

## **Análise da Variação Genética de Proteínas em Populações Mediterrânicas de Águia de Bonelli *Hieraetus fasciatus* (Vieillot, 1822)**

Pedro Cardia, Bárbara Fráguas, Miguel Pais, Thomas Guillemaud, Luís Palma, Maria Leonor Cancela, Nuno Ferrand

Centro de Estudos em Ciência Animal -ICETA, Campus Agrário de Vairão, 4485-661 Vairão.

Departamento de Zoologia e Antropologia, Faculdade de Ciências do Porto, 4050 Porto.

**Abstract.** The analysis of the protein genetic diversity in Mediterranean populations of Bonelli's Eagle was performed by means of conventional starch gel electrophoresis and isoelectric focusing in free pH gradients. The samples analysed in this study came from 7 Iberian populations and from the population in the island of Cyprus. Bonelli's Eagle was found to have a high genetic diversity (7 polymorphic loci out of 23) especially when compared to other raptor species, and at a level similar of that presented by non-endangered avian species, even though Bonelli's Eagle is suffering a marked decline in the Mediterranean area. No significant genetic differences were detected among Iberian populations and within these, the greatest diversity is found in those populations with the highest number of breeding pairs. Cyprus population is also clearly differentiated from the Iberian populations, but whether this is due to the existence of differences between eastern and western Mediterranean populations or to the insular character of the Cyprus population cannot be established due to the lack of samples from other eastern Mediterranean populations. The inference of parental phenotypes has allowed the detection of a replacement of a breeding adult in the Portuguese Southwest population. Additionally, it has been established that it is highly likely that the replacing individual came from a population other than the Southwest one.

**Introdução.** Na região do Paleártico Ocidental, a águia de Bonelli sofreu um forte declínio populacional acompanhado por uma contracção na sua área de distribuição. Na Europa, é considerada uma espécie ameaçada e de conservação prioritária, tendo o estatuto de Rara em Portugal (Cabral *et al.*, 1990; Rocamora, 1994; Snow & Perrins, 1998). Mais de 80% da população europeia concentra-se na Península Ibérica (Portugal: 77 casais; Espanha: 679-775) que assim se constitui como o principal refúgio da espécie neste continente (Rocamora, 1994; Arroyo & Garza, 1995; Snow & Perrins, 1998; Palma *et al.*, 1999). O desenvolvimento e implementação de estratégias de conservação de espécies raras e ameaçadas deve integrar, desde o início, o conhecimento da sua diversidade genética. Este é essencial para compreender

processos tão diversos como sejam: a diminuição da aptidão biológica em populações com grande consanguinidade (*inbreeding depression*); a hibridação e introgressão; a fixação de alelos deletérios; a perda de alelos por deriva genética; os padrões de fluxo génico em populações fragmentadas; e a análise da viabilidade de populações (Haig & Avise, 1996). Adicionalmente, estes dados fornecem valiosas informações sobre o comportamento e demografia, sendo essenciais para a gestão de populações de espécies ameaçadas em cativeiro (Willis & Wiese, 1993). Os estudos existentes sobre a variabilidade genética de Accipitriformes são em número reduzido e abarcam um pequeno número de espécies: *Aquila adalberti* (Negro & Hiraldo, 1993; Padilla *et al.*, 2000), *A. chrysaetus* (Suchentrunk *et al.*, 1999), *Accipiter gentilis* (Gavin *et al.*, 1998) e *Haliaeetus leucocephalus* (Knight *et al.*, 1995). Para a águia de Bonelli apenas existem dados preliminares sobre a diferenciação genética das suas populações no Paleártico ocidental (Cardia *et al.*, 2000). Com o presente trabalho pretende-se determinar qual a diversidade genética de algumas populações mediterrânicas da espécie e analisar a sua distribuição intra e interpopulacional.

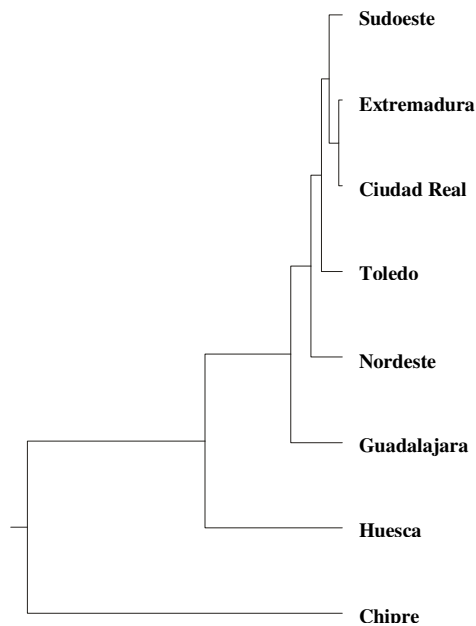
**Metodologia.** A recolha de amostras decorreu durante as épocas de nidificação de 1995 a 1999. As amostras de sangue ( $\pm 2\text{mL}$ ) foram obtidas por punção da veia braquial de juvenis com 30 a 40 dias de idade. A análise da diversidade genética das populações de águia de Bonelli foi feita através do estudo de 23 loci proteicos polimórficos (20 proteínas eritrocitárias e 3 plasmáticas) com técnicas de electroforese convencional em géis de amido e focagem isoeléctrica em gradientes de pH livres. O padrão de bandas resultante da separação das proteínas foi visualizado por coloração geral de proteínas ou coloração bioquímica. As frequências génicas foram calculadas por contagem directa de genes a partir de uma sub-amostra de indivíduos não aparentados. A heterozigotia de cada locus foi calculada de acordo com Nei & Roychoudhury (1974) e a heterozigotia média de cada população ( $H$ ) foi calculada pelo quociente entre o somatório das heterozigotias de cada locus e o número de loci. Para calcular as distâncias genéticas de Nei entre as populações e construir as árvores filogenéticas foi usado o programa PHYLIP 3.5c (Nei, 1978; Felsenstein, 1993).

**Resultados & Discussão.** O número de amostras analisadas, a sua proveniência e os dados referentes à variação genética da águia de Bonelli e de outros Accipitriformes estão resumidos na tabela 1.

**Tabela 37.** Variabilidade genética de proteínas em populações de Accipitriformes. **Legenda.** P – proporção de loci polimórficos; N – número médio de alelos nos loci polimórficos; H – heterozigotia média da população; a) Gavin *et al.*, 1998; b) Knight *et al.*, 1995; c) Suchentrunk *et al.*, 1999; d) Negro & Hiraldo, 1993.

Espécie	Nº casais Reprodutores	Nº de amostras analizadas	Nº de loci Examinados	Nº de loci polimórficos	P	N	H	Fonte
<i>Accipiter gentilis</i>	107	225	20	1	0,050	5	0,034	a)
<i>Haliaeetus leucocephalus</i>	14	72	32	1	0,031	2	0,003	b)
<i>Aquila chrysaetus</i>	300	15	37	4	0,108	2	0,037	c)
<i>Aquila adalberti</i>	126	42	22	0	0	0	0	d)
<i>Hieraetus fasciatus</i>	>160	197	23	7	0,304	2,6	0,098	Este trabalho
Extremadura	100	64	23	7	0,304	2,3	0,089	“
Sudoeste	24	58	23	6	0,261	2,2	0,095	“
Nordeste	30	35	23	6	0,261	2,2	0,096	“
Ciudad Real	-	11	23	6	0,261	2	0,098	“
Guadalajara	-	5	23	4	0,174	2	0,080	“
Toledo	-	4	23	4	0,174	2	0,104	“
Huesca	-	2	23	2	0,087	2	0,044	“
Chipre	5-10	6	23	4	0,174	2,3	0,044	“

Foram descobertos sete loci polimórficos (PEPD2, MPI, NP, PGM1, PGM3, PX e PY) enquanto os restantes 16 não evidenciaram qualquer variação de natureza genética. Entre os loci polimórficos, quatro apresentam dois alelos (PEPD2, MPI, PGM1 e PGM2), dois apresentam 3 alelos (NP e PY) e um tem 4 alelos (PX). Não



**Figura 1.** Árvore filogenética das populações de águia de Bonelli, obtida com o método de agrupamento UPGMA (SNEATH & SOKAL, 1973) a partir da matriz de distâncias genéticas de NEI.

parecem existir diferenças significativas entre as populações Ibéricas quanto à sua constituição genética. A maior diversidade encontra-se nas populações de maior efectivo populacional, muito particularmente na Extremadura (ESP). Nesta população estão presentes todos os alelos observados em aves da Península Ibérica e tem ainda um polimorfismo privativo na enzima PGM1. A população da ilha de Chipre está claramente diferenciada das populações Ibéricas, exibindo um alelo privativo nas proteínas PX e PY e tendo fixado o

alelo 2 da enzima MPI. A águia de Bonelli tem uma apreciável variabilidade genética, claramente superior à das restantes rapinas e semelhante à verificada em espécies de aves não ameaçadas, não obstante estar em acentuada regressão em quase toda a região Mediterrânica.. O valor de H de cada população é bastante elevado no Sudoeste, Extremadura, Nordeste e Ciudad Real sendo mesmo superior à média das heterozigotias de espécies de aves não ameaçadas ( $H=0,065$ ;  $n=79$  espécies; Evans, 1987). A média das heterozigotias de populações de espécies ameaçadas é de 0,019 (Haig & Avise, 1996), valor claramente menor do que o obtido para a águia de Bonelli. No entanto, estes resultados deverão ser interpretados com cautela, pois algumas espécies de aves ameaçadas apresentam heterozigotias igualmente elevadas - *Mycteria ibis* ( $H=0,093$ ) e *Picoides borealis* ( $H=0,078$ ; Haig & Avise, 1996). Comparativamente, a águia de Bonelli apresenta um grande número de loci polimórficos, mesmo relativamente a espécies para as quais o número de amostras e loci analisados é de igual ou maior grandeza, e tem um valor de P três vezes superior ao das restantes espécies. Na figura 1 apresenta-se a árvore filogenética obtida com o métodos de agrupamento UPGMA (Sneath & Sokal, 1973). Na figura, detecta-se uma separação basal entre as populações da Península Ibérica e de Chipre. Esta separação poderá resultar da existência de diferenças entre as populações orientais (presumíveis “fontes” dos indivíduos que colonizaram Chipre) e as populações ocidentais na bacia do Mediterrâneo. Resultados preliminares obtidos a partir de DNA mitocondrial e de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) indicam que existe alguma diferenciação entre as populações do Mediterrâneo oriental (Israel, Grécia e Arábia Saudita) e do Mediterrâneo ocidental (Portugal, Espanha, Marrocos, Tunísia e Córsega) mas, simultaneamente existirá um certo grau de fluxo génico entre estas populações (Cardia *et al.*, 2000). No processo de colonização da ilha deverá ter ocorrido uma acentuada diminuição do efectivo populacional da espécie, que se reflecte na elevada distância genética entre esta população e as populações Ibéricas. De entre todos os resultados obtidos, assume particular relevância a detecção da substituição de um progenitor num casal da população do Sudoeste de Portugal, posteriormente confirmada por observação directa e comparação com os registos de campo. Após o ano de 1997 (inclusivé) existe um padrão consistente de mudança nos fenótipos das crias deste casal nos loci PEPD2, MPI, PGM3, PX e PY. Adicionalmente, os resultados do locus PGM3 apontam para que um dos progenitores iniciais tenha sido substituído por um indivíduo proveniente de uma outra população

que não a do Sudoeste, pois o alelo 2 do locus PGM3 só foi detectado na população do Sudoeste na descendência do referido casal nascida após a substituição. Com base nos resultados obtidos para o locus PGM3, poderá especular-se que a população de origem deste imigrante se encontra em Espanha, pois situam-se neste país as populações que apresentam as maiores frequências do alelo 2

#### **Bibliografia.**

- Arroyo, B. & Garza, V. 1995. Factores de Regresión del Águila Perdicera *Hieraaetus fasciatus* en España. *Congreso Internacional Rapaces del Holarctico*. WWGBP. Badajoz.
- Cabral, M.J.M., Magalhães, C.P.M., Oliveira, E. & Romão, C. 1990. *Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal*. Vol. 1 - Mamíferos, Aves, Répteis e Anfíbios. Serviço Nacional de Parques Reservas e Conservação da Natureza, Lisboa.
- Cardia, P., Fráguas, B., Pais, M., Guillemaud, T., Palma, L., Cancela, M.L., Ferrand, N. & Wink, M. 2000. Preliminary Genetic Analysis of some Western Palearctic Populations of Bonelli's Eagle (*Hieraaetus fasciatus*). *Raptors at Risk - Proceedings of the 5<sup>th</sup> World Conference on Birds of Prey and Owls*. WWGBP. Midrand.
- Felsenstein, J. 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) Version 3.5c. Distribuído pelo Autor. Seattle. University of Washington.
- Gavin, T.A., Reynolds, R.T., Joy, S.M., Leslie, D. & May, B. 1998. Genetic Evidence for Low Frequency of Extra-Pair Fertilizations in Northern Goshawks. *The Condor* 100: 556-560
- Haig, S.M. & Avise, J.C. 1996. Avian Conservation Genetics. In: Avise, J.C. & Hamrick, J.L. (Eds.). *Conservation Genetics: case histories from nature*. Chapman & Hall. New York.
- KNIGHT, R.L., CRAIG, G.R., SMITH, M.H., GRIER, J.W. & Mclean, R.G. 1995. Genetic Variation and Nesting Bald Eagles. *The Condor* 97: 282-283.
- Negro, J.J. & Hiraldo, F. 1993. Lack of Allozyme Variation in the Spanish Imperial Eagle *Aquila adalberti*. *Ibis* 136: 87-90.
- Nei, M. 1978. Estimation of Average Heterozygosity and Genetic Distance from a Small Number of Individuals. *Genetics* 23: 341-369.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press. New York.
- Nei, M. & Roychoudhury, A.K. 1974. Sampling Variance of Heterozygosity and Genetic Distance. *Genetics* 73: 379-390.
- Padilla, J.A., Martínez-Trancón, M., Rabasco, A., Parejo, J.C., Sansinforiano, M.E. & Guijo, M.I. 2000. Genetic Variability in the Iberian Imperial Eagle (*Aquila adalberti*) Demonstrated by RAPD Analysis. *The Journal of Heredity* 91(6): 495-499.
- Palma, L., Ferrand, N., Cancela, L., Beja, P., Guillemaud, T., Fráguas, B., Pais, M., Cardia, P., Inácio, R., Höfle, U., Blanco, J.M., Figueiredo, D. & Fonseca, L.C. 1999. A Conservação da Águia de Bonelli *Hieraaetus fasciatus* em Portugal numa Abordagem Pluridisciplinar. In Beja, P., Catry, P. & Moreira, F. (Eds.). *Actas do II Congresso de Ornitologia da Sociedade Portuguesa para o Estudo das Aves*. SPEA. Lisboa.
- Rocamora, G. 1994. Bonelli's Eagle *Hieraaetus fasciatus*. In Tucker, G.M. & Heath, M.F. (Eds.). *Birds in Europe: their Conservation Status*. BirdLife Conservation Series 3. BirdLife International. Cambridge.
- Sneath, P.H.A. & Sokal, P.R. 1973. *Numerical Taxonomy*. W.H. Freeman & Company.
- Snow, D.W. & Perrins, C.M. 1998. *The Birds of the Western Palearctic, Concise Edition – Volume 1, Non-Passerines*. Oxford University Press. Oxford.
- Suchentrunk, F., Haller, H. & Ratti, P. 1999. Gene Pool Variability of a Golden Eagle (*Aquila chrysaetus*) Population from the Swiss Alps. *Biological Conservation* 90: 151-155.
- Willis, K. & Wiese, R.J. 1993. Effect of New Founders on Retention of Gene Diversity in Captive Populations: a formalization of the nucleus population concept. *Zoo Biology* 12: 535-548.