 30: 245-250.

Anexo I. Tabela com registros de gavião-real em localidades no Brasil. Apresenta Bioma, o Estado, a localidade, registros natureza, museus e de indivíduos removidos da natureza.

Identificação	Bioma	Estado	Localidade	Natureza (Data)	Museu (Data)	Indivíduos removidos (Data)
1	Amazônia	Amapá	Rio Tartarugal	Novaes, 1974: Avistamento (antes de 1974)		
2	Amazônia	Amapá	Rio Cupixi/Reserva do Desenvolvimento Sustentável do Rio Iratapuru		IEPA 1160 (5/8/2005)	
3	Amazônia	Amapá	Estrada para Vila Nova			Criadouro da RPPN REVECON, Macapá - AP (2007)
4	Amazônia	Acre	Sena Madureira	Peres, 1990: avistamento (1989)		Zoológico Chico Mendes, Rio Branco - AC (2008)
5	Amazônia	Acre	Senador Guiomard			Zoológico Chico Mendes, Rio Branco - AC (2006)
6	Amazônia	Amazonas	Floresta Nacional Purus	Ninho fotografado pela Administração da Flona Purus, Boca do Acre - AM (2009)		
7	Amazônia	Amazonas	Parque Nacional de Anavilhas	Registro fotográfico de Bierregard (2004)		
8	Amazônia	Amazonas	Balbina	Registro fotográfico de Robson Czaba (1997)		
9	Amazônia	Amazonas	Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá	Olmos et al., 2006:Ninho		
10	Amazônia	Amazonas	Parque Nacional do Jaú	Borges et al., 2000: Avistamento (1994)		
11	Amazônia	Amazonas	Novo Aripuanã	Indivíduo apedrejado resgatado e devolvido na natureza em Novo Aripuanã pelo Projeto Gavião-real Projeto Gavião-real/INPA (2008)		
12	Amazônia	Amazonas	Barreirinha	Indivíduo machucado resgatado pelo IBAMA - AM, reabilitado e devolvido na natureza em Barreirinha pelo Projeto Gavião-real/INPA (2007 a 2008)		

Continuação 1

Identificação	Bioma	Estado	Localidade	Natureza (Data)	Museu (Data)	Indivíduos removidos (Data)
13	Amazônia	Amazonas	Lago Cururu/Manacapuru	Ninhos monitorados pelo Projeto Gavião-real (a partir de 2002)		
14	Amazônia	Amazonas	Manaquiri	Ninho monitorado pelo Projeto Gavião-real/INPA (a partir de 2004)		
15	Amazônia	Amazonas	Parintins	Ninhos monitorados pelo Projeto Gavião-real/INPA (a partir de 2004); indivíduo caçado e entregue ao Projeto Gavião-real/INPA (2006)	INPA 629 (1/6/2004)	Indivíduo caçado e entregue ao Projeto Gavião-real/INPA (2006)
16	Amazônia	Amazonas	Reserva Adolpho Duke	Ninhos monitorados pelo Projeto Gavião-real/INPA (a partir de 2001); indivíduo caçado e penas entregue ao Projeto Gavião-real/INPA (2003); Avistamento pela Equipe do Projeto Gavião-real/INPA (2007) Indivíduo baleado resgatado pelo IBAMA - AM, reabilitado e devolvido na natureza em Nhamundá pelo Projeto Gavião-real/INPA (2006); indivíduo caçado e entregue ao Projeto Gavião-real/INPA (2007)		Indivíduo caçado e penas entregue ao Projeto Gavião-real/INPA (2003)
17	Amazônia	Amazonas	Nhamundá	Indivíduo caçado e entregue ao Projeto Gavião-real/INPA (2007)		Indivíduo caçado e entregue ao Projeto Gavião-real/INPA (2007)
18	Amazônia	Amazonas	Tefé		MNRJ 33547 (1985)	
19	Amazônia	Amazonas	Itacoatiara		INPA 588 (1/11/1986); INPA 630 (16/08/2000)	
20	Amazônia	Amazonas	Reserva do Desenvolvimento Sustentável Amanã		INPA 628 (21/2/2004)	
21	Amazônia	Amazonas	Reserva do Desenvolvimento Sustentável Mamirauá		INPA 829 (27/6/1995)	
22	Amazônia	Amazonas	Reserva PDBFF ZF 2		INPA 830 (1979)	
23	Amazônia	Amazonas	Km 59, BR174		INPA 828 (03/2001)	
24	Amazônia	Amazonas	Estirão do Equador		MZJH 0220 (20/2/1961)	

Continuação 2

Identificação	Bioma	Estado	Localidade	Natureza (Data)	Museu (Data)	Indivíduos removidos (Data)
25	Amazônia	Amazonas	Manaus		PANS 67603 (1925); UCLABMC 2203, esqueleto, (1942)	Indivíduo caçado e penas entregue ao Projeto Gavião-real/INPA (2009)
26	Amazônia	Amazonas	Labrea			Zoológico do Centro Integrado de Guerra na Selva CIGS, Manaus - AM
27	Amazônia	Amazonas	Estação Ecológica Juami-Japurá			Indivíduo caçado e unhas da garra entreguem à Administração da Estação Juami-Japurá, repassado ao Projeto Gavião-real/INPA (2007 - 2008)
28	Amazônia	Amazonas	Manicoré			Indivíduo caçado e penas entregue ao Projeto Gavião-real/INPA, Manaus - AM (2005)
29	Amazônia	Amazonas	Presidente Figueiredo			Indivíduo caçado e garra entregue ao Projeto Gavião-real/INPA (1995-2000)
30	Amazônia	Maranhão	Esplanada	Ferrari & Carvalho, 2003: avistamento (2003)		
31	Amazônia/Cerrado	Maranhão	Alto Parnaíba	Ninhos monitorados pela Nordeste (2007)		
32	Amazônia/Cerrado	Mato Grosso	Barra do Bugre	Ninho na Pousada Curupira (Barra do Bugre - MT) monitorado pelo Projeto Gavião-real/INPA (a partir de 2004)		
33	Amazônia	Mato Grosso	RPPN Cristalino	Ninho registrado pela Administração da RPPN Cristalino (2006)		
34	Amazônia/Cerrado	Mato Grosso	Vila Bela da Santíssima Trindade	Silveira e D'Horta, 2002: avistamento		
35	Amazônia	Mato Grosso	Xingu	Sick, 1997: Relato de ocorrência		Sick, 1997: Indivíduo mantido preso por Tribo Indígena (1947 - 1957)

Continuação 3

Identificação	Bioma	Estado	Localidade	Natureza (Data)	Museu (Data)	Indivíduos removidos (Data)
36	Amazônia	Mato Grosso	Rio Xingu		AMNH 29102 (1931)	
37	Amazônia/Cerrado	Mato Grosso	Araguaiana		MZJH 0221 (1952)	
38	Amazônia	Mato Grosso	Juruena			Trinca et al., 2007: Indivíduo caçado (2000-2007)
39	Amazônia	Mato Grosso	Nova Bandeirantes			Trinca et al., 2007: Três indivíduos caçados (2000-2007)
40	Amazônia	Mato Grosso	Alta Floresta			Trinca et al., 2007: Sete indivíduos caçados (2000-2007); Zoológico da Universidade do Mato Grosso, Cuiabá - MT
41	Amazônia	Mato Grosso	Nova Monte Verde			Trinca et al., 2007: Indivíduo caçado (2000-2007)
42	Amazônia	Mato Grosso	Aripuanã			Indivíduo caçado e penas entregue ao SOS Falconiformes (2007 - 2008)
43	Amazônia	Mato Grosso	Guarantã do Norte			Zoológico da Universidade Federal do Mato Grosso UFMT, Cuiabá - MT
44	Amazônia/Cerrado	Mato Grosso	Sinop			Zoológico de Americana, Americana - SP
45	Amazônia	Pará	Rio Tocantins	Sick, 1997: Relato de ocorrência; Schubart, 1965: Avistamento (1938)		
46	Amazônia	Pará	Rio Cururu	Sick, 1997: Relato de ocorrência		
47	Amazônia	Pará	Floresta Nacional Tapajós	Ninhos monitorados pelo Projeto Gavião-real/INPA (a partir de 2004);Henriques et al., 2003		
48	Amazônia	Pará	Floresta Nacional de Carajás	Ninhos monitorados pelo Projeto Gavião-real/INPA (a partir de 2007); indivíduo resgatado e devolvido a natureza pelo IBAMA - PA (2006)		

Continuação 4

Identificação	Bioma	Estado	Localidade	Natureza (Data)	Museu (Data)	Indivíduos removidos (Data)
49	Amazônia	Pará	Goinésia	Ninho monitorado pelo Projeto Gavião-real (a partir de 2004)		Fundação Zoobotânica de Marabá, Marabá – PA
50	Amazônia	Pará	Faro	Ninho monitorado pelo Projeto Gavião-real (a partir de 2004); Indivíduo caçado e entregue ao Projeto Gavião-real/INPA (2004)		
51	Amazônia	Pará	Tailândia	Ninho monitorado pelo Projeto Gavião-real (a partir de 2004); Olmos et al., 2006: avistamento		Criadouro Conservacionista Tibagi, Serra Guaramiranga - CE (2006)
52	Amazônia	Pará	Altamira	Ninho monitorado pelo Projeto Gavião-real (2009)		
53	Amazônia	Pará	Estrada Aguás Claras/Serra dos Carajás/Paraupébas	Pacheco, et al. 2007: registro fográfico		
54	Amazônia	Pará	Paragominas	Galetti & Carvalho, 2000: nidificação		Sete Indivíduos do Bioparque Amazônia, Belém – PA
55	Amazônia	Pará	Rio Trombetas	Olmos et al., 2006: avistamento		
56	Amazônia	Pará	Estação Científica Ferreira Penna/Floresta Nacional do Caxiuanã/Melgaço	Martins et al. 2005: avistamento		
57	Amazônia	Pará	Reserva Extrativista Tapajós Arapiuns	Peres et al., 2003		
58	Amazônia	Pará	Rio Guamá		MPEG 3445 (1904)	
59	Amazônia	Pará	Bragança	Bond, 1927: nidificação (1926)	WFVZ 15967, ovos (1926)	
60	Amazônia	Pará	Capim		MZUSP 43864 (1959)	
61	Amazônia	Pará	Curuça		MPEG A08643	
62	Amazônia	Pará	Rio Tapajós		MHNT 6721 (1997)	

Continuação 5

Identificação	Bioma	Estado	Localidade	Natureza (Data)	Museu (Data)	Indivíduos removidos (Data)
63	Amazônia	Pará	Rondon do Pará			Dois indivíduos do Criadouro CRAX Sociedade de Pesquisa do Manejo e Conservação da Fauna Silvestre, Contagem – MG
64	Amazônia	Pará	Curionópolis			Indivíduo resgatado pelo IBAMA - PA (2009)
65	Amazônia	Pará	Tomé Açu			Indivíduo resgatado pelo IBAMA - PA (2009)
66	Amazônia	Pará	Santarém			Quatro Indivíduos do Zoológico das Faculdades Integradas Tapajós, Santarém – PA
67	Amazônia	Pará	Serra Pelada/Parauapebas			Parque das Aves, Foz do Iguaçu – PR
68	Amazônia	Pará	Jacundá			Zoológico de Carajás, Carajás – PA
69	Amazônia	Pará	Área Indígena Xikrins			Zoológico de Carajás, Carajás – PA
70	Amazônia	Pará	Capitão Poço			Zoológico de São Paulo, São Paulo – SP
71	Amazônia	Pará	Tucuruí			Indivíduo caçado e penas entregues ao Projeto Gavião-real/INPA (2006); Dois indivíduos resgatados pelo IBAMA - PA (2006)
72	Amazônia	Rondônia	Seringueira			Indivíduo morreu eletrecutado em cabo de transmissão de alta tensão e a garra foi entregue ao Projeto Gavião-real/INPA (2000 - 2005)
73	Amazônia	Rondônia	Vilhena			Dois indivíduos do Criadouro Parque Dois Irmãos, Recife – PE

Continuação 6

Identificação	Bioma	Estado	Localidade	Natureza (Data)	Museu (Data)	Indivíduos removidos (Data)
74	Amazônia	Rondônia	Costa Marques		Exemplar, IBAMA - RO (1995)	
75	Amazônia	Rondônia	Rio Jamary		MNRJ 9264 (1909 -1914)	
76	Amazônia	Rondônia	Rio Ji-Paraná		MNRJ 9265 (1909 -1914)	
77	Amazônia	Rondônia	Reserva Biológica do Jaru	Asa encontrada pelo IBAMA - RO e entregue ao Projeto Gavião-real/INPA (2007)		
78	Amazônia	Rondônia	Chuoinguaia	Avistamento e penas encontradas pela Equipe do Projeto Gavião-real/INPA (2007)		
79	Amazônia	Rondônia	Parque Natural Municipal de Pimenta Bueno	Avistamento e ninho registrado por Almério Alcântara, dados sendo trabalhados para publicação (2008)		
80	Amazônia	Rondônia	Campo Novo	Ninho monitorado pelo Projeto Gavião-real/INPA (2006)		
81	Amazônia	Rondônia	Parque Pacas Novos	Ninho relatado pelo Administração do Parque Pacas Novos - RO (2008)		
82	Amazônia	Rondônia	Porto Velho			Pena de Flexa Indígena: Projeto Gavião-real (2000-2007)
83	Amazônia	Roraima	Boa Vista		MZJH 1013 (1968); Museu Regional de Boa Vista	
84	Amazônia	Roraima	Boca do Rio Joaperi	Registro fotográfico pela ONG Vitória Amazônia (Manaus - AM)		
85	Amazônia	Roraima	Rio Mucajaí			Pinto, 1966: Indivíduo capturado no ninho

Continuação 7

Identificação	Bioma	Estado	Localidade	Natureza (Data)	Museu (Data)	Indivíduos removidos (Data)
86	Amazônia	Roraima	Parque Nacional da Serra da Mocidade	Registro Fotográfico realizado pela Administração do Parque Nacional da Serra da Mocidade		
87	Amazônia	Roraima	Parque Nacional do Viruá	Ninho relatado pela Administração do Parque Nacional do Viruá		
88	Amazônia	Roraima	Estação Ecológica do Maracá	Avistamento relatado pela Administração Estação Ecológica do Maracá		
89	Mata Atlântica	Bahia	Porto Seguro	Ninho monitorado pelo Projeto Gavião-real/INPA (a partir de 2004)		
90	Mata Atlântica	Bahia	Parque Nacional do Pau-Brasil	Avistamento realizado pela Equipe do Projeto Gavião-real/INPA (a partir de 2008)		
91	Mata Atlântica	Bahia	Estação Experimental Pau-Brasil/ Porto Seguro	Galetti et al. 1997: Avistamento (1991)		
92	Mata Atlântica	Bahia	Serra das Lontras	Silveira et al. 2005: Avistamento (2000)		
93	Mata Atlântica	Bahia	Itagimirim	Indivíduo resgatado pelo IBAMA - BA, reabilitado e devolvido na natureza no PARNA Pau Brasil - BA pelo Projeto Gavião-real/INPA (2008)		
94	Mata Atlântica	Bahia	Jequié	Pinto, 1935: Relato (antes de 1935)		
95	Mata Atlântica	Bahia	Amargosa	Pinto, 1935: Relato (antes de 1935)		

Continuação 8

Identificação	Bioma	Estado	Localidade	Natureza (Data)	Museu (Data)	Indivíduos removidos (Data)
96	Mata Atlântica	Bahia	Porto Seguro	Pinto, 1935: Relato de recebimento de uma garra como troféu de caça (antes de 1935); Criadouro da RPPN Veracel, Porto Seguro - BA		
97	Mata Atlântica/Caatinga/Cerrado	Bahia	Mundo Novo		Garra depositada no Museu do Mosteiro Jequitibá, Mundo Novo - BA (1955-1965)	
98	Mata Atlântica	Bahia	Tancredo Neves			Zoológico de Salvador, Salvador – BA
99	Mata Atlântica	Bahia	Eunápolis			Criadouro de Águia Branca, Águia Branca – ES
100	Mata Atlântica	Bahia	Monte Pascoal			Zoológico de São Paulo, São Paulo – SP
101	Mata Atlântica	Espírito Santo	Reserva Natural Vale do Rio Doce, Linhares	Pacheco et al. 2003: Avistamento (1985, 1992, 2000 e 2002); Srbek-Araujo & Chiarello, 2006: Avistamento (2005)		
102	Mata Atlântica	Espírito Santo	Pedro Canário	Pacheco et al. 2003: Avistamento (1986)		
103	Mata Atlântica	Espírito Santo	Reserva Biológica Augusto Ruschi, Santa Teresa	Pacheco et al. 2003: Avistamento (1990)		

Continuação 9

Identificação	Bioma	Estado	Localidade	Natureza (Data)	Museu (Data)	Indivíduos removidos (Data)
104	Mata Atlântica	Espírito Santo	Reserva Biológica de Sooretama, Sooretama	Pacheco et al. 2003: Avistamento (1996)		
105	Mata Atlântica	Espírito Santo	Floresta Nacional de Goytacazes	Registro Fotográfico realizado pela Administração da Floresta Nacional de Goytacazes		
106	Mata Atlântica	Espírito Santo	Reserva Biológica do Corrego do Viado	Ruschi, 1979: Avistamento (antes de 1950)		
107	Mata Atlântica	Espírito Santo	Colatina	Sick, 1997: Ninho (1937)	MNRJ 39629 (10/06/1941); No 424, Museu Regional da Fauna e Flora, Itatiaia - RJ, transferido para MNRJ (1953); No 0361, Museu Lorenzutti, Linhares - ES (1958); Exemplar, Faculdade de Colatina	
108	Mata Atlântica	Espírito Santo	Linhares	Ruschi, 1979: Ninho (1944)	MBML 6761(12/3/1970); N° 0353, Museu Lorenzutti, Linhares - ES (1999); AMNH 7240 (1929)	Criadouro CRAX Sociedade de Pesquisa do Manejo e Conservação da Fauna Silvestre, Contagem – MG
109	Mata Atlântica	Espírito Santo	Santa Teresa		MBML 2097 (1945); MBML 6762 (1949)	
110	Mata Atlântica	Espírito Santo	São Gabriel da Palha			Ruschi, 1979: Indivíduo resgatado após cair do ninho (antes de 1950)
111	Mata Atlântica	Espírito Santo	Rio Claro/luna			Ruschi, 1979: Indivíduo capturado (antes de 1950)
112	Mata Atlântica/Cerrado	Mato Grosso do Sul	Bonito	Pereira & Salzo, 2006: Nidificação		

Continuação 10

Identificação	Bioma	Estado	Localidade	Natureza (Data)	Museu (Data)	Indivíduos removidos (Data)
113	Mata Atlântica/Cerrado	Mato Grosso do Sul	Parque Nacional da Serra da Bodoquena	Pereira & Salzo, 2006: avistamento; Pena encontrada na natureza pela Administração do Parque Nacional da Serra do Bodoquena, Bonito - MS (2007)		
114	Mata Atlântica/Cerrado	Mato Grosso do Sul	Serra da Bodoquena	Pivatto et al., 2006: avistamento		
115	Mata Atlântica	Minas Gerais	RPPN Serra do Relógio/Descoberto	Registro fotográfico divulgado pela RPPN Serra do Relógio		
116	Mata Atlântica	Minas Gerais	Cataguases	Oliveira & Silva, 2006: relato de registro fotográfico (1996)		
117	Mata Atlântica/Cerrado	Minas Gerais	Tapira	Oliveira & Silva, 2006: registro fotográfico		
118	Mata Atlântica/Cerrado	Minas Gerais	Lagoa Santa	Rodrigues, 2008: coleta de exemplar por J.T. Reinhardt (1847-1855)		
119	Mata Atlântica	Minas Gerais	Rio Mucuri		MNRJ 32531 (1920-1940)	
120	Mata Atlântica	Paraná	Bahia de Guaratuba	Scherer-Neto & Ribas, 2004: avistamento (2003)		
121	Mata Atlântica	Paraná	General Carneiro	Registro realizado Luciano Pizzatto e divulgado pelo Instituto ECOPLAN		
122	Mata Atlântica	Paraná	Laranjeiras do Sul		MHNCI 2893 (30/8/1964)	
123	Mata Atlântica	Paraná	Céu Azul		MHNCI 2918 (1982 -1983)	
124	Mata Atlântica	Paraná	Palmas		MZUSP 11187 (1925); MHNCI 2006	

Continuação 11

Identificação	Bioma	Estado	Localidade	Natureza (Data)	Museu (Data)	Indivíduos removidos (Data)
125	Mata Atlântica	Paraná	Foz do Iguaçu			Microchip 00-01BE-F5BA, Refúgio Biológico Bela Vista/Itaipu Binacional, Foz do Iguaçu – PR
126	Mata Atlântica	Paraná	Londrina			Straube, 2005: relato de indivíduo caçado (década de 1930)
127	Mata Atlântica	Rio Grande do Sul	Gravataí	Sick, 1997: Relato (antes de 1958)	MAO 151 (13/7/1938)	
128	Mata Atlântica	Rio Grande do Sul	Getúlio Vargas		Exemplar, Museu Regional Olívio Otto, Carazinho - RS (1939)	
129	Mata Atlântica	Rio Grande do Sul	Três Arroios		Exemplar, Museu Frei Miguel, Luzerna - SC (4/9/1927)	
130	Mata Atlântica	Rio Grande do Sul	Tapera/Selbach		Museu do Colégio La Salle Dores, Porto Alegre - RS (1940)	
131	Mata Atlântica	Rio Grande do Sul	Distrito Garibaldi/Taquara		MCN 072 (1923)	
132	Mata Atlântica	Rio Grande do Sul	Passo Fundo		MCN 088 (1940 - 1950)	
133	Mata Atlântica	Rio de Janeiro	Imediações da BR-116/Serra dos Órgãos	Pacheco et al. 2003: avistamento (1980)		
134	Mata Atlântica	Rio de Janeiro	Parque Nacional do Itatiaia	Pacheco et al. 2003: avistamento (1984 e 2000)		
135	Mata Atlântica	Rio de Janeiro	Itatiaia	Sick, 1997: Avistamento (1973)		
136	Mata Atlântica	Rio de Janeiro	Paraty	Pacheco et al. 2003: avistamento (1997)		
137	Mata Atlântica	Rio de Janeiro	Itaperuna		MF 470, MNRJ (6/9/1943)	

Continuação 12

Identificação	Bioma	Estado	Localidade	Natureza (Data)	Museu (Data)	Indivíduos removidos (data)
138	Mata Atlântica	Santa Catarina	Pilões	Albuquerque 1995: avistamento (1980)		
139	Mata Atlântica	Santa Catarina	Guaramirim	Sick, 1997: Relato de ocorrência (1948 - 1950)		
140	Mata Atlântica	Santa Catarina	Mafra	Sick, 1997: Relato de ocorrência (1948 - 1950)		
141	Mata Atlântica	Santa Catarina	Rio Peixe	Sick, 1997: Relato de ocorrência (1968)		
142	Mata Atlântica	Santa Catarina	Parque Estadual da Serra do Tabuleiro/Caldas da Imperatriz	Albuquerque 1995: avistamento (década de 1990)		
143	Mata Atlântica	Santa Catarina	Rancho Queimado		Museu do Homem do Sambaqui "Pe João Alfredo Rohr, S.J./Colégio Catarinense (27/05/1962)	
144	Mata Atlântica	São Paulo	Cananéia	Galetti et al. 1997: avistamento (1989, 1991 e 1993)		
145	Mata Atlântica	São Paulo	Ariiri	Galetti et al. 1997: avistamento (1990)		
146	Mata Atlântica/Cerrado	São Paulo	Palestina		Exemplar, Museu Didático Luiz Dino Vizotto, Uniesp, São José Rio Preto - SP (1970 -1973)	
147	Mata Atlântica/Cerrado	São Paulo	Ituverava		MZUSP 8261 (1911)	
148	Mata Atlântica	São Paulo	Poruba/Ubatuba		MHNT 6720 (1967)	

AMNH - American Museum of Natural History; IEPA - Instituto Estadual de Pesquisa do Amapá; MBML - Museu de Biologia Professor Mello Leitão; MPEG - Museu Paraense Emílio Goeldi; WFVZ - Western Foundation of Vertebrate Zoology; MZUSP - Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo; MHNCI - Museu de História Natural Capão da Imbuia; MCN - Museu Anchieta de Ciências Naturais; MZJH - Museu de Zoologia Professor José Hidasi.

Anexo II. Tabela de amostras obtidas na natureza, de museus e de criadouros. Traz informação sobre a fonte da amostra, a Organização cedente, o bioma, a localidade, o Município, o Estado, a data, o sexo determinado ou confirmado. A ausência de dado é identificado por (?).

Identificação da Amostra	Fonte da Amostra - Organização Cedente	Região (Bioma)	Localidade - Município	Estado	Data	Sexo Confirmado ou Determinado neste Estudo	Código do Projeto Gavião-real & LEGAL
Natureza							
1	Ninho/Penas - Projeto Gavião-real	Amazônia	Vila Amazônia - Parintins	Amazonas	2004	?	H2
2	Ninho/Penas - Projeto Gavião-real	Amazônia	Vila Amazônia - Parintins	Amazonas	2004	Fêmea	H15
3	Ninho/Penas - Projeto Gavião-real	Amazônia	Vila Amazônia - Parintins	Amazonas	2004	Fêmea	H16
4	Ninho/Penas - Projeto Gavião-real	Amazônia	Vila Amazônia - Parintins	Amazonas	2004	Fêmea	H19
5	Ninho/Penas - Projeto Gavião-real	Amazônia	Vila Amazônia - Parintins	Amazonas	2005	?	H20
6	Ninho/Penas - Projeto Gavião-real	Amazônia	Vila Amazônia - Parintins	Amazonas	2007	Fêmea	H162
7	Ninho/Penas - Projeto Gavião-real	Amazônia	Parintins	Amazonas	2008	Fêmea	H178
8	Ninho/Penas - Projeto Gavião-real	Amazônia	Lago Cururu - Manacapuru	Amazonas	2005	?	H1
9	Ninho/Penas - Projeto Gavião-real	Amazônia	Lago Cururu - Manacapuru	Amazonas	2002	Fêmea	H23
10	Ninho/Penas - Projeto Gavião-real	Amazônia	Reserva Duke - Manaus	Amazonas	2001	Fêmea	H3
11	Ninho/Penas - Projeto Gavião-real	Amazônia	Manaquiri	Amazonas	2004	Macho	H18
12	Ninho/Penas - Projeto Gavião-real	Amazônia	Floresta Nacional Tapajós	Pará	2004	Macho	H6
13	Ninho/Penas - Projeto Gavião-real	Amazônia	Floresta Nacional Tapajós	Pará	2004	?	H21
14	Ninho/Penas - Projeto Gavião-real	Amazônia	Tailândia	Pará	2004	Fêmea	H5

Continuação 1

Identificação da Amostra	Fonte da Amostra - Organização Cedente	Região (Bioma)	Localidade - Município	Estado	Data	Sexo Confirmado ou Determinado neste Estudo	Código do Projeto Gavião-real & LEGAL
15	Ninho/Penas - Projeto Gavião-real	Amazônia	Goinésia	Pará	2004	Fêmea	H17
16	Ninho/Penas - Projeto Gavião-real	Amazônia	Campo Novo	Rondônia	2006	Fêmea	H125
17	Avistamento/Penas - Projeto Gavião-real	Amazônia	Fazenda Imaculada - Chuoiंगाia	Rondônia	2007	Macho	H124
18	Ninho/Penas - Pousada Curupira/MT e Projeto Gavião-real	Amazônia	Barra do Bugre	Mato Grosso	2004	Fêmea	H127
19	Ninho/Penas - Parque Nacional da Serra do Bodoquena e Projeto Gavião-real	Cerrado/Mata Atlântica	Bonito	Mato Grosso do Sul	2005	Fêmea	H30
20	Ninho/Penas - Nordeste (Maranhão/MA)	Cerrado/Amazônia	Alto Parnaíba	Maranhão	2007	Fêmea	H149
21	Ninho/Penas - Nordeste (Maranhão/MA)	Cerrado/Amazônia	Alto Parnaíba	Maranhão	2007	Fêmea	H168
22	Ninho/Pena - Projeto Gavião-real	Amazônia	Parintins	Amazonas	2005	?	H215
23	Ninho/Pena - Projeto Gavião-real	Amazônia	Itacoatiara	Amazonas	2001	?	H201
24	Ninho/Pena - Projeto Gavião-real	Amazônia	Floresta Nacional de Carajás	Pará	2008	Macho	H212
25	Avistamento/Penas - Parque Nacional da Serra do Bodoquena (Bonito-AM)	Cerrado/Mata Atlântica	Parque Nacional da Serra do Bodoquena - Bonito	Mato Grosso do Sul	2007	Fêmea	H9
26	Morto/Pena de Flexa Indígena - Projeto Gavião-real	Amazônia	Porto Velho	Rondônia	?	Fêmea	H202
27	Morto/Garra - LEGAL e Projeto Gavião-real	Amazônia	Seringueira	Rondônia	2000-2005	?	H187
28	Caça/Tecido - Projeto Gavião-real	Amazônia	Floresta Nacional Tapajós	Pará	2007	Fêmea	H169
29	Caça/Tecido - Projeto Gavião-real	Amazônia	Faro	Pará	2004	?	H150
30	Caça/Penas - Projeto Gavião-real	Amazônia	Reserva Duke - Manaus	Amazonas	2003	Fêmea	H22
31	Caça/Penas - Projeto Gavião-real	Amazônia	Manicoré	Amazonas	2005	Fêmea	H24

Continuação 2

Identificação da Amostra	Fonte da Amostra - Organização Cedente	Região (Bioma)	Localidade - Município	Estado	Data	Sexo Confirmado ou Determinado neste Estudo	Código do Projeto Gavião-real & LEGAL
32	Caça/Garra - Projeto Gavião-real	Amazônia	Presidente Figueiredo	Amazonas	1995-2000	?	H151
33	Caça/penas - LEGAL e Projeto Gavião -real	Amazônia	Tucuruí	Pará	2006	Fêmea	H122
34	Caça/Tecido - IBAMA/AM e Projeto Gavião-real	Amazônia	Vila Amazônia - Parintins	Amazonas	2007	Macho	H159
35	Caça/Tecido - IBAMA/AM e Projeto Gavião-real	Amazônia	Comunidade Santa Maria do Aduacá - Nhanundá	Amazonas	2007	Macho	H158
36	Caça/Unha do garra - Estação Ecológica Juami Japurá	Amazônia	Estação Ecológica Juami Japurá	Amazonas	2007-2008	Fêmea	H180
37	Caça/penas - SOS Falconiformes (Belo Horizonte/MG)	Amazônia	Aripuanã	Mato Grosso	2007-2008	Fêmea	H177
38	Caça/Asa - Reserva Biológica do Jaru e IBAMA/RO	Amazônia	Reserva Biológica do Jaru	Rondônia	2007	Macho	H152
39	Caça/Asa - Projeto Gavião-real	Amazônia	?	Amazonas	2006	?	H14
40	Reabilitado e solto/Sangue - IBAMA/AM e Projeto Gavião-real	Amazônia	Nhanundá	Amazonas	2006	Fêmea	H126
41	Reabilitado e solto/Sangue - IBAMA/AM e Projeto Gavião-real	Amazônia	Barreirinha	Amazonas	2008	Fêmea	H161
42	Reabilitado e solto/Sangue - IBAMA/AM e Projeto Gavião-real	Amazônia	Novo Aripuanã	Amazonas	2008	Fêmea	H184
43	Resgatado e solto/Sangue - RPPN Veracel/BA, IBAMA/BA e Projeto Gavião-real	Mata Atlântica	Itagimirim - BA	Bahia	2008	Fêmea	H147
44	Resgatado e solto/Sangue - IBAMA/PA	Amazônia	Floresta Nacional de Carajás	Pará	2006	Macho	H163
Museu							
45	MNRJ 9264 - Museu Nacional do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro/RJ)	Amazônia	Rio Jamary - Jamary	Rondônia	1909-1914	?	H45
46	MNRJ 9265 - Museu Nacional do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro/RJ)	Amazônia	Rio Ji-Paraná - Ji-Paraná	Rondônia	1909-1914	Fêmea	H46
47	MNRJ 33547 - Museu Nacional do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro/RJ)	Amazônia	Tefé	Amazonas	1985	Macho	H49
48	MNRJ 39629 - Museu Nacional do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro/RJ)	Mata Atlântica	Colatina	Espírito Santo	10/6/1941	?	H50
49	MF 470 - Museu Nacional do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro/RJ)	Mata Atlântica	Itaperuna	Rio de Janeiro	6/9/1943	Fêmea	H51

Continuação 3

Identificação da Amostra	Fonte da Amostra - Organização Cedente	Região (Bioma)	Localidade - Município	Estado	Data	Sexo Confirmado ou Determinado neste Estudo	Código do Projeto Gavião-real & LEGAL
50	MNRJ 32531 - Museu Nacional do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro/RJ)	Mata Atlântica	Rio Mucuri	Minas Gerais	1920-1940	Fêmea	H48
51	MNRJ 26353 - Museu Nacional (Rio de Janeiro/RJ)	?	?	?	?	?	H52
52	MNRJ 22382 - Museu Nacional do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro/RJ)	?	?	?	?	Fêmea	H47
53	Nº 424 - Museu Regional da Fauna e Flora - Parque Nacional de Itatiaia (Rio de Janeiro/RJ)	Mata Atlântica	Colatina	Espírito Santo	1953	Fêmea	H44
54	INPA 588 - Coleção de Aves do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA (Manaus/AM)	Amazônia	Itacatiara	Amazonas	1/11/1986	?	H55
55	INPA 628 - Coleção de Aves do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA (Manaus/AM)	Amazônia	Reserva do Desenvolvimento Sustentável Amanã	Amazonas	21/2/2004	Fêmea	H53
56	INPA 629- Coleção de Aves do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA (Manaus/AM)	Amazônia	Parintins	Amazonas	1/6/2004	Macho	H56
57	INPA 829 - Coleção de Aves do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA (Manaus/AM)	Amazônia	Reserva do Desenvolvimento Sustentável Mamirauá	Amazonas	27/6/1995	Fêmea	H57
58	INPA 830 - Coleção de Aves do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA (Manaus/AM)	Amazônia	Reserva PDBFF ZF 2	Amazonas	1979	Fêmea	H59
59	INPA 828 - Coleção de Aves do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA (Manaus/AM)	Amazônia	Km 59 BR174	Amazonas	2001	Macho	H58
60	INPA 630 - Coleção de Aves do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA (Manaus/AM)	Amazônia	Itacatiara	Amazonas	16/8/2000	Fêmea	H54
61	MHNCI 2006 - Museu de História Natural Capão do Imbuia (Curitiba/PR)	Mata Atlântica	Palmas	Paraná	?	Fêmea	H171
62	MHNCI 2918 - Museu de História Natural Capão do Imbuia (Curitiba/PR)	Mata Atlântica	Céu Azul	Paraná	1982 - 1983	Fêmea	H28
63	MHNCI 2893 - Museu de História Natural Capão do Imbuia (Curitiba/PR)	Mata Atlântica	Laranjeiras do Sul	Paraná	30/8/1964	Macho	H170

Continuação 4

Identificação da Amostra	Fonte da Amostra - Organização Cedente	Região (Bioma)	Localidade - Município	Estado	Data	Sexo Confirmado ou Determinado neste Estudo	Código do Projeto Gavião-real & LEGAL
64	MHNCI 2894 - Museu de História Natural Capão do Imbuia (Curitiba/PR)	Mata Atlântica	?	Paraná	?	Fêmea	H172
65	MHNCI 4615 - Museu de História Natural Capão do Imbuia (Curitiba/PR)	?	?	?	?	Macho	H61
66	MHNCI 4616 - Museu de História Natural Capão do Imbuia (Curitiba/PR)	?	?	?	?	?	H62
67	MHNCI 5462 - Museu de História Natural Capão do Imbuia (Curitiba - PR)	?	?	?	?	Macho	H63
68	MHNCI 0760/2895 - Museu de História Natural Capão do Imbuia (Curitiba/PR)	?	?	?	?	Macho	H60
69	MHNT 6721 - Museu de História Natural de Taubaté (Taubaté/SP)	Amazônia	Rio Tapajós	Pará	1997	Macho	H174
70	MHNT 6720 - Museu de História Natural de Taubaté (Taubaté/SP)	Mata Atlântica	Sertão do Poruba - Ubatuba	São Paulo	1967	Fêmea	H173
71	MHNT 4824 - Museu de História Natural de Taubaté (Taubaté/SP)	?	?	?	?	Macho	H175
72	MHNT 1862 - Museu de História Natural de Taubaté (Taubaté/SP)	?	?	?	?	Fêmea	H176
73	MZUSP 11187 - Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo - USP (São Paulo/SP)	Mata Atlântica	Palmas	Paraná	1925	?	H29
74	MZUSP 43864 - Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo/USP (São Paulo/SP)	Amazônia	Capim	Pará	1959	Fêmea	H25
75	MZUSP 8261 - Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo/USP (São Paulo/SP)	Mata Atlântica	Ituverava	São Paulo	1911	Fêmea	H31
76	MBML 6761 - Museu de Biologia Professor Mello Leitão (Santa Teresa/ES)	Mata Atlântica	Linhares	Espírito Santo	12/3/1970	Fêmea	H35
77	MBML 2097 - Museu de Biologia Professor Mello Leitão (Santa Teresa/ ES)	Mata Atlântica	Santa Teresa	Espírito Santo	1945	?	H34

Continuação 5

Identificação da Amostra	Fonte da Amostra - Organização Cedente	Região (Bioma)	Localidade - Município	Estado	Data	Sexo Confirmado ou Determinado neste Estudo	Código do Projeto Gavião-real & LEGAL
78	MBML 6762 - Museu de Biologia Professor Mello Leitão (Santa Teresa/ES)	Mata Atlântica	Santa Teresa	Espírito Santo	1949	?	H36
79	MPEG 3445 - Museu Paraense Emílio Goeld (Belém - PA)	Amazônia	Rio Guamá	Pará	1904	?	H26
80	MPEG A08643 - Museu Paraense Emílio Goeld (Belém/PA)	Amazônia	Curuçá	Pará	?	?	H167
81	MCN 072 - Museu de Ciências Naturais da FZBRS (Porto Alegre - RS)	Mata Atlântica	Taquara	Rio Grande do Sul	1923	Fêmea	H40
82	MCN 088 - Museu de Ciências Naturais da Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul (Porto Alegre/RS)	Mata Atlântica	Passo Fundo	Rio Grande do Sul	1940 - 1950	Fêmea	H41
83	Nº 0361 - Museu Lorenzutti (Linhares/ES)	Mata Atlântica	Idependencia - Colatina	Espírito Santo	1958	?	H42
84	Nº 0353 - Museu Lorenzutti (Linhares/ES)	Mata Atlântica	Rancho Alto - Linhares	Espírito Santo	1999	Fêmea	H43
85	MZJH 0220 - Museu de Zoologia Professor José Hidasí	Amazônia	Estirão do Equador	Amazonas	20/2/1961	?	H208
86	MZJH 1013 - Museu de Zoologia Professor José Hidasí	Amazônia	Boa Vista	Roraima	1968	Macho	H206
87	FMO 72 - Museu de Zoologia Instituto José Hidasí (Goiânia/GO)	?	?	?	?	Fêmea	H146
88	FMO 8213 - Museu de Zoologia Instituto José Hidasí (Goiânia/GO)	?	?		?	Fêmea	H145

Continuação 6

Identificação da Amostra	Fonte da Amostra - Organização Cedente	Região (Bioma)	Localidade - Município	Estado	Data	Sexo Confirmado ou Determinado neste Estudo	Código do Projeto Gavião-real & LEGAL
89	Nº 001 - Museu de História Natural Mozart de Oliveira Vallim (Cornélio Procópio/PR)	?	?	?	?	?	H67
90	Nº 001/1 - Museu de História Natural Mozart de Oliveira Vallim (Cornélio Procópio/PR)	?	?	?	?	Macho	H68
91	MAO 151 - Museu Anchieta de Ciências Naturais (Porto Alegre - RS)	Mata Atlântica	Gravataí	Rio Grande do Sul	13/7/1938	Fêmea	H39
92	IEPA 1160 - Coleções Científicas Fauna do Amapá/Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá - IEPA (Macapá/AP)	Amazônia	UC Reserva de Desenvolvimento Sustentável do Rio Iratapuru	Amapá	5/8/2005	Macho	H181
93	Nº 132 - Museu Regional Olívio Otto (Carazinho/RS)	Mata Atlântica	Getúlio Vargas	Rio Grande do Sul	?	Fêmea	H33
94	A7 - Museu do Colégio La Salle Dores (Porto Alegre/RS)	Mata Atlântica	Tapera/Selbach	Rio Grande do Sul	1940	?	H38
95	Exemplar - Museu Didático Luiz Dino Vizotto/Unesp/IBILCE (São José Rio Preto/SP)	Mata Atlântica	Palestina	São Paulo	1970-1973	?	H10
96	Exemplar - IBAMA/RO (Porto Velho/RO)	Amazônia	Costa Marques	Rondônia	1995	?	H7
97	Exemplar - Museu Frei Miguel (Luzerna/SC)	Mata Atlântica	Três Arroios	Rio Grande do Sul	4/9/1927	Fêmea	H37
98	Garra - Museu do Mosteiro Jequitibá (Mundo Novo/BA)	Mata Atlântica	Mundo Novo	Bahia	1955-1965	Fêmea	H179
99	Exemplar - Museu Histórico de Boa Vista (Boa Vista/RR)	Amazônia	Boa Vista	Roraima	?	Fêmea	H209

Continuação 7

Identificação da Amostra	Fonte da Amostra - Organização Cedente	Região (Bioma)	Localidade - Município	Estado	Data	Sexo Confirmado ou Determinado neste Estudo	Código do Projeto Gavião-real & LEGAL
100	F 15 - Museu de Zoologia da Universidade de Brasília (Brasília/DF)	?	?	?	?	Fêmea	H144
101	FAPEC 0500 - Museu Dom Bosco (Campo Grande/MS)	?	?	?	?	?	H65
102	Exemplar - Museu de História Natural PUC Minas (Belo Horizonte/MG)	?	?	?	?	Fêmea	H32
103	Exemplar - Parque Santur (Balneário Camburiú/SC)	Mata Atlântica	?	Santa Catarina	?	Fêmea	H123
104	Exemplar - Museu Histórico Didático Pedagógico D. João VII (São José do Rio Preto/SP)	?	?	?	?	Fêmea	H66
<hr/> Criadouro							
105	Indivíduo - Criadouro CRAX Sociedade de Pesquisa do Manejo e Conservação da Fauna Silvestre (Contagem/MG)	Mata Atlântica	?	Espírito Santo	2000-2004	Macho	H111
106	Indivíduo do Casal 1 - CRAX Sociedade de Pesquisa do Manejo e Conservação da Fauna Silvestre (Contagem/MG)	?	?	?	?	Macho	H97
107	Indivíduo do Casal 1 - Criadouro CRAX Sociedade de Pesquisa do Manejo e Conservação da Fauna Silvestre (Contagem/MG)	Amazônia	Rondon do Pará	Pará	1990-2000	Fêmea	H98
108	Indivíduo do Casal 2 - Criadouro CRAX Sociedade de Pesquisa do Manejo e Conservação da Fauna Silvestre (Contagem/MG)	Mata Atlântica	?	Bahia	1990 -1997	Fêmea	H100
109	Indivíduo do Casal 2 - Criadouro CRAX Sociedade de Pesquisa do Manejo e Conservação da Fauna Silvestre (Contagem/MG)	Amazônia	Rondon do Pará	Pará	1990-2001	Macho	H99

Continuação 8

Identificação da Amostra	Fonte da Amostra - Organização Cedente	Região (Bioma)	Localidade - Município	Estado	Data	Sexo Confirmado ou Determinado neste Estudo	Código do Projeto Gavião-real & LEGAL
110	Indivíduo do Casal 3 - CRAX Sociedade de Pesquisa do Manejo e Conservação da Fauna Silvestre (Contagem/MG)	?	?	?	?	Fêmea	H102
111	Indivíduo do Casal 4 - Criadouro CRAX Sociedade de Pesquisa do Manejo e Conservação da Fauna Silvestre (Contagem/MG)	Amazônia	?	Rondônia	1996	Fêmea	H104
112	Indivíduo do Casal 5 - Criadouro CRAX Sociedade de Pesquisa do Manejo e Conservação da Fauna Silvestre (Contagem/MG)	Amazônia	?	Rondônia	?	Fêmea	H106
113	Indivíduo do Casal 6 - Criadouro CRAX Sociedade de Pesquisa do Manejo e Conservação da Fauna Silvestre (Contagem/MG)	Amazônia	Rondon do Pará	Pará	1990-2000	Macho	H107
114	Indivíduo do Casal 6 - Criadouro CRAX Sociedade de Pesquisa do Manejo e Conservação da Fauna Silvestre (Contagem/MG)	Amazônia	?	Rondônia	2002	Fêmea	H108
115	Indivíduo - Bioparque Amazônia (Belém/PA)	Amazônia	?	Pará	?	Fêmea	H71
116	Indivíduo do Casal 1 - Bioparque Amazônia (Belém/PA)	Amazônia	Paragominas	Pará	?	Fêmea	H73
117	Indivíduo do Casal 2 - Bioparque Amazônia (Belém/PA)	Amazônia	Paragominas	Pará	?	Fêmea	H75
118	Indivíduo do Casal 3 - Bioparque Amazônia (Belém/PA)	Amazônia	Paragominas	Pará	?	Macho	H76
119	Indivíduo do Casal 3 - Bioparque Amazônia (Belém/PA)	Amazônia	Paragominas	Pará	?	Fêmea	H77
120	Indivíduo do Casal - Zoológico das Faculdades Integradas Tapajós (Santarém/PA)	Amazônia	Santarém	Pará	1995 - 2000	Macho	H130

Continuação 9

Identificação da Amostra	Fonte da Amostra - Organização Cedente	Região (Bioma)	Localidade - Município	Estado	Data	Sexo Confirmado ou Determinado neste Estudo	Código do Projeto Gavião-real & LEGAL
121	Indivíduo do Casal - Zoológico das Faculdades Integradas Tapajós (Santarém/PA)	Amazônia	Santarém	Pará	1995 - 2000	Fêmea	H131
122	Indivíduo do Casal Cativo Alter do Chão - Zoológico das Faculdades Integradas Tapajós (Santarém/PA)	Amazônia	Santarém	Pará	1995 - 2000	Macho	H132
123	Indivíduo do Casal Casal Cativo Alter do Chão - Zoológico das Faculdades Integradas Tapajós (Santarém /PA)	Amazônia	Santarém	Pará	1995 - 2000	Fêmea	H133
124	Indivíduo do Casal - Zoológico de Belo Horizonte (Belo Horizonte/MG)	?	?	?	?	Fêmea	H88
125	Indivíduo do Casal em Exposição - Zoológico de Belo Horizonte (Belo Horizonte/MG)	Amazônia	?	Rondônia	?	Macho	H85
126	Indivíduo do Casal em Exposição - Zoológico de Belo Horizonte (Belo Horizonte/MG)	Amazônia	?	Rondônia	?	Fêmea	H86
127	Indivíduo do Casal Goeld - Criadouro Eurico (Brasília/DF)	Amazônia	?	Pará	?	Macho	H134
128	Indivíduo do Casal Goeld - Criadouro Eurico (Brasília/DF)	Amazônia	?	Pará	?	Fêmea	H135
129	Indivíduo do Casal CIGS - Criadouro Eurico (Brasília/DF)	Amazônia	?	Amazonas	>2000	Macho	H136
130	Indivíduo do Casal - Zoológico de Carajás (Carajás/PA)	Amazônia	Jacundá	Pará	2006	Macho	H164
131	Indivíduo do Casal - Zoológico de Carajás (Carajás/PA)	Amazônia	Área Indígena Xikrins - Carajás	Pará	1990	Fêmea	H165
132	Indivíduo do Casal - Zoológico de Curitiba (Curitiba/PR)	?	?	?	?	Fêmea	H81
133	Indivíduo do Casal - Zoológico de Curitiba - PR (Curitiba/PR)	?	?	?	?	Macho	H80
134	Indivíduo do Casal - Criadouro Conservacionista Tibagi (Serra Guaramiranga/CE)	Amazônia	?	Amazonas	1998-2000	Macho	H95

Continuação 10

Identificação da Amostra	Fonte da Amostra - Organização Cedente	Região (Bioma)	Localidade - Município	Estado	Data	Sexo Confirmado ou Determinado neste Estudo	Código do Projeto Gavião-real & LEGAL
135	Indivíduo do Casal - Criadouro Conservacionista Tibagi (Serra Guaramiranga/CE)	Amazônia	?	Pará	2004	Fêmea	H96
136	Indivíduo do Casal - Bosque Municipal São José do Rio Preto (São José do Rio Preto/SP)	Amazônia	?	Pará	?	Fêmea	H121
137	Indivíduo do Casal - Bosque Municipal São José do Rio Preto (São José do Rio Preto/SP)	?	?	?	?	Macho	H13
138	Indivíduo do Casal - Zoológico Municipal Quinzinho de Barros (Sorocaba/SP)	?	?	?	?	Fêmea	H83
139	Indivíduo do Casal - Zoológico Municipal Quinzinho de Barros (Sorocaba/SP)	?	?	?	?	Macho	H82
140	Indivíduo 1 Recinto Extra - Criadouro Parque Dois Irmãos (Recife/PE)	Amazônia	Vilhena	Rondônia	?	Fêmea	H115
141	Indivíduo 2 Recinto Extra - Criadouro Parque Dois Irmãos (Recife/PE)	Amazônia	Vilhena	Rondônia	?	Fêmea	H116
142	Indivíduo do Casal - Zoológico da Universidade Federal do Mato Grosso (Cuiabá/MT)	Amazônia	Guarantã do Norte	Mato Grosso	2000-2004	Fêmea	H8
143	Indivíduo do Casal - Zoológico da Universidade do Federal Mato Grosso (Cuiabá/MT)	Amazônia	Alta Floresta	Mato Grosso	2000-2004	Macho	H120
144	Indivíduo - Zoológico de Salvador (Salvador/BA)	Mata Atlântica	Tancredo Neves	Bahia	1995-1998	Fêmea	H91
145	Indivíduo do Casal - Zoológico de Salvador (Salvador/BA)	Amazônia	?	Pará	1999	Fêmea	H90
146	Indivíduo - Zoológico de Goiânia (Goânia/GO)	Amazônia	?	Mato Grosso	?	Fêmea	H128
147	Indivíduo Morto - Zoológico de Goiânia (Goânia/GO)	?	?	?	?	?	H129
148	Indivíduo do Casal - Criadouro Conservacionista Fazenda São José (Itirapina/SP)	Mata Atlântica	?	Bahia	1990-2000	Fêmea	H141
149	Indivíduo - Fundação Zoobotânica de Marabá (Marabá/PA)	Amazônia	Goinésia	Pará	?	?	H166
150	Indivíduo do Casal - Parque das Aves (Foz do Iguaçu/PR)	Amazônia	Serra Pelada - Carajás	Pará	?	Fêmea	H70
151	Indivíduo do Casal - Zoológico do Museu Paraense Emílio Goeld (Belém/PA)	Amazônia	?	Pará	?	Fêmea	H79
152	Indivíduo - Criadouro Eunício (Brasília/DF)	Amazônia	?	Pará	?	Macho	H185
153	Indivíduo - Zoológico de Americana - SP (Americana/SP)	Amazônia	Sinop	Mato Grosso	2004	Fêmea	H84
154	Indivíduo - (Aguia Branca/ES)	Mata Atlântica	Eunápolis	Bahia	1990-2000	Fêmea	H11

Continuação 11

Identificação da Amostra	Fonte da Amostra - Organização Cedente	Região (Bioma)	Localidade - Município	Estado	Data	Sexo Confirmado ou Determinado neste Estudo	Código do Projeto Gavião-real & LEGAL
155	Indivíduo - Reserva Particular do Patrimônio Natural Estação Veracel (Porto Seguro/BA)	Mata Atlântica	Porto Seguro	Bahia	1997	Fêmea	H12
156	Indivíduo - Zoológico Chico Mendes (Acre/AC)	Amazônia	Senador Guiomar	Acre	2006	Fêmea	H148
157	Indivíduo - Zoológico Chico Mendes (Acre/AC)	Amazônia	Sena Madureira	Acre	2008	Fêmea	H213
158	Indivíduo - Reserva Particular do Patrimônio Natural REVECON (Macapá/AP)	Amazônia	Estrada de Vila Nova	Amapá	06/01/2007	Fêmea	H183
159	Indivíduo - Zoológico do Centro Integrado de Guerra na Selva CIGS (Manaus/AM)	Amazônia	Labrea	Amazonas	?	Fêmea	H4
160	Indivíduo do Casal - Parque Ecológico de São Paulo (São Carlos/SP)	?	?	?	?	Macho	H142
161	Indivíduo do Casal Extra - Zooparque Itatiba (Itatiba/SP)	?	?	?	?	Macho	H138
162	Indivíduo do Casal - Zoológico de Sapucaia do Sul (Rio Grande do Sul/RS)	?	?	?	?	Macho	H92
163	Nº 00-0610-D1F7 - Refúgio Biológico Bela Vista/Itaipu Binacional (Foz do Iguaçu/PR)	?	?	?	?	Fêmea	H64
164	Refúgio Biológico Bela Vista/Itaipu Binacional (Foz do Iguaçu/PR)	Mata Atlântica	Foz do Iguaçu	Paraná	2005	Macho	H204
165	Indivíduo do Casal - Criadouro Eunício (Brasília/DF)	Amazônia	?	Pará	?	Fêmea	H216
166	Indivíduo do Casal - Criadouro Eunício (Brasília/DF)	Amazônia	?	Pará	?	Macho	H214

Anexo III. Banhos, A.; Hrbek, T.; Gravena, W.; Sanaiotti, T.; Farias, I.P. 2008. Genomic resources for the conservation and management of the harpy eagle (*Harpia harpyja*, Falconiformes, Accipitridae). *Genetics and Molecular Biology*, 31 (1): 146-154.



Genomic resources for the conservation and management of the harpy eagle (*Harpia harpyja*, Falconiformes, Accipitridae)

Aureo Banhos¹, Tomas Hrbek^{1,2}, Waleska Gravena¹, Tânia Sanaiotti³ and Izeni P. Farias¹

¹Laboratório de Evolução e Genética Animal, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brazil.

²Department of Biology, University of Puerto Rico, Río Piedras, San Juan, Puerto Rico.

³Departamento de Ecologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM, Brazil.

Abstract

We report the characterization and optimization of 45 heterologous microsatellite loci, and the development of a new set of molecular sex markers for the conservation and management of the Neotropical harpy eagle (*Harpia harpyja* L. 1758). Of the 45 microsatellites tested, 24 were polymorphic, six monomorphic, 10 uncharacterizable due to multiple bands and five did not amplify. The observed gene diversity of the analyzed sample of *H. harpyja* was low and similar to that of other threatened Falconiformes. While a high proportion of the microsatellite markers were highly variable, individuals of *H. harpyja* could be differentiated by a joint analysis of just three ($p = 2.79 \times 10^{-4}$) or four markers ($p = 2.89 \times 10^{-5}$). Paternity could be rejected with 95.23% and 97.83% probabilities using the same three and four markers, respectively. The sex determination markers easily and consistently differentiated males from females even with highly degraded DNA extracted from naturally shed feathers. The markers reported in this study potentially provide an excellent set of molecular tools for the conservation and management of wild and captive *H. harpyja* and they may also prove useful for the enigmatic Neotropical crested eagle (*Morphnus guianensis* Daudin 1800).

Key words: conservation genetics, *Harpia harpyja*, microsatellites, raptors, sex markers.

Received: March 16, 2007; Accepted: June 11, 2007.

Introduction

The Neotropical harpy eagle (*Harpia harpyja* L. 1758, Falconiformes, Accipitridae) is the largest eagle in the Americas and is considered the most powerful bird of prey in the world (Collar, 1989; Sick, 1997). This species inhabits the upper stratum of New World forests from southern Mexico to northeastern Argentina but is comparatively rare throughout its distribution. The main threats to the conservation of *H. harpyja* is habitat fragmentation, hunting and trade in live birds (Vargas G *et al.*, 2006). The slow reproductive rate and low population densities of *H. harpyja* make these threats significant throughout its distribution. *Harpia harpyja* is classified as near threatened by the International Union for the Conservation of Nature (IUCN) and is cited in Appendix I of the Convention on the International Trade of Threatened Species of Fauna and Flora (CITES). While active conservation programs exist

in several countries where this eagle occurs, implementation of conservation programs is challenging and conservation success is difficult to assess due to the difficulty of obtaining ecological data. Molecular markers often allow indirect estimates of many ecologically important parameters, and if available would greatly facilitate the conservation and management of *H. harpyja*.

The knowledge of biology of threatened species is of indispensable interest for conservation. However, as in the case for many threatened raptors, *H. harpyja* is difficult to study because adults are very difficult to capture and mark, individual birds may move over great distances and while slight size dimorphism exists, there is no sexual dimorphism in plumage making males and females difficult-to-distinguish. However, molecular tools may overcome many of these challenges (*e.g.* Frankham *et al.*, 2002; Allendorf and Luikart, 2006), especially since such methods can use non-invasive sampling techniques based on DNA extraction from feathers (*e.g.* Pearce *et al.*, 1997; Segelbacher, 2002; Horváth *et al.*, 2005; Rudnick *et al.*, 2005). Understanding the genetic characteristics of a species is also extremely important for the success of *in situ*

Send correspondence to Izeni Pires Farias. Laboratório de Evolução e Genética Animal, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, 69077-000 Manaus, AM, Brazil. E-mail: izeni_farias@ufam.edu.br.

and *ex situ* conservation programs because this information allows definition of management units needed to minimize the loss of genetic diversity while at the same time preserving the existing genetic structure of the species (Haig, 1998; Hedrick, 2001).

Of the various types of molecular markers used today, microsatellites have many positive attributes, including hypervariability, co-dominance, abundance and tolerance to variation in DNA quality and quantity (Selkoe and Toonen, 2006). Additionally, due to our reasonably good understanding of molecular evolution and the development of robust computational methods, microsatellites are well-suited to answer questions related to effective population size, population structure, migration and colonization rates, and reproductive system, thus providing essential data for conservation. The need to characterize species-specific loci by expensive and laborious isolation and characterization procedures is the primary limitation to the more widespread use of microsatellites. Although mutations in the flanking regions of microsatellite loci may prevent amplification, many studies have shown that microsatellites isolated from one species can amplify homologous products in related species (*e.g.* Martínez-Cruz *et al.*, 2002; Busch *et al.*, 2005), a characteristic known as transferability or cross-species amplification (Selkoe and Toonen, 2006).

Other important molecular markers for conservation are those for sex determination, mainly for species that do not possess apparent sexual dimorphism, whether at the juvenile or adult stage, as is the case of for *H. harpyja*. In all neognath birds, the female is the heterogametic (WZ) and the male homogametic (ZZ) sex. Molecular methods of sex determination are based on the amplification of paralogous copies of the Chromo helicase DNA binding protein gene (*CHD1*) present on chromosomes W and Z using mismatch primers, *i.e.* while the forward primer amplifies *CHD1* copies on both W and Z chromosomes, the reverse primers are designed to anneal to either W or Z chromosome and amplify different sized products. Molecular sex markers developed for birds (Griffiths *et al.*, 1998) have limited applicability in Falconiformes due to the fact that the differentiation of amplified *CHD1W* and *CHD1Z* fragments is unreliable because both fragments are large and similar in size. Recent publication by Ito *et al.* (2003) presents a solution that appears to be applicable to all Falconiformes by increasing the size difference of the *CHD1W* and *CHD1Z* amplified fragments. However, the relatively large size of these fragments makes PCR amplification from forensic samples difficult.

In this study we present the results of an amplification test of 45 microsatellite loci, isolated and characterized by other authors in various other accipitrid raptors, the characterization and optimization of 30 of these microsatellites and the development of a new set of molecular sex markers for *H. harpyja*. In addition, we also present a preliminary characterization of genetic diversity of *H. harpyja* and

comment on the usefulness of a subset of these microsatellite markers for assessing the joint probability of the identity of any two samples and of paternity exclusion. We conclude that a carefully chosen subset of microsatellite markers optimized for multiplexing and the newly developed molecular sex markers provide highly valuable and simple-to-use set of molecular tools to assist in the formulation of conservation and management strategies for this threatened raptor.

Material and Methods

Specimens

Molted feathers were collected from individual harpy eagle (*Harpia harpyja* L. 1758 Falconiformes, Accipitridae) specimens from three main Brazilian biomes: the Amazonian rainforest, the Atlantic rainforest and the Pantanal wetland. Some feather samples were collected from nests in the wild while other samples came from zoos and museums; however, in all cases samples of feather originated from wild-born individuals (Table 1).

Microsatellite loci

There are approximately 100 microsatellite loci isolated and characterized for Falconiformes, some of these being published after we commenced our study. For testing in *H. harpyja* we chose 45 based in the following criteria: 1) loci were isolated from related falconiform species, 2) loci had at least five alleles in the species for which they were developed, and had preferentially a perfect repeat motif, and 3) when cross-species amplification tests were made, the loci were polymorphic in phylogenetically distantly related taxa. The tested microsatellite loci were taken from six microsatellite panels described by the following authors: Nesje and Røed (2000); Martínez-Cruz *et al.* (2002); Busch *et al.* (2005); Hailer *et al.* (2005); Johnson *et al.* (2005); Mira *et al.* (2005); a complete list of loci is presented in Table 2. Preliminary screening was done using two captive *H. harpyja* specimens for which sufficient quantities of good quality DNA could be extracted. For this preliminary screening and for characterization of specimens in Table 1, total genomic DNA was extracted from a blood clot in the superior umbilicus (a small opening at the proximal tip of the calamus or quill) as recommended by Horváth *et al.*, (2005) using the Qiagen® DNA extraction kit (Valencia, CA, USA). Polymerase chain reactions (PCR) were carried out a total volume of 10 µL consisting of 1 µL of sample DNA (~10 ng), 1 µL each of forward and reverse primer (2 µM), 1 µL of 10X Buffer (200 mM Tris-KCl, pH 8.5), 0.7 µL of MgCl₂ (25 mM), 0.8 µL of dNTP (10 mM), 0.2 µL *Taq* DNA polymerase (5 units/µL; Biotools, Spain) and 4.3 µL of water. All primers were purchased from IDT, Coralville, IA, USA (www.idtdna.com), and dNTPs were purchased from Fermentas, Glen Burnie,

Table 1 - Demographic information for the harpy eagles (*Harpia harpyja*) subjected to microsatellite primer characterization. All birds originated in the wild.

Original source location (biome, municipality and state)	Specimen code	Specimen origin	Institution providing the sample [†]
Amazon			
Parintins, Amazonas	H2	Nature	INPA Gavião-real Project
Manaus, Amazonas	H3	Nature	INPA Gavião-real Project
Amazonas	H14	Nature	INPA Gavião-real Project
Tailândia, Pará	H5	Nature	INPA Gavião-real Project
Belterra, Pará	H6	Nature	INPA Gavião-real Project
Labrea, Amazonas	H4	Captive	CIGS Zoo
Amazonas	Hh1	Captive	CIGS Zoo
Amazonas	Hh2	Captive	CIGS Zoo
Amazonas	Hh3	Captive	CIGS Zoo
Amazonas	Hh4	Captive	CIGS Zoo
Amazonas	Hh5	Captive	CIGS Zoo
Costa Marques, Rondônia	H7	Museum	IBAMA Museum, Costa Marques, Rondônia
Atlantic forest			
Eunápolis, Bahia	H11	Captive	Breeder, Águia Branca, Espírito Santo state
Bahia	H12	Captive	Estação Vera Cruz/Veracel, Porto Seguro, Bahia
Foz do Iguacu, Paraná	H27	Captive	Bela Vista Biological refuge, Foz do Iguacu, Paraná
Cascavél, Paraná	H28	Museum	Natural History Museum, Capão do Imbuia, Curitiba, Paraná
Pantanal			
Bonito, Mato Grosso do Sul	H30	Nature	Gerencia do PARNA da Serra Bodoquena

[†]INPA = Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM; CIGS = Centro Integrado de Guerra na Selva, Manaus, AM; IBAMA = Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis.

[‡]Accession number MHNCI 2918.

MD, USA (www.fermentas.com). Amplification consisted of 35 cycles of denaturation at 93 °C for 15 s, annealing between 50 °C and 55 °C for 30 s and extension at 68 °C for 30 s, and a final seven minute extension at 68 °C was added after the last cycle. For the microsatellite loci that amplified we re-synthesized the forward primer by adding an M13 tail to its 5' end to allow for dynamic fluorescent labeling with FAM-6 labeled M13 primer following the protocol described by Schuelke (2000). Genotyping PCR was performed in a total volume of 10 µL containing 1 µL of reverse primer (0.2 µM), 0.5 µL of M13 labeled forward primer (0.2 µM), 0.5 µL of FAM-6 labeled M13 primer (0.2 µM) and the other reagents described above. Amplification was carried out in a Hybaid PCR thermocycler (Thermo Scientific, USA) and had two main cycling steps (modified from Schuelke, 2000), consisting of an initial denaturation step of 1 min at 93 °C followed by 30 cycles of 30 s at 93 °C, 30 s at 55 °C and 30 s at 68 °C then 20 cycles of 30 s at 93 °C, 30 s at 50 °C, and 30 s at 68 °C. The reaction was completed by a final extension for 30 min at 68 °C to minimize stutter due to non-specific incorporation of adenine (Brownstein *et al.*, 1996). The PCR product was visualized using a MegaBACE1000 (GE Healthcare, United Kingdom) and analyzed with the software Fragment Profiler v1.2 (GE Healthcare, United Kingdom) following the

manufacturer's recommendations. For each microsatellite marker we genotyped 10 to 17 (average 15) specimens of *H. harpyja* originating from all three main Brazilian biomes (Table 1). The variable number of specimens analyzed per microsatellite locus was due to failures in genotyping and the limited quantity of DNA available for repeat analyses, a common problem with forensic samples such as naturally shed feathers (Segelbacher, 2002).

The characterization of each microsatellite locus was based on number of alleles and gene diversity (Nei, 1978), expected (H_E) and observed (H_O) heterozygosity (Weir, 1996), deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) and linkage disequilibrium between all pairs of loci. All the analyses were performed using the program Arlequin v3.1 (Excoffier *et al.*, 2005), with significance levels for multiple tests being adjusted using the sequential Bonferroni correction (Rice, 1989). To evaluate the potential use of the microsatellite loci for relatedness analyses, we also estimated the probability of paternity exclusion at an individual locus (Q or P_{ei}), and the joint probability of paternity exclusion at all loci (QC or P_{et}) following Weir (1996). Additionally, we estimated the probability of genetic identity at an individual locus (I) and the joint probability of genetic identity at all loci (IC) according to Paetkau *et al.* (1995).

Table 2 - Characterization of 45 microsatellite loci for the harpy eagle (*Harpia harpyja*) originally isolated from other raptor species by the authors cited. Loci which failed to amplify are underlined and a dash (-) indicates loci that failed to genotype. Table shows the following: number of eagles tested (N); number of alleles per locus, with the range of allele sizes in base pairs in parentheses (A); observed heterozygosity (H_O); expected heterozygosity (H_E); significance of the difference between H_O and H_E (only the microsatellite BBU46 showed significant deviation after Bonferroni correction for multiple comparisons) (p); probability of paternity exclusion (Q); and probability of genetic identity (I).

Author and locus	GenBank numbers	Repeat motif	<i>H. harpyja</i>						
			N	A	H_O	H_E	p	Q	I
Nesje and Røed, 2000									
<u>NVHfr142</u>	<u>AF200201</u>	<u>(GT)₁₂</u>	-	-	-	-	-	-	-
NVHfr144-2	AF200202	(CA) ₁₅	-	-	-	-	-	-	-
NVHfr190-2	AF200204	(CA) ₁₂	-	-	-	-	-	-	-
NVHfr195-2	AF200205	(CA) ₁₆	15	2 (154-160)	0.07143	0.07143	1.00000	0.03383	0.86941
NVHfr206	AF200207	(CA) ₁₄	17	7 (156-166)	0.66666	0.76782	0.57515	0.54547	0.10344
Martínez-Cruz <i>et al.</i> , 2002									
Aa11	AF469497	(CA) ₁₁	13	3 (244-248)	0.38462	0.33354	1.00000	0.16622	0.49190
Aa12	AF469498	(GT) ₁₂	-	-	-	-	-	-	-
Aa26	AF469501	(AC) ₁₄	15	2 (133-135)	0.20000	0.18621	1.00000	0.08595	0.68860
Aa27	AF469502	(CA) ₁₁	17	1 (87)	-	-	-	-	-
Aa36	AF469504	(AC) ₁₆	16	4 (93-119)	0.53333	0.66322	0.12511	0.37763	0.21334
Aa43	AF469508	(AC) ₁₄	16	7 (101-115)	0.93333	0.76552	0.21817	0.53864	0.10823
Aa49	AF469509	(AC) ₁₂	11	1 (146)	-	-	-	-	-
Aa57	AF469514	(TG) ₁₂	16	5 (120-130)	0.80000	0.66437	0.42135	0.42738	0.17271
Busch <i>et al.</i> , 2005									
IEAAAG04	AY631063	(AAAG) ₆ (AAAC) ₄ (AAAG) ₆	13	7 (216-244)	0.61538	0.81538	0.00655	0.60251	0.07861
IEAAAG05	AY631064	(AAAG) ₇	11	1 (108)	-	-	-	-	-
IEAAAG11	AY631066	(AAAG) ₂₆	-	-	-	-	-	-	-
IEAAAG12	AY631067	(AAAG) ₁₀ (GAAG) ₃ (AAAG) ₅	-	-	-	-	-	-	-
IEAAAG14	AY631069	(AAAG) ₁₈	-	-	-	-	-	-	-
IEAAAG15	AY631070	(AAAG) ₇	17	11 (136-176)	1.00000	0.89425	0.01247	0.74009	0.03279
Hailer <i>et al.</i> , 2005									
HAL01	AY817040	(GT) ₁₇	15	2 (116-118)	0.06667	0.18621	0.10360	0.08595	0.68860
HAL03	AY817042	(CAAA) ₆	15	2 (141-145)	0.85714	0.50794	0.02233	0.21491	0.38025
HAL04	AY817043	(CA) ₂ AA(CA) ₁₂ CG(CA) ₄	16	2 (156-158)	0.06667	0.06667	1.00000	0.03170	0.87735
HAL09	AY817048	(AC) ₁₇	16	4 (131-137)	0.73333	0.57241	0.28994	0.29392	0.29251
HAL10	AY817049	(CA) ₁₂	17	3 (217-221)	0.33333	0.29655	1.00000	0.14708	0.53511
HAL13	AY817052	(CA) ₁₇	-	-	-	-	-	-	-
Johnson <i>et al.</i> , 2005									
BBU42	AJ715912	(GGGT) ₅ (GA) ₅	15	2 (204-206)	0.07143	0.07143	1.00000	0.03383	0.86941
BBU46	AJ715916	(AC) ₁₂	16	4 (147-153)	1.00000	0.54943	0.00030	0.25831	0.32979
BBU06	AJ715878	(AC) ₉	10	1 (97)	-	-	-	-	-
<u>BBU33</u>	<u>AJ715903</u>	<u>(GT)₁₂</u>	-	-	-	-	-	-	-
<u>BBU34</u>	<u>AJ715904</u>	<u>(AC)₁₂</u>	-	-	-	-	-	-	-
BBU51	AJ715921	(AC) ₁₇	14	3 (150-154)	0.35714	0.31481	1.00000	0.15609	0.51429
BBU59	AJ715928	(CA) ₅	16	1 (132)	-	-	-	-	-
Mira <i>et al.</i> , 2005									
HF-C1D2	AY823594	(AG) ₂₀	16	7 (167-179)	0.93333	0.71724	0.00632	0.48810	0.13549
HF-C1D10	AY823588	(GAA) ₁₉	-	-	-	-	-	-	-
HF-C1E6	AY823586	(GAA) ₁₅ GAG(GAA) ₁₆	10	3 (167-185)	0.30000	0.48947	0.00217	0.26298	0.33134
HF-C1E8	AY823587	(GAA) ₂₆	17	5 (216-231)	0.73333	0.68046	0.16898	0.42061	0.18058
HF-C2D4	AY823595	(GA) ₁₅	-	-	-	-	-	-	-
HF-C3F2	AY823596	(CT) ₂₀	13	4 (165-171)	0.38462	0.67385	0.01486	0.41819	0.17951
<u>HF-C4G1</u>	<u>AY823589</u>	<u>(AG)₁₇</u>	-	-	-	-	-	-	-
HF-C5D4	AY823597	(GA) ₁₈	16	5 (168-176)	0.53333	0.48276	0.65557	0.27000	0.32718
HF-C6C4	AY823591	(GA) ₂₈	15	1 (134)	-	-	-	-	-
HF-C7E1	AY823592	(GA) ₂₂	14	2 (144-146)	0.23077	0.21231	1.00000	0.09686	0.65424
HF-C7G4	AY823598	(GA) ₁₁ TA(GA) ₇	16	3 (115-139)	0.33333	0.38391	0.60033	0.18736	0.44392
<u>HF-C8F4</u>	<u>AY823599</u>	<u>(GA)₁₄</u>	-	-	-	-	-	-	-
HF-P1A10	AY823584	(GT) ₁₄ (GA) ₂₂	-	-	-	-	-	-	-

Sex determination markers in *H. harpyja*

For the characterization of sex markers we used the primers developed by Ito *et al.* (2003). Tests were performed on 10 specimens of *H. harpyja* collected from museums, zoos and nature (Table 3), of which two samples were of known sex while the other samples were of unknown sex. The PCR reactions for the sex markers were carried out in a total volume of 25 µL containing 1 µL of DNA (~10 ng), 2.5 µL of NP primer (2 µM), 1.3 µL of MP primer (2 µM), 1.3 µL of P2 primer (2 µM), 2.5 µL of 10X Buffer (200 mM Tris-KCl, pH 8.5), 2.5 µL of MgCl₂ (25 mM), 2.0 µL of dNTP (10 mM), 0.2 µL *Taq* DNA polymerase (5 units/µL; Biotools, Spain) and 11.8 µL of deionized water. All primers were purchased from IDT, Coralville, IA, USA (www.idtdna.com), and dNTPs were purchased from Fermentas, Glen Burnie, MD, USA (www.fermentas.com). The thermocycling profile consisted of 1 min denaturation at 93 °C, followed by 35 cycles of denaturation at 93 °C for 10 s, annealing at 52 °C for 35 s and extension at 68 °C for 30 s. The reaction was completed by a final extension for seven minutes at 68 °C. The PCR products were separated on a 3% (w/v) agarose gel. To assess the consistency of the results we repeated each PCR three times for each specimen. The *CDH1Z* and *CDH1W* gene fragments of a number

of the specimens did not amplify, most likely due to a high degree of DNA degradation; therefore we designed two primers, CHD1Wr (5'-GCTGATCTGGTTTCAGAT TAA-3') and CHD1Zr (5'-AGTCACTATCAGATCCAG AG-3') as substitutes for primers MP (Ito *et al.*, 2003) and P2 (Griffiths *et al.*, 1998) respectively (Table 4). Our new primer set reduced the size of amplicons by nearly 100 bp and using this strategy we were able to sex the remaining specimens of unknown sex.

Results and Discussion

Transferability and characterization of the microsatellites in *H. harpyja*

Of the 45 microsatellite loci tested in our sample of *H. harpyja*, 40 amplified successfully but only 30 could be genotyped unambiguously. All 30 loci amplified at 55 °C and produced unambiguous genotypes, thus all PCR reactions were standardized to this annealing temperature. A total of 24 microsatellites loci were polymorphic and the number of alleles per locus ranged from 2 to 11 (Table 4). After sequential Bonferroni correction for multiple comparisons (Rice, 1989), a significant departure from HWE was observed only in the locus BBU46. This and six additional loci that showed HWE deviations before Bonferroni

Table 3 - Harpy eagle individuals (*Harpia harpyja*) subjected in the sex-determination.

Specimen code	Specimen origin	Institution providing the sample [†]	Sex
1 = H8	Captive	UFMT Zoo	female
2 = H121	Captive	Bosque Municipal de São José do Rio Preto, São Paulo	female
3 = H56*	Museum ^ˆ	INPA Coleção de Aves	male
4 = H57*	Museum ^ˆ	INPA Coleção de Aves	female
5 = H71	Captive	Foz Tropicana Parque das Aves, Foz do Iguaçu, Paraná	female
6 = H75	Captive	Bioparque Amazônia Crocodilo Safari Zoo, Belém, Pará	female
7 = H76	Captive	Bioparque Amazônia Crocodilo Safari Zoo, Belém, Pará	male
8 = H79	Captive	Parque Zoobotânico do Museu Paraense Emilio Goeldi, Belém, Pará	female
9 = H96	Captive	Criadouro Conservacionista Sítio Tibagi, Serra Guaramiranga, Ceará	female
10 = H120	Captive	UFMT Zoo	male

[†]INPA = Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM; UFMT = Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá, MT.

*Control individuals of known sex. ^ˆAccession number INPA 629. ^ˉAccession number INPA 829.

Table 4 - Primers used for molecular sex determination of the harpy eagle (*Harpia harpyja*).

Primer	5' - 3' primer sequence	Author
P2 (anneals to CHD1W/Z)	TCTGCATCGCTAAATCCTTT	(Griffiths <i>et al.</i> , 1998)
MP (anneals to CHD1W)	AGTCACTATCAGATCCAGAA	(Ito <i>et al.</i> , 2003) [*]
NP (anneals to CHD1W/Z)	GAGAAACTGTGCAAAAACAG	(Ito <i>et al.</i> , 2003)
CHD1Wr (anneals to CHD1W)	GCTGATCTGGTTTCAGATTAA	This study
CHD1Zr (anneals to CHD1Z)	AGTCACTATCAGATCCAGAG	This study

^{*}Ito *et al.* (2003) report the sequence of the primer MP as 5'-AGTCACTATCAGATCCGAA-3'; however this clearly is a mistake as can be seen from Figure 2 of their paper and GenBank sequences AB096141-AB096156.

correction were re-scored from original electrophoregrams to eliminate potential scoring biases. The observed and expected gene diversity (Nei, 1978) over all loci was 0.50580 and 0.47242, respectively. We found less than 5% of pairs with significant linkage disequilibrium across all pairs of loci. Indexes of joint probability of paternity exclusion ($p = 0.99596$) and genetic identity ($p = 1.04221 \times 10^{-8}$) were highly robust.

The high rate of cross-species amplification (40 out of 45 loci) and characterizability (30 out of 45 loci) was attributable to our initial choice of loci. Five of the six microsatellite panels were developed for other Accipitrid species, the same family as the *H. harpyja*. The transferability of microsatellite primers between species is directly related to the genetic divergence of the species concerned; the greater the genetic divergence, the greater the probability of mutations at priming sites, and thus lower the probability of successful annealing of primers. Although we chose only polymorphic loci, the rates of polymorphism characterized for *H. harpyja* did not reflect the polymorphism observed in the original studies (reg. $R = 0.035$, $p = 0.402$). Levels of polymorphism depend on the sample analyzed, and there is also no expectation of transferability of the degree of polymorphism (Ellegren *et al.*, 1995).

The 24 polymorphic loci appeared to present an excellent panel for population analyses of *H. harpyja*. They were also robust markers for estimating kinship and paternity relations (Weir, 1996) and to identify individuals (Paetkau and Strobeck, 1995). However, statistically significant levels of paternity exclusion and genetic identity can be obtained with a panel of only three or four loci. Paternity can be excluded at the $p = 0.95233$ and genetic identity rejected at the $p = 0.00028$ levels using just the loci IEAAAG15, IEAAAG04 and Aa43. The addition of the NVHfr206 locus would increase these probabilities to $p = 0.97834$ and $p = 0.00003$ levels, respectively. The allelic classes produced by the loci IEAAAG15, IEAAAG04 and Aa43 are non-overlapping, and thus conducive to multiplexing even with one dye set and dynamic fluorescent labeling of alleles (Schuelke, 2000). Inclusion of the locus NVHfr206 would require the use of a second fluorescent dye since its allele sizes overlap with those of the locus IEAAAG15. Dynamic multiplexing with the first three loci would result in a statistically significant estimate of paternity exclusion and/or genetic identity at less than US\$ 1 per sample analyzed.

Genetic diversity of *H. harpyja*

For the IUCN near-threatened *H. harpyja* the average H_o calculated by us was 0.506, similar to that for the recently surveyed accipitrid species *Aquila adalberti* (the Spanish imperial eagle; $H_o = 0.516$) and *Aquila heliaca* (the eastern imperial eagle; $H_o = 0.563$) listed as vulnerable by IUCN (Martinez-Cruz *et al.*, 2004). Genetic diversity is necessary for populations and species to adapt to environ-

mental change and reflects their evolutionary potential (Frankham *et al.*, 2002), low genetic diversity therefore being viewed as an indirect measure of extinction threat. It may also be that *H. harpyja* presents the signature of a genetic bottleneck. Garza and Williamson (2001) have demonstrated that for a population sample of microsatellite loci the mean ratio of the number of alleles to the range in allele size, the M parameter, can be used to detect reductions in population size. The average value of M for the 24 microsatellite loci was 0.84, a value significantly lower than that obtained under simulation of a pre-bottleneck population size ($p = 0.026$ using the genetic parameter θ of 2.24). θ is a summary statistic representing four times the product of the effective population size and the mutation rate (Hartl and Clark, 1997). We derived θ from estimated census sizes of 10^4 to 10^5 harpy eagle individuals (Ferguson-Lee, 2001; Vargas G *et al.*, 2006) assuming that the effective number of individuals is equivalent to 1/10 the census size (Frankham *et al.*, 2002), and that microsatellite mutation rate (μ) estimates range from 2.5×10^{-3} to 5.6×10^{-4} (e.g. Dallas, 1992; Weber and Wong, 1993; Brinkmann *et al.*, 1998; Sajantila *et al.*, 1999; Kayser and Sajantila, 2001; Hrbek *et al.*, 2006). Using the most conservative parameter estimates ($\theta = 2.24$, $\mu = 5.6 \times 10^{-4}$) a value of $M = 0.84$ reflects a significant reduction in population size ($p = 0.026$). When the parameter θ was estimated directly from the microsatellite data ($\theta = 1.50$), the M value was not significant ($p = 0.101$). However, the θ calculated from the data itself is necessarily a lower bound estimate if *H. harpyja* shows any population structure. Although there is a possibility that *H. harpyja* has experienced a genetic bottleneck, a more definitive inference can only be made with more extensive sampling, and the determination of any existing population structuring.

Although we cannot extend the perceived threat to the entire distribution of *H. harpyja*, it seems reasonable to extrapolate low genetic diversity and associated threat potential to other Neotropical regions which are often anthropogenically impacted and near the periphery of the natural distribution of this raptor. Within Brazil, *H. harpyja* possesses its core and broadest area of distribution and, at least within the Amazon basin, it appears to have suffered limited anthropogenic impact. Yet, the genetic diversity of *H. harpyja* is lower than that of other accipitrid raptors listed by IUCN in categories which indicate a greater risk of extinction. Furthermore, *H. harpyja* is not even on the official list of threatened species of the Brazilian Environmental Agency (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA). Although our preliminary data clearly bring into question the current classification status by IUCN and IBAMA, in order to facilitate adequate management and conservation policies, a denser sampling throughout the distribution of *H. harpyja* is necessary to find out how genetic diversity is distributed

over geographic landscape, how genetically diverse is *H. harpyja* throughout the areas of its distribution, and if it has suffered a genetic bottleneck.

Molecular sex markers

Using the primers from Ito *et al.* (2003) we were able to confirm the sex of the two *H. harpyja* specimens of known sex, a male (specimen 3) and a female (specimen 4) (Figure 1). The PCR pattern of males is characterized by a single band and that of females by two bands, with 100 base pairs difference between the two bands. The other eight *H. harpyja* specimens of differing DNA qualities and concentrations were characterized as two males (specimens 7 and 10) and six females (specimens 1, 2, 5, 6, 8 and 9). Molecular sex determination was repeated three times, each time resulting in the same pattern. The primer set of Ito *et al.* (2003) minimizes false positive identifications since the female-specific *CHD1W* gene product is the smaller product. Theoretically even in the case when highly degraded DNA is used and only the smaller *CHD1W* gene fragment is amplified, this fragment will 100 bp smaller than the *CHD1Z* gene fragment and therefore this specimen will be easily identifiable as a female. However, some of our specimens showed no amplification of the molecular sex markers, most probably due to the very high levels of DNA degradation common in feathers, which apparently do not allow amplification of the ~300 to 400 bp fragments generated by the markers from Ito *et al.* (2003). Therefore we designed primers CHD1Wr and CHD1Zr to substitute for primers MP (Ito *et al.*, 2003) and P2 (Griffiths *et al.*, 1998), respectively in our PCR reactions. The new primer combination NP/CHD1Wr produced a 250 bp fragment while NP/CHD1Zr produced a 300 bp fragment. Primers to obtain even shorter products could not be designed, since the regions amplified span a size variable intron lacking suitably conserved regions. With these new primer combinations we were able to sex our remaining specimens.

Molecular tools for the conservation of the harpy eagle

We have characterized a set of molecular tools useful for *in situ* and *ex situ* conservation and management of *H. harpyja*. The loci IEAAAG15, IEAAAG04 and Aa43 together with sex markers provide powerful and cost effective tools for identifying best potential mates in captive breeding programs. The correct identification of the sex of individual birds in conservation programs, currently a difficult invasive procedure, is clearly fundamental for the success of any breeding program. If the goal of the breeding program is to minimize pedigree inbreeding and maximize genetic diversity, microsatellite markers in addition to the three presented above will need to be used. Captive breeding decisions must be made in light of any potential natural population genetic structuring which, although at present unknown, will be easily determinable with the presented set

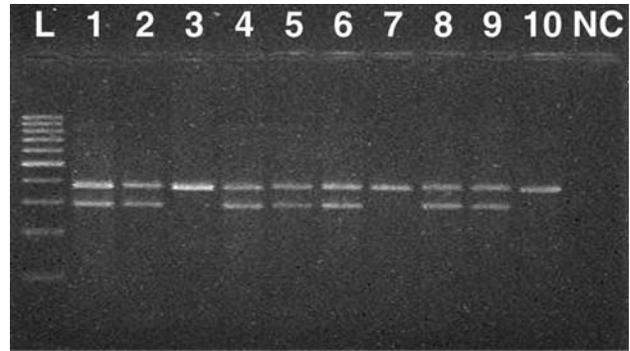


Figure 1 - Molecular discrimination of *Harpia harpyja* specimens of known and unknown sex. Individuals 3 and 4 are male and female, respectively. Females show two bands separated by approximately 100 bp while males show only a single band. The size standard (L) is the GeneRuler 100 bp DNA ladder (Fermentas, Hanover, MD, USA). Negative control is labeled as NC.

of 24 polymorphic microsatellite markers once sufficient sampling data are obtained. The existence, or absence, of population structure is also critical for *ex situ* management and reintroduction programs. With few exceptions, *H. harpyja* is effectively extinct in the Brazilian Atlantic rainforest and IBAMA has approved a plan presented by the CRAX Society (Sociedade de Pesquisa do Manejo e Reprodução da Fauna Silvestre, MG, Brazil) to reintroduce *H. harpyja* into the Atlantic Rainforest from a captive population maintained and bred by the CRAX Society. The captive population consists of birds from various biomes, confiscated animals of unknown origin and the hybrid offspring of these animals (Nemésio *et al.*, 2000). The program is currently stalled as specific areas of introduction and financial sponsors have yet to be identified. Even more critically, no data currently exist on whether *H. harpyja* from the Amazon rainforest and the Atlantic rainforest form one large population and are genetically and demographically interchangeable, or if they represent two differentiated populations. The introduction of inappropriate birds could have serious negative conservation consequences, potentially even leading to the extinction of the remnant Atlantic rainforest populations of *H. harpyja* (Frankham *et al.*, 2002; Hedrick, 2005; Allendorf and Lusk, 2006). If, however, introductions are scientifically justified, they would be of great benefit in helping to rescue the highly threatened Atlantic rainforest population. Therefore a molecular study of representative specimens from the Amazon and Atlantic rainforests is urgently needed, and the markers reported in this study will greatly facilitate these conservation efforts. Last, but not least, if *H. harpyja* shows a signal of strong population structuring, these microsatellites could further be used to identify the origin of seized specimens from illegal animal traders and clandestine breeding units. In Brazil, for instance, confiscated specimens of *H. harpyja* are generally destined for zoos and legalized breeding units (Efe *et al.*, 2006), the principal reason for this bureaucratic decision being the lack of knowl-

edge of the region in which the individuals were clandestinely captured. The assignment of confiscated specimens to their regions of origin could be accomplished with the use of molecular methods, and the confiscated birds could be repatriated to their areas of origin. However, in the case that *H. harpyja* comprises a panmictic population there will be no restrictions on seized specimens being released in any region within the distribution of *H. harpyja* and these specimens may be used to augment the severely depleted Atlantic rainforest population. The caveat of these inferences is that they are based on neutral genetic markers. It is possible that *H. harpyja* from different areas of its distribution may show adaptive differences even if differentiation among regions is not observed at the level of neutral genetic markers, and therefore management and conservation strategies should not solely rely on conclusions drawn from putatively neutral microsatellite markers. In spite of this cautionary note, we believe that the markers reported in this study will prove to be excellent tools for the conservation and management of *H. harpyja* throughout its geographic distribution, and we also presume that they can be utilized for studies of other raptor species such as the enigmatic species of the genus *Morphnus*.

Acknowledgments

We thank all the people and institutions that provided feather samples for this study: IBAMA Costa Marques, Foz Tropicana Parque das Aves, Crocodilo Safari Zoo, UFMT Zoo, MPEG Parque Zoobotânico, Bosque Municipal de São José do Rio Preto, Criadouro Sítio Tibagi, Museu de História Natural Capão da Imbuia, Refúgio Biológico Bela Vista - Itaipu Binacional, Estação Vera Cruz - Veracel, Zoológico do Centro Integrado de Guerra na Selva (Zoológico CIGS), and Gerência do Parque Nacional Serra da Bodoquena. We also thank members of the Laboratório de Evolução e Genética Animal (LEGAL UFAM), Projeto Gavião-real of INPA, Coordenação do Curso de Genética, Evolução e Biologia Evolutiva (INPA) and Coordenação de Ecologia (INPA) for help in the laboratory, the field and for discussion. We thank two anonymous reviewers for improving the manuscript. IBAMA (#120/2005 - CGFU/LIC) and CGEN (#088/2005) provided collection and genetic assessment permits, respectively. Financial support for this study was provided by grants from Fundação O Boticário de Proteção à Natureza, Cleveland Zoological Society, Programa Bolsa de Estudos para Conservação da Amazônia (Programa BECA), and Fundação de Amparo a Pesquisa da Amazônia (FAPEAM). This study forms a portion of a Ph.D. dissertation of Aureo Banhos who has a scholarship from the Brazilian Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior.

References

Allendorf FW and Luikart G (2006) Conservation and the Genetics of Populations. Blackwell Publishing, New York, 644 pp.

- Brinkmann B, Klintschar M, Neuhuber F, Hühne J and Rolf B (1998) Mutation rate in human microsatellites: Influence of the structure and length of the tandem repeat. *J Human Genet* 62:1408-1415.
- Brownstein MJ, Carpten JD and Smith JR (1996) Modulation of non-templated nucleotide addition by Taq DNA polymerase: Primer modifications that facilitate genotyping. *Bio-techniques* 20:1004-1010.
- Busch JD, Katzner TE, Bragin E and Keim P (2005) Tetranucleotide microsatellites for aquila and haliaeetus eagles. *Mol Ecol Notes* 5:39-41.
- Collar NJ (1989) Harpy eagle. *World Birdswatch* 11:5.
- Dallas JF (1992) Estimation of microsatellite mutation rates in recombinant inbred strains of mouse. *Mam Genome* 3:452-456.
- Efe MA, Martins-Ferreira C, Olmos F, Mohr LV and Silveira LF (2006) Diretrizes da Sociedade Brasileira de Ornitologia para a destinação de aves provenientes do tráfico e cativeiro. *Rev Brasil Ornitol* 14:67-72.
- Ellegren H, Primmer CR and Sheldon B (1995) Microsatellite evolution: Directionality or bias in locus selection? *Nat Genet* 11:60-62.
- Excoffier L, Laval G and Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.1: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinf Online* 1:47-50.
- Ferguson-Lee J (2001) *Raptors of the World*. Houghton Mifflin, Boston, 872 pp.
- Frankham R, Ballou JR and Briscoe DA (2002) *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge, 640 pp.
- Garza JC and Williamson EG (2001) Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Mol Ecol* 10:305-318.
- Griffiths RC, Double MC, Orr K and Dawson RJG (1998) A DNA test to sex most birds. *Mol Ecol* 7:1071-1075.
- Haig SM (1998) Molecular contributions to conservation. *Ecology* 79:413-425.
- Hailer F, Gautschi B and Helander B (2005) Development and multiplex PCR amplification of novel microsatellite markers in the White-tailed Sea Eagle, *Haliaeetus albicilla* (Aves, Falconiformes, Accipitridae). *Mol Ecol Notes* 5:938-940.
- Hartl DL and Clark AG (1997) *Principles of Population Genetics*. 3rd ed. Sinauer Associates, Sunderland, 542 pp.
- Hedrick PW (2001) Conservation genetics: Where are we now? *Trends Ecol Evol* 16:629-636.
- Hedrick PW (2005) 'Genetic restoration': A more comprehensive perspective than 'genetic rescue'. *Trends Ecol Evol* 20:109.
- Horváth MB, Martínez-Cruz B, Negro JJ, Kalmar L and Godoy JA (2005) An overlooked DNA source for non-invasive genetic analysis in birds. *J Avian Biol* 36:84-88.
- Hrbek T, de Brito RA, Wang B, Pletscher LS and Cheverud JM (2006) Genetic characterization of a new set of recombinant inbred lines (LGXSM) formed from the intercross of SM/J and LG/J inbred mouse strains. *Mam Genome* 17:417-429.
- Ito H, Sudo-Yamaji A, Abe M, Murase T and Tsubota T (2003) Sex identification by alternative polymerase chain reaction methods in falconiformes. *Zool Sci* 20:339-344.
- Johnson PCD, Fowlie MK and Amos W (2005) Isolation of microsatellite loci from the common buzzard, *Buteo buteo* (Aves, Accipitridae). *Mol Ecol Notes* 5:208-211.

- Kayser M and Sajantila A (2001) Mutations at Y-STR loci: Implications for paternity testing and forensic analysis. *Forensic Sci Int* 118:116-121.
- Martínez-Cruz B, David VA, Godoy JA, Negro JJ, O'Brien SJ and Johnson WE (2002) Eighteen polymorphic microsatellite markers for the highly endangered Spanish imperial eagle (*Aquila adalberti*) and related species. *Mol Ecol Notes* 2:323-326.
- Martínez-Cruz B, Godoy JA and Negro JJ (2004) Population genetics after fragmentation: The case of the endangered Spanish imperial eagle (*Aquila adalberti*). *Mol Ecol* 13:2243-2255.
- Mira S, Wolff K and Cancela ML (2005) Isolation and characterization of microsatellite markers in Bonelli's eagle (*Hieraaetus fasciatus*). *Mol Ecol Notes* 5:493-495.
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583-590.
- Nemésio A, Machado AR and Andrade MA (2000) Reprodução da hápia (*Harpia harpyja*) em cativeiro. *Aves* 1:34-35.
- Nesje M and Røed KH (2000) Microsatellite DNA markers from the gyrfalcon (*Falco rusticolus*) and their use in other raptor species. *Mol Ecol* 9:1438-1440.
- Paetkau D, Calvert W, Stirling I and Strobeck C (1995) Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Mol Ecol* 4:347-354.
- Paetkau D and Strobeck C (1995) The molecular basis and evolutionary history of a microsatellite null allele in bears. *Mol Ecol* 4:519-520.
- Pearce JM, Fields RL and Scribner KT (1997) Nest materials as a source of genetic data for avian ecological studies. *J Field Ornithol* 68:471-481.
- Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43:223-225.
- Rudnick JA, Katzner TE, Bragin EA, Rhodes Jr. OE and DeWoody JA (2005) Using naturally shed feathers for individual identification, genetic parentage analyses, and population monitoring in an endangered Eastern imperial eagle (*Aquila heliaca*) population from Kazakhstan. *Mol Ecol* 14:2959-2967.
- Sajantila A, Lukka M and Syvänen A-C (1999) Experimentally observed germline mutations at human micro- and mini-satellite loci. *Eur J Hum Genet* 7:263-266.
- Schuelke M (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nat Biotech* 18:233-234.
- Segelbacher G (2002) Noninvasive genetic analysis in birds: Testing reliability of feather samples. *Mol Ecol Notes* 2:367-369.
- Selkoe KA and Toonen RJ (2006) Microsatellites for ecologists: A practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecol Lett* 9:615-629.
- Sick H (1997) *Ornitologia Brasileira*. Editora Nova Fronteira, Rio de Janeiro, 912 pp.
- Vargas GJJ, Whitacre D, Mosquera R, Albuquerque J, Piana R, Thiollay J-M, Márquez C, Sánchez JE, López ML, Midence S *et al.* (2006) Estado y distribución actual del Águila Arpia (*Harpia harpyja*) en Centro y Sur América. *Ornitol Neotrop* 17:39-55.
- Weber JL and Wong CC (1993) Mutation of human short tandem repeats. *Hum Mol Genet* 2:1123-1128.
- Weir BS (1996) *Genetic Data Analysis II: Methods for Discrete Population Genetic Data*. Sinauer Associates, Sunderland, 445 pp.

Associate Editor: João S. Morgante

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)