

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, CONSERVAÇÃO E
BIOLOGIA EVOLUTIVA

**MARCADORES MOLECULARES PARA O
MONITORAMENTO DO GAVIÃO-REAL (*Harpia
harpyja*) NA NATUREZA**

RENAN COSER

Manaus, Amazonas

Julho de 2014

RENAN COSER

**MARCADORES MOLECULARES PARA O MONITORAMENTO DO
GAVIÃO-REAL (*Harpia harpyja*) NA NATUREZA**

Orientadora: Dra. Izeni Pires Farias

Co-orientador: Dr. Aureo Banhos dos Santos

Co-orientadora: Dra. Tânia M. Sanaiotti

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia como parte dos requisitos para obtenção de título de Mestre.

Manaus, Amazonas

Julho de 2014

RENAN COSER

Marcadores moleculares para o monitoramento do gavião-real (*Harpia harpyja*) na natureza

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

APROVADA EM: 31 / 07 / 2014

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Mário Cohn-Haft, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Prof. Dr. Carlos Henrique Schneider, Universidade Federal do Amazonas

Profa. Dra. Doriane Picanço Rodrigues, Universidade Federal do Amazonas

FICHA CATALOGRÁFICA

S586 Coser, Renan
Marcadores moleculares para o monitoramento do Gavião-Real (*Harpia Harpyja*) na natureza / Renan Coser da Silva. --- Manaus: [s.n.], 2015.
43 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado) --- INPA, Manaus, 2014.
Orientador : Izeni Pires Farias.
Coorientador: Aureo Banhos dos Santos; Tânia Margarete Santos.
Área de concentração : Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

1. Gavião-Real. 2. Microssatélites. I. Título.

CDD 598.9

SINOPSE

Nesse estudo, foram avaliados *primers* heterólogos já utilizados em gavião-real, além do desenvolvimento de marcadores microssatélites na espécie, mostrando-se possível também utilizá-los em gavião-real-falso. Esses novos *primers* auxiliaram na diferenciação de dois indivíduos em uma reserva florestal e demonstram ser uma ferramenta que pode contribuir com a preservação do gavião-real.

A Deus por me ajudar nos momentos difíceis, e por fornecer o material para estudo de todos os biólogos.

Aos meus pais, Dirceu e Elisabete Maria, pelo apoio em todos os momentos da minha vida.

A minha noiva Priscilla por todo carinho, compreensão, companheirismo, apoio, além de ser minha psicóloga, médica, animadora de torcida, chefe de cozinha, etc., durante o mestrado.

Ao meu irmão Bruno pelo carinho, paciência e pelo auxílio nas lições escolares quando ainda éramos pequenos.

Aos amigos da eterna república “A onda”, Anderson e Hugo, pela grande amizade e pelos momentos de distração, se fazendo presentes mesmo a distância.

Ao amigo André, pelo companheirismo e amizade que ultrapassa décadas.

A minha afilhada Anne pelos seus sorrisos que me faz esquecer os problemas do dia a dia.

E a minha sobrinha Beatriz que traz felicidade a espera de sua chegada.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Dra. Izeni Pires Farias, pela atenção, compreensão, paciência, ensinamentos e sinceridade em seus atos e palavras.

Ao meu co-orientador e orientador durante minha graduação Dr. Aureo Banhos dos Santos, pois sem seu apoio e ensinamentos dificilmente estaria atingindo essa etapa na minha vida.

A minha co-orientadora Tânia Margarete Sanaiotti, que me recebeu de braços abertos e me permitiu continuar trabalhando com o gavião-real, além de seus ensinamentos, atenção e companheirismo.

Ao Dr. Tomas Hrbek pelos ensinamentos, soluções de problemas e dúvidas, ajuda inestimável durante todo o processo do trabalho.

A toda equipe do Programa de Conservação do Gavião-real, pelo companheirismo e coleta de material genético na Reserva Florestal Adolpho Ducke durante os últimos 12 anos, além dos trabalhos anteriores realizados com o gavião-real, que me possibilitaram compreender melhor sobre essa magnífica ave.

A Francisca Helena Aguiar da Silva pela sua amizade e conselhos/contribuições no presente trabalho.

A todos os integrantes do Laboratório de Evolução e Genética Animal (LEGAL), pelo apoio e companheirismo.

Ao José Gregorio Martinez pela amizade e por tirar todas minhas dúvidas durante os processos laboratoriais.

A todos professores do GCBEv pelos ensinamentos adquiridos em sala de aula.

Ao CNPQ – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo fornecimento da bolsa de mestrado.

Ao convênio INPA/FDB/ VALE S.A. pela contribuição no financiamento do trabalho.

“Um fracassado vencerá um gênio com trabalho duro”

(Rock Lee, anime Naruto)

RESUMO

O gavião-real (*Harpia harpyja*) é uma espécie quase ameaçada de extinção, mas pouco estudada. Capturar e marcar indivíduos dessa espécie para estudo é muito difícil. Uma solução para minimizar essa dificuldade é utilizar amostras não invasivas, como penas encontradas na natureza, e marcadores moleculares para o monitoramento indireto de indivíduos e populações. No presente trabalho foram analisados oito pares de *primers* heterólogos de regiões microssatélites em gavião-real. Além disso, foram desenvolvidos onze novos pares de *primers* de regiões microssatélites através do sequenciamento de nova geração. Em alguns locos dos *primers* heterólogos testados, foi observada a diminuição considerável das repetições em tandem do microssatélite, o uso de locos nessa condição podem subestimar a diversidade genética da espécie. Dos onze novos *primers* desenvolvidos, dez são de regiões polimórficas. Esses novos *primers* também foram testados no falso gavião-real (*Morphnus guianensis*), onde dez *primers* foram amplificados com sucesso, sendo sete polimórficos. Os *primers* foram aplicados posteriormente na identificação de indivíduos de gavião-real na Reserva Florestal Adolpho Ducke, revelando que os dois ninhos encontrados na região foram utilizados por fêmeas adultas distintas. Desta maneira tais marcadores podem ser utilizados para o monitoramento e conservação do gavião-real.

ABSTRACT

The Harpy Eagle (*Harpy harpyja*) is a near threatened (NT) species, but is little studied. Capture and marking of individuals of this species is very difficult. One solution that minimizes this difficulty is the use of non-invasive samples such as shed feathers, and molecular markers for the indirect monitoring of individuals and populations. In the present study eight pairs of heterologous microsatellite primers were analyzed in Harpy Eagle individuals. In addition, eleven new microsatellite primer were developed through next-generation sequencing. In some loci of the heterologous primers tested, a considerable decrease of number of tandem repeats of the microsatellite was observed, and thus the use of those loci may underestimate the genetic diversity of the species. Of the eleven new primers developed ten polymorphic loci were used. These new primers were also tested on Crested Eagle (*Morphnus guianensis*), where ten primers were successfully amplified, and seven were polymorphic. The primers were subsequently applied in the identification of individuals of Harpy Eagles in the Adolpho Ducke Forest Reserve, revealing that the two nests found in the region were used by different adult females.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	8
Técnicas moleculares usadas em gavião-real	10
Marcadores microssatélites	11
OBJETIVOS.....	14
Objetivo geral	14
Objetivos específicos	14
CAPÍTULO I.....	15
CAPÍTULO II.....	20
CAPÍTULO III.....	25
Resumo	26
Introdução.....	27
Material e Métodos	29
Área de Estudo.....	29
Extração de DNA.....	30
Identificação dos indivíduos	31
Determinação do sexo	32
Genotipagens.....	34
Resultados e Discussão	35
CONCLUSÃO GERAL DA DISSERTAÇÃO.....	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

INTRODUÇÃO GERAL

O gavião-real, harpia ou uiraçu, possui o nome científico *Harpia harpyja* (Linnaeus, 1758), pertencente à família Accipitridae, é considerada a maior águia da América, além de ser uma das maiores aves de rapina do mundo (Collar, 1989). Sua distribuição limita-se apenas à América, se estendendo desde o sul do México até a Argentina (Ferguson-Lees e Christie, 2001; Vargas *et al.*, 2006) (Figura 01). A espécie distribui-se mais amplamente nas florestas do Brasil, predominando nas florestas Amazônica e Atlântica (Banhos, 2009), dois biomas fortemente atingidos pelo desmatamento.

Segunda a *BirdLife International* (2013), essa espécie é considerada como globalmente quase ameaçada de extinção. No Brasil, o gavião-real também é considerado como quase ameaçado (Machado *et al.*, 2005; Soares *et al.*, 2008), porém alguns estados brasileiros na região da Mata Atlântica consideram a espécie como criticamente ameaçada ou extinta na natureza (Garcia e Marini, 2006). As principais ameaças para o gavião-real são a perda de habitat, caça, criação ilegal e tráfico de animais silvestres (Banhos, 2009). Banhos (2009) estimou como o desmatamento na Amazônia poderia influenciar no tamanho populacional da espécie, sendo que se a taxa de desmatamento atual permanecer constante, no tempo de três gerações a harpia será considerada uma espécie vulnerável.

O gavião-real é considerada um predador de topo na cadeia trófica (Vargas *et al.*, 2006), se alimentando basicamente de primatas e preguiças, porém pode se alimentar também de roedores, marsupiais, carnívoros e aves (Aguilar-Silva, 2007). Algumas dessas presas são consideradas ameaçadas de extinção em alguns países (Muñiz-López, 2008). No Brasil, em alguns estados da Mata Atlântica, algumas dessas presas também são consideradas ameaçadas (Banhos, 2009). Em sua nidificação, o gavião-real preferencialmente prepara seu ninho em árvores emergentes, sendo que algumas delas possuem interesse comercial para exploração madeireira (Da Luz, 2005). Em média o gavião-real gera um filhote a cada dois a três anos, onde após estes adquirirem independência (em torno de dois a três anos), geralmente o casal retorna para a mesma árvore para uma nova nidificação (Fowler e Cope, 1964; Rettig, 1978; Alvarez, 1996).

Essas características ecológicas da espécie tornam a conservação da espécie um grande desafio.

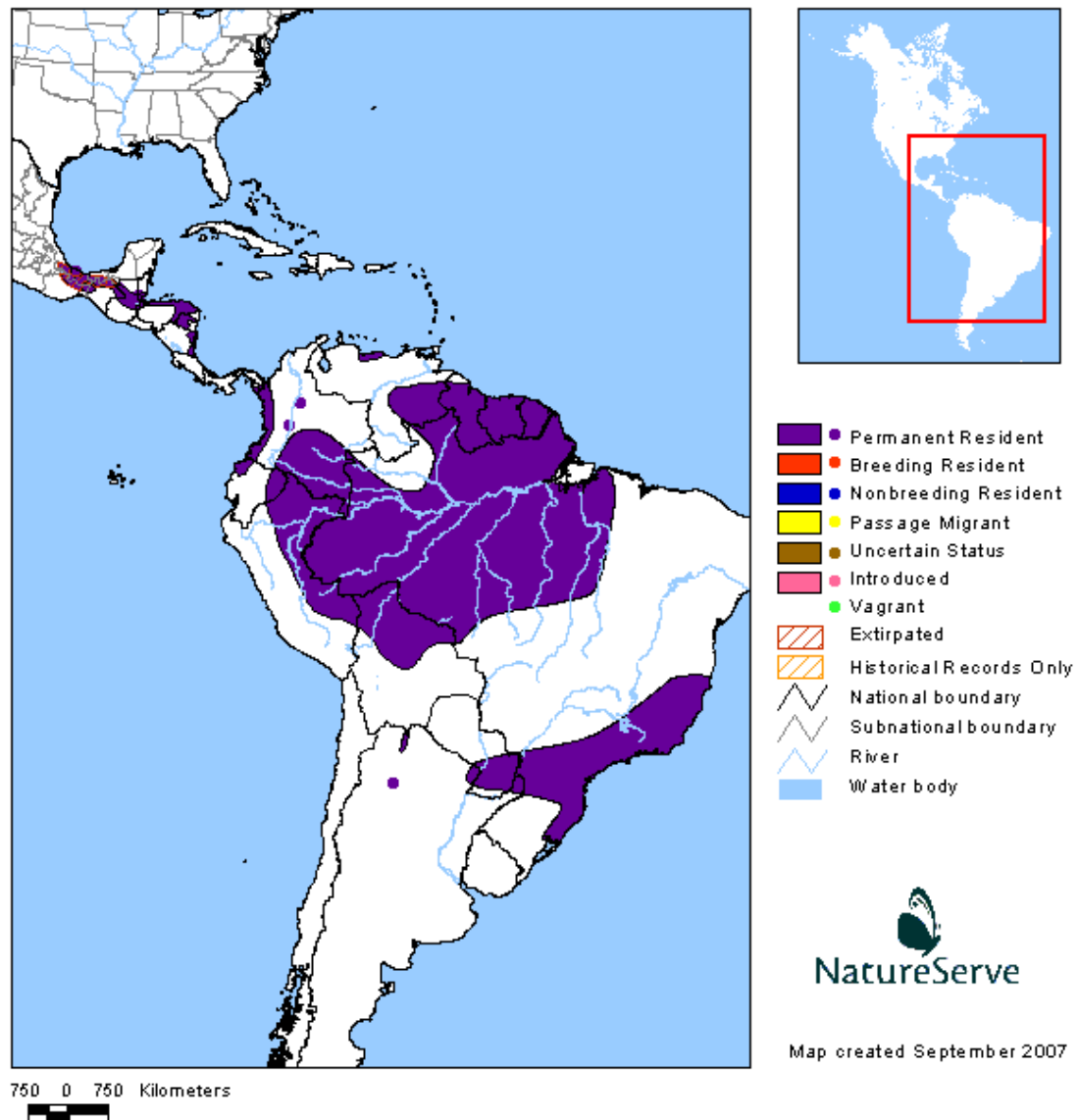


Figura 01: Mapa da distribuição global do gavião-real (NatureServe, 2014).

O gavião-real é uma espécie difícil de ser estudada e monitorada na natureza. Machos e fêmeas não apresentam dimorfismo sexual aparente na plumagem (Banhos *et al.*, 2008), apresentando uma diferença apenas no tamanho corporal, em geral, as fêmeas são em torno de 1/3 maiores que os machos (Banhos, 2009). Devido a sua baixa densidade demográfica, a espécie é de difícil detecção em florestas densas (Bierregaard, 1995; Stotz *et al.*, 1996). Além disso, capturar e marcar os indivíduos adultos também é muito difícil, assim como outras águias (Rudnick *et al.*, 2005).

Uma solução para minimizar as dificuldades para estudar o gavião-real é o uso de amostras não invasivas, como penas encontradas na natureza, e o emprego

de marcadores moleculares para o monitoramento de indivíduos e populações (eg. Rudnick *et al.*, 2005).

Técnicas moleculares usadas em gavião-real

Alguns estudos do gavião-real foram realizados utilizando marcadores moleculares. Um dos marcadores utilizados foi a sequência da região controle do DNA mitocondrial (Banhos, 2009; Lerner 2007), tendo entre seus objetivos detectar fluxo gênico da espécie entre diferentes regiões na América. Lerner (2007) sugeriu que ocorra uma migração predominante da América Central para a América do Sul, porém Banhos (2009) sugeriu o oposto. Quando analisado apenas amostras do Brasil, Banhos (2009) encontrou que há um fluxo gênico unidirecional entre os biomas da Mata Atlântica e Amazônia através do leste da Amazônia.

Outro tipo de marcadores moleculares utilizados para o estudo do gavião-real são os microssatélites (Banhos *et al.*, 2008; Banhos, 2009), que foram empregados com a finalidade de investigar a diversidade genética da espécie em nível populacional. Banhos (2009) apontou que a diversidade genética nos locos microssatélites é similar a encontrada para outras espécies de águias apontadas como ameaçadas. Além disso, o autor inferiu com o mesmo marcador que há um fluxo gênico bidirecional do gavião-real entre a Amazônia e a Mata Atlântica, porém na Mata Atlântica uma taxa apresentando maior número de emigrantes por geração que imigrantes.

Os resultados do marcador microssatélite e do DNAm_t não são exatamente os mesmo pois os marcadores apresentam formas de herança distintas (Banhos, 2009). Ao comparar os dois marcadores utilizados, o autor sugere que a fêmea tende a ser mais residente quando comparado ao macho da espécie. Isso pode indicar que a espécie possa ter o sistema de reprodução poligínico (um macho se reproduzindo com várias fêmeas, porém a fêmea se reproduz com apenas um macho) devido a uma tendência de maior dispersão de machos comparado as fêmeas, contradizendo Fowler e Cope (1964), que acreditava que o gavião-real apresentava o sistema de reprodução monogâmico. Dessa forma, mais estudos em campo e genéticos são necessários para confirmação de seu sistema reprodutivo (Banhos, 2009).

Marcador molecular para identificação do sexo dos indivíduos foi outra classe de marcadores já utilizado no estudo do gavião-real. Banhos *et al.* (2008) adaptou *primers* de Ito *et al.* (2003) com a finalidade de obter melhores resultados na sexagem de indivíduos de gavião-real utilizando amostras de penas e museu. Banhos (2009) aplicou os *primers* adaptados e encontrou uma razão sexual de aproximadamente 1 macho para cada 2,11 fêmeas nas amostras provenientes da natureza, museu e criadouros.

Marcadores microssatélites

Os marcadores microssatélites, também conhecidos por SSR (*Simple Sequence Repeats*), são pequenas sequências de 1 a 6 pares de bases (pb) repetidas em tandem, sendo encontrados em grande quantidade no genoma nuclear. Estes fornecem grande número de informações, por possuir alta taxa de evolução (entre 10^{-6} a 10^{-2} mutações por geração) (Schlötterer, 2000), distinguir os indivíduos homocigotos dos heterocigotos (co-dominância) e apresentar alta taxa de reprodutibilidade (Faleiro, 2007). Devido a essas características, estes marcadores fornecem dados que podem ser utilizados para realizar estimativas de tamanho efetivo populacional, estrutura populacional, dispersão, taxas de colonização e sistema reprodutivo (Nesje *et al.*, 2000; Martínez-Cruz *et al.*, 2004; Rudnick *et al.*, 2005).

Os SSR são classificados de acordo com a sequência da repetição, podendo ser: perfeitos, imperfeitos, interrompidos e compostos (Oliveira *et al.*, 2006). Nos microssatélites perfeitos a sequência repetitiva não é interrompida por nenhuma outra base (EX: CACACACACACA). Os microssatélites imperfeitos apresentam interrupção da repetição por uma base nucleotídica (EX: CACACACACATACACACACA). Os microssatélites interrompidos apresentam uma sequência dentro da sequência em tandem (EX: CACACACAGTCTCCACACACA). Já os microssatélites compostos apresentam duas sequências de repetições diferentes lado a lado (EX: CACACACACATGTGTGTGTG) (Oliveira *et al.*, 2006).

Os microssatélites podem surgir (“nascer”) no DNA através de mutações, sendo estas de inserções ou deleções (indels) ou até mesmo por substituições em sequências de proto-microssatélites (número mínimo de repetições) (Zhu *et al.*, 2000), e através do erro da enzima DNA polimerase (um slippage) durante a

replicação do DNA, gerando novas repetições idênticas uma ao lado da outra (Buschiazzo e Gemmell 2006), provocando assim novas sequências em cada erro da enzima (gerando novos alelos no loco). Outra forma de surgimento dos microsatélites é através de elementos móveis iniciadores de microsatélites (ou mini-me), essa forma de surgimento foi observada na ordem Diptera, porém outros organismos que possuem esses elementos móveis podem também ser suscetíveis a esse mecanismo (Wilder e Hollocher, 2001).

Em alguns casos, pode ocorrer uma “morte” do microsatélite em duas etapas. A primeira ocorre uma interrupção da repetição através de uma mutação, onde impede o deslizamento da DNA polimerase, e a segunda etapa seria a deleção de parte das repetições do microsatélite, sendo que ao final do processo a região homóloga que ainda possui uma pequena parte da repetição fica bastante distinta da anterior ao processo (Taylor *et al.*, 1999). O processo de “morte” do microsatélite é demorado e possui várias etapas, ocorre a uma taxa oposta a de nascimentos de novos microsatélites (Bhargava e Fuentes, 2010).

Apesar das características vantajosas dos marcadores microsatélites para estudos, muitas vezes é difícil a caracterização de locos da espécie que se deseja trabalhar e os custos de desenvolvimento desses marcadores são elevados. Em aves essa dificuldade é ainda maior devido ao tamanho reduzido do genoma (comparado a outros táxons de vertebrados) e a baixa frequência dos microsatélites quando comparados a outros táxons de vertebrados (Primmer *et al.*, 1997). Dessa forma, alguns pesquisadores preferem transferir para a espécie de estudo marcadores microsatélites já desenvolvidos para outras espécies relacionadas filogeneticamente. Apesar das regiões flaqueadoras poderem apresentar diferenças na sequência nucleotídica, é possível amplificar produtos provenientes de uma região homóloga entre espécies relacionadas (e.g. Martínez-Cruz *et al.*, 2002; Busch *et al.*, 2005), conhecidos como *primers* heterólogos.

A utilização de *primers* heterólogos deve ser realizada com cautela, pois podem apresentar diferenças na composição do microsatélite e levar a interpretações equivocadas. Taylor *et al.*, 1999, por exemplo, apontou em um estudo com a família Cichlidae que o loco TmoM27 apresenta diferenças entre o número de repetições ((CA)₁₆ e (CA)₂), além de também apresentar classificações distintas, como microsatélites perfeitos e imperfeitos ((CA)₁₆ e (CA)₂₁CC(CA)₁₃), podendo interferir diretamente nas estimativas de variabilidade deste loco em algumas

espécies da família. Além disso, podem ocorrer algumas dificuldades ao se utilizá-los, como a não amplificação dos fragmentos de interesse ou até mesmo uma amplificação inespecífica ou ambos, principalmente em amostras não-invasivas, que possuem baixa quantidade e qualidade de DNA. Garner *et al.*, 2005, por exemplo, em um estudo com mamíferos compararam *primers* heterólogos com autólogos (específico para a espécie) e encontraram que a heterozigosidade (H_E) foi aproximadamente 10% menor em *primers* heterólogos. Francisco *et al.* (2006) também relataram que a variabilidade genética encontrada foi menor utilizando *primers* heterólogos em abelhas Meliponini. *Primers* heterólogos já foram utilizados no gavião-real por Banhos *et al.* (2008) e Banhos (2009), este último menciona que as análises de diversidade genética podem ter sido subestimadas devido aos *primers* e a utilização de amostras não invasivas e de museu.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Obter ferramentas genéticas que possam contribuir nos estudos genéticos para a conservação do gavião-real (*Harpia harpyja*).

Objetivos específicos

- Analisar os *primers* microssatélites heterólogos já usados em gavião-real;
- Desenvolver marcadores microssatélites para o gavião-real;
- Transferir os *primers* desenvolvidos para gavião-real para o gavião-real-falso (*Morphnus guianensis*);
- Identificar indivíduos através de penas provenientes dos ninhos da Reserva Florestal Adolpho Ducke (RFAD);
- Sexar as penas provenientes dos ninhos da RFAD.

CAPÍTULO I

Análise de *primers* heterólogos usados em *Harpia harpyja*

ANÁLISE DE PRIMERS HETERÓLOGOS USADOS EM *Harpia harpyja*

Resumo

Gavião-real (*Harpia harpyja*) é uma espécie topo de cadeia trófica que sofre várias ameaças, como a perda de habitat, caça e remoção da natureza para o tráfico de animais silvestres e criação ilegal em cativeiro. *Primers* de marcadores microsatélites foram transferidos para o gavião-real por Banhos *et al.* (2008) para auxiliar nos estudos de genética da conservação da espécie. Entretanto, *primers* heterólogos podem gerar subestimativas nos índices de variabilidade genética das espécies. Dessa forma, oito *primers* heterólogos transferidos por Banhos *et al.* (2008) foram analisados, três desses *primers* não apresentaram características adequadas para serem empregados em estudos de genética da conservação do gavião-real.

Palavras chaves: Gavião-real, marcadores microsatélites, transferibilidade.

Harpia harpyja (Linnaeus, 1758), vulgarmente chamado de gavião-real ou harpia, é uma ave de rapina que se distribui na América, desde o sul do México até a Argentina (Vargas *et al.*, 2006). No Brasil, sua distribuição é mais ampla, ocorrendo principalmente nas florestas Amazônica e Atlântica, biomas que sofrem acentuado processo de desmatamento. A espécie ocorre em baixas densidades e é difícil de ser observado nas florestas tropicais densas (Bierregaard, 1995; Stotz *et al.*, 1996). Considerada uma espécie predadora de topo de cadeia trófica, o gavião-real sofre ameaças como a perda de habitat, caça e remoção da natureza para o tráfico de animais silvestres e criação ilegal em cativeiro (Vargas *et al.*, 2006). Devido a essas ameaças, a espécie é considerada globalmente como quase ameaçada de extinção pela *BirdLife International* (2013). No Brasil, a espécie também é considerada como quase ameaçada (Machado *et al.*, 2005; Soares *et al.*, 2008).

Neste trabalho foram avaliados oito *primers* heterólogos de microsatélites transferidos de outras espécies para o gavião-real por Banhos *et al.* (2008), *primers* desenvolvidos por: Hailer *et al.* (2005) (locos HAL09 e HAL10), Nesje e Røed (2000) (loco NVHfr206), Busch *et al.* (2005) (loco IEAAAG15), Johnson *et al.* (2005) (loco

BBU51) e Mira *et al.* (2005) (loco HF-C1D2, HF-C7G4 e HF-C1E8). Para isso, foram utilizados o DNA extraídos de quinze amostras de sangue de indivíduos de gavião-real, com procedência da natureza do Brasil, cedidas pelo Programa de Conservação do Gavião-real no Brasil (PCGR-INPA).

As extrações de DNA foram realizadas seguindo o protocolo de Sambrook *et al.* (1989). Em seguida os marcadores foram amplificados através de PCRs (polymerase chain reaction), utilizando o termociclador *Veriti™ Thermal Cycler* (Applied Biosystems, Inc.). As PCRs foram realizadas seguindo o protocolo econômico de Schuelke (2000) para um volume de 10 µL de produto final, com 4,3 µL de água ultra-pura, 0,7 µL de MgCl₂ (25 mM), 1,0 µL de solução tampão 10X (Tris-KCl 200mM pH 8.5), 0,8 µL de dNTP (10 mM), 0,5 µL *primer* M13 (2 µM), 0,5 µL de *primer* forward M13 (2 µM), 1,0 µL de *primer* reverse (2 µM), 0,2 µL de Taq DNA polimerase (5U/ µL) e 1,0 µL de DNA da amostra (~ 25 ng). As condições das PCRs foram: 1 minuto à temperatura 93°C para a desnaturação do DNA; 30 ciclos de 93°C, 55°C e 68°C com duração de 30 segundos cada, para desnaturar a fita de DNA, anelamento dos *primers* e de extensão final dos fragmentos que foram formados respectivamente; 20 ciclos com as temperaturas de 93°C, 50°C e 68°C, para a desnaturação, anelamento e extensão respectivamente, com duração de 30 segundos cada temperatura, com o objetivo de anelar o *primer* M13 aos fragmentos formados; e finalmente uma temperatura de 68°C para extensão final, por 30 minutos. Para a visualização dos alelos, 1 µL de cada reação de PCR foi adicionado a 1 µL de ROX (DeWoody *et al.*, 2004) juntamente com 8 µL de formamida Hi-Di (Applied Biosystems, Inc.) e encaminhado ao sequenciador ABI 3130 xl de acordo com o protocolo do fabricante. As genotipagens dos indivíduos foram visualizadas no software GeneMapper v4.0 (Applied Biosystems, Inc.) e os indivíduos homozigotos foram selecionados e em seguida sequenciados.

Para os sequenciamentos, os produtos das PCRs de amostras com genótipos homozigotos foram purificados utilizando EXOSAP (Introgen, Calsdad, CA) e em seguida foram realizadas as reações de sequenciamento usando o Kit BigDye Terminator versão 3.1 (Applied Biosystems, Inc.), de acordo com protocolo do fabricante. Tanto os *primers forward* como os *reverse* foram usados nos sequenciamentos. Posteriormente as amostras foram analisadas no sequenciador automático ABI 3130xl (Applied Biosystems, Inc.). As sequências foram visualizadas no programa BioEdit (Hall, 1999). A sequências obtidas para o gavião-real foram

comparadas com a sequência original da espécie que o marcador foi desenvolvido, obtidas do GenBank.

Na maioria dos casos ocorreu uma redução nas repetições em *tandem* do microssatélite em *Harpia harpyja* (Tabela 01), onde apenas o marcador IEAAAG15 apresentou um acréscimo de repetições na região em *tandem* do microssatélite. O elevado número de reduções de repetições nas sequências dos marcadores microssatélites é preocupante, pois microssatélites que possuem menor número de repetições em *tandem* sofrem menor número de mutações, gerando assim um menor grau de polimorfismo (Zhu *et al.* 2000). Dessa forma, o *primer* HAL10 não seria recomendado para ser usado nos estudos com gavião-real devido ao baixo grau de polimorfismo, o que poderia levar a uma provável subestimação dos dados. Os *primers* HF-C7G4 e HF-C1E8 apresentaram características do processo de “morte” do microssatélite (Taylor *et al.* 1999), onde além de mutações interrompendo as repetições em *tandem*, observa-se também uma alta redução no número das repetições. Dessa forma, os *primers* heterólogos que ainda apresentam alto grau de polimorfismo e que poderiam apresentar boas condições para uso são os *primers* HAL09, NVHfr206, BBU51, IEAAAG15 e HF-C1D2, pois apresentam uma grande quantidade de repetições. Ainda que estes *primers* heterólogos aparentemente apresentem boas condições, o isolamento e caracterização de marcadores microssatélites específicos adicionais seria uma estratégia mais recomendável e confiável para serem empregados em trabalhos de genética da conservação do gavião-real, gerando dados com maior qualidade.

<i>Primer</i>	Autor	Esp. orig. ¹	Sequência original	Sequência em <i>Harpia harpyja</i>	<i>Nh</i> ²
HAL09	Hailer <i>et al.</i> , 2005	<i>Haliaeetus albicilla</i>	(AC) ₁₇	(AC) ₉	7
HAL10	Hailer <i>et al.</i> , 2005	<i>Haliaeetus albicilla</i>	(CA) ₁₂	(CA) ₇	3
NVHfr206	Nesje e Røed, 2000	<i>Falco rusticolus</i>	(CA) ₁₄	(CA) ₁₁ (TA) ₅ AA	3
IEAAAG15	Busch <i>et al.</i> , 2005	<i>Aquila heliaca</i>	(AAAG) ₇	(AAAG) ₁₇	2
BBU51	Johnson <i>et al.</i> , 2005	<i>Buteo buteo</i>	(AC) ₁₇	(AC) ₁₁	9
HF-C1D2	Mira <i>et al.</i> , 2005	<i>Hieraaetus fasciatus</i>	(AG) ₂₀	(AG) ₄ AA(AG) ₁₅	4
HF-C7G4	Mira <i>et al.</i> , 2005	<i>Hieraaetus fasciatus</i>	(GA) ₁₁ TA(CA) ₇	(GA) ₁₀ TA(CA) ₃ TGCA	7
HF-C1E8	Mira <i>et al.</i> , 2005	<i>Hieraaetus fasciatus</i>	(GAA) ₂₆	(GAA) ₄ (GGA) ₂ (GAA) ₄ AAA(GAA) ₅	10

Tabela 01: Sequenciamento de oito marcadores microsatélites heterólogos aplicados em *Harpia harpyja*, sendo comparado o tamanho da repetição do marcador.

¹Primers desenvolvido originalmente para a espécie; ²Número de homozigoto em *Harpia harpyja*.

CAPÍTULO II

Coser, R; Matínez, J.G.; Nunes, M.; Assunção, E.N.; Astolfi-Filho, S.; Banhos, A.; Sanaiotti, T.M.; Hrbek, T.; Farias, I.P. 2014. Development of microsatellite markers for the near threatened eagles *Harpia harpyja* and *Morphnus guianensis* using nextgeneration sequencing. *Conservation Genet Resour.* DOI 10.1007/s12686-014-0268-7.

Desenvolvimento de marcadores microssatélites para as águias quase ameaçadas *Harpia harpyja* e *Morphnus guianensis* utilizando sequenciamento nextgeneration.

Resumo

Nós isolamos e caracterizamos 11 loci microssatélites para *Harpia harpyja* usando o *IonTorrent* PGM. Os loci foram validados 22 em *Harpia harpyja* e 16 indivíduos de *Morphnus guianensis*. Dez dos loci eram variáveis em *H. harpyja*, variando de dois a seis alelos por locus. Sete dos loci eram variáveis em *M. guianensis* que varia de dois a seis alelos por locus. Genótipos não apresentaram desvio na expectativa do equilíbrio de Hardy-Weinberg, e nenhum desequilíbrio de ligação foi observado. Estes marcadores têm uma expectativa de fornecer um recurso importante para estudos genéticos populacionais, conservacionistas e para o monitoramento dessas duas espécies de accipitrídeos quase ameaçadas.

Palavras-chave Gavião-real; Uiraçu-falso; Microssatélites; Genética da conservação.

O gavião-real, *Harpia harpyja* (Linneaus 1758), é a maior águia da região Neotropical e é considerada a ave de rapina mais poderosa do mundo. BirdLife International estima entre 20.000 e 50.000 indivíduos em estado selvagem (BirdLife International 2013). Sua espécie-irmã, o gavião-real-falso, *Morphnus guianensis* (Daudin 1800), é uma ave de rapina neotropical ainda mais rara e mais enigmática. Sua distribuição se sobrepõe à do gavião-real, mas suas densidades são ainda mais baixas, e sua distribuição atual parece ser em grande parte restrita a bacia amazônica. BirdLife International estima que 1.000-10.000 indivíduos igualando-se a 670-6,700 indivíduos adultos maduros existem em estado selvagem (BirdLife International 2012). Ambas as espécies são classificadas como quase ameaçadas (NT) pela IUCN e são citados no Anexo I da CITES, principalmente devido à fragmentação do habitat e são mortos por serem considerados uma praga. Nenhum recurso molecular específico das espécies foi desenvolvido até o momento.

Nós isolamos e caracterizamos 11 loci microssatélites para *H. harpyja*. Usando o protocolo padrão de extração de fenol clorofórmio, extraímos o DNA a

partir de sangue de cinco indivíduos que se estendeu a distribuição geográfica conhecida da harpia no Brasil. Preparamos um mix de DNA equimolar e posteriormente simultaneamente digerimos 200 ng de DNA genômico com as enzimas de restrição SdaI e Csp6I (Fermentas) e ligamos estes fragmentos digeridos aos ligantes que incluem os adaptadores IonTorrent P e barcoded A, seguindo o raciocínio da metodologia ddRAD de *Peterson et al.* (2012). A digestão foi amplificada por PCR, analisadas sobre a E-Gel 2% com SYBR Safe™ (Invitrogen™), e a fração de tamanho entre 350 e 400 pb sendo recolhida. A amplificação clonal e o sequenciamento foram realizados com o kit de 400 pb em um chip Ion PGM 318. Obtivemos 311.007 sequências de alta qualidade, com uma média de 257 pares de base de comprimento.

Nós exportamos os dados brutos, menos barcode, e importamos os dados para o software Geneious 7.0.6. Geramos 11.923 contigs com cobertura de 3x ou superior e com 100 pb ou mais. Nós exportamos os contigs e usamos o script MISA (Thiel et al. 2003) escrito em Perl para procurar sequências com pelo menos 5 di-, tri-, tetra- ou penta-nucleotídeos, perfeitos ou com repetições imperfeitas. Identificamos 226 *contigs* e analisamos aqueles que tiveram pelo menos oito repetições (29 *contigs*) para variação no número de repetições nas sequências que formaram os *contigs*. Nós projetamos *primers* para todos os oito microssatélites variáveis. Além disso, nós projetamos *primers* para todos os microssatélites com pelo menos dez repetições perfeitas para os quais foi possível projetar *primers* (três microssatélites), mesmo que os microssatélites não demonstrassem variação entre os cinco indivíduos que entraram no mix do sequenciamento.

Foram triados 22 *H. harpyja* e 16 *M. guianensis* seguindo o protocolo de PCR descrito no *Banhos et al.* (2008), mas utilizando as temperaturas de anelamento relatados na Tabela 1. Os produtos de PCR foram analisados no ABI 3130xl (Applied Biosystems). Os genótipos obtidos foram visualizados no software GeneMapper v4.0 (Applied Biosystems).

Os microssatélites foram caracterizados no software Arlequin 3.5. Dez dos 11 marcadores foram polimórficos, estando em equilíbrio de Hardy-Weinberg e não ligados em *H. harpyja*. Dez marcadores também foram amplificados sendo que sete loci foram polimórficos em *M. guianensis*. A avaliação preliminar indica baixos níveis de diversidade genética em ambas as espécies. Espera-se que esses marcadores

revelam-se como um recurso importante para a conservação e monitoramento destas duas espécies quase ameaçadas da família Accipitridae

Tabela 1 - Caracterização de 11 loci microssatélites em *Harpia harpyja* e *Morphnus guianensis*.

	Primer (5' - 3')	Repetição do microssatélite	T (°C)	<i>Harpia Harpyja</i>					<i>Morphnus Guianensis</i>				
				Tamanho (bp)	N/A	H _O	H _E	P	Tamanho (bp)	N/A	H _O	H _E	P
Hh1531	F-GCTGATTTTTATCCGGACTG R-GAATGGTGCATCTCTGGTGT	(TG) ₉	55	219-215	22/3	0.07143	0.07078	1.00000	219	12/1	---	---	---
Hh2161	F-GAGGAGCCCACAGATAATGA R-TGCAGCAAATGTTGTCAAT	(TG) ₁₀	55	198-218	22/3	0.63636	0.46934	0.20184	210-232	11/5	0.90909	0.78788	0.07086
Hh2436	F-TTGCCCCAGAAATCTTTGTA R-CCTTCTGC AAAAAGCATCAG	(GT) ₈	55	214-216	22/2	0.04545	0.04545	1.00000	212-216	11/2	0.09091	0.36797	0.03752
Hh3297	F-CCCCAGAATTTTGCTTTCAC R-CTTGGAGGTGAGCCAGTTA	(TG) ₄ CA(TG) ₆	58	228-238	22/3	0.09091	0.08985	1.00000	---	---	---	---	---
Hh3533	F-TACAAAGTAGCTATAGAGAGGG R-TCTCTCAGAGCTCCTGCCTA	(GT) ₉ TA(TG) ₇	55	225-247	22/6	0.63636	0.74313	0.32400	221	8/1	---	---	---
Hh4162	F-TCACCTACCAGGCAGAACTT R-TAAGGGAATTTGGTTCTGG	(AT) ₉	55	220-222	22/2	0.31818	0.33298	1.00000	216	3/1	---	---	---
Hh5032	F-AGCAATGGCCAAGATGACTC R-TCCCAGGCGAGAAGTAAGTAA	(GT) ₁₁	55	224-226	22/2	0.04545	0.04545	1.00000	224-238	15/6	0.80000	0.71264	0.47705
Hh5113	F-ACCTTATCTGCCGTCTCCTT R-AAACAGCTTTCCATGCATCT	(TG) ₈	55	222-228	21/4	0.38095	0.45877	0.25823	226-232	16/4	0.56250	0.59879	0.14570
Hh7603	F-CACTCCAACCCTCTGAGAA R-TGTGATAGAGCCATCCACGA	(GT) ₁₁	55	193-197	21/2	0.42857	0.34495	0.53332	192-198	16/5	0.56250	0.66532	0.10876
Hh8280	F-GTTCATGGAGCGGGAGAATA R-TGGGAAACCTGTTGTGTTG	(ATT) ₁₃	55	178-187	20/4	0.70000	0.76026	0.93026	184-190	8/3	0.50000	0.56667	0.08474
Hh9320	F-CAATGTGTCTGAGAGGTTCTCC R-CCACAGATCTACCAATCCAAA	(AC) ₁₃	55	101	22/1	---	---	---	109-113	5/2	0.20000	0.46667	0.33303
Todos loci						0.36469	0.36558				0.32955	0.37872	

Nota: Locus Hh7603 teve uma diferença de 1 pb entre *H. harpyja* e *M. guianensis*, devido a uma exclusão 1 pb no microssatélite flanqueando região de *M. guianensis*; Sequências consenso foram depositados sob os números Genbank KM197508-KM197518

N / A: Número de número indivíduos / alelo, H_O: Heterozigidade observada, H_E: Heterozigidade esperava.

CAPÍTULO III

Identificação de indivíduos em ninhos distintos de gavião-real (*Harpia harpyja*) na Reserva Florestal Adolpho Ducke, Manaus-AM.

Identificação de indivíduos em ninhos distintos de gavião-real (*Harpia harpyja*) na Reserva Florestal Adolpho Ducke, Manaus-AM.

Resumo

O gavião-real (*Harpia harpyja*) é uma espécie de difícil detecção e identificação de indivíduos na natureza, dificultando os estudos ecológicos sobre a espécie. Amostras não invasivas, como penas encontradas na natureza, e o emprego de marcadores moleculares podem minimizar essa dificuldade, permitindo o monitoramento de indivíduos de forma indireta. Fêmeas de dois ninhos da Reserva Florestal Adolpho Ducke, em Manaus – AM, foram identificadas através de suas penas, com o auxílio de marcadores moleculares microssatélites e de identificação de sexo. Dessa forma, foi possível concluir que os dois ninhos encontrados na região foram utilizados por fêmeas adultas distintas.

Introdução

O gavião-real (*Harpia harpyja*) é uma espécie de difícil detecção devido sua baixa densidade demográfica, encontrado em florestas densas (Bierregaard, 1995; Stotz *et al.*, 1996). Apresenta longa vida, com exemplares em cativeiro chegando aos 41 anos de idade (Alvarez-Cordero, 1996), esta característica permite que um mesmo adulto seja encontrado numa mesma área por décadas, como por exemplo dentro e uma reserva florestal em ciclos reprodutivos consecutivos (Aguiar-Silva *et al.*, 2011).

A Identificar indivíduos utilizando anilhas ou marcação por telemetria também é difícil de realizar, pois existe uma dificuldade de capturar indivíduos adultos, assim como outras águias (Rudnick *et al.*, 2005). Além disso, a espécie não apresenta dimorfismo sexual aparente na plumagem, o dimorfismo é somente no tamanho corporal, com as fêmeas possuindo maior porte e envergadura (cerca de 12%) que os machos (Fowler e Cope, 1964; Sick, 1997; Ferguson-Lees e Christie, 2001).

A utilização de amostras não-invasivas, como penas, de espécies que possuem essas características é uma alternativa que pode minimizar essas dificuldades de estudo (Pearce *et al.*, 1997; Horváth *et al.*, 2005; Rudnick *et al.*, 2005; Rudnick *et al.*, 2007; Banhos *et al.*, 2008; Banhos, 2009). As penas podem ser obtidas a partir de espécimens depositadas em museus, mantidas em criadouros ou de indivíduos silvestres em ambiente natural (penas caídas no chão próximo a ninhos) (Banhos *et al.*, 2008; Aguiar-Silva *et al.*, 2014).

A coleta de penas no ambiente natural geralmente é obtida quando se realiza o monitoramento do gavião-real no ninho, pois as penas caem naturalmente do corpo da ave e podem ser encontradas no chão da floresta, nos arredores da árvore ninho. No caso de penas encontradas abaixo do ninho, pode-se inferir que pertencem aos indivíduos que utilizam o ninho (o casal mais um filhote caso exista), uma vez que as águias são consideradas territorialistas e monogâmicas (Sick, 1997; Rudnick *et al.*, 2005). Além de penas, também é possível coletar outros registros que possam comprovar que o gavião-real esteve presente no local, como restos de presas, fragmentos de ovos e pelotas de regurgitação (Aguiar-Silva, 2007; Aguiar-Silva *et al.*, 2014).

Tais amostras não-invasivas permitem obter DNA da espécie, porém de menor qualidade e em menor quantidade comparado a amostras invasivas (sangue

e tecido como exemplo). Entretanto, com esses tipos de amostras é possível amplificar regiões tanto do DNA mitocondrial quanto nuclear (eg. Horvath *et al.*, 2005; Rudnick *et al.*, 2005; Rudnick *et al.*, 2007; Banhos, 2008; Banhos *et al.* 2009, Lerner *et al.* 2009).

Dentre os trabalhos citados com amostras não invasivas, encontra-se o trabalho de Rudnick *et al.* (2005), onde os autores estudaram o sistema reprodutivo da espécie da águia imperial (*Aquila heliaca*). Além disso, com esses tipos de amostras e emprego de marcadores moleculares também é possível identificar o sexo dos indivíduos (Rudnick *et al.* 2005; Banhos *et al.* 2008; Banhos, 2009).

O objetivo desse trabalho foi identificar indivíduos através de penas provenientes de ninhos da Reserva Florestal Adolpho Ducke, Manaus – AM, utilizando marcadores moleculares microssatélites e de identificação de sexo.

Material e Métodos

Área de Estudo

A Reserva Florestal Adolpho Ducke (RFAD) está inserida no bioma Amazônia, situada na cidade de Manaus – AM, Brasil. A reserva possui 10.000 hectares (100 km²) e é classificada como floresta tropical úmida de baixa altitude, existindo árvores que variam de 30 a 35 metros, com árvores emergentes entre 45 e 50 metros, apresentando características de dossel fechado e sub-bosque apresentando pouca luminosidade (Oliveira *et al.*, 2008). Atualmente a reserva faz contato diretamente com a área urbana, sofrendo uma grande pressão antrópica (Oliveira *et al.*, 2008).

As penas analisadas da RFAD foram coletadas pelo Programa de Conservação do Gavião-real (PCGR-INPA) ao redor de dois ninhos de gavião-real, sendo que o ninho mais ao sul, descoberto em 2001 não foi reutilizado pelo casal desde 2003 (Ninho Ducke Ipiranga), já o ninho mais ao norte foi descoberto em 2011 (Ninho Ducke Sede) e permanece ativo em 2014 (Figura 01).

Apesar das divergências de datas de mapeamento dos ninhos, acredita-se que ambos os ninhos estavam ativos na RFAD durante o mesmo período de tempo, de 2001 a 2003, pois existem registros visuais de um juvenil em março de 2002 voando ao norte da RFAD (Luciano Nicolás Naka, *pers. comm*), próximo do local onde foi encontrado o ninho em 2011 (Ninho Ducke Sede). Nesta mesma época que o ninho Ducke Ipiranga estava ativo, com um filhote e era monitorado pelo PCGR. A distância entre os dois ninhos da RFAD é de aproximadamente 7 km, valor próximo aos 8 km registrado para distâncias entre ninhos em outra região na Amazônia Central (Aguiar-Silva *et al.*, 2011). Na Venezuela e Panamá, o gavião-real possui uma área de vida mínima de 10 Km² e 45 Km² respectivamente (Alvarez-Cordero, 1996), dessa forma é provável que os avistamentos na RFAD sejam de indivíduos distintos ao norte e ao sul da reserva, hipótese que foi testada no presente trabalho.

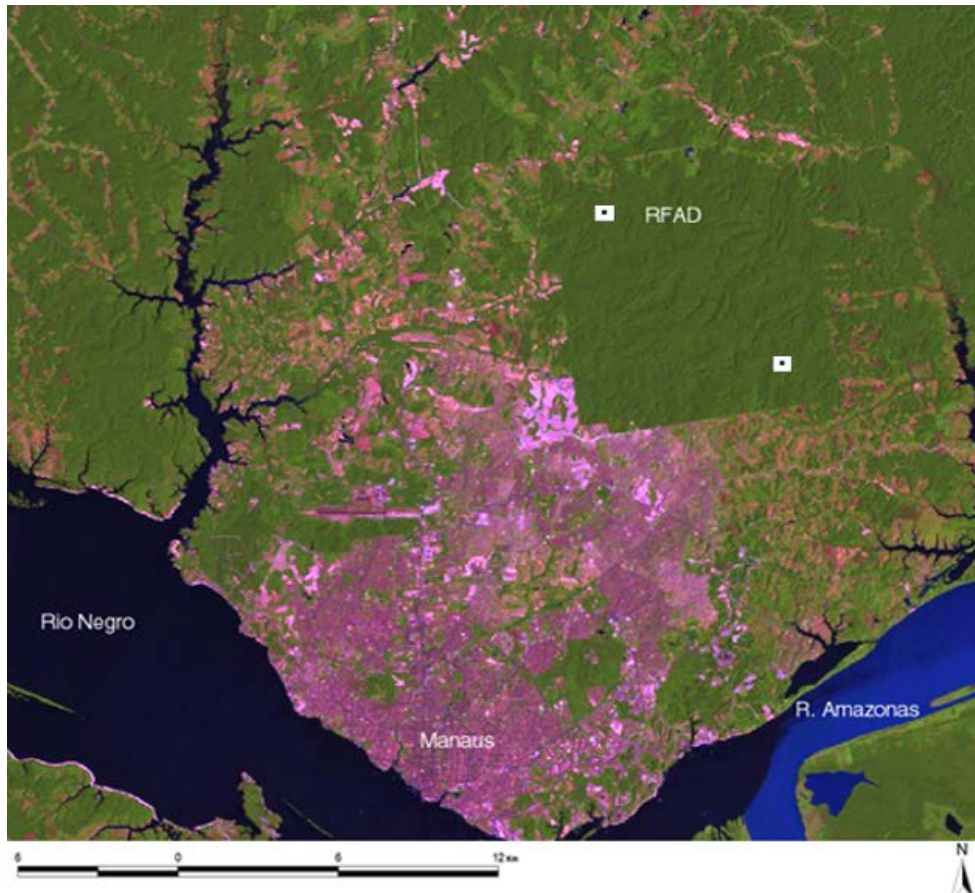


Figura 01: Localização da RFAD em Manaus, destacando as localidades dos ninhos que foram utilizadas no presente trabalho, sendo o mais ao norte o ninho Ducke Sede e mais ao sul da reserva o ninho Ducke Ipiranga. Modificado (INPA, 2012).

Extração de DNA

Penas do gavião-real de dois ninhos da RFAD foram coletadas e cedidas pela equipe do PCGR do INPA. Um total de 14 amostras de penas foram utilizadas, sendo sete penas de cada ninho. Observadas as características e coloração das penas, o ninho da Ducke Ipiranga apresentou quatro penas de um provável jovem (H3N, H3P, H3R e H3V) e três de adulto, enquanto todas as amostras do ninho Ducke Sede foram de adulto.

As amostras foram submetidas à extração do DNA seguindo as recomendações de Horvath *et al.* (2005), utilizando como fonte de DNA o coágulo de sangue da região do umbílico superior, vestígio de um vaso que irriga de sangue a pena durante seu desenvolvimento, que tem melhor e uma maior quantidade de DNA quando comparado a ponta basal do calamus que fica em contato direto com o corpo do animal (Figura 01). As extrações de DNA foram realizadas com Kit extração

de DNA da Qiagen®, seguindo o protocolo do fabricante e adicionando dithiothreitol (DTT) para degradar a queratina presente nas amostras de pena.

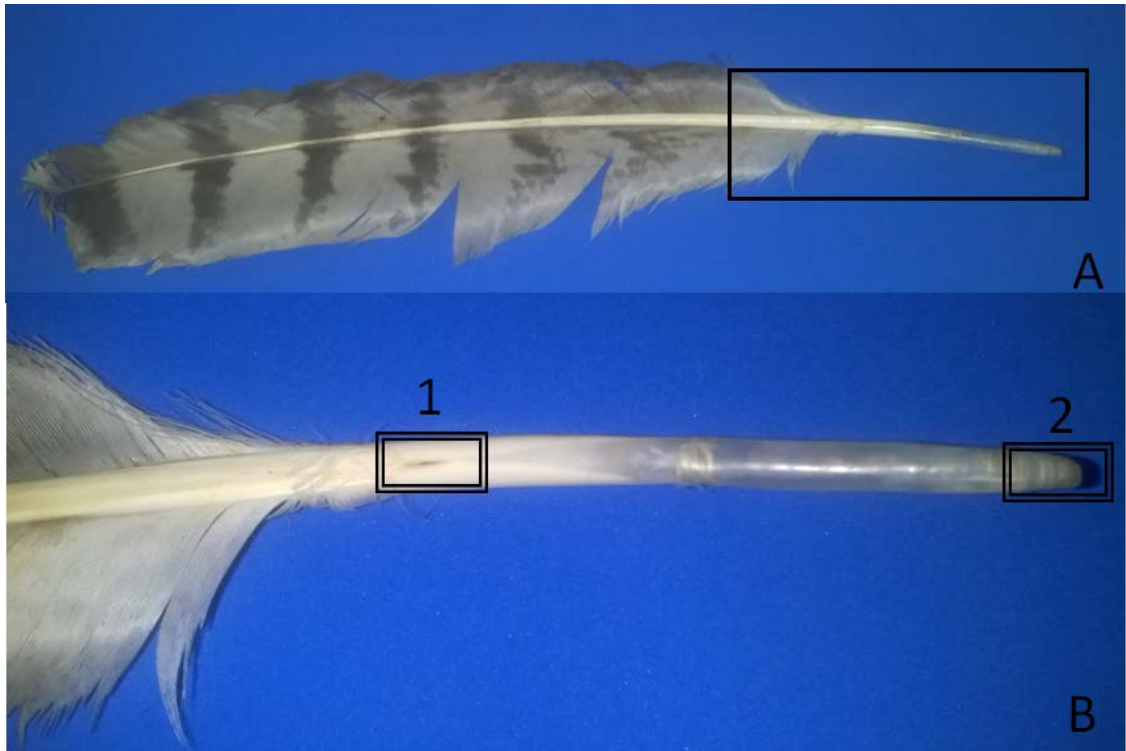


Figura 01: Pena de gavião-real, (A) em destaque área que contém coágulos de sangue. (B) Amplificação da área destacada em A, umbílico superior (B1), região preferencial para extração de DNA e umbílico inferior (B2).

Identificação dos indivíduos

Três *primers*, Hh2161, Hh8280 e Hh3533, foram desenvolvidos e utilizados para identificação dos indivíduos (ver capítulo 02). Após a extração do DNA os marcadores foram amplificados por meio da técnica de PCR (polymerase chain reaction - reação em cadeia pela polimerase) utilizando o termociclador *Veriti™ Thermal Cycler* (Applied Biosystems, Inc.). Os *primers* citados foram marcados com fluorescência, com a adição de uma cauda M13 (sequência de oligonucleotídeo de 18pb na extremidade 5'), visando realizar a genotipagem com menor custo financeiro (Schuelke, 2000).

Para a PCR, foi realizado um mix para um volume final de 10 μL . Cada reação contém 3,5 μL de água ultra-pura; 1,2 μL de MgCl_2 (25 mM); 1,0 μL de solução tampão 10X (Tris-KCl 200mM pH 8.5); 1,0 μL de dNTP (10 mM); 0,5 μL *primer* M13-FAM-6 (2 μM) (este contendo fluorescência; veja Schuelke, 2000); 0,5 μL de *primer*

forward M13 (2 μ M); 1,0 μ L de *primer* reverse (2 μ M); 0,2 μ l de Taq DNA polimerase (5U/ μ L) e 1,0 μ L de DNA da amostra em questão.

As condições da PCR no termociclador foram: inicialmente coloca-se em 94°C por 1 minuto para a desnaturação da dupla fita de DNA. Posteriormente realizou-se 25 ciclos de 94°C, 55°C e 68°C com duração de 30, 30 e 40 segundos respectivamente, para desnaturar a fita de DNA, anelar os *primers* e extensão final dos fragmentos a serem formados. Em seguida, executa-se 30 ciclos com as temperaturas de 94°C, 52°C e 72°C, para a desnaturação, anelamento e extensão, com duração de 30, 30 e 60 segundos respectivamente, com o objetivo de anelar o *primer* M13-FAN aos fragmentos formados. E finalmente uma temperatura de 72°C para extensão final, por 30 minutos.

Posteriormente, foi realizada a confirmação da amplificação do fragmento de interesse através da corrida de eletroforese em gel de agarose 1%, sendo adicionados 2 μ L do Gel Red (*Thermo Scientific*) e 2 μ L do produto da PCR. Em seguida os produtos foram encaminhados para genotipagem (veja adiante).

Determinação do sexo

Para a sexagem das penas, foram utilizados *primers* desenvolvidos por Ito *et al.* (2003) e Banhos *et al.* (2008) (Tabela 01). Os *primers* exploram diferenças presentes nos cromossomos sexuais do gavião-real, promovendo a amplificação de parte do íntron do gene codificador da proteína *chromo-helicase-DNA-binding* (CHD1). No caso, foram utilizados três *primers*, um *reverse* que se anela em uma região específica do cromossomo sexual W (CHD1Wr), exclusivo das fêmeas, um *reverse* que se anela em uma região específica do cromossomo sexual Z (CHD1Zr), presente em ambos os sexos, e outro *forward* que se anela em regiões homólogas dos cromossomo W e Z (NP; CHD1Z/W) (Banhos *et al.*, 2008). A combinação dos *primers* NP e CHD1Wr produz fragmentos de 250 pb e a combinação dos *primers* NP e CHD1Zr produz fragmentos de 300 pb. A visualização de dois fragmentos de 250 e 300 pb nos produtos de PCR indica a presença dos dois cromossomos sexuais na amostra (ZW), dessa forma é considerado que o indivíduo da amostra trata-se de uma fêmea. A visualização de apenas um fragmento de aproximadamente 300 pb indica a presença do cromossomo sexual (ZZ), dessa

forma é considerado que o indivíduo da amostra trata-se de um macho (Banhos *et al.*, 2008).

Banhos *et al.* (2008) e Banhos (2009) sugeriram realizar a visualização dos produtos de amplificação em gel de agarose 3%. Essa metodologia apresenta algumas dificuldades na identificação do sexo, pois os produtos provenientes de DNA degradado e de baixa qualidade (situação comum das amostras não invasivas provenientes de penas de gavião-real) tendem a amplificar com menos dificuldade os fragmentos menores comparados com os maiores, podendo gerar uma “perda” do fragmento maior. Essa situação é conhecida como alelo *dropout* (Buchan *et al.*, 2005), não gerando a quantidade de fragmentos necessários que possam ser visualizadas em gel de agarose. Dessa forma, identificar os sexos pode ser difícil, necessitando que a PCR seja repetida várias vezes em muitos casos e mesmo assim gerar muitas dúvidas.

Para evitar esse tipo de problema na sexagem foi adicionada uma cauda M13 no *primer* NP de Ito *et al.* (2003) com o objetivo de utilizar o *primer* M13-FAM-6 juntamente com os outros componentes de PCR, visando realizar uma genotipagem das amostras não-invasivas. O processo de genotipagem possibilita visualizar fragmentos que possuem pequenas concentrações no produto da PCR, gerando maior confiabilidade no resultado e evitando a necessidade de repetições da PCR.

Tabela 01 - Conjunto de *primers* utilizados para a identificação do sexo do gavião-real.

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

Os fragmentos de DNA foram amplificados através da técnica de PCR utilizando o termociclador Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems, Inc.). Para um volume final de 10 µL de PCR, foram adicionados 4,0 µL de água ultra-pura; 1,0 µL (25mM) MgCl₂; 0,8 µL (10mM) dNTPs; 1,0 µL de Buffer 10 X (Tris-KCL 200mM pH 8.5); 0,5 µL de *primer* NP M13 (2 µM); 0,5 µL de *primer* CHD1Zr (2 µM); 0,5 µL de

primer CHD1Wr (2 μ M); 0,5 μ L *primer* M13-FAM-6 (2 μ M) (este contendo fluorescência (veja Schuelke, 2000); e 0,2 μ L de Taq DNA polimerase (5 U/ μ L). As condições da PCR no termociclador foram: 68 °C por 1 minuto para uma desnaturação inicial, seguido de 25 ciclos de 93 °C por 10 segundos para desnaturação, 52 °C por 35 segundos para pareamento dos *primers*, 68 °C por 30 segundos para extensão da fita de DNA. Posteriormente outro ciclo contendo 94 °C, 52 °C e 72 °C por 30 vezes para a desnaturação, anelamento e extensão respectivamente. Após essa etapa, a confirmação da amplificação dos fragmentos foi realizada através da corrida de eletroforese em gel de agarose 1%, sendo adicionados 2 μ L do Gel Red (*Thermo Scientific*) e 2 μ L do produto da PCR e em seguida encaminhadas para genotipagem.

Genotipagens

Os produtos resultantes das PCRs foram diluídos (isso dependendo da intensidade da banda no gel) para reduzir sua concentração. Ao produto diluído foi adicionado 8 μ L de formamida Hi-Di (*Applied Biosystems, Inc.*) e 1 μ L de 6-carboxi-X-rodamina (ROX) (*DeWoody et al., 2004*), sendo este, um marcador de tamanho padrão usado para comparação com os fragmentos a ser genotipado, sendo encaminhado ao sequenciador ABI 3130 xl de acordo com o protocolo do fabricante.

Os genótipos de cada indivíduo foram visualizados com o auxílio do programa *GeneMapper*TM versão 4.0 (*Applied Biosystems Inc.*) para inferir os tamanhos dos alelos de cada loco. Nos casos em que a visualização dos genótipos não foi clara na primeira vez, a genotipagem foi repetida.

Resultados e Discussão

Em relação aos marcadores microssatélites, foi possível genotipar todas as amostras com o *primer* Hh2161, mas este loco não apresentou alelos diferentes entre as amostras dos dois ninhos, todas as amostras genotipadas apresentaram o alelo com tamanho de 216 pb em homozigose (Tabela 02). Com o *primer* Hh3533 não foi possível genotipar duas amostras do Ninho Ducke Ipiranga e uma amostra do Ninho Ducke Sede, mas este loco também não apresentou alelos diferentes entre as amostras genotipadas dos dois ninhos, todas as amostras apresentaram o alelo com tamanho de 247 pb em homozigose (Tabela 02). E por fim, com *primer* Hh8280 não foi possível genotipar duas amostras do Ninho Ducke Ipiranga, mas este loco apresentou três alelos diferentes entre as amostras genotipadas dos dois ninhos, com os alelos com tamanho de 184 pb e 187 pb em heterozigose para as penas do Ninho Ducke Ipiranga e o alelo com tamanho de 178 pb em homozigose para todas as amostras do Ninho Ducke Sede (Tabela 02).

Dessa forma os dados obtidos através do *primer* Hh8280 indicam a presença de pelo menos dois indivíduos diferentes nas amostras, um no ninho Ninho Ducke Ipiranga (genótipo 184/187) e outro no do Ninho Ducke Sede (genótipo 178/178). Acredita-se que quatro amostras do Ninho Ducke Ipiranga (H3N, H3P, H3R e H3V) pertencem a um indivíduo jovem, devido as características da penas, seria um descendente do casal do ninho Ducke Ipiranga, porém não foi possível confirmar, pois os *primers* não demonstraram diferenças entre as penas encontradas nesse ninho.

As amostras genotipadas com os *primers* de sexagem com adição da cauda M13 demonstraram grande eficiência e resultados claros, todas as amostras apresentaram dois fragmentos distintos de 250 e 300pb, dessa forma, todas as penas encontradas nos arredores dos ninhos são provenientes de fêmeas. Os dados da sexagem e genótipos no loco Hh8280 indicam a presença duas fêmeas adultas distintas entre os ninhos, uma fêmea representada pela amostra H3AA do Ninho Ducke Ipiranga e outra representada pelas amostras H415C, H415D, H415T, H415B, H415R e H415U do ninho Ducke Sede.

A quantidade de amostras de fêmeas adultas pode ser devido ao fato das fêmeas ficarem mais tempo que os machos no ninho prestando cuidado parental, uma fêmea adulta chega a permanece 97% do tempo no ninho durante a incubação

(Rettig, 1978). Assim, penas de fêmeas adultas podem ser encontradas com mais frequências que a de machos adultos próximo dos ninhos.

Dessa forma, de acordo com os dados de observações de campo, sexagem e genótipos das amostras, conclui-se que a RFAD apresentou duas fêmeas adultas no mesmo período temporal, uma em cada ninho da reserva.

Tabela 02: Genotipagem utilizando marcadores microssatélites nos ninhos Ducke Ipiranga e Ducke Sede. As amostras que não foram possíveis identificar os alelos são demonstrados como “?”.

Ninho	Amostra	Hh2161	Hh8280	Hh3533
Ducke Ipiranga	H3N	216/216	184/187	247/247
	H3P	216/216	184/187	247/247
	H3R	216/216	184/187	247/247
	H3V	216/216	184/187	247/247
	H3J	216/216	?	?
	H3K	216/216	?	?
	H3AA	216/216	184/187	247/247
Ducke Sede	H415C	216/216	178/178	247/247
	H415D	216/216	178/178	247/247
	H415T	216/216	178/178	247/247
	H415B	216/216	178/178	247/247
	H415R	216/216	178/178	247/247
	H415U	216/216	178/178	?
	H415Q	216/216	178/178	247/247

CONCLUSÃO GERAL DA DISSERTAÇÃO

Dos 8 marcadores microssatélites analisados:

- Grande parte apresentou redução nas repetições em tandem do microssatélite em *Harpia harpyja*.
- Apenas o *primer* IEAAAG15 apresentou acréscimo e manteve a classificação perfeita do microssatélite.
- HF-C7G4 e HF-C1E8 apresentaram características de “morte” do microssatélite.
- Os *primers* HAL09, NVHfr206, BBU51, IEAAAG15 e HF-C1D2 apresentam boas condições de uso em *Harpia harpyja*.

Os 11 locos isolados e caracterizados para *Harpia harpyja*:

- 10 apresentam polimorfismo em *Harpia harpyja*.
- 10 *primers* foram aplicados com sucesso em *Morphnus guianensis*, sendo sete polimórficos.
- Avaliação preliminar indica baixos níveis de diversidade genética em ambas as espécies.

Monitoramento na RFAD:

- Identificação de dois indivíduos distintos.
- Constatação de dois casais distintos em diferentes ninhos no período de 2002 na reserva.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguiar-Silva, 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 Pesquisas da Amazônia/ Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 87pp.
- Aguiar-Silva, F.H.; Luz, B.B; Sanaiotti, T.M.; Jaudoin, O.; Cabral, L.D. 2011. Monitoramento da reprodução de gavião-real (*Harpia harpyja*) na floresta nacional do tapajós - PA. Anais/I Seminário de Pesquisas Científicas da Floresta Nacional do Tapajós. Santarém-PA: Floresta Nacional do Tapajós/ICMBio. 146pp.
- Aguiar-Silva, F.H; Sanaiotti, T.M.; Luz, B.B. 2014. Food Habits of the Harpy Eagle, a Top Predator from the Amazonian Rainforest Canopy. *Journal of Raptor Research*, 48(1):24-35
- Alvarez-Cordero, E.C. 1996. *Biology and conservation of the Harpy Eagle in Venezuela e Panamá*. Tese de Doutorado, University of Florida, USA. 228pp.
- Banhos, A. 2009. *Genética, Distribuição e Conservação do Gavião-real (Harpia harpyja) no Brasil*. Tese de Doutorado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas. 153pp
- 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.
- Bhargava, A.; Fuentes F.F. 2010. Mutational Dynamics of Microsatellites. *Mol Biotechnol*, 44:250–266.
- 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.
- BirdLife International ,2012. *Morphnus guianensis*. IUCN Red List Threat. Species. Version 2013.2. (www.iucnredlist.org). Acesso: 08/05/2014.

- Birdlife International, 2013. *Harpia harpyja*. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.2. (<http://www.iucnredlist.org/details/22695998/0>). Acesso: 08/05/2014
- Buchan, J.C.; Archie, E.A.; Van Horn, R.C.; Moss, C.J.; Alberts, S.C. 2005. Locus effects and sources of error in noninvasive genotyping. *Molecular Ecology Notes*, 5:680–683. doi: 10.1111/j.1471-8286.2005.01002.x
- Busch, J.D.; Katzner, T.E.; Bragin, E.; Keim, P. 2005. Tetranucleotide microsatellites for *aquila* and *haliaeetus* eagles. *Molecular Ecology*, 5: 39–41.
- Buschiazzo, E.; Gemmell, N.J. 2006. The rise, fall and renaissance of microsatellites in eukaryotic genomes. *Bioessays*, 28: 1040–1050.
- Collar, N.J. 1989. *Harpy Eagle*. World Birdwatch, v. 11, p. 5.
- Da Luz, B. B. 2005. *Arquitetura de árvores 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. 80pp.
- DeWoody, A.; Schupp, J.; Kenefic, L.; Busch, J.; Murfitt, L.; Keim, P. 2004. Universal method for producing ROX-labeled size standards suitable for automated genotyping. *BioTechniques*, 37:348-352.
- Faleiro, F.G. 2007. *Marcadores Genético-Moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos*. Embrapa, Planaltina, DF, Brasil. 102pp
- Ferguson-Lees, J.; Christie, D.A. 2001. *Raptors of the World*. Christopher Helm, London. 872 p.
- Fowler, M.J.; Cope, J.B. 1964. Notes on the Harpy Eagle in British Guiana. *The Auk*, 81: 257-273.
- Francisco, F.O.; Brito, R.M.; Arias, M.C. 2006. Allele number and heterozygosity for microsatellite loci in different stingless bee species (Hymenoptera: Apidae, Meliponini). *Neotropical Entomology*, 35 (5): 638-643.

- Garcia, F.I.; Marini, M.A. 2006. Estudo comparativo entre as listas global, nacional e estaduais de aves ameaçadas no Brasil. *Natureza & Conservação*, 4(2): 24-49.
- Garner, A.; Rachlow J.L; Hicks, J.F. 2005. Patterns of genetic diversity and its loss in mammalian populations. *Conservation Biology*, 4:1215–1221.
- 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.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-8.
- 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.
- INPA, 2012. Sítios de pesquisa, (<http://peld.inpa.gov.br/sitios/ducke>). Acesso: 25/11/2012.
- 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(2):208–211.
- Lerner, H.R.L. 2007. *Molecular Phylogenetics of Diurnal Birds of Prey in the Avian Accipitridae Family*. Tese de Doutorado. University of Michigan, 125pp.
- Lerner, H.R.; Johnson, J.A.; Lindsay, A.R.; Kiff, L.F.; Mindell, D.P. 2009. It's not too late for the Harpy Eagle (*Harpia harpyja*): high levels of genetic diversity and differentiation can fuel conservation programs. *PLoS One*, 4:e7336. doi: 10.1371/journal.pone.0007336.

- 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. Fundação Biodiversitas, Belo Horizonte, Brasil. 160pp.*
- 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(8): 2243- 2255.
- Mira, S.; Wolff, K.; Cancela, M.L. 2005. Isolation and characterization of microsatellite markers in Bonelli's eagle (*Hieraaetus fasciatus*). *Molecular Ecology Notes* 5(3):493-495.
- Muñiz-López, R. 2008. Revisión de la situación del Águila Harpía *Harpia harpyja* en Ecuador. *Cotinga*, 29: 42–47.
- NatureServe, 2014. NatureServe Infonatura, (<http://infonatura.natureserve.org/>). Acesso: 10/06/2014.
- Nesje, M.; Røed, K.H. 2000. Microsatellite DNA markers from the gyrfalcon (*Falco rusticolus*) and their use in other raptor species. *Molecular Ecology*, 9(9): 1438-1440.
- Nesje, M.; Røed, K.H.; Lifjeld, J.T.; Lindberg, P.; Steen, O.F. 2000. Genetic relationships in the peregrine falcon (*Falco peregrinus*) analysed by microsatellite DNA markers. *Molecular Ecology*, 9: 53–60.
- Oliveira, E.J.; Pádua, J.G.; Zucchi, M.I.; Vencovsky, R.; Vieira, M.I. C. 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genet. Mol. Biol.* 29(2):294-307.
- Oliveira, M.L.; Baccaro, F.B.; Braga-Neto, R.; Magnusson, W.E. 2008. *Reserva Ducke: A biodiversidade amazônica através de uma grade*. Áttema Design Editorial, Manaus.

- 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.
- Peterson, B.K.; Weber, J.N.; Kay, E.H.; Fisher, H.S.; Hoekstra, H.E. 2012. Double digest RADseq: an inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species. *PLoS One* 7:e37135. doi:10.1371/journal.pone.0037135.
- 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.
- Rettig, N. 1978. Breeding behavior of the Harpy Eagle (*Harpia harpyja*). *The Auk*, 95(4): 629-643.
- 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.
- Rudnick, J.A.; Katzner, T.E.; Bragin, E.A.; Dewoody, J.A. 2007. Species identification of birds through genetic analysis of naturally shed feathers. *Molecular Ecology Notes*, 7: 757-762.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T.; 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2^a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schlötterer, C. 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, 109(6): 365-371.
- Schuelke, M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, 18: 233-234.
- Sick, H. 1997. *Ornitologia Brasileira*. Editora Nova Fronteira, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. 912p.
- Soares, E.S.; Amaral, F.S.R.; Carvalho-Filho, E.P.M.; Granzinolli, 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, 5: 136 p.
- Stotz, D.F.; Fitzpatrick, J.W.; Parker III, T.A.; Moskovits, D.K. 1996. *Neotropical Birds: Ecology and Conservation*. University of Chicago Press, Chicago, USA. 502pp.
- Taylor, J.S.; Durkin, J.M.H.; Breden, F. 1999. The Death of a Microsatellite: A Phylogenetic Perspective on Microsatellite Interruptions. *Mol. Biol. Evol.* 16(4):567–572.
- Thiel, T.; Michalek, W.; Varshney, R.K.; Graner, A. 2003. Exploiting EST databases for the development and characterization of genederived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor Appl Genet* 106:411–422.
- Vargas, J.J.G.; 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.
- Wilder, J.; Hollocher, H. 2001. Mobile Elements and the Genesis of Microsatellites in Diptera. *Mol. Biol. Evol.* 18(3):384–392.
- Zhu, Y.; Strassmann, J.E.; Queller, D.C. 2000 Insertions, substitutions, and the origin of microsatellites. *Genetics Research*, 76:227-236