



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Thaís Coelho Thomazini

**Estrutura populacional de *Athene cunicularia* (Strigiformes: Strigidae) em
áreas antropizados do cerrado Paulista**

São José do Rio Preto
2021

Thaís Coelho Thomazini

Estrutura populacional de *Athene cunicularia* (Strigiformes: Strigidae) em áreas antropizadas do cerrado Paulista

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Adriana Coletto Morales

São José do Rio Preto
2021

T465e	Thomazini, Thaís Coelho Estrutura populacional de <i>Athene cunicularia</i> (Strigiformes: Strigidae) em áreas antropizados do cerrado Paulista / Thaís Coelho Thomazini. – São José do Rio Preto, 2021 54 f. : il., tabs. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto Orientadora: Adriana Coletto Morales 1. Genética de Populações. 2. Microssatélites. 3. Coruja. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Thaís Coelho Thomazini

Estrutura populacional de *Athene cunicularia* (Strigiformes: Strigidae) em áreas antropizadas do cerrado Paulista

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Adriana Coletto Morales
UNESP – Câmpus de Jaboticabal
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Luciana Paes de Barros Machado
UNICENTRO - Universidade Estadual do Centro-Oeste

Prof. Dr. Luís Fábio Silveira
MZUSP - Museu de Zoologia da USP

São José do Rio Preto
10 de setembro de 2021

Aos meus pais, amo vocês.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Adriana Coletto Morales, por todos os ensinamentos ao longo destes anos, pela contribuição direta no meu desenvolvimento profissional, científico e pessoal. Também por toda atenção, acolhimento, suporte, “puxões de orelha” ... Sou realmente grata por ser sua orientada.

À Nara, eterna “co-ori”. Muito obrigada por todas as contribuições, amizade e reflexões sobre os dados mesmo via WhatsApp e nos horários mais improváveis do dia.

À Amanda e ao Rafael, e aqui incluo também outros companheiros de laboratório que passaram pelo LaBE no decorrer destes anos. Sou grata pelas discussões valorosas, troca de conhecimento e prazeroso ambiente de trabalho.

A todos que foram para campo comigo, Profa. Dra. Adriana, Rafael, Duda, João, Ádamo, Alicia e Jade, por todo auxílio nesta etapa fundamental do trabalho.

Ao meu pai, João Luís, por me ensinar a amar as aves desde pequena, por me ensinar disciplina e comprometimento, por cultivar em mim o hábito de leitura e amor pela área de ciência e educação. Por ser diretamente responsável por eu possuir os principais pilares da minha vida.

À minha mãe, Daniele, por todo apoio, escuta e afeto não só na vida, como também nas etapas fundamentais deste mestrado. Sempre acompanhando de perto todo o meu trabalho e auxiliando no que estava ao seu alcance.

Aos meus irmãos e avós, por todo carinho e apoio sempre.

Ao meu parceiro, Ádamo, por não apenas ser meu companheiro de vida, mas também por ter sido fundamental tanto nos momentos comemorativos quanto nos momentos difíceis ao longo do desenvolvimento deste trabalho, inclusive indo para campo comigo quando necessário.

Às minhas amigas próximas Cacau, Cinthya, Mari e Cyn, por todos os momentos bons compartilhados sem “deixar a peteca cair” mesmo durante a pandemia; e, mais recentemente, à Michelle e à Laís, por me receberem tão bem em minha casa nova e serem tão queridas comigo nesta etapa final do mestrado.

Dentre as amigas, um agradecimento especial à Flavinha e à Duda. À Flavinha por estar sempre presente em todos os momentos importantes da minha vida, não sendo diferente durante o mestrado; e à Duda, por toda amizade compartilhada no dia a dia, sempre presente tanto nos momentos de diversão quanto nos “perrengues” (inclusive acordando às 5h da manhã e tomando chuva ao ir para campo comigo).

À minha psicóloga, Dra Helenice Giampietro, por todo auxílio e em especial neste período de pandemia, em que tivemos nossa produção impactada.

À UNESP, que há 10 anos contribui com meu desenvolvimento profissional e pessoal. Sou extremamente grata por realizar o ensino superior nesta universidade.

Ao Programa de Pós-graduação em Biociências, pela oportunidade de aperfeiçoamento e desenvolvimento profissional de tão alta qualidade.

A todos os professores e colegas com quem tive contato ao longo destes anos e contribuíram com meu desenvolvimento profissional.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, à qual agradeço.

“A coruja não agoura: o que ela faz é saber o segredo da noite”
João Guimarães Rosa (1985, p. 194)

“Ao meu passado eu devo o meu saber e a minha ignorância (...)
Meu caminho é novo, mas meu povo não. Meu coração de fogo vem do
coração do meu país”

Anavitória (2021)

RESUMO

Os processos antrópicos comumente interferem no modo como as comunidades de espécies locais se estabelecem no ambiente, em especial o processo de urbanização, que tende a modificar o uso da terra de forma mais duradoura. Curiosamente algumas espécies como a coruja-buraqueira, *Athene cunicularia* (Strigiformes: Strigidae), apresentam características que as permitem ter êxito em ocupar áreas urbanas, entretanto, esta capacidade de ocupação não significa que elas não possam ser negativamente afetadas pela urbanização. Sabendo que a variabilidade genética é de extrema importância para que as populações mantenham sua capacidade de adaptação frente às mudanças ambientais, investigar o nível de estruturação e diversidade genética contida nas populações tem demonstrado ser uma excelente ferramenta de estudo na compreensão das respostas adaptativas das espécies. Desta forma, foi investigada a estrutura e diversidade genética presente em quatro populações de corujas-buraqueiras em áreas antropizadas de cerrado no interior Paulista, utilizando sete marcadores microssatélites espécie-específicos, cujo caráter codominante e alta reprodutibilidade, faz com que sejam marcadores moleculares ideais para estudos genético-populacionais. Faz-se importante ressaltar que até o momento não há registros de estudos com *A. cunicularia* no Brasil do ponto de vista genético, sendo este então pioneiro. Os resultados da análise genotípica de diversidade genética, juntamente com as informações sobre a distribuição desta diversidade, indicam que as populações de *A. cunicularia* analisadas possuem considerável diferenciação genética e que esta se relaciona positivamente com a distância geográfica dos indivíduos. Esta diferenciação genética se deve pela presença de alelos raros e exclusivos nas populações, resultado do processo de isolamento por distância ocasionado pela redução de fluxo gênico que, ao que tudo indica, ocorre devido à seleção de habitat e comportamento de nidificação da espécie. O desvio no Equilíbrio Hardy-Weinberg pelo excesso de homozigotos é característico do Efeito Whalund, o que juntamente com os dados de estruturação populacional sugere que as quatro populações analisadas se tratam na verdade de metapopulações, nas quais é possível identificar uma ancestralidade constituída por seis unidades genéticas no passado evolutivo de *A. cunicularia* e ainda presente nas quatro localidades amostradas.

Palavras-chave: Genética de populações. Coruja-buraqueira. Microssatélites. Diversidade genética.

ABSTRACT

Anthropogenic processes commonly interfere in the way communities of local species establish themselves in the environment, especially the urbanization process, which tends to modify land use in a more lasting way. Interestingly, some species such as the burrowing owl, *Athene cunicularia* (Strigiformes: Strigidae), have characteristics that allow them to be successful in occupying urban areas, however, this occupation capacity does not mean that they cannot be negatively affected by urbanization. Knowing that genetic variability is extremely important for populations to maintain their adaptive capacity to environmental changes, investigating the level of structuring and genetic diversity contained in populations has proven to be an excellent study tool in understanding the adaptive responses of species. Thus, the genetic structure and diversity present in four populations of burrowing owls in anthropized areas of cerrado in the interior of São Paulo was investigated, using seven species-specific microsatellite markers, whose codominant character and high reproducibility make them ideal molecular markers for genetic-population studies. It is important to emphasize that until then there are no studies with *A. cunicularia* in Brazil from a genetic point of view, which was then a pioneer. The results of the genotypic analysis of genetic diversity, together with information about the distribution of this diversity, indicate that the populations of *A. cunicularia* analyzed have considerable genetic differentiation and that this is positively related to the geographic distance of individuals. This genetic differentiation is due to the presence of rare and exclusive alleles in populations, a result of the isolation process by distance caused by the reduction of gene flow which, it seems, occurs due to the selection of habitat and the nesting behavior of the species. The deviation in the Hardy-Weinberg Equilibrium due to the excess of homozygotes is characteristic of the Wahlund Effect, which, together with the population structure data, suggests that the four populations analyzed are metapopulations, in which it is possible to identify an ancestry consisting of six genetics units in the evolutionary past of *A. cunicularia* and still present in the four sampled localities.

Keywords: Population genetics. Burrowing owl. Microsatellites. Genetical diversity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Casinha construída pelos moradores ao redor da toca de <i>A. cunicularia</i> , São José do Rio Preto, SP.	18
Figura 2 – Exemplar da espécie <i>Athene cunicularia</i> , popularmente conhecida como coruja-buraqueira, em Bonfim Paulista, SP	19
Figura 3 – Família de <i>Athene cunicularia</i> , onde é possível observar o filhote com coloração mais clara em relação aos pais, em Jaboticabal, SP.	19
Figura 4 – Indivíduo de <i>Athene cunicularia</i> utilizando ambos os pés para cavar sua toca, Jaboticabal, SP.....	20
Figura 5 – A) Mapa da região do Cerrado brasileiro evidenciando o cerrado Paulista e as localidades das cidades de onde são provenientes os indivíduos deste trabalho. B) Mapa com vista aérea onde é possível observar a distância entre os locais de origem dos indivíduos amostrados. C) Localização das corujas-buraqueiras amostradas em Jaboticabal, SP (JAB). D) Localização das corujas-buraqueiras amostradas em Ribeirão Preto, SP (RIB) e Bonfim Paulista, SP (BON). E) Localização das corujas-buraqueiras amostradas em São José do Rio Preto, SP (SJRP).....	26
Figura 6 – Etapas do procedimento de captura de <i>Athene cunicularia</i> utilizando a armadilha Tomahawk. A) coruja do lado de fora da armadilha, B) coruja entrando na armadilha após ouvir o playback, C) coruja dentro da armadilha após sair do ninho.....	29
Figura 7 – Resolução em gel de agarose MetaPhor™ 3% do locus ATCU08 para os vouchers AC23-AC31, os alelos estão identificados ao lado de suas respectivas bandas e o padrão de peso molecular com marcação em pares de base (pb) indicado à esquerda.	31
Figura 8 – Gráfico resultante do Teste de Mantel, correlacionando as variáveis distância genética e distância geográfica.	39
Figura 9 – Gráfico do cálculo feito pelo STRUCTURE HARVASTER determinando como seis o valor mais provável de agrupamentos (K) para os 49 indivíduos de <i>Athene cunicularia</i> localizados no cerrado do interior Paulista.....	41

Figura 10 – Gráfico da análise Bayesiana realizada pelo programa *STRUCTURE* com os seis grupamentos genéticos (representados pelas cores rosa claro, rosa escuro, verde, roxo, laranja e azul) e como estes grupamentos se distribuem nas quatro populações de *Athene cunicularia* amostradas (BON, JAB, RIB e SJRP). O eixo X indica os indivíduos separados nas populações pré-definidas a partir de suas localidades de captura.41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Voucher recebido no Laboratório de Biologia Evolutiva (LaBE), localidade de procedência, código de identificação e coordenadas geográficas das localidades dos indivíduos utilizados neste trabalho.	25
Tabela 2 – <i>Loci</i> de DNA microsatélite desenvolvidos para <i>Athene cunicularia</i> ; sequência dos iniciadores; unidade de repetição; N: número de alelos encontrados nas populações das quais os iniciadores foram desenvolvidos; pb: distribuição de alelos observados em cada <i>locus</i> ...	30
Tabela 3 – Frequência alélica para cada <i>loci</i> de microsatélite para os 49 indivíduos de <i>Athene cunicularia</i> localizados em áreas antropizadas do cerrado Paulista.....	34
Tabela 4 – Frequência alélica para cada <i>loci</i> de acordo com a localidade dos indivíduos de <i>Athene cunicularia</i> localizados em áreas antropizadas do cerrado Paulista.....	35
Tabela 5 – Distância genética ($\delta\mu$) entre as quatro populações de <i>Athene cunicularia</i> localizadas em áreas antropizadas do cerrado Paulista.	36
Tabela 6 – Diversidade alélica e Equilíbrio de Hardy-Weinberg de sete <i>loci</i> de microsatélite de <i>Athene cunicularia</i> localizadas em áreas antropizadas do cerrado Paulista.	36
Tabela 7 – Diversidade alélica e Equilíbrio de Hardy-Weinberg para as populações de <i>Athene cunicularia</i> amostradas em áreas antropizadas do cerrado Paulista.....	37
Tabela 8 – Indicativo da presença ou ausência de alelos nulos para os sete <i>loci</i> microsatélites utilizados.....	38
Tabela 9 – Comparação entre análise de distância genética de Cavalli-Sforza e Edwards (1967) e de F_{ST} de Weir (1996) sem e com correção de alelos nulos pelos métodos descritos por Chapuis e Estoup (2007).	39
Tabela 10 – Análise de variância molecular (AMOVA) utilizando sete <i>loci</i> microsatélites sem hierarquia, para os 49 indivíduos de <i>Athene cunicularia</i> no interior do cerrado Paulista. As populações foram divididas de acordo com a localidade dos indivíduos.....	40
Tabela 11 – Indivíduos de <i>Athene cunicularia</i> que apresentaram relações de descendência direta e as populações das quais são provenientes.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMOVA	Análise de Variância Molecular
BAR	Cidade de Barrinha, SP
BON	Cidade de Bonfim Paulista, SP
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EHW	Equilíbrio Hardy-Weinberg
EUA	Estados Unidos da América
F	Índice de fixação
FCAV	Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
F_{IS}	Desvio do EHW dentro das subpopulações
F_{IT}	Desvio do EHW na população total
F_{ST}	Desvio do EHW entre as subpopulações
G-W	Índice de Garza-Williamson
H_E	Heterozigosidade esperada
H_O	Heterozigosidade observada
HVGLD	Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel"
IBILCE	Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas
JAB	Cidade de Jaboticabal, SP
K	Número de agrupamentos
LaBE	Laboratório de Biologia Evolutiva
Lat.	Latitude
LOD	(sem tradução direta) Estimativa estatística
Long.	Longitude
MCMC	Monte Carlo via Cadeias de Markov
Na	Número médio de alelos

Ne	Número efetivo de alelos
pb	Pares de base
RIB	Cidade de Ribeirão Preto, SP
SJRP	Cidade de São José do Rio Preto, SP
SMM	<i>Stepwise Mutation Model</i>
SSR	<i>Simple Sequence Repeats</i>
STR	<i>Short Tandem Repats</i>
UNESP	Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

LISTA DE SÍMBOLOS

m	Metro
kg	Quilograma
h	Hora

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 <i>Athene cunicularia</i> – caracterização da espécie de estudo	16
1.2 Genética populacional	21
2 OBJETIVOS	24
2.1 Objetivos específicos	24
3 METODOLOGIA.....	25
3.1 Área amostral e obtenção do material biológico.....	25
3.1.1 Origem das amostras.....	25
3.1.2 Área amostral.....	26
3.1.3 Captura e coleta.....	28
3.2 Obtenção e amplificação dos <i>loci</i> de microssatélites.....	29
3.3 Análise da diversidade genética.....	31
3.4 Análise da distribuição da diversidade genética	32
3.5 Análise de parentesco	33
4 RESULTADOS	34
4.1 Análise genotípica e diversidade genética.....	34
4.2 Distribuição da diversidade genética	40
4.3 Análise de parentesco	41
5 DISCUSSÃO	43
6 CONCLUSÕES.....	48
REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Athene cunicularia* – caracterização da espécie de estudo

Pertencentes à ordem Strigiformes, as corujas possuem distribuição por todos os continentes, excetuando a Antártida, e formam um grupo com padrões morfológicos, anatômicos e comportamentais bem característicos (MOTTA-JUNIOR; BUENO; BRAGA, 2006). Atualmente, são reconhecidas 234 espécies de corujas (WINKLER; BILLERMAN; LOVETTE, 2020), das quais 24 foram registradas em território brasileiro (MOTTA-JUNIOR; BUENO; BRAGA, 2006). A ordem Strigiformes é composta por duas famílias: Tytonidae e Strigidae, sendo esta última detentora do maior número de espécies, 216 (MOTTA-JUNIOR; BUENO; BRAGA, 2006; WINKLER; BILLERMAN; LOVETTE, 2020). O gênero *Athene* é um dos pertencentes à família Strigidae, com seu registro fóssil mais antigo encontrado na Hungria, datando da época do Mioceno, (ARONSON *et al.*, 2014) (BEHRENSMEYER; TURNER, 2013). Este gênero é composto por cinco espécies de corujas pequenas: *Athene blewitti* (Hume, 1873), *Athene brama* (Temminck, 1821), *Athene noctua* (Scopoli, 1769), *Athene superciliaris* (Vieillot, 1817) e a espécie deste estudo, *Athene cunicularia* (Molina, 1782), também conhecida como coruja-buraqueira, caburé-do-campo e coruja-mineira (HÖFLING; CAMARGO, 2008; LEPAGE; WARNIER, 2014).

A distribuição da coruja-buraqueira compreende do sul do Canadá, EUA, até a Terra do Fogo, Argentina (KÖNIG; WEICK, 2008) e de acordo com o *Integrated Taxonomic Information System*, *Athene cunicularia* possui 22 subespécies. No Brasil ocorrem três subespécies: ao sul *A. cunicularia cunicularia* (Molina, 1782), ao leste *A. cunicularia grallaria* (Temminck, 1822) e ao norte *A. cunicularia minor* (Cory, 1918), sendo sabido que algumas subespécies do sul se sobrepõem e se conectam (LEPAGE; WARNIER, 2014). Inicialmente a área de ocorrência de *A. cunicularia* no Brasil excetuava os biomas Amazônia e Mata Atlântica, por constituírem ambientes florestais, entretanto, em 1997, Sick já relatava que em Brasília estas corujas expandiam sua área de ocorrência ao passo em que ocorria a destruição de áreas florestais, colonizando as áreas abertas remanescentes. Este padrão foi recentemente observado no bioma amazônico, onde já há registros da espécie tanto em áreas de savanas naturais quanto em áreas antropizadas, como as de ambientes de pastagens, (GOMES; BARREIROS; SANTANA, 2013) e no bioma de mata Atlântica a espécie já é amplamente registrada (*e.g.* (MENQ, 2016).

Apesar das corujas serem popularmente conhecidas por seus hábitos noturnos, a *A. cunicularia* possui atividades tanto noturnas quanto em períodos crepusculares e diurnos

(MOTTA-JUNIOR; BUENO; BRAGA, 2006), ocupando habitats abertos como campos, pastagens, restingas e campos agrícolas (SICK, 1997; KÖNIG; WEICK, 2008). Em alguns locais elas apresentam comportamento migratório, sendo uma espécie protegida pela *Migratory Bird Treaty Act* (MBTA 1918), do qual Canadá, Estados Unidos e México são signatários. Além dos ambientes citados, é constatada a presença de *A. cunicularia* em áreas urbanas, possivelmente pela oferta de alimento ser abundante devido à luminosidade urbana, o que inclusive faz com que ocorra na dieta uma predominância de presas que são atraídas pela luminosidade (RODRÍGUEZ; OROZCO-VALOR; SARASOLA, 2021) e pela recente capacidade de cavarem suas próprias tocas, como será dito mais a frente.

A coruja-buraqueira possui dieta generalista, predominantemente composta por invertebrados (MOTTA-JUNIOR; BUENO; BRAGA, 2006), sendo verificado uma predominância da dieta carnívora-insetívora quando as corujas-buraqueiras estão em época reprodutiva (TOMMASO *et al.*, 2009). Em áreas urbanas essas corujas são frequentemente encontradas sobre cupinzeiros terrícolas, postes e telhados (SICK, 1997; BELTON, 2000), proximidade que acaba beneficiando também os seres humanos, pois um casal de corujas-buraqueiras consome uma média de 12.300 a 26.200 insetos e de 540 a 1.100 roedores por ano (MOTTA-JUNIOR; ALHO, 2000), casualmente também consome escorpiões (SICK, 1997); sendo estes considerados pragas urbanas.

Esta proximidade com áreas antropizadas também oferece riscos e pode trazer prejuízos para as populações de corujas-buraqueiras. Um estudo realizado por Santos e colaboradores (2015), onde investigaram como as diferentes civilizações se relacionam com as corujas ao longo do tempo e ao redor do mundo, demonstra que apesar das corujas serem socialmente utilizadas como símbolo do conhecimento, há também uma forte associação delas com o “mau agouro” e “trevas”, principalmente por serem aves noturnas. E estas tradições e crenças podem colocar as espécies em vulnerabilidade, visto que por serem temidas costumam ser atacadas e mortas (ICMBIO, 2011; SANTOS *et al.*, 2015). No estudo de Santos, também há o relato do consumo de carne de coruja-buraqueira na medicina popular uruguaia, onde as pessoas acreditam que a carne destas corujas estimula o apetite de convalescentes (GOMES, 2015 *apud* SANTOS *et al.*, 2015). Ainda, é comum que pessoas encontrem filhotes sozinhos, devido ao seu comportamento de sair do ninho e explorar os arredores do local, e os levem para centros de triagens das prefeituras ou zoológicos por acreditarem que estão indefesos e que não irão sobreviver sozinhos (MOTTA-JUNIOR; BUENO; BRAGA, 2006). Este último, apesar de interferir no ciclo natural da espécie, não possui motivação negativa, pois ao levar a ave até profissionais qualificados a pessoa acredita estar ajudando o filhote. Ao mesmo passo que

existem estas crenças populares pejorativas, as corujas, especialmente as buraqueiras pelo seu comportamento diurno, também despertam a simpatia das pessoas. Sendo possível observar ações populares em defesa da conservação destas aves, bem como seus ciclos reprodutivos costumam ser acompanhados pelos moradores vizinhos, que têm simpatia pelos filhotes (Figura 1).

Figura 1 – Casinha construída pelos moradores ao redor da toca de *A. cunicularia*, São José do Rio Preto, SP.



Fonte: THOMAZINI, T.C., foto tirada pela autora.

Considerada uma ave de pequeno porte, o tamanho corporal das corujas-buraqueiras varia de 23 a 28 centímetros; sua cabeça tem forma arredondada, sem penas auriculares, e possui um disco facial coberto por plumas, cuja disposição guia o som ambiente para os ouvidos, fazendo com que tenham uma audição extremamente aguçada (SICK, 1997; MOTTA-JUNIOR; BUENO; BRAGA, 2006). Seus olhos são amarelos e capazes de enxergar muito bem durante o dia e durante a noite, sua plumagem é cor de terra avermelhada com traços e pontos pálidos; a região peitoral é mais pálida do corpo e rajada de marrom. Sua cauda é curta e possuem tarsos-metatarsos longos, relacionados ao hábito terrícola da espécie (HÖFLING; CAMARGO, 2008) (Figura 2). Machos e fêmeas possuem morfologia similar (LEUPIN; LOW, 2001), enquanto os filhotes apresentam plumagem clara nos primeiros dias de vida (MOTTA-JUNIOR; BUENO; BRAGA, 2006) (Figura 3).

Figura 2 – Exemplar da espécie *Athene cunicularia*, popularmente conhecida como coruja-buraqueira, em Bonfim Paulista, SP



Fonte: THOMAZINI, T.C., foto tirada pela autora.

Figura 3 – Família de *Athene cunicularia*, onde é possível observar o filhote com coloração mais clara em relação aos pais, em Jaboticabal, SP.

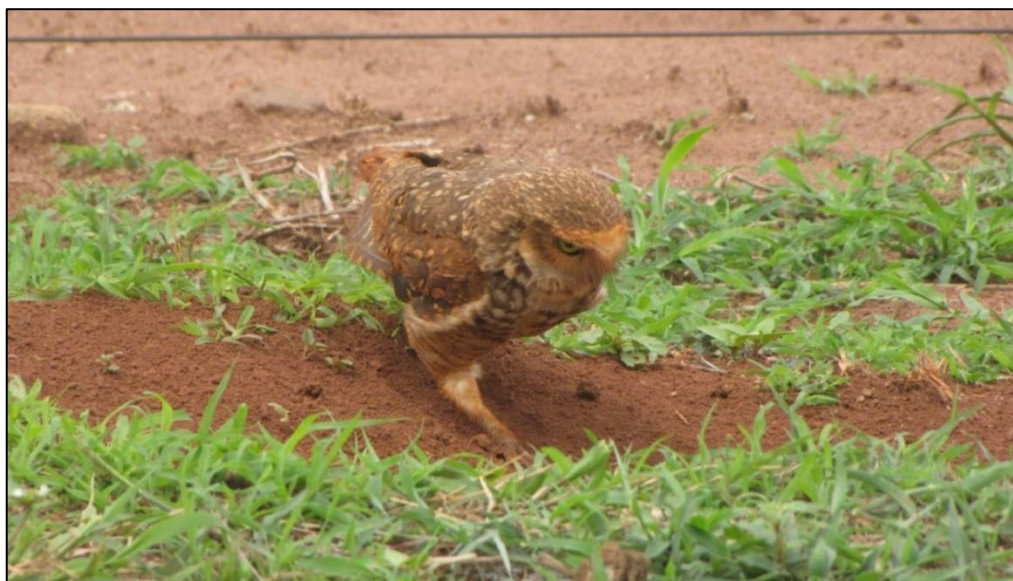


Fonte: THOMAZINI, T.C., foto tirada pela autora.

A época de reprodutiva das corujas-buraqueiras geralmente ocorre no final da estação seca, sendo marcada por rituais de cantos e chamamento entre os jovens que procuram parceiros para acasalar. O nome popular de *A. cunicularia*, coruja-buraqueira, provém de seu comportamento de nidificação, onde diferentemente da maioria das aves, que nidificam em ninhos, *A. cunicularia* nidifica em cavidades no solo. Geralmente elas ocupam e ampliam as tocas deixadas por animais fossoriais utilizando ambos os pés para cavar e ampliar as dimensões do buraco (MOTTA-JUNIOR; BUENO; BRAGA, 2006) (Figura 4).

No entanto, considera-se que em ambientes mais antropizados, onde geralmente não são encontrados os animais fossoriais que deixariam tocas, essa espécie tenha desenvolvido uma inovação comportamental, capaz de cavar os próprios buracos, garantindo sucesso na ocupação destes ambientes (MARTÍNEZ *et al.*, 2017). Além da nidificação, as cavidades também são importantes como local de fuga de predadores, estoque de alimentos e abrigo (THOMSEN, 1971), podendo um casal de corujas-buraqueiras ocupar mais de uma toca (SICK, 1997)

Figura 4 – Indivíduo de *Athene cunicularia* utilizando ambos os pés para cavar sua toca, Jaboticabal, SP.



Fonte: ANDREAZZI, R.B.

Durante a postura, as corujas-buraqueiras chegam a botar de dois a três ovos, a fêmea os incuba por aproximadamente 20 dias, neste período é alimentada pelo macho (MOTTA-JUNIOR; BUENO; BRAGA, 2006). Na época reprodutiva é frequente observar os pais defendendo ativamente o ninho, emitindo vocalizações de alarme e dando voos rasantes sobre os invasores. O comportamento de defesa de território é característico do cuidado parental,

assim como a construção do ninho, incubação dos ovos e dos filhotes, alimentação dos filhotes, proteção contra predadores e alimentação das fêmeas pelos machos antes da postura dos ovos e durante o período de incubação (SILVER; ANDREWS; BALL, 1985).

1.2 Genética populacional

Ações antrópicas, de forma recorrente, provocam mudanças ambientais que afetam de formas diversas as populações naturais, mudanças como perda e fragmentação de habitat, a presença de poluentes diversos e, numa escala maior, mudanças climáticas (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2009), sendo que a destruição de habitat é reconhecida como maior ameaça à biodiversidade e causa principal da extinção de espécies (PIMM; RAVEN, 2000; PRIMACK; RODRIGUES, 2001). A urbanização é uma ação antrópica cujos efeitos na biodiversidade é algo crescente nas últimas décadas (MARZLUFF, 2001). O processo de urbanização provoca drásticas modificações em escalas temporais e espaciais, visto que ocorre a remoção da vegetação preexistente, modifica ciclos biogeoquímicos, altera o solo, interfere no direcionamento de rios e modifica o microclima, além da presença de estruturas artificiais (ALBERTI *et al.*, 2003; GRIMM *et al.*, 2008), sendo ainda um dos processos mais duradouros de modificação do uso da terra (MCKINNEY, 2006). Apesar destes efeitos negativos que a urbanização submete às populações, há espécies capazes de se estabelecerem em habitats urbanos, como mencionado na seção anterior para *Athene cunicularia*, e devido ao processo de seleção das espécies para este habitat a urbanização é atualmente considerada como principal fator de homogeneização biótica (MCKINNEY, 2006), estando inclusive como categoria de ameaças na IUCN (categoria 1.1 “*Housing & urban areas*”).

As ações antrópicas, e as mudanças ambientais causadas por elas, impulsionam modificações evolutivas como especiação, hibridação e respostas adaptativas (LANKAU *et al.*, 2011) por submeterem os organismos a condições evolutivas que envolvem modificações numa escala de tempo muito inferior à que estes organismos foram submetidos em seu passado evolutivo (JULIAN, S.E., KING, T.L., SAVAGE, 2003). A variação genética nas populações influencia diretamente nas respostas evolutivas que estas populações podem ter (PIMM; RAVEN, 2000; LANKAU *et al.*, 2011), a perda de diversidade genética, por exemplo, reduz a capacidade de adaptação das espécies frente às mudanças no ambiente (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2009). Diante destas informações e da velocidade com que processos antrópicos se estabelecem e afetam as populações naturais, nos últimos anos vêm se tornando uma prática importante obter e monitorar o *status* populacional da biodiversidade através de

seus padrões genéticos (SCHWARTZ; LUIKART; WAPLES, 2007; SIH; FERRARI; HARRIS, 2011).

Estes eventos evolutivos dos quais as populações estão sujeitas se intensificam quando a população em questão possui um menor número de indivíduos, se tornando mais susceptíveis a sofrerem com processos genéticos como: deriva genética que acarreta na fixação de mutações, endocruzamento, variações no fluxo gênico que podem resultar na diminuição do valor adaptativo (BRITO; FERNANDEZ, 2000). A variabilidade é um dos primeiros quesitos a ser avaliado em uma população de interesse por ser fundamental na adaptação das populações por seleção natural e possibilitar a compreensão da história evolutiva daquele grupo; podendo ser medida pela heterozigosidade em polimorfismos ou pela variação da herdabilidade em caracteres quantitativos (LANDE, 1998). Os índices de estruturação populacional, ou seja, como a variabilidade genética se encontra distribuída entre as populações e entre seus indivíduos, também é um fator investigado por fornecer informações que permitem entender como forças evolutivas influenciam na dinâmica das populações (LEE; MITCHELL-OLDS, 2011). Compreender o fluxo gênico e seus efeitos é de extrema importância para diversas áreas de pesquisa, como genética e ecologia de populações, biologia da conservação e epidemiologia (BALLOUX; LUGON-MOULIN, 2002) e com o avanço das técnicas moleculares foram desenvolvidos diversos marcadores genéticos que possibilitam uma melhor compreensão dos processos evolutivos (BRIAN CHARLESWORTH; DEBORAH CHARLESWORTH; BARTON, 2003).

Um dos marcadores desenvolvidos são os de DNA microsatélites, também conhecidos como SSR, “*Simple Sequence Repeats*” ou STR “*Short Tandem Repats*”. Os marcadores moleculares microsatélites são formados por arranjos de repetições em tandem de dois a seis nucleotídeos (TAUTZ, 1989). A existência dessas unidades de repetição pode ser resultante do deslizamento da DNA polimerase durante a replicação e reparo da molécula de DNA (*replication slippage*) (SCHLÖTTERER; TAUTZ, 1992). A variação na quantidade destes elementos repetidos confere aos microsatélites alto grau de polimorfismo, o que faz com que eles estejam entre um dos tipos mais polimórficos do genoma (ELLEGREN, 2004). Para vertebrados, a repetição dinucleotídica $[CA]_n$ é uma das mais abundantes, possuindo uma média de 15 a 30 kb (LEE; KOCHER, 1996).

Além do alto polimorfismo, os microsatélites possuem características que os tornam ideais para efetuar estudos de estrutura genético-populacionais: por se localizarem preferencialmente em regiões consideradas seletivamente neutras, possuem alta reprodutibilidade, apresentam herança mendeliana do tipo codominante o que possibilita a

identificação dos heterozigotos, ocorrem em alta frequência no genoma, têm caráter multialélico e são de fácil genotipagem (ELLEGREN, 2004; ELLIS; BURKE, 2007; ZOLET *et al.*, 2017).

Devido as sequências de DNA flanqueadoras da região microssatélites serem conservadas entre as espécies, é possível o desenvolvimento de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), específicos para essas sequências adjacentes ao microssatélite (TAUTZ, 1998). Há marcadores microssatélites específicos desenvolvidos para *Athene cunicularia* (KORFANTA; SCHABLE; GLENN, 2002; MACÍAS-DUARTE *et al.*, 2010) que podem ser de grande auxílio para compreender sua variabilidade genética e fluxo gênico, uma vez que a estrutura genética é o reflexo do intercâmbio de alelos entre as populações. Estes marcadores DNA microssatélites são ideais para efetuar estudos de estrutura genético-populacionais (ELLIS; BURKE, 2007).

A compreensão das relações intraespecíficas, bem como a variabilidade genética contida nas populações, são importantes ferramentas em estudos biológicos e em estratégias de conservação. Apesar da ampla distribuição de *A. cunicularia*, grande parte dos estudos genéticos populacionais foram realizados apenas em regiões temperadas (DESMOND; SAVIDGE, 1999; KORFANTA; MCDONALD; GLENN, 2005; MACÍAS-DUARTE, 2019), no Brasil destacam-se os trabalhos referentes à dieta, habitat e comportamento de caça (DESMOND; SAVIDGE, 1999; MOTTA-JUNIOR; ALHO, 2000; SPECHT; GONÇALVES; YOUNG, 2013; SANTOS, 2019), de modo que estudar esta espécie no Brasil do ponto de vista genético é pioneiro e de grande valia para entendermos também como o ambiente influencia na sua história de vida.

2 OBJETIVOS

Compreender a diversidade genética de *Athene cunicularia* em áreas antropizadas do cerrado Paulista, utilizando como marcador *loci* de DNA microssatélite.

2.1 Objetivos específicos

- caracterizar a variabilidade genética das corujas-buraqueiras em áreas antropizadas de cerrado do interior Paulista;
- investigar a existência de estrutura populacional presente nas populações e as causas decorrentes para sua ocorrência ou não;
- descrever as relações de parentesco presente entre os indivíduos amostrados.

3 METODOLOGIA

3.1 Área amostral e obtenção do material biológico

3.1.1 Origem das amostras

Foram amostrados 49 indivíduos de vida livre da espécie *Athene cunicularia* provenientes de localidades com áreas antropizadas de cerrado do interior Paulista. Deste total, as amostras biológicas de 41 indivíduos foram obtidas através de captura e coleta nas distintas localidades, cinco amostras foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Karin Werther, Departamento de Patologia Veterinária e Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" (HVGLD), ambos na FCAV-UNESP, Câmpus de Jaboticabal, e três amostras foram coletadas de indivíduos encontrados já sem vida nas rodovias. As amostras biológicas foram armazenadas e processadas no Laboratório de Biologia Evolutiva (LaBE), Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, FCAV-UNESP, onde receberam um voucher (Tabela 1).

Tabela 1 – Voucher recebido no Laboratório de Biologia Evolutiva (LaBE), localidade de procedência, código de identificação e coordenadas geográficas das localidades dos indivíduos utilizados neste trabalho.

Nº voucher LaBE	Localidade	Código identificação	Coordenadas Geográficas	
			Lat.	Long.
AC30	Bonfim Paulista, SP	BON	21°17'8.00"S	47°49'14.09"O
AC31	Bonfim Paulista, SP	BON	21°17'6.07"S	47°49'07.07"O
AC32	Bonfim Paulista, SP	BON	21°17'6.03"S	47°49'11.07"O
AC34	Bonfim Paulista, SP	BON	21°14'14.05"S	47°49'45.09"O
AC35	Bonfim Paulista, SP	BON	21°14'36.06"S	47°49'35.02"O
AC36	Bonfim Paulista, SP	BON	21°14'27.03"S	47°49'46.01"O
AC37	Bonfim Paulista, SP	BON	21°14'21.09"S	47°50'04.05"O
AC38	Bonfim Paulista, SP	BON	21°14'44.07"S	47°49'31.02"O
AC39	Bonfim Paulista, SP	BON	21°14'22.09"S	47°49'34.01"O
AC1*	Jaboticabal, SP	JAB	21°15'19"S	48°19'21"O
AC2*	Jaboticabal, SP	JAB	21°15'19"S	48°19'21"O
AC3*	Jaboticabal, SP	JAB	21°15'19"S	48°19'21"O
AC4*	Jaboticabal, SP	JAB	21°15'19"S	48°19'21"O
AC8*	Jaboticabal, SP	JAB	21°15'19"S	48°19'21"O
AC9	Jaboticabal, SP	JAB	21°14'46.72"S	48°18'1.84"O
AC10**	Jaboticabal, SP	JAB	21°15'57.20"S	48°17'45.28"O
AC12	Jaboticabal, SP	JAB	21°14'46.67"S	48°18'1.06"O
AC13	Jaboticabal, SP	JAB	21°14'46.57"S)	48°18'0.78"O
AC14	Jaboticabal, SP	JAB	21°14'25.21"S	48°17'36.62"O
AC15**	Jaboticabal, SP	JAB	21°16'14.3"S	48°17'46.6"W
AC16	Jaboticabal, SP	JAB	21°14'22.71"S	48°17'29.64"O
AC17	Jaboticabal, SP	JAB	21°14'46.06"S	48°18'5.75"O
AC18	Jaboticabal, SP	JAB	21°14'46.00"S	48°18'5.71"O

AC19	Jaboticabal, SP	JAB	21°14'39.16"S	48°17'52.82"O
AC20	Jaboticabal, SP	JAB	21°14'32.58"S	48°17'43.90"O
AC21	Jaboticabal, SP	JAB	21°14'28.31"S	48°17'10.88"O
AC22	Jaboticabal, SP	JAB	21°14'18.98"S	48°17'40.98"O
AC27	Jaboticabal, SP	JAB	21°16'00.02"S	48°17'47.00"O
AC29**	Jaboticabal, SP	JAB	21°15'52.09"S	48°17'11.03"O
AC23	Ribeirão Preto, SP	RIB	21°11'53.51"S	47°48'5.66"O
AC24	Ribeirão Preto, SP	RIB	21°10'43.01"S	47°47'1.03"O
AC25	Ribeirão Preto, SP	RIB	21°10'44.02"S	47°46'59.01"O
AC26	Ribeirão Preto, SP	RIB	21°10'43.00"S	47°47'01.03"O
AC28	Ribeirão Preto, SP	RIB	21°10'53.04"S	47°46'58.07"O
AC33	Ribeirão Preto, SP	RIB	21°11'50.05"S	47°49'8.08"O
AC40	São José do Rio Preto, SP	SJRP	20°47'16.60"S	49°21'40.80"O
AC41	São José do Rio Preto, SP	SJRP	20°46'59.30"S	49°21'41.40"O
AC42	São José do Rio Preto, SP	SJRP	20°49'26.30"S	49°20'29.30"O
AC43	São José do Rio Preto, SP	SJRP	20°49'22.10"S	49°20'27.60"O
AC44	São José do Rio Preto, SP	SJRP	20°47'59.30"S	49°21'41.40"O
AC45	São José do Rio Preto, SP	SJRP	20°46'16.30"S	49°23'30.70"O
AC46	São José do Rio Preto, SP	SJRP	20°47'27.10"S	49°24'49.70"O
AC47	São José do Rio Preto, SP	SJRP	20°47'31.10"S	49°24'52.80"O
AC48	São José do Rio Preto, SP	SJRP	20°49'38.40"S	49°24'48.80"O
AC49	São José do Rio Preto, SP	SJRP	20°49'33.10"S	49°23'58.70"O
AC50	São José do Rio Preto, SP	SJRP	20°46'16.10"S	49°19'26.60"O
AC51	São José do Rio Preto, SP	SJRP	20°46'38.60"S	49°20'43.40"O
AC52	São José do Rio Preto, SP	SJRP	20°46'0.80"S	49°21'29.10"O
AC53	São José do Rio Preto, SP	SJRP	20°47'21.10"S	49°24'59.00"O
Total: 49 indivíduos		4 localidades		

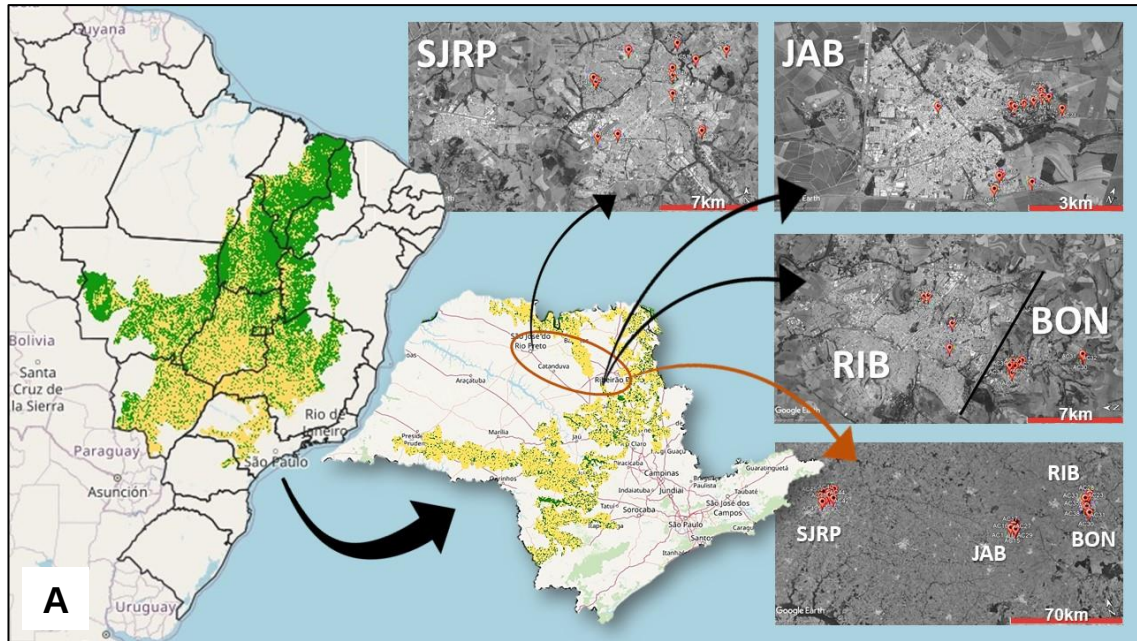
*cedido pela Profa. Dra. Karin Werther **encontrado morto na rodovia.

3.1.2 Área amostral

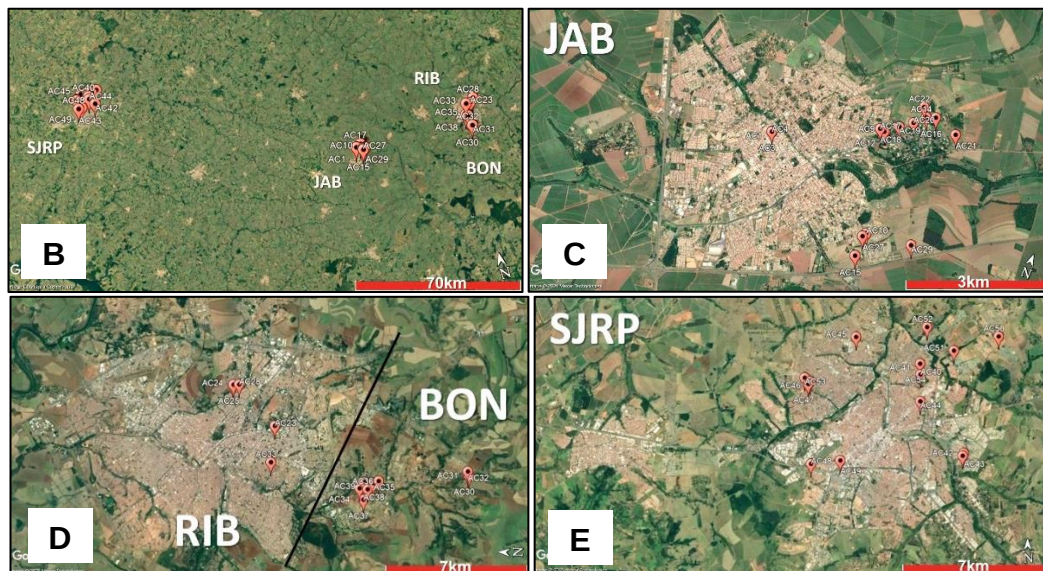
A área amostral está inserida em áreas antropizadas de cerrado do interior Paulista (Figura 5A-B), e foram escolhidas de forma a abranger diferentes matrizes, como áreas com muitas e poucas edificações, centros urbanos, regiões mais periféricas e rodovias, com populações amostradas próximas uma das outras (5 km), intermediárias (74 / 35 km) e distantes (100 km). Das 49 amostras utilizadas, 20 são provenientes da cidade de Jaboticabal, SP, das quais 13 foram coletadas nas dependências da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, FCAV-UNESP (Figura 5C); seis são provenientes de Ribeirão Preto, SP, e foram coletadas em áreas diversas no interior da cidade (Figura 5D); nove são provenientes de Bonfim Paulista, SP, e foram coletadas nas dependências do loteamento do residencial Terras de San Pedro, um complexo de terrenos com poucas edificações e no condomínio Royal Park, onde as coletas foram feitas nos poucos terrenos que ainda não haviam construções e nas áreas de praça do condomínio (Figura 5D); e 14 são provenientes de São José do Rio Preto, SP, coletadas em áreas diversas no interior da cidade (Figura 5E).

Figura 5 – A) Mapa da região do Cerrado brasileiro evidenciando o cerrado Paulista e as

localidades das cidades de onde são provenientes os indivíduos deste trabalho. B) Mapa com vista aérea onde é possível observar a distância entre os locais de origem dos indivíduos amostrados. C) Localização das corujas-buraqueiras amostradas em Jaboticabal, SP (JAB). D) Localização das corujas-buraqueiras amostradas em Ribeirão Preto, SP (RIB) e Bonfim Paulista, SP (BON). E) Localização das corujas-buraqueiras amostradas em São José do Rio Preto, SP (SJRP).



* Em verde áreas naturais e em amarelo áreas de uso antrópico.



Fonte: Elaborado pela autora através do Google Earth-Mapas (2021) e MapBiomas (2021).

3.1.3 Captura e coleta

Os procedimentos de capturas e coletas do material biológico estão regulamentados de acordo com a licença SISBIO de número 68449, como também aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCAV-UNESP, Câmpus de Jaboticabal. O método de captura iniciou-se detectando os ninhos e os indivíduos através de visualização, as capturas ocorreram no período da manhã entre 5h e 10h30 e, eventualmente, no final da tarde, entre 16h e 18h. Para tal, utilizou-se armadilhas *Tomahawk* e *playback* da vocalização da própria espécie *A. cunicularia*, classificada como “canto”. O som utilizado se encontra disponível no site WikiAves (2021) sob código WA1395322.

Com a ave fora do seu ninho, a armadilha foi posicionada na entrada e um tecido escuro foi colocado por cima, de forma a permitir a entrada da ave apenas por uma fresta entre ambos. Uma pequena caixa de som foi escondida na entrada desta fresta e o *playback* reproduzido, assim, demonstrando curiosidade, a coruja entrava em seu ninho pela fresta entre o tecido e a armadilha (Figura 6A-B). Ao entrar no ninho a fresta era rapidamente fechada de forma manual e o *playback* reproduzido novamente, porém, desta vez a caixa de som era posicionada do lado de fora e mais afastada do ninho. Ao ouvir o *playback* a coruja saía de seu ninho e adentrava a armadilha sendo desta forma capturada (Figura 6C). Todo este processo levou em média 2 horas.

Realizada a captura dos indivíduos, foi feita a contenção manual e então foram coletadas plumas peitorais, indicadas por possuírem menor calibre e consequentemente gerar menos incômodo à ave no momento da coleta biológica. As amostras foram armazenadas em álcool absoluto na Coleção de Tecidos do Laboratório de Biologia Evolutiva (LaBE), localizado no Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, na FCAV-UNESP, Câmpus de Jaboticabal, onde receberam um *voucher*.

Figura 6 – Etapas do procedimento de captura de *Athene cunicularia* utilizando a armadilha *Tomahawk*. A) coruja do lado de fora da armadilha, B) coruja entrando na armadilha após ouvir o *playback*, C) coruja dentro da armadilha após sair do ninho.



Fonte: THOMAZINI, T.C., fotos tiradas pela autora.

3.2 Obtenção e amplificação dos *loci* de microssatélites

O DNA total foi extraído individualmente utilizando dois kits de extração DNeasy Blood & Tissue® (Qiagen) e NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel). As reações de amplificação via PCR (*Polymerase chain reaction*) foram padronizadas para um volume final de 15 µl contendo 7,5 µl de GoTaq® Master Mix (Promega), 0,6 µl dos *primers forward* e *reverse* a 2mM, 4,3 µl de água deionizada e 2,0 µl de DNA com 100ng. As reações foram amplificadas no termociclador MJ Research PTC-100 Thermal Cycler (GMI Inc). Utilizando um conjunto de sete *primers* de DNA microssatélite específicos para *A. cunicularia*, um desenvolvidos por Korfanta e colab., (2002) e seis desenvolvidos por Macias-Duarte e colab., (2010) (Tabela 2), os *loci* foram amplificados seguindo condições adaptadas do método descrito pelos desenvolvedores. Para todos os iniciadores foram utilizadas *touchdown* PCR, nesta PCR o anelamento ocorre em um intervalo de temperaturas cuja temperatura inicial é acrescida de 2°C a cada 30s até a atingir a temperatura final. Desta forma, as condições de *touchdown* PCR para o *primer* BUOW11 foram: um ciclo inicial de desnaturação de 96°C por 9 minutos, seguido por 34 ciclos de 95°C por 45 segundos, 54-60°C por 30 segundos, 72°C por 45 segundos e

extensão final a 72°C por 10 min; e as condições de *touchdown* PCR para os iniciadores ATCU04, ATCU06, ATCU08, ATCU23, ATCU43 e ATCU45 foram: um ciclo inicial de desnaturação de 95°C por 5 minutos, seguido por 34 ciclos de 95°C por 30 segundos, 52-62°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e extensão final a 72°C por 10 min.

Tabela 2 – *Loci* de DNA microssatélite desenvolvidos para *Athene cunicularia*; sequência dos iniciadores; unidade de repetição; N: número de alelos encontrados nas populações das quais os iniciadores foram desenvolvidos; pb: distribuição de alelos observados em cada *locus*.

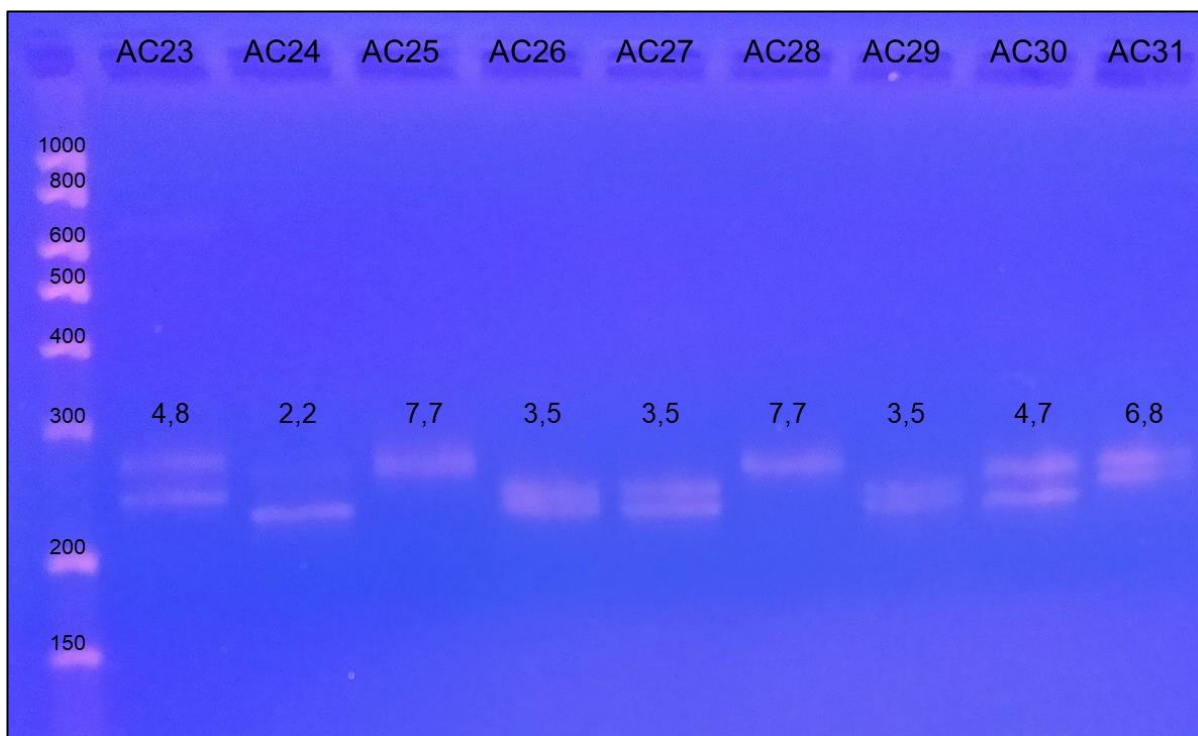
<i>Loci</i>	Sequência (5'-3')	Unidade de Repetição	N	pb
ATCU04**	F: TTCATGGGTTTATGATCTGACTTC R: AGCCATTCCCTTCAGTCTTC	(CA) ₃ TG(CA) ₁₈	5 (a) 10 (b)	349-367
ATCU06**	F: GAAATGGAAGGAGGAGTGC R: GCCATCCCTAATGCTTGTG	(CT) ₈ CA(CT) ₁₃	13 (a) e 15 (b)	201-255
ATCU08**	F: GCCCTCATATCATTAAAGATCCTTC R: GGATTGTCATTTCCTCAG	(CA) ₂₀	25 (a) e 25 (b)	223-293
ATCU28**	F: CAGTGTGAGAGTCAAGACATGC R: TGGAGAGGTTTAGGGCTAGG	(GT) ₁₀ AT(GT) ₉	10 (a) e 9 (b)	328-352
ATCU43**	F: GATCAGCTTGAGCAAAGG R: GGGAGATGTTGAGGAAATCG	(CA) ₁₉	14 (a) e 12 (b)	174-212
ATCU45**	F: CTACCGAGCAGTGACAGTTTG R: GGGTGGACAGTTCCTCATTC	(GATA) ₈ GGTA(GATA) ₂	9 (a) e 10 (b)	242-282
BUOW11*	F: GGCACTCCCTGATTGTC R: GGCTATAATGGGTGAGTCA	(ACTC) ₅₊₄₊₂	12 (c)	191-235

* Korfanta *et al.*, 2002; ** Macias-Duarte *et al.*, 2010; a) população de Sinaloa, México; b) população da Califórnia, EUA; c) populações do oeste dos EUA e Flórida, EUA.

O produto da PCR foi aplicado em gel de agarose *MetaPhor*TM 3%, ideal para microssatélites por se tratar de um gel de alta resolução, discriminando até dois pares de base e por reduzir a quantidade de bandas inespecíficas (WANG *et al.*, 2009). O gel foi corado com brometo de etídio e para a visualização das bandas os produtos de PCR foram previamente corados com *Loading Dye* (Thermo Fisher), que possui os corantes Azul de Bromofenol e Xileno Cianol FF. O tamanho dos fragmentos foi determinado pelo marcador de peso molecular *Low Range DNA Ladder* de 50 a 1.000 pares de base (Cellco Biotec).

Os géis foram posteriormente analisados de forma manual, através da visualização e contagem dos alelos. Estes foram caracterizados por seu tamanho e orientação em relação ao marcador de peso molecular, sendo então numerados de 1 a n (Figura 7).

Figura 7 – Resolução em gel de agarose *MetaPhor*TM 3% do *locus* ATCU08 para os vouchers AC23-AC31, os alelos estão identificados ao lado de suas respectivas bandas e o padrão de peso molecular com marcação em pares de base (pb) indicado à esquerda.



Fonte: THOMAZINI, T.C., foto tirada pela autora.

3.3 Análise da diversidade genética

Após realizada a genotipagem, a diversidade genética foi estimada por meio do número total de alelos por *locus* (N), frequência do alelo mais comum (freq), número de alelos exclusivos observados, heterozigosidade observada (Ho) e heterozigosidade esperada (He). O Equilíbrio Hardy-Weinberg (EHW) foi calculado no programa Arlequin v.3.5.2.2 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010). O programa Arlequin v.3.5.2.2 também foi utilizado para se calcular o desequilíbrio de ligação dos *loci* utilizados. A verificação da presença de alelos nulos e seu possível aumento no número de homozigotos, foi realizada com o auxílio do programa Micro-Checker v.2.2.3 (VAN OOSTERHOUT *et al.*, 2004). A correção dos alelos nulos foi realizada pelo *software* FreeNA que efetua o cálculo da distância genética de Cavalli-Sforza e Edwards (1967) sem e com correção de alelos nulos pelo método INA descrito por Chapuis e Estoup (2007), e efetua o cálculo de F_{ST} de Weir (1996) sem e com correção de alelos nulos pelo método ENA também descrito por Chapuis e Estoup (2007). Nestes cálculos foram utilizados intervalo de confiança de 95%, correção de Bonferroni e 1.000 simulações de Monte

Carlo. O método método INA corrige o viés induzido pela presença de alelos nulos na distância genética, e o método ENA corrige o viés induzido pela presença de alelos nulos na estimativa de F_{ST} .

A presença de alelos nulos ocorre quando há uma mutação no DNA alvo reduzindo ou inibindo a capacidade de anelamento dos *primers*, dessa forma, estes alelos não são amplificados corretamente e não se tornam visíveis nos géis de eletroforese. A análise de distância genética ($\delta\mu$)² foi estimada pelo *software* Arlequin v.3.5.2.2 utilizando o modelo *Stepwise Mutation Model* (SMM), específico para dados de microssatélites (GOLDSTEIN *et al.*, 1995) e apresentada na forma de matriz comparativa entre as quatro localidades onde os indivíduos foram amostrados. O Teste de Mantel (DINIZ-FILHO *et al.*, 2013), realizado para investigar a significância estatística entre distância geográfica e distância genética, foi executado no programa R (R CORE TEAM, 2020), utilizando o script VEGAN (OKSANEN *et al.* 2020) a partir dos dados de distância genética par a par entre todos os indivíduos e a localização geográfica obtida por GPS de todos os indivíduos amostrados.

3.4 Análise da distribuição da diversidade genética

Investigar se há subdivisão genético-populacional e qual o melhor agrupamento para os genótipos, foi o primeiro passo para compreender como a diversidade genética está distribuída na população. Para tal foi utilizado o *software* *STRUCTURE* v.2.3.4 (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000), que realiza este cálculo a partir do método *Bayesiano* em que ocorrem agrupamentos de amostras que compartilham padrões de variação similares. Através da Cadeia de Monte Carlo a bayesiana atribui, de forma aleatória, os indivíduos a um número pré-determinado de grupos (K), as frequências da variabilidade genética são então estimadas para cada K e este processo é repetido inúmeras vezes, gerando um número ideal de agrupamento dos genótipos para cada K pré-determinado.

Esta análise foi executada utilizando K=1 a K=10, com 1.000.000 de interações MCMC e *burn-in* inicial de 100.000. O modelo de ancestralidade adotado foi o “Admixture”, considerando assim que os indivíduos podem ter uma ancestralidade mista, podendo herdar uma fração de seu genoma de ancestrais das referidas populações. Foram realizadas dez simulações independentes para cada K gerado, de forma a avaliar sua estabilidade.

O programa *online* *STRUCTURE* HAVESTER (EARL; VONHOLDT, 2012) foi utilizado para a leitura dos resultados gerados pelo *STRUCTURE* v.2.3.4, considerando o método “Evanno” (EVANNO; REGNAUT; GOUDET, 2005) o melhor valor de agrupamento

para o conjunto de dados é detectado a partir de um gráfico dos valores de probabilidade média por K. Para testar os possíveis grupos gerados pela análise de distribuição, foi realizada uma Análise de Variância Molecular (AMOVA) por meio do programa Arlequin v.3.5.2.2, esta análise determina o nível de compartilhamento genético existente entre os grupos de indivíduos amostrados. A AMOVA foi gerada utilizando-se o R_{ST} análise mais apropriada para dados microssatélites por considerar nos cálculos a diferença no número de repetições entre alelos microssatélites. Por fim, para a identificação da presença de estruturação genética, foram utilizados os índices de fixação F de Wright (HOLSINGER; WEIR, 2015), os coeficientes de endocruzamentos F_{IS} , F_{ST} e F_{IT} que se baseiam na comparação dos níveis de heterozigosidade presentes na hierarquia da estrutura populacional: indivíduo, subpopulação e população total, respectivamente.

Calculado através do Arlequin v.3.5.2.2 e utilizado para investigar a presença de *bottleneck* nas populações amostradas, o índice de Garza-Williamson (G-W) modificado calcula a razão média do número de alelos em um *locus* com relação ao tamanho do alelo, seu resultado varia de 0 a 1, onde o valor sendo abaixo de 0,68 indica que a população em questão sofreu uma redução populacional recente e valor mais próximos de 1 indica população estacionária (GARZA; WILLIAMSON, 2001).

3.5 Análise de parentesco

O grau de parentesco entre as corujas capturadas foi estimado por meio do programa Cervus 3.0.7 (KALINOWSKI *et al.*, 2010). Para tal o *software* inicialmente calcula as frequências alélicas e em seguida é realizada uma simulação das relações de parentesco, a partir destes dois dados gerados o *software* estima as relações de parentesco finais. Neste trabalho utilizou-se a análise “Parent Pair (Sexe Unknown)”, método mais adequado quando não há informações sobre nenhum dos parentais e nem sobre o sexo dos indivíduos amostrados.

A validação do relacionamentos é dada pelo LOD score, resultante do cálculo logaritmico natural da razão de verossimilhança geral. Relacionamento com LOD positivo indica que a probabilidade do indivíduo candidato ser o parental verdadeiro do indivíduo analisado é maior do que de não ser; com LOD zero indica que a probabilidade do candidato ser o parental verdadeiro é igual a de não ser; e com LOD negativo indica que a probabilidade do candidato ser o parental verdadeiro é menor do que de não ser (KALINOWSKI *et al.*, 2010).

4 RESULTADOS

4.1 Análise genotípica e diversidade genética

As análises estatísticas foram realizadas com os 49 indivíduos de *A. cunicularia* provenientes das quatro localidades antropizadas de cerrado do interior Paulista amostradas – Bonfim Paulista (BON), Jaboticabal (JAB), Ribeirão Preto (RIB) e São José do Rio Preto (SJRP) – utilizando os sete *loci* de microssatélites. O resultado destas análises constatou a presença de 49 genótipos, 55 alelos e 100% de polimorfismo em cada *locus*. Ao todo foram identificados 12 alelos raros (freq. <0,05) sendo os *loci* ATCU06 e BUOW11 com a maior quantidade destes alelos (3) (Tabela 3).

Tabela 3 – Frequência alélica para cada *loci* de microssatélite para os 49 indivíduos de *Athene cunicularia* localizados em áreas antropizadas do cerrado Paulista

Alelos	<i>Loci</i>						
	ATCU04	ATCU06	ATCU08	ATCU28	ATCU43	ATCU45	BUOW11
1	0,143	0,031*	0,041*	0,010*	0,020*	0,102	0,010*
2	0,306	0,031*	0,061	0,020*	0,082	0,306	0,031*
3	0,388	0,122	0,102	0,082	0,071	0,235	0,102
4	0,102	0,265	0,133	0,153	0,071	0,143	0,102
5	0,061	0,204	0,082	0,276	0,204	0,143	0,092
6		0,245	0,122	0,163	0,378	0,051	0,245
7		0,041*	0,173	0,235	0,092	0,020*	0,245
8		0,061	0,153	0,061	0,082		0,143
9			0,122				0,031*
10			0,010*				

*alelos raros (freq.<0,05)

Ao verificar a frequência alélica dos *loci* de acordo com as populações amostradas é possível identificar a presença de alelos raros e/ou exclusivos nas populações BON, JAB e SJRP. A população JAB apresentou a maior quantidade de alelos exclusivos (3) e para o *locus* ATCU28 apresentou um alelo simultaneamente raro e exclusivo. A população SJRP apresentou a maior quantidade de alelos raros (10) e para o *locus* BUOW11 apresentou um alelo simultaneamente raro e exclusivo. A população RIB foi a única a não apresentar nem alelos raros nem exclusivos (Tabela 4).

Tabela 4 – Frequência alélica para cada *loci* de acordo com a localidade dos indivíduos de *Athene cunicularia* localizados em áreas antropizadas do cerrado Paulista.

<i>Locus</i>	<i>Alelos</i>	BON N=9	JAB N=20	RIB N=6	SJRP N=14
ATCU04	1	0,111	0,150	0,167	0,143
	2	0,222	0,175	0,167	0,607
	3	0,389	0,600	0,500	0,036
	4	0,222	0,025*	0,167	0,107
	5	0,056	0,050	0,000	0,107
ATCU06	1	0,000	0,050	0,000	0,036*
	2	0,000	0,025*	0,083	0,036*
	3	0,167	0,100	0,083	0,143
	4	0,278	0,225	0,250	0,321
	5	0,167	0,175	0,333	0,214
	6	0,278	0,250	0,250	0,214
	7	0,056	0,050	0,000	0,036*
	8	0,056	0,125	0,000	0,000
ATCU08	1	0,000	0,100**	0,000	0,000
	2	0,000	0,100	0,167	0,000
	3	0,056	0,200	0,083	0,000
	4	0,222	0,075	0,083	0,179
	5	0,111	0,075	0,083	0,071
	6	0,111	0,100	0,000	0,214
	7	0,167	0,150	0,333	0,143
	8	0,111	0,150	0,083	0,214
	9	0,167	0,050	0,167	0,179
	10	0,056**	0,000	0,000	0,000
ATCU28	1	0,000	0,025*/**	0,000	0,000
	2	0,056	0,025*	0,000	0,000
	3	0,056	0,125	0,000	0,071
	4	0,167	0,250	0,083	0,036*
	5	0,222	0,225	0,333	0,357
	6	0,111	0,100	0,083	0,321
	7	0,333	0,200	0,333	0,179
	8	0,056	0,050	0,167	0,036*
ATCU43	1	0,000	0,050**	0,000	0,000
	2	0,111	0,125	0,083	0,000
	3	0,167	0,075	0,083	0,000
	4	0,000	0,100	0,000	0,107
	5	0,278	0,175	0,583	0,036*
	6	0,444	0,400	0,250	0,357
	7	0,000	0,050	0,000	0,250
	8	0,000	0,025*	0,000	0,250
ATCU45	1	0,167	0,000	0,500	0,036*
	2	0,333	0,375	0,250	0,214
	3	0,333	0,175	0,083	0,321
	4	0,111	0,150	0,000	0,214
	5	0,056	0,225	0,000	0,143
	6	0,000	0,050	0,167	0,036*
	7	0,000	0,025*	0,000	0,036*
BUOW11	1	0,000	0,000	0,000	0,036*/**
	2	0,000	0,050	0,000	0,036*
	3	0,000	0,175	0,000	0,107
	4	0,000	0,075	0,000	0,250
	5	0,056	0,150	0,000	0,071
	6	0,167	0,250	0,250	0,286
	7	0,389	0,275	0,333	0,071
	8	0,222	0,025*	0,417	0,143

9	0,167**	0,000	0,000	0,000
---	---------	-------	-------	-------

*alelos raros (freq.<0,05) **alelos exclusivos

A análise de distância genética ($\delta\mu$), específica para marcadores microsatélites, indicou que a maior divergência genética (1,35098) está presente entre as populações RIB e SJRP enquanto a menor divergência genética (0,14881) está presente entre as populações BON e RIB (Tabela 5).

Tabela 5 – Distância genética ($\delta\mu$) entre as quatro populações de *Athene cunicularia* localizadas em áreas antropizadas do cerrado Paulista.

Pop	BON	JAB	RIB	SJRP
BON	0			
JAB	1,05554	0		
RIB	0,14881	1,07512	0	
SJRP	1,27473	1,02065	1,35089	0

BON: Bonfim Paulista, JAB: Jaboticabal, RIB: Ribeirão Preto, SJRP: São José do Rio Preto

Fonte: Elaborado pela autora

Os sete *loci* de microsatélites analisados considerando os indivíduos amostrados como uma única população, apresentou heterozigosidade observada menor do que a heterozigosidade esperada, sendo observado desvios no Equilíbrio de Hardy-Weinberg para todos os *loci* analisados. Todos os valores de *p* foram significativos após correção de Bonferroni (Tabela 6).

Tabela 6 – Diversidade alélica e Equilíbrio de Hardy-Weinberg de sete *loci* de microsatélite de *Athene cunicularia* localizadas em áreas antropizadas do cerrado Paulista.

Loci	Equilíbrio Hardy-Weinberg				
	N	Ho	He	p-value	s.d.
ATCU04	5	0,18367	0,72880	0,00000	0,00000
ATCU06	8	0,42857	0,81401	0,00000	0,00000
ATCU08	10	0,48980	0,88534	0,00000	0,00000
ATCU28	8	0,67347	0,81633	0,00002	0,00000
ATCU43	8	0,36735	0,79150	0,00000	0,00000
ATCU45	7	0,36735	0,80518	0,00000	0,00000
BUOW11	9	0,53061	0,83695	0,00000	0,00000

N: número de alelos, Ho: heterozigosidade observada, He: heterozigosidade esperada.

Fonte: Elaborado pela autora

O EHW analisado por população, mostrou que apenas a população JAB apresentou valores de *p* significativos para todos os *loci* com índices de Ho menor que He. As demais

populações não apresentaram valores de p significativos para a maioria dos *loci* amostrados (Tabela 7). A presença de *loci* em desequilíbrio de ligação foi constatada tanto na análise considerando todos os indivíduos como se fossem uma única população, quanto para as populações amostradas separadamente.

Tabela 7 – Diversidade alélica e Equilíbrio de Hardy-Weinberg para as populações de *Athene cunicularia* amostradas em áreas antropizadas do cerrado Paulista.

Equilíbrio Hardy-Weinberg					
BON					
<i>Loci</i>	N	Ho	He	<i>p-value</i>	s.d.
ATCU04	5	0,11111	0,77778	0,00000	0,00000
ATCU06	6	0,33333	0,83007	0,00105	0,00003
ATCU08	8	0,77778	0,90196	0,47474*	0,00043
ATCU28	7	0,77778	0,83660	0,59125*	0,00043
ATCU43	4	0,33333	0,72549	0,00610*	0,00007
ATCU45	5	0,44444	0,77778	0,00837*	0,00008
BUOW11	5	0,77778	0,78431	0,08124*	0,00027
JAB					
<i>Loci</i>	N	Ho	He	<i>p-value</i>	s.d.
ATCU04	5	0,15000	0,59872	0,00000	0,00000
ATCU06	8	0,55000	0,84615	0,00000	0,00000
ATCU08	9	0,35000	0,89359	0,00000	0,00000
ATCU28	8	0,75000	0,83846	0,00082	0,00002
ATCU43	8	0,50000	0,79231	0,00045	0,00002
ATCU45	6	0,30000	0,77179	0,00000	0,00000
BUOW11	7	0,45000	0,82051	0,00005	0,00001
RIB					
<i>Loci</i>	N	Ho	He	<i>p-value</i>	s.d.
ATCU04	4	0,00000	0,72727	0,00139	0,00004
ATCU06	5	0,50000	0,81818	0,20577*	0,00030
ATCU08	7	0,33333	0,87879	0,00084	0,00003
ATCU28	5	0,66667	0,80303	0,77906*	0,00042
ATCU43	4	0,33333	0,63636	0,09088*	0,00030
ATCU45	4	0,66667	0,71212	0,13376*	0,00034
BUOW11	3	0,16667	0,71212	0,01395*	0,00012
SJRP					
<i>Loci</i>	N	Ho	He	<i>p-value</i>	s.d.
ATCU04	5	0,35714	0,60847	0,00260*	0,00006
ATCU06	7	0,28571	0,80952	0,00000	0,00000
ATCU08	6	0,57143	0,84921	0,01637*	0,00012
ATCU28	6	0,50000	0,75661	0,00750*	0,00008
ATCU43	5	0,21429	0,76190	0,00003	0,00001
ATCU45	7	0,28571	0,80952	0,00000	0,00000
BUOW11	8	0,64286	0,84127	0,09912*	0,00024

N: número de alelos, Ho: heterozigidade observada, He: heterozigidade esperada, *valores não significativos após correção de Bonferroni

A presença de gargalo populacional foi indicada para a população RIB, que, para os seis indivíduos amostrados, apresentou índice de Garza-Williamson de 0,59 ($< 0,68$). Enquanto as populações BON (0,74), JAB (0,93) e SJRP (0,81) se mostraram estacionárias de acordo com o índice por apresentarem valores maiores que 0,68 e próximos à 1.

A estimativa de frequências de alelos nulos baseada no déficit de heterozigotos em relação ao esperado pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg indicou a possibilidade da presença de alelos nulos em quatro *loci* dos sete analisados devido à alta presença de homozigotos observados. Na Tabela 8 é possível observar quais *loci* possuem este indicativo, bem como a heterozigosidade esperada e observada para cada um deles. O valor de p para o *locus* ATCU04 não foi possível de ser calculado pelo *software*, visto que mais de 50% de alelos deste *locus* possuem a mesma categoria de tamanho. Na comparação entre os cálculos de distância genética e índice de F_{ST} sem e com a correção de alelos nulos realizados pelo *software* FreeNA (Tabela 9) é possível observar que não ocorreram alterações significativas entre os cálculos.

Tabela 8 – Indicativo da presença ou ausência de alelos nulos para os sete *loci* microsatélites utilizados.

	Alelos nulos	Ho	He	<i>p-value</i>
ATCU04	sim	9	5,785	x
ATCU06	sim	10	3,071	$< 0,001^*$
ATCU08	não	6	2,535	$> 0,05$
ATCU28	não	7	3,785	$< 0,025^*$
ATCU43	sim	11	3,714	$< 0,001^*$
ATCU45	sim	10	3,071	$< 0,001^*$
BUOW11	não	5	2,642	$> 0,05$

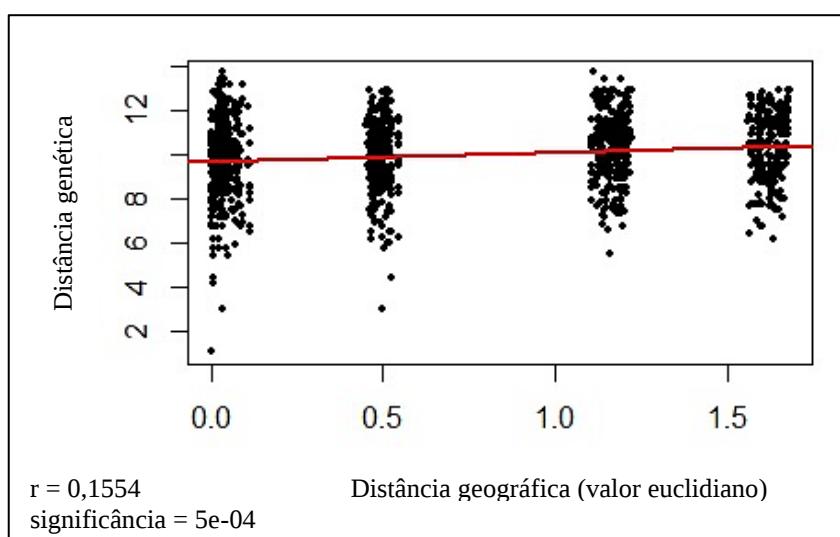
* valores de p significativos, x: não foi possível calcular.

Tabela 9 – Comparação entre análise de distância genética de Cavalli-Sforza e Edwards (1967) e de F_{ST} de Weir (1996) sem e com correção de alelos nulos pelos métodos descritos por Chapuis e Estoup (2007).

Distância genética sem correção					F_{ST} sem correção				
	BON	JAB	RIB	SJRP		BON	JAB	RIB	SJRP
BON	0				BON	0			
JAB	0,310	0			JAB	-0,016	0		
RIB	0,305	0,397	0		RIB	-0,044	0,013	0	
SJRP	0,368	0,343	0,458	0	SJRP	0,019	0,047	0,064	0
Distância genética com correção					F_{ST} com correção				
	BON	JAB	RIB	SJRP		BON	JAB	RIB	SJRP
BON	0				BON	0			
JAB	0,308	0			JAB	-0,006	0		
RIB	0,330	0,369	0		RIB	-0,024	0,022	0	
SJRP	0,365	0,327	0,439	0	SJRP	0,019	0,042	0,052	0

O Teste de Mantel indicou a existência de correlação positiva ($r = 0,1554$ e significância = $5e-04$) entre as variáveis localização geográfica dos indivíduos amostrados e a distância genética entre eles (Figura 8).

Figura 8 – Gráfico resultante do Teste de Mantel, correlacionando as variáveis distância genética e distância geográfica.



Fonte: Elaborado pela autora através do R (2020)

4.2 Distribuição da diversidade genética

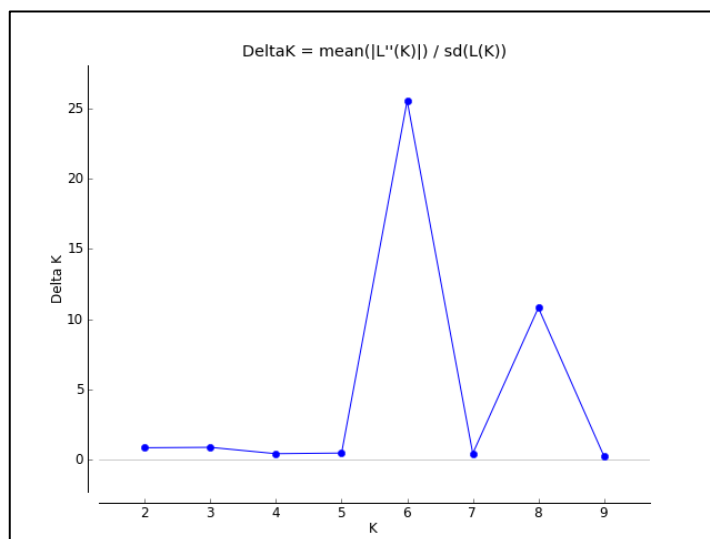
A análise de estrutura genética foi utilizada para investigar os indivíduos de *A. cunicularia* amostrados no cerrado do interior paulista, em um contexto geográfico. Assim, a análise de variância molecular (AMOVA) foi realizada com a ausência de grupo hierárquico e os indivíduos foram agrupados em populações definidas de acordo com a localidade de captura dos indivíduos: BON, JAB, RIB e SJRP (Tabela 10). O Índice de Fixação F_{ST} , que determina o grau de endogamia dos indivíduos em relação às subpopulações, obteve valor de 0,52769 com intervalo de confiança significativo após correção de Bonferroni ($p\text{-value}= 0,00000+-0,00000$).

Tabela 10 – Análise de variância molecular (AMOVA) utilizando sete *loci* microssatélites sem hierarquia, para os 49 indivíduos de *Athene cunicularia* no interior do cerrado Paulista. As populações foram divididas de acordo com a localidade dos indivíduos.

Fonte de variação	d.f.	Componentes da variação	Porcentagem da variação
Entre populações	48	10,52275	52,77%
Dentro das populações	49	9,41837	47,23%
Total	97	20,42633	
Índice de Fixação:	F_{ST} : 0,52769	$p\text{-value}= 0,00000+-0,00000$	

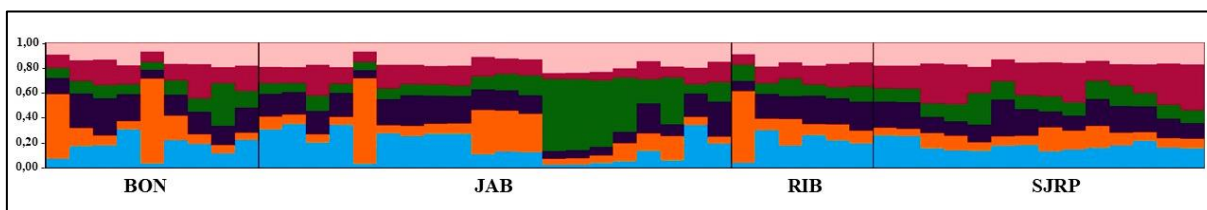
Através do *STRUCTURE* foi possível identificar a presença de seis grupamentos genético-populacionais ($K=6$) obtidos pelo método de Evanno *et al.* (2005), nos quais a variabilidade genética dos indivíduos amostrados foi distribuída de acordo com sua similaridade (Figura 9). Após a obtenção do número mais provável de grupamentos genético-populacionais para representar estes grupos amostrados, foi elaborado um gráfico demonstrando como estes seis grupamentos (representados pelas cores rosa claro, rosa escuro, verde, roxo, laranja e azul) se distribuem nos 49 indivíduos aqui amostrados e suas respectivas populações (Figura 10).

Figura 9 – Gráfico do cálculo feito pelo *STRUCTURE HARVESTER* determinando como seis o valor mais provável de agrupamentos (K) para os 49 indivíduos de *Athene cunicularia* localizados no cerrado do interior Paulista.



Fonte: Elaborado pela autora através do *STRUCTURE HARVESTER* (2012)

Figura 10 – Gráfico da análise Bayesiana realizada pelo programa *STRUCTURE* com os seis grupamentos genéticos (representados pelas cores rosa claro, rosa escuro, verde, roxo, laranja e azul) e como estes grupamentos se distribuem nas quatro populações de *Athene cunicularia* amostradas (BON, JAB, RIB e SJRP). O eixo X indica os indivíduos separados nas populações pré-definidas a partir de suas localidades de captura.



Fonte: Elaborado pela autora através do *STRUCTURE* (2000)

4.3 Análise de parentesco

As relações de descendência estimadas indicaram 10 indivíduos relacionados geneticamente com valores de LOD positivos. Na análise realizada não constava o sexo de cada indivíduo, desta forma o programa calcula a probabilidade de cada um dos 49 indivíduos amostrados possuírem relacionamento de descendência direta com cada um dos demais 48 indivíduos. Como é possível observar na Tabela 11, foram constatadas algumas relações entre os indivíduos, mas sem discriminação de qual seria o parental e qual seria o descendente.

Adicionalmente, foi calculada a probabilidade de haver pai e mãe, de forma conjunta. Neste caso, foi identificado para os indivíduos AC18 e AC35 seus possíveis pais. Ocorreram relacionamentos entre indivíduos de uma mesma população (JAB) e entre indivíduos de populações distintas (BON e JAB), não foi observado relacionamento significativo entre os indivíduos de RIB e SJRP.

Tabela 11 – Indivíduos de *Athene cunicularia* que apresentaram relações de descendência direta e as populações das quais são provenientes.

Descendência	Parentais	LOD score	Significância
AC8 _{JAB}	AC35 _{BON}	3,75E+14	+
AC35 _{BON}	AC8 _{JAB}	3,75E+14	+
AC15 _{JAB}	AC16 _{JAB}	6,60E+14	*
AC16 _{JAB}	AC15 _{JAB}	6,60E+14	*
AC17 _{JAB}	AC18 _{JAB}	8,85E+14	*
AC18 _{JAB}	AC17 _{JAB}	8,85E+14	*
AC18 _{JAB}	AC17 _{JAB} e AC38 _{BON}	9,13E+14	+
AC35 _{BON}	AC8 _{JAB} e AC30 _{BON}	9,23E+14	+

Intervalo de confiança: * 95%, + 80%.

5 DISCUSSÃO

Nossos resultados derivados da investigação da diversidade genética nas quatro populações de *Athene cunicularia* do cerrado Paulista, revelaram um alto polimorfismo presente nos sete *loci* analisados. Este alto polimorfismo também se fez presente nas populações de corujas-buraqueiras para as quais foram desenvolvidos os SSR (KORFANTA; SCHABLE; GLENN, 2002; MACÍAS-DUARTE *et al.*, 2010). Dos sete *loci* aqui utilizados, apenas o ATCU04 possuiu riqueza alélica igual à descrita por Macias-Duarte (2010) para uma população de 40 corujas-buraqueiras localizadas no México; os demais *loci* possuíram riqueza alélica inferior às encontradas por estes autores, mesmo apresentando alto grau de polimorfismo. Assim como, nas populações de corujas-buraqueiras do México e da Califórnia, o *locus* ATCU08 foi o mais polimórfico deste estudo, com 10 alelos (MACÍAS-DUARTE *et al.*, 2010).

Este polimorfismo presente em microssatélites pode estar positivamente correlacionado com a quantidade de nucleotídeos e com o número de repetições dos motivos de repetição (ELLEGEN, 2004), fato que embasa os resultados deste estudo, onde o *locus* ATCU04 (5 alelos) é o menos diverso e o *locus* ATCU08 (10 alelos) é o mais diverso. Além de que o *locus* ATCU04 é um hexanucleotídico com 18 repetições, enquanto ATCU08 é dinucleotídico com 20 repetições, estando dessa forma mais sujeito à eventos de *slippage* e, com isso, mutações mais frequentes (ELLEGEN, 2004).

A existência de alelos raros nas populações JAB e SJRP pode ser devido à uma origem evolutiva mais recente para estes alelos, de modo que ainda não houve tempo suficiente para se dispersarem pelas populações. Em populações pequenas a probabilidade de alelos com frequência menor que 0,05 serem perdidos através de eventos estocásticos torna-se maior e, como consequência desta perda, há redução na diversidade genética da população em questão. Ademais, o registro destes alelos nas populações JAB (N=20) e SJRP (N=14) pode indicar uma amostragem satisfatória destes indivíduos, visto que foi possível identificar com o número amostral utilizado a presença de 17 alelos raros; da mesma forma que a ausência de alelos raros nas populações BON e SJRP pode ser um indicativo inicial de que estas populações precisariam de um maior número amostral de indivíduos para análises mais robustas. No caso dos alelos exclusivos, eles também podem estar presentes nas populações por possuírem origem recente no grupo amostrado, mas também podem indicar um baixo fluxo gênico entre os grupos em questão, fazendo com que estes alelos se encontrem restritos ao grupo no qual se originaram. Assim, quantidade de alelos exclusivos presentes nas populações BON (3), JAB (3) e SJRP (1)

pode indicar que estas populações possuem baixo fluxo gênico com as demais, condição que será discutida com mais detalhes em conjunto com as demais análises deste trabalho.

O distanciamento genético observado entre as populações, em especial SJRP, tanto na análise de distância genética $\delta\mu$ quanto na de Cavalli-Sforza e Edwards (1967) pode ser uma consequência da presença de alelos raros e exclusivos, pois à medida que alelos surgem e ficam restritos à sua população de origem, aumenta-se o distanciamento genético desta população para com as demais, o que reforça a existência de um baixo fluxo gênico entre as populações. Nossas análises confirmam que a distância genética entre estas populações de corujas-buraqueiras está positivamente correlacionada à distância geográfica, ou seja, para estes indivíduos quanto maior a distância geográfica maior a distância genética. A população SJRP se encontra a mais de 100 km de distância das demais populações quando traçada uma linha reta entre elas, e apresenta também o maior distanciamento genético com as demais, enquanto BON e RIB são as populações mais próximas dentre as outras (5 km em linha reta) e apresentam os menores valores de distância genética obtidos.

A análise de Equilíbrio Hardy-Weinberg para todos os indivíduos analisados como uma só população evidenciaram um déficit de heterozigotos em relação ao esperado, este resultado se diferencia do encontrado nas três populações estudadas por Macías-Duarte (2010) e Korfanta (2002), que se encontraram em Equilíbrio. Enquanto na análise de EHW por populações observou-se que apenas a população JAB foi a única a apresentar valores de p significativos para todos os *loci* estudados e déficit de heterozigotos. Considerando que a população JAB possui o maior número de indivíduos amostrados (20) e maior representatividade alélica por *loci*, torna-se compreensível que os resultados desta população sejam próximos aos de quando analisamos a população como um todo. Estes resultados podem ser um indicativo do baixo número amostral na análise. Mesmo com a presença de desequilíbrio de ligação detectado tanto na população total quanto separadamente, os cálculos não permitem que se rejeite a hipótese nula de que para estas populações H_o e H_e são iguais e que em todos os cenários foi observado um déficit de heterozigotos.

A possível presença de alelos nulos é frequentemente questionada para marcadores microsatélites, especialmente quando há déficit de heterozigotos, porém, devido a não alteração significativa da distância genética e dos índices de F_{ST} após a correção de alelos nulos, bem como alguns resultados não significativos que indicam a presença destes alelos na amostra, e o fato de que a frequência de alelos nulos em até 20% exerce pouca influência sobre estimativas de diferenciação genética (CHAPUIS; ESTOUP, 2007), é possível considerar que os alelos nulos não estão enviesando os resultados deste trabalho. Faz-se importante ressaltar

que alguns eventos evolutivos também resultam em desvio no EHW, o excesso de homozigotos é esperado, por exemplo, em populações pequenas ou que tenham sido acometidas por eventos de deriva genética como *Bottleneck* (gargalo populacional). Em nossas análises, a população RIB obteve indicativo de gargalo-populacional recente de acordo com o índice de Garza-Williamson. Vale ressaltar que os locais onde estas corujas foram capturadas são áreas rodeadas com significativa presença de construções urbanas, é possível pensar que populações ancestrais que lá existiram perderam seu local de nidificação para as construções, de modo que a população local atual é uma amostra do que existiu anteriormente, sendo denotada pela perda de variabilidade genética característico de uma população que tenha sofrido gargalo populacional, este um dos tipos de deriva genética. Mas, é possível que alelos não tenham sido amostrados nesta coleta, uma vez que esta é a população com menor quantidade de indivíduos amostrados.

Déficit de heterozigotos também é esperado quando ocorre o efeito Whalund, no qual há estruturação de subpopulações. A análise de estrutura genética, AMOVA, realizada para as corujas-buraqueiras amostradas, demonstrou que a variação genética presente nos indivíduos é maior entre as quatro populações do que dentro de cada uma delas, o índice de fixação de 0,53 é considerado alto, de modo que há indicação de restrição do fluxo gênico entre as populações amostradas. Para compreender tal restrição deve-se considerar que entre as localidades urbanas amostradas há uma vasta presença de áreas constituídas por agroecossistemas, principalmente pelo plantio de cana-de-açúcar, e o sucesso reprodutivo das corujas-buraqueiras neste tipo de habitat tende a ser inferior à 35% (MARTÍNEZ, *et al.* 2017). Outra questão a se destacar é o comportamento de cuidado parental e defesa de território desta espécie, compostos por vocalizações e posturas de intimidação, que tendem a beneficiar indivíduos que nidificam próximos uns dos outros (CAVALLI, *et al.* 2006); fazendo com que, apesar do comportamento de dispersão efetuado pelos jovens, seja comum registrar adensamento populacional para esta espécie (e.g. MARTÍNEZ, *et al.* 2017). A partir destas informações, pode-se inferir que, neste cenário, a seleção de habitat realizada pelas corujas-buraqueiras e seu comportamento de nidificação, podem estar promovendo o isolamento por distância entre estas populações amostradas, confirmado pela correlação positiva entre distância genética e geográfica.

Ao analisarmos o grau de parentesco dos indivíduos amostrados, foi possível identificar relacionamentos de descendência direta entre indivíduos de BON e JAB, reforçando que apesar da estruturação e distanciamento genético diagnosticados para as populações, ainda há a ocorrência de fluxo gênico entre elas. O compartilhamento alélico estabelecido por fluxo gênico é possível quando ocorre o comportamento de dispersão praticado pelos indivíduos jovens

quando saem de seus ninhos em busca de parceiros e novos locais para nidificação. Importante ressaltar que a distância geográfica e as matrizes que rodeiam estas áreas pode ser um impeditivo para isto, visto que mesmo com uma amostragem satisfatória para as populações JAB e SJRP não foram identificados relacionamentos de parentesco entre os indivíduos presentes nelas, sugerindo que este evento de dispersão e troca de alelos entre estas corujas se dê entre pequenas distâncias, e, portanto, se encaixando no Modelo *Stepping-stone* (SLATKIN, 1987) de estruturação genética. No entanto, mesmo BON e RIB sendo demasiadamente próximas, não foi verificado indivíduos com parentesco entre estas localidades, isto pode indicar tanto que as áreas propícias para nidificação nestas áreas urbanas estejam escassas, que as corujas não possuem mais tanto êxito em ocupá-las, buscando então outros locais, e como já comentado anteriormente a necessidade de um maior número amostral a ser analisado para se evitar análises sem robustez.

A dinâmica aqui observada sugere que as populações amostradas neste trabalho podem se tratar na verdade de metapopulações, condição caracterizada por grupos populacionais fragmentados e isolados espacialmente em fragmentos de habitats, e ocasionalmente conectados por eventos de migração que estabelecem fluxo gênico. A teoria das metapopulações foi proposta por Levins em 1969, e nela, fenômenos de extinção local, colonização e recolonização ocorrem com frequência no conjunto de fragmentos de habitats. A confirmação desta condição ainda precisa ser investigada para *A. cunicularia* utilizando amostragem e modelos estatísticos específicos.

A análise de estruturação genética realizada pelo programa *STRUCTURE* identificou que os indivíduos que compõem as quatro populações aqui amostradas são geneticamente constituídos por seis unidades genéticas evolutivas. A ancestralidade genética das seis unidades ainda se faz presente nas quatro populações aqui amostradas. É possível observar uma maior presença do grupo genético representado em verde na população JAB, e uma maior presença do grupo genético representado em rosa escuro na população SJRP. Esta configuração reflete a estruturação genética observada nas populações através do índice de F_{ST} que mostra que a maior variação é encontrada entre as populações, sendo mantida ainda a similaridade ancestral, apesar destas particularidades. Estes dados permitem sugerir que anteriormente estas populações se encontravam em isolamento nas áreas abertas, colonizaram novas áreas com o desmatamento, mas não se uniram a ponto de formarem uma única população, se mantendo em pequenos grupos e hoje estão organizadas em metapopulações. Embora não haja como afirmar com estes dados a sincronia dos eventos de urbanização, desmatamento e formação dos agroecossistemas

com os dados genéticos, ainda é possível inferir que nossas amostras evidenciam eventos de isolamento geográfico seguido de fluxo gênico.

As evidências genético-populacionais aqui apresentadas, contribuem de forma pioneira e relevante para a compreensão da caracterização genética de *Athene cunicularia* no Brasil. Desta forma, este trabalho também possibilita que novos questionamentos e investigações possam ser realizados para compreender a dinâmica populacional desta espécie e sua relação com processos antrópicos.

6 CONCLUSÕES

A partir dos dados analisados na busca da compreensão da estrutura populacional de *Athene cunicularia* em áreas antropizadas de cerrado no interior Paulista, pode-se concluir que a presença de alelos raros e exclusivos nas populações resulta numa diferenciação genética entre elas, e que esta diferenciação está diretamente correlacionada com a distância geográfica, podendo ser resultado da restrição de fluxo gênico ocasionado pela uso do solo, seleção de habitat e comportamento de nidificação das corujas-buraqueiras. O desvio do Equilíbrio Hardy-Weinberg identificado com alta presença de homozigotos é característico de Efeito Wahlund, o que juntamente com os dados de estruturação populacional sugere que as quatro populações analisadas se tratam na verdade de metapopulações, nas quais é possível identificar uma ancestralidade constituída por seis unidades genéticas no passado evolutivo de *A. cunicularia* que ainda estão presentes nos indivíduos das quatro localidades amostradas.

REFERÊNCIAS

- ALBERTI, M. *et al.* Integrating humans into ecology: opportunities and challenges for studying urban ecosystems. **BioScience**, v. 53, n. 12, p. 1169-1179, 2003.
- ANAVITÓRIA.; LEE, R. **Amarelo, Azul e Branco**. Rio de Janeiro, Anavitória Artes, 2021. Disponível em <<https://www.youtube.com/watch?v=GtvS897PiyQ>> Acesso em 13/07/2021.
- ARBELÁEZ-CORTES, E. *et al.* Genetic *STRUCTURE* of the red mangrove (*Rhizophora mangle* L.) on the Colombian Pacific detected by microsatellite molecular markers. **Hydrobiologia**, v. 583, n. 1, p. 321–330, 2007.
- ARONSON, M. F. J. *et al.* A global analysis of the impacts of urbanization on bird and plant diversity reveals key anthropogenic drivers. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 281, n. 1780, 12 fev. 2014.
- BALLOUX, F.; LUGON-MOULIN, N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. **Molecular ecology**, v. 11, n. 2, p. 155-165, 2002.
- BEHRENSMEYER, A. K.; TURNER, A. **Fossilworks: Gateway to the Paleobiology Database**. 2013. Disponível em: <<http://fossilworks.org>>. Acesso em 24/05/2017.
- BELTON, W. **Aves do Rio Grande do Sul: distribuição e biologia**. São Leopoldo: Editora Unisinos, 2000.
- BirdLife International**. Important Bird Areas factsheet: Isla Diego de Almagro. Downloaded from <http://www.birdlife.org>. 2021
- BLOUIN, M. S. *et al.* Use of microsatellite *loci* to classify individuals by relatedness. **Molecular ecology**, v. 5, n. 3, p. 393-401, 1996.
- CAVALLI, M. Differing nest-defence behaviour in urban and rural populations of breeding Burrowing Owls. **Emu**, v. 116, n. 4, p. 428-434, 2016.
- CAVALLI-SFORZA, L. L.; EDWARDS, A. WF. Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures. **American journal of human genetics**, v. 19, n. 3 Pt 1, p. 233, 1967.
- CHAPUIS, M. P.; ESTOUP, A. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. **Molecular biology and evolution**, v. 24, n. 3, p. 621-631, 2007.

- CHARLESWORTH, B.; CHARLESWORTH, D.; BARTON, N. H. The effects of genetic and geographic *STRUCTURE* on neutral variation. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 34, n. 1, p. 99-125, 2003.
- BRITO, D.; FERNANDEZ, F. A. S. Dealing with extinction is forever: understanding the risks faced by small populations. **Ciência e Cultura(Sao Paulo)**, v. 52, n. 3, p. 161-170, 2000.
- DESMOND, M. J.; SAVIDGE, J. A. Satellite burrow use by burrowing owl chicks and its influence on nest fate. **Studies in Avian Biology**, v. 19, p. 128-130, 1999.
- DINIZ-FILHO, J. A. F. *et al.* Mantel test in population genetics. **Genetics and molecular biology**, v. 36, p. 475-485, 2013.
- EARL, D. A.; VONHOLDT, B. M. *STRUCTURE* HARVESTER: a website and program for visualizing *STRUCTURE* output and implementing the Evanno method. **Conservation genetics resources**, v. 4, n. 2, p. 359-361, 2012.
- ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature reviews genetics**, v. 5, n. 6, p. 435-445, 2004.
- ELLIS, J. R.; BURKE, J. M. EST-SSRs as a resource for population genetic analyses. **Heredity**, v. 99, n. 2, p. 125-132, 2007.
- EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the *software STRUCTURE*: a simulation study. **Molecular ecology**, v. 14, n. 8, p. 2611-2620, 2005.
- EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular ecology resources**, v. 10, n. 3, p. 564-567, 2010.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Introduction to conservation genetics**. Cambridge university press, 2009.
- GARZA, J. C.; WILLIAMSON, E. G. Detection of reduction in population size using data from microsatellite *loci*. **Molecular ecology**, v. 10, n. 2, p. 305-318, 2001.
- GOLDSTEIN, D. B. *et al.* An evaluation of genetic distances for use with microsatellite *loci*. **Genetics**, v. 139, n. 1, p. 463-471, 1995.
- GOMES, L. A Coruja no mundo. **Diálogo Médico**, São Paulo, v. 1, n.2, p. 34-37, 2005

GOMES, F. B. R.; BARREIROS, M. H. M.; SANTANA, T. B. K. Novos registros da expansão geográfica de *Athene cunicularia* na Amazônia central com especial referência as atividades humanas. **Atualidades Ornitológicas**, v. 172, p. 12-14, 2013.

GOOGLE EARTH-MAPAS. Disponível em <<https://earth.google.com/web>> Acesso em 15/02/2021

GRIMM, N. B. *et al.* Global change and the ecology of cities. **Science**, v. 319, n. 5864, p. 756-760, 2008.

HAUSER, L. *et al.* Loss of microsatellite diversity and low effective population size in an overexploited population of New Zealand snapper (*Pagrus auratus*). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 18, p. 11742-11747, 2002.

HÖFLING, E.; DE ALMEIDA CAMARGO, H. F. Aves no campus da cidade universitária Armando de Salles Oliveira. **Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo**, ed. 3, 2008.

HOLSINGER, K. E.; WEIR, B. S. Genetics in geographically *STRUCTURE* populations: defining, estimating and interpreting F_{ST} . **Nature Reviews Genetics**, v. 10, n. 9, p. 639-650, 2015.

JULIAN, S. E.; KING, T. L.; SAVAGE, W. K. Isolation and characterization of novel tetranucleotide microsatellite DNA markers for the spotted salamander, *Ambystoma maculatum*. **Molecular Ecology Notes**, v. 3, n. 1, p. 7-9, 2003.

KALINOWSKI, S. T.; TAPER, M. L.; MARSHALL, T. C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular ecology**, v. 16, n. 5, p. 1099-1106, 2007.

KÖNIG, C.; WEICK, F. **Owls of the world**. A&C Black, 2008.

KORFANTA, N. M.; MCDONALD, D. B.; GLENN, T. C. Burrowing Owl (*Athene cunicularia*) population genetics: a comparison of North American forms and migratory habits. **The Auk**, v. 122, n. 2, p. 464-478, 2005.

KORFANTA, N. M.; SCHABLE, N. A.; GLENN, T. C. Isolation and characterization of microsatellite DNA *primers* in burrowing owl (*Athene cunicularia*). **Molecular Ecology Notes**, v. 2, n. 4, p. 584-585, 2002.

- LANDE, R. Demographic stochasticity and Allee effect on a scale with isotropic noise. **Oikos**, p. 353-358, 1998.
- LANKAU, R. *et al.* Incorporating evolutionary principles into environmental management and policy. **Evolutionary Applications**, v. 4, n. 2, p. 315-325, 2011.
- LEE, C-R.; MITCHELL-OLDS, T. Quantifying effects of environmental and geographical factors on patterns of genetic differentiation. **Molecular ecology**, v. 20, n. 22, p. 4631-4642, 2011.
- LEE, W-J; KOCHER, T. D. Microsatellite DNA markers for genetic mapping in *Oreochromis niloticus*. **Journal of Fish Biology**, v. 49, n. 1, p. 169-171, 1996.
- LEPAGE, D.; WARNIER, J. **The Peters' check-list of the birds of the world (1931–1987) database**. Avibase, the World Database. 2014.
- LEUPIN, E. E.; LOW, D. J. Burrowing Owl reintroduction efforts in the Thompson-Nicola region of British Columbia. **Journal of Raptor Research**, v. 35, n. 4, p. 392-398, 2001.
- LEVINS, R. Some demographic and genetic consequences of environmental heterogeneity for biological control. **American Entomologist**, v. 15, n. 3, p. 237-240, 1969.
- MACÍAS-DUARTE, A. *et al.* Novel microsatellite *loci* for the burrowing owl *Athene cunicularia*. **Conservation Genetics Resources**, v. 2, n. 1, p. 67-69, 2010.
- MACÍAS-DUARTE, A. *et al.* Genetic variation among island and continental populations of Burrowing Owl (*Athene cunicularia*) subspecies in North America. **Journal of Raptor Research**, v. 53, n. 2, p. 127-133, 2019.
- MAPBIOMAS. Disponível em < <http://mapbiomas.org> > Acesso em 15/02/2021.
- MARTÍNEZ, G. *et al.* Microscale nest-site selection by the burrowing owl (*Athene cunicularia*) in the pampas of Argentina. **The Wilson Journal of Ornithology**, v. 129, n. 1, p. 62-70, 2017.
- MARZLUFF, J. M. Worldwide urbanization and its effects on birds. In: **Avian ecology and conservation in an urbanizing world**. Springer, Boston, MA, p. 19-47, 2001.
- MCKINNEY, M. L. Urbanization as a major cause of biotic homogenization. **Biological conservation**, v. 127, n. 3, p. 247-260, 2006.
- MENQ, W. Aves de rapina da Mata Atlântica. **Aves de rapina Brasil**, 2016..

- MOTTA-JUNIOR, J. C.; ALHO, C. J. R. Ecologia alimentar de *Athene cunicularia* e *Tyto alba* (Aves: Strigiformes) nas Estações Ecológica de Jataí e Experimental de Luiz Antônio, SP. **Estação Ecológica de Jataí**, v. 1, p. 346, 2000.
- MOTTA-JUNIOR, J. C.; BUENO, A. A.; BRAGA, A. C. R. Corujas brasileiras. **Departamento de Ecologia, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo**, 2006.
- OKSANEN, F. J. *et al.* vegan: Community Ecology Package. R package version 2.5-7. 2020. Disponível em <<https://CRAN.R-project.org/package=vegan>> Acesso em 15/08/2021.
- PIMM, S. L.; RAVEN, P. Extinction by numbers. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 843-845, 2000.
- POMPANON, F. *et al.* Genotyping errors: causes, consequences and solutions. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, n. 11, p. 847-859, 2005.
- PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. Biologia da Conservação. 2001.
- PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population *STRUCTURE* using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945-959, 2000.
- R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Austria, 2020. Disponível em <<https://www.R-project.org/>> Acesso em 15/08/2021.
- RODRÍGUEZ, A.; OROZCO-VALOR, P. M.; SARASOLA, J. H.. Artificial light at night as a driver of urban colonization by an avian predator. **Landscape Ecology**, v. 36, n. 1, p. 17-27, 2021.
- ROSA, J. G. **Ave, Palavra**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, p. 194, 1985.
- SANTOS, E. G. **Aves em aeroportos: avaliação de translocações de *Athene cunicularia* na região de Brasília-DF**. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Universidade de Brasília. Brasília, 2019.
- SANTOS, C. B. *et al.* Do mau agouro à arte: a coruja no imaginário popular. **Revista de Educação do IDEAU**, v. 10, n. 22, p. 1-13, 2015.
- SCHLÖTTERER, C.; TAUTZ, D. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic acids research*, v. 20, n. 2, p. 211-215, 1992.
- SCHWARTZ, M. K.; LUIKART, G.; WAPLES, R. S. Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management. **Trends in ecology & evolution**, v. 22, n. 1, p. 25-33, 2007.
- SICK, H.; BARRUEL, P. **Ornitologia brasileira**. Editora Nova Fronteira, 1997.

- SIH, A.; FERRARI, M. C. O.; HARRIS, D. J. Evolution and behavioural responses to human-induced rapid environmental change. **Evolutionary applications**, v. 4, n. 2, p. 367-387, 2011.
- SILVER, R.; ANDREWS, H.; BALL, G. F. Parental care in an ecological perspective: a quantitative analysis of avian subfamilies. **American Zoologist**, v. 25, n. 3, p. 823-840, 1985.
- SLATKIN, M. Gene flow and the geographic structure of natural populations. **Science**, v. 236, n. 4803, p. 787-792, 1987.
- SPECHT, G. V. A.; GONÇALVES, G. L.; YOUNG, R. J. Comportamento de caça da coruja-buraqueira, *Athene cunicularia* (Molina, 1782) (Aves: Strigiformes) em ambiente urbano em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. **Lundiana: International Journal of Biodiversity**, v. 11, n. 1, p. 17-20, 2013.
- TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic acids research**, v. 17, n. 16, p. 6463-6471, 1989.
- THOMSEN, L. Behavior and ecology of burrowing owls on the Oakland Municipal Airport. **The Condor**, v. 73, n. 2, p. 177-192, 1971.
- TOMMASO, D. C. *et al.* Dieta de la Lechucita Vizcachera (*Athene cunicularia*) en dos áreas con diferente uso de la tierra en el centro-sur de la provincia de La Pampa, Argentina. 2009.
- VAN OOSTERHOUT, C. *et al.* MICRO-CHECKER: *software* for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, n. 3, p. 535-538, 2004.
- WANG, X. *et al.* A new electrophoresis technique to separate microsatellite alleles. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 11, 2009.
- WINKLER, D. W.; BILLERMAN, S. M.; LOVETTE, I. J. Owls (Strigidae), version 1.0. In **Birds of the World** (S. M. Billerman, B. K. Keeney, P. G. Rodewald, and T. S. Schulenberg, Editors). Cornell Lab of Ornithology, Ithaca, NY, USA. 2020.
- WikiAves. [coruja-buraqueira (*Athene cunicularia*)]. **WikiAves, a Enciclopédia das Aves do Brasil**. 2021. Disponível em: <<https://www.wikiaves.com.br/wiki/coruja-buraqueira>>. Acesso em 31/05/2021.

TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

Autorizo a reprodução xerográfica do presente Trabalho de Conclusão, na íntegra ou em partes, para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 08/10/2021



Assinatura do autor