



Universidade de Brasília
Instituto de Biologia
Departamento de Ecologia

Coloração estrutural iridescente do tiziu (*Volatinia jacarina*, Aves:Emberizidae): Mecanismos de produção, variação e função



Rafael Maia Villar de Queiroz

Orientadora: Regina H. F. Macedo

Dissertação apresentada ao Departamento de Ecologia da Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ecologia.

Brasília, 2008



Universidade de Brasília
Instituto de Biologia
Departamento de Ecologia

Coloração estrutural iridescente do tiziu (*Volatinia jacarina*, Aves:Emberizidae): Mecanismos de produção, variação e função

Rafael Maia Villar de Queiroz

Orientadora: Regina H. F. Macedo

Dissertação apresentada ao Departamento de Ecologia da Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ecologia.

Brasília, 2008

RAFAEL MAIA VILLAR DE QUEIROZ

Coloração estrutural iridescente do tiziu (*Volatinia jacarina*,
Aves:Emberizidae): Mecanismos de produção, variação e função

Dissertação aprovada junto ao Programa de Pós Graduação em Ecologia da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ecologia

Banca Examinadora:

Profa. Regina H. F. Macedo
Orientador – UnB

Profa. Marina Anciães
Membro Titular – INPA

Prof. Valdir F. Pessoa
Membro Titular – UnB

Prof. Miguel Â. Marini
Suplente – UnB

Brasília, março de 2008

Sumário

Agradecimentosiii

Resumo vi

Abstractvii

Capítulo 1: Caracterização nanoestrutural de bárbulas de penas de machos de tiziu

(*Volatinia jacarina*) e mecanismos de produção de cor 1

INTRODUÇÃO 1

METODOLOGIA 7

Área de estudos e coleta de amostras 7

Espectrofotometria 8

Microscopia Eletrônica 9

Modelagem ótica 11

RESULTADOS 15

Nanoestrutura das bárbulas 15

Modelagem ótica 17

DISCUSSÃO 22

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 29

Capítulo 2: Grandões ou apressadinhos: vias alternativas para a expressão de

ornamentos em machos de tiziu (*Volatinia jacarina*)..... 35

INTRODUÇÃO 35

METODOLOGIA 38

Área de estudos e coleta de amostras.....	38
Espectrofotometria	39
Características da coloração.....	40
Análises estatísticas.....	43
RESULTADOS	44
DISCUSSÃO	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

Capítulo 3: Características de plumagem variam com idade, filopatria e estação

reprodutiva em machos de tiziu (<i>Volatinia jacarina</i>)	62
INTRODUÇÃO	62
METODOLOGIA	65
Área de estudos e coleta de amostras	65
Espectrofotometria	67
Características da coloração.....	68
Análises estatísticas.....	72
RESULTADOS	74
DISCUSSÃO	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
Apêndice I – Script para cálculo de matrizes do modelo ótico de filme fino	94

Agradecimentos

Principalmente com a minha memória, que adora me deixar na mão, escrever agradecimentos é inevitavelmente esquecer algumas pessoas importantes, mas vou fazer o melhor que posso!

Primeiramente à minha incrível mãe, que me apoiou e me estimulou em todas as minhas decisões acadêmicas, e fez de tudo para que meu caminho fosse o mais tranquilo e proveitoso possível. Você é espetacular, e duvido que um dia eu consiga demonstrar o quão grato eu sou por tudo. Obrigado.

À minha também incrível orientadora Regina Macedo, cuja paixão pelo estudo do comportamento animal me contagiou, e cujos profissionalismo, carinho e atenção fizeram do meu período no laboratório o melhor da minha vida acadêmica. Espero um dia corresponder às suas expectativas, e retribuir tudo que você fez por mim. Obrigado.

À minha ajudante de campo, revisora de texto, e principalmente companheira de vida, Débora Goedert. Ter você ao meu lado torna cada dia o melhor de todos. Estar com você todos esses dias me dá força e vontade de ser um homem melhor que ontem. O que seria de mim sem você? =) Amo você.

À minha família, em especial Gustavo, Carmem, Paula e Vó Zuita. Espero que esse monte de papel justifique tanta viagem e tanto tempo no laboratório! Pelo apoio e pelo carinho, constantes e incondicionais, Obrigado.

Aos amigos e “comparsas no crime” Raphael Igor Dias, Eduardo Santos, Daniel Paz, Marcos “Roca” Lima e Carolina Bernardo, pelas inúmeras conversas no laboratório, fora dele, e nas viagens juntos. Vocês tornam fácil saber como eu quero ser “quando crescer”. Obrigado.

Aos colegas “tiziólogos” que me acompanharam nesses anos de campo, em especial aos grandes amigos Matheus Andreozzi, Alexandre Dias, Henrique Veloso e Marcelo Moraes. Pular da cama todo dia de madrugada foi mais fácil por saber que vocês iam segurar a minha

onda por lá! Também à Luiza Brasileiro e ao Roberto Victor, pela ajuda e pelas conversas no lab. À Thaís Aguilar, responsável pelo meu primeiro contato com aves e com o tiziu, além de estimular minha curiosidade quanto a seu comportamento e evolução. Obrigado.

À profa. Sônia Nair Bão, por abrir-me as portas de seu laboratório, e em especial ao João Victor Caetano. Sem seu comprometimento e sua ajuda, parte desse trabalho teria sido simplesmente impossível. Aos profs. Júnio Rosa Cruz, Matthew Shawkey e Shinya Yoshioka, que, de perto ou de longe, foram imprescindíveis por investirem tempo e me ajudarem a aprender física e ótica “na velocidade da luz”! Obrigado.

Aos colegas ornitólogos Daniel Gressler, Luane Santos, Nadinni Souza e Lilian Tonica, pelas conversas, discussões e desesperos coletivos com os bichos que não param de dar trabalho. Obrigado.

Aos colegas de pós e de UnB Fabricius Maia, Pedro de Podestà e Marcela Brasil (República da uva!); Mari Schneider, Gabriel Horta, Felipe Gawryszewski, Juliano Carregaro, Stefano Aires, Daniel Pessoa, Pedro Ivo Pellicano, Jesine Falcão, Eduardo Perini, Sérgio Henrique, Alexandre Avelino, Marcos Macedo, Saulo Andrade e Carlos Maximiliano, por todo o tempo compartilhado nesses dois anos (em alguns casos, até mais!). As conversas acadêmicas só não ensinaram mais que o “besteirol” desenvolvido em conjunto. Em especial, agradeço ao Leandro Ambrósio, por ter tido o tempo e a paciência de me ajudar com as fotos das penas em macro. Obrigado!

Ao amigo-irmão e ídolo Rogério Lionzo, por me deixar explorar seu incrível talento (que pode ser visto nas ilustrações dessa tese!), que só não é maior que sua amizade. Por me servir de exemplo de uma pessoa incrível e bem-sucedida por querer ser o melhor no que gosta de fazer, Obrigado.

À profa. Maria Luiza Gastal e ao prof. Paulo Abrantes, por me mostrarem que há na biologia um mundo muito maior e mais bonito que apenas a coleta e análise de dados. Por me

ensinarem a entender a importância da filosofia da biologia, e com isso me tornar um pesquisador mais competente e preparado, um enorme Obrigado.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior), pela bolsa de estudos que permitiu a execução desse projeto. Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia pelo apoio logístico, aos professores pelos ensinamentos e funcionários pela ajuda. Ao pessoal da FAL/UnB, que permitiu e facilitou nosso projeto lá. À Animal Behavior Society e à National Geographic Society, pelo financiamento, essencial para o andar do trabalho. À American Ornithologists Union, Arizona State University e à Universidad de Chile, pelas bolsas de viagem para congressos. Obrigado.

À Marina Anciães, por vir de tão longe, primeiro para nos ensinar a usar o espectrofotômetro, e agora para participar da minha banca. Aos professores Valdir Pessoa e Miguel Marini, por aceitarem meu convite e contribuírem com suas críticas e sugestões. Obrigado.

E por último, mas definitivamente não menos importante, a todos os meus amigos que me ajudavam a lembrar que há uma vida fora da UnB! Em especial ao Bruno Bueno, que redefiniu como eu definia “amizade”. Também em especial a Eduardo Penna e Guilherme Abbad, muitíssimo Obrigado! Fernando “Amilgo”, Fred, Marquinhos, Marina, Paulo; Gabriel, Anne, Daniel e Eric (Warhammer!); Obrigado! Babi, por além de tudo ainda me agilizar as viagens! Aos amigos de longe, mas não menos presentes, meus afilhados Alexandre e Emanuelle (saudades tremendas!); Rodrigo Martin e Bruno Thomaz. “Obrigado” às dúzias para vocês!

Três páginas, e eu tenho certeza que ainda vou esquecer algumas pessoas. A essas, obrigado e desculpas. Espero que isso reflita como eu sou grato e me sinta em dívida com tantas pessoas. Obrigado, obrigado, obrigado a todos por tudo!

Resumo

Coloração estrutural é aquela produzida pela interação da luz com estruturas nanométricas de diferentes índices de refração, que irão reforçar a reflexão de determinados comprimentos de onda. Uma das características particulares a esse tipo de coloração é que as estruturas podem estar organizadas de forma a produzir uma coloração que muda suas características de acordo com o ângulo de incidência da luz e de observação; esse tipo de coloração é denominado coloração iridescente. Dessa forma, utilizando como modelo de estudo o tiziu (*Volatinia jacarina*), cujos machos apresentam durante a estação reprodutiva uma plumagem nupcial negro-azulada iridescente, de origem estrutural, essa dissertação teve como objetivos: (1) caracterizar nanoestruturalmente as bárbulas das penas da plumagem nupcial de machos de tiziu, identificando as estruturas e os mecanismos responsáveis pela produção de sua cor; (2) verificar possíveis fontes de variação em características da coloração, relacionadas a aspectos ecológicos e sociais da espécie; e (3) testar hipóteses adaptativas relativas ao conteúdo de informação que esses sinais visuais podem conter. Para atingir esses objetivos, foram combinadas metodologias de trabalho de campo, espectrofotometria, microscopia eletrônica e modelagem ótica. As estruturas responsáveis pela produção de cor nas bárbulas analisadas são uma camada delgada de queratina e a camada de melanina que se encontra abaixo dessa. Alterações das propriedades óticas da melanina oferecem melhores modelos preditivos da cor, sugerindo diferenças em relação ao conhecimento acumulado na literatura até o presente momento. Foram identificadas relações entre características da coloração e aspectos da qualidade individual e da idade dos machos, sugerindo que essa característica possa ser um sinal honesto na comunicação visual dessa espécie.

Palavras-chave: Seleção sexual, ornamentos sexuais, hipótese da desvantagem, maturação atrasada de plumagem, modelagem de filme fino, filopatria.

Abstract

Structural coloration is produced through the interaction of light with nanometric structures of different refractive indexes, which results in reinforcement in the reflection of certain wavelengths. A peculiar characteristic of this type of color is that structures may be organized so that color properties change in relation to the angle of incidence of the light and of the observer; this kind of color is called iridescent coloration. Thus, using the Blue-black Grassquit (*Volatinia jacarina*), a species in which males molt to a structural blue-black iridescent plumage during reproduction, as a model organism, the objectives of this dissertation were (1) to nanostructurally characterize feather barbules from male nuptial plumage, identifying structures and mechanisms responsible for color production; (2) to verify possible sources of variation in color characteristics associated to ecological and social aspects of this species; and (3) to test for adaptive hypotheses as to the information content that such visual signals may have. To meet these objectives, field, spectrometry, electron microscopy and optical modeling methodologies were combined. A thin keratin layer over a melanin layer are responsible for color production in the analyzed barbules. Changes in melanin optical properties, however, resulted in better predictive models, suggesting differences as to what has been published so far. Relationships between coloration characteristics and male quality and age were also identified, suggesting that this characteristic may be an honest signal in this species' visual communication system.

Keywords: Sexual selection, sexual ornaments, handicap hypothesis, delayed plumage maturation, thin-film modelling, philopatry.

Capítulo 1

Caracterização nanoestrutural de bárbulas de penas de machos de tiziu (*Volatinia jacarina*) e mecanismos de produção de cor

INTRODUÇÃO

A sinalização visual exerce um papel essencial na comunicação de aves, fato este que pode ser constatado pela visão altamente acurada de cores (Cuthill 2006), além da diversidade e ubiquidade de ornamentos e colorações encontradas nesse táxon (Gill 1994). Em interações sociais, aspectos da coloração de caracteres sexuais secundários podem prover diversas informações a respeito do indivíduo, tais como sua qualidade genética (Figuerola et al. 1999), agressividade (Part & Qvarnström 1997), ou estratégia de investimento na prole (Badyaev & Hill 2002), podendo assim influenciar a sua resposta em interações agonísticas (Alonso-Alvarez et al. 2004) ou intersexuais (Yezerinac & Weatherhead 1997).

Existem basicamente duas formas de produção de cor em penas de aves. Cores pigmentárias são produzidas devido às propriedades químicas dos pigmentos e de sua concentração nas penas, pois irão absorver e refletir diferenciadamente os comprimentos de onda. Os principais grupos de pigmentos envolvidos nesse processo são os carotenóides (responsáveis pelos tons vermelhos, laranjas e amarelos; McGraw 2006a) e as melaninas (que produzem cores negras, marrons e tons rufos; McGraw 2006b). Entretanto, esses pigmentos e suas combinações não produzem todos os tons de cores observados em aves; por exemplo, não existem pigmentos azuis conhecidos (Bagnara et al. 2007), e raríssimos casos de pigmentos verdes (McGraw 2006c).

De fato, cores podem ainda ser produzidas não devido a propriedades químicas de pigmentos, mas por propriedades físicas das estruturas da pena. Quando a luz interage com estruturas nanométricas de diferentes índices de refração e proporcionais ao seu comprimento de onda, diversos tons de azul, violeta e ultra-violeta podem ser produzidos; esse tipo de coloração é denominado coloração estrutural (Prum 2006). Nas penas de aves, os principais materiais responsáveis por esse fenômeno são a queratina, a melanina (que pode ou não ser encontrada em grânulos, denominados melanossomas) e o ar.

Embora o espectro ultra-violeta não seja visível ao olho humano, diversos estudos com aves já identificaram evidências de que pelo menos 57 espécies são capazes de enxergar nesse espectro (Cuthill et al. 2000; Cuthill 2006). Esses estudos abrangem técnicas que variam de avaliações comportamentais a estudos eletrofisiológicos e seqüenciamento de genes que codificam opsinas de cones que absorvem luz violeta ou ultravioleta. Além disso, há evidência de que espécies de pelo menos 15 de 23 ordens estudadas, incluindo passeriformes, apresentam visão tetracromática (Mullen & Pohland 2008). Embora ainda exista um questionamento quanto ao espectro ultra-violeta representar um papel especial na comunicação das aves ou ser apenas mais um canal cromático (Banks 2001; Hausmann et al. 2003), a ubiquidade da produção de cor nesse espectro e o papel das nanoestruturas de penas nesse processo não devem ser subestimados (Eaton & Lanyon 2003).

A coloração estrutural pode ser derivada da dispersão incoerente ou coerente das ondas de luz refratadas (Prum 2006). Modelos de dispersão incoerente assumem que a dispersão resultante da interação com partículas de índice de refração diferentes são independentes ou aleatórias e, portanto, as ondas de luz não interferem umas com as outras. Exemplos de cores resultantes de dispersão incoerente incluem o azul do céu e o branco de alguns animais, incluindo penas. Essa situação ocorre principalmente quando as partículas estão espalhadas desordenadamente e são grandes quando comparadas ao comprimento de

onda. Nesse caso, apenas o tipo, o tamanho, o formato e a quantidade das partículas refratárias são relevantes na produção de cor (Prum & Torres 2003).

Já modelos de dispersão coerente assumem que o tamanho e a distribuição das partículas refratárias estão de tal modo ordenadas que permitem uma interação não-aleatória entre os comprimentos de onda. Nesse caso, a estrutura pode ser chamada de cristal fotônico: cristal, por ter um arranjo ordenado de posição e rotação, e fotônico por interagir e modificar a luz incidente (Kinoshita & Yoshioka 2005a). Estruturas cristalinas podem ter organização em uma dimensão (por exemplo, lâminas finas empilhadas alternadamente; nesse caso, a estrutura é conhecida como um filme fino), duas (repetições na vertical e na horizontal) ou até em três dimensões (organizadas na vertical, horizontal, e em profundidade). A interação entre as ondas refratadas de diferentes comprimentos é responsável pela cor produzida: ondas de um certo comprimento que estão em fase quando refratadas se reforçam (e portanto se destacam na cor produzida), enquanto ondas fora de fase se anulam (diminuindo sua percepção pelo observador). Assim, não só as características citadas no caso da dispersão incoerente, mas também a ordenação espacial das partículas, são relevantes para determinar em que comprimento de onda a luz incidente será particularmente refletida (Prum & Torres 2003).

Em penas de aves, sistemas uni- e bidimensionalmente organizados já foram descritos (e.g. Greenwalt et al. 1960a,b; Prum et al. 1998; Andersson 1999; Zi et al. 2003), e técnicas avançadas de ressonância magnética estão sendo empregadas para investigar se o córtex medular de barbas de penas pode funcionar como cristais fotônicos tridimensionais (M. Shawkey, dados não publicados). Penas que funcionam como sistemas refratores unidimensionais ou bidimensionais podem possuir também a propriedade de serem iridescentes. Uma plumagem com coloração iridescente é aquela que muda suas propriedades, principalmente o matiz, de acordo com o ângulo de incidência da luz (Osorio & Ham 2002).

Esse tipo de coloração é resultante de dispersão coerente da luz através de estruturas laminares, onde o ângulo afeta a distância ótica (definida como a distância linear multiplicada pelo índice de refração) percorrida e conseqüentemente as relações de fase das ondas refratadas, alterando assim os comprimentos de onda reforçados e anulados e a cor percebida (Kinoshita & Yoshioka 2005b).

As nanoestruturas nas bárbulas de penas podem organizar-se de diversas formas para gerar iridescência, resultando em uma grande variabilidade interespecífica em estruturas e cores iridescentes refletidas. Machos do pássaro-caramanchão-cetim (*Ptilonorhynchus violaceus*), por exemplo, apresentam em suas bárbulas melanossomas organizados formando uma camada espessa no interior da matriz queratinosa, sob uma fina camada de queratina, formando um sistema no qual uma camada de queratina sobrepõe-se a uma superfície absorvente. Isso resulta em uma plumagem estrutural iridescente que reflete principalmente na faixa do azul ao ultra-violeta (Doucet et al. 2006). Em diversos icterídeos, uma estrutura (e um espectro de reflectância) similar é encontrada, tendo sido demonstrado, inclusive, que a transição evolutiva de uma plumagem negra opaca para uma iridescente é resultado da organização dos grânulos de melanina na medula da bárbula (Shawkey et al. 2007).

A formação de uma camada de melanina, no entanto, não é necessária para a produção de cores iridescentes em penas. No pombo doméstico (*Columba livia*), por exemplo, a queratina da bárbula forma um anel oco e, embora em seu interior sejam encontrados grânulos de melanina, estes não se encontram suficientemente organizados para formar uma camada nítida (Yoshioka et al. 2007). O resultado é a formação de um filme fino de queratina sobre um substrato (ar) com índice de refração inferior ao da queratina, o que resulta na coloração iridescente verde-violeta observada nas penas do pescoço dos indivíduos dessa espécie (Yin et al. 2006). A espessura da camada de queratina determina se a pena terá uma cor violeta com

incidência de luz perpendicular, transitando para o verde com o aumento do ângulo de incidência, ou vice-versa (Yoshioka et al. 2007).

Além dessas estruturas simples de uma camada, outras mais complexas já foram descritas para penas de aves. Algumas espécies de beija flor (família Trochilidae) possuem, por exemplo, melanossomas ovais e ocos, adicionando assim interfaces entre os três elementos (queratina, melanina e ar; Greenwalt et al. 1960a), embora estes ainda caracterizem um cristal fotônico unidimensional (pois essa variação continua ocorrendo somente no sentido córtex-medula da bábula). Além disso, camadas múltiplas desses grânulos (entre 7 e 15) resultam nas cores extremamente saturadas e brilhantes encontradas nessas espécies (Greenwalt et al. 1960b). As penas da cauda do pavão, por outro lado, são um exemplo de cristal fotônico bidimensional, com melanossomas e vacúolos de ar organizados periodicamente nos sentidos transversal e longitudinal das bábulas. As diferentes cores encontradas nessas penas extremamente ornamentadas são simplesmente o resultado de variações nas características dessa estrutura, como a espessura da camada de queratina, o arranjo dos grânulos ou ainda a curvatura da bábula (Yoshioka & Kinoshita 2002; Zi et al. 2003). Até mesmo as cores marrons da cauda nessa espécie, geralmente atribuídas a processos pigmentares, têm sido caracterizadas como estruturais (Li et al. 2005).

Modelos óticos de filme-fino são ferramentas úteis para o estudo de coloração estrutural iridescente pois permitem, com base nas características morfológicas (espessura e organização) e óticas (índices de refração e coeficientes de extinção), prever o comportamento da luz quando encontra essas estruturas. Dessa forma, é obtida a “cor teórica” produzida pela estrutura, que pode ser comparada aos dados empíricos e assim testar se a coloração medida é realmente produzida por aquelas estruturas e por aquela organização. Estes modelos permitem ainda testar as próprias características óticas das estruturas, alterando seus valores e comparando a aderência dos modelos gerados ao obtido experimentalmente.

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar a produção de cor por penas de machos de tiziu, *Volatinia jacarina*. Nessa espécie, fatores comportamentais e morfológicos estão integrados em um contexto comunicativo que pode influenciar o resultado de interações sociais e ecológicas e, portanto, apresentar conseqüências na aptidão dos indivíduos. Sendo assim, esta é uma espécie potencial para o estudo de mecanismos proximais e evolutivos que atuam na produção e manutenção dessas características.

O tiziu é um Emberizidae granívoro que migra da Amazônia para o Brasil Central durante seu período reprodutivo, o qual coincide com o período chuvoso na região. Durante essa época, machos efetuam muda para uma plumagem negra-azulada iridescente, com manchas subaxilares brancas, e defendem territórios bastante pequenos e aglomerados (Murray Jr. 1982; Almeida & Macedo 2001). Nesses territórios, executam seu chamativo *display*, caracterizado por um salto vertical curto acompanhado do canto. A movimentação do indivíduo durante esse salto ressalta as tonalidades e o brilho de sua plumagem negra, além de resultar na exibição das conspícuas manchas brancas (Webber 1985).

Apesar de socialmente monogâmico, Carvalho e colaboradores (2006) encontraram que cerca de metade dos filhotes em uma população de tizius foram oriundos de cópulas extra-par e, portanto, sugeriram que sua morfologia e seu comportamento estariam fortemente integrados em um contexto de sinalização sexual. A plumagem em particular foi sugerida como uma característica que potencialmente sinaliza a qualidade individual dos machos, pois suas características de coloração estão associadas à sua condição corporal durante a muda (Doucet 2002) e à velocidade de sua muda, que por sua vez está associada à carga parasitária (Costa & Macedo 2005). Tendo em vista esse contexto, torna-se extremamente relevante compreender os processos envolvidos na produção dessa coloração. Assim, combinando técnicas de espectrofotometria, microscopia eletrônica e modelagem física das propriedades óticas de materiais refratores, este trabalho busca (1) caracterizar microestruturalmente a

região da pena responsável pela produção de cor na plumagem nupcial de tizius, (2) testar a aplicabilidade desses modelos teóricos para simular essa produção, e (3) avaliar a importância de cada uma das estruturas envolvidas no mecanismo de produção de cor.

METODOLOGIA

Área de estudos e coleta de amostras

A coleta de penas foi realizada durante duas estações reprodutivas, sendo a primeira entre 04 de novembro de 2005 e 22 de janeiro de 2006, e a segunda entre 13 de novembro de 2006 e 10 de janeiro de 2007. A área de estudos foi um pomar abandonado, inserido em uma matriz de cerrado preservado na Fazenda Água Limpa (15°56'S 47°56'W), uma fazenda experimental de propriedade da Universidade de Brasília. Nessa área, de aproximadamente 2,56 ha, foi demarcado um *grid* utilizando-se 86 estacas individualmente numeradas e distantes em 20m umas das outras.

Durante esse período, indivíduos foram capturados com o auxílio de 3 a 5 redes de neblina, armadas diariamente na área de estudos. Todos os indivíduos capturados foram marcados com uma anilha metálica numerada do CEMAVE, além de uma combinação única de três anilhas plásticas coloridas. De cada macho foram coletadas três penas da plumagem nupcial da cabeça, do manto e do peito, além de duas penas brancas de cada uma das manchas subaxilares. As penas foram fixadas com fita crepe a um cartão de papel com a identificação do indivíduo, que foi embalado em papel alumínio e mantido em ambiente fresco e seco para posteriores análises de coloração.

Espectrofotometria

Para as análises espectrais, as penas coletadas de cada região do corpo de cada indivíduo foram fixadas conjuntamente com fita crepe a um papel camurça negro, de forma a simular a organização dessas penas no corpo do pássaro. A reflectância dessas penas foi então medida utilizando-se um espectrofotômetro Ocean Optics USB4000 e uma fonte de luz de xenônio pulsante PX-2 (Ocean Optics, Dunedin, Florida), que fornece iluminação no espectro ultra-violeta e no visível para humanos (250-750nm). Luz não-polarizada foi utilizada em todas as medições, e as medidas de reflectância foram tomadas em relação a um branco padrão WS-1-SS (Ocean Optics, Dunedin, Florida).

Medidas de reflectância foram tomadas em duas geometrias de medição: perpendicular à superfície da pena, ou seja, tanto a luz incidente quanto a reflexão medida em paralelo à normal (daqui em diante, referida por “normal”), e com ambas as fibras de emissão e coleta de luz a 45° da normal (referida por “45”; Fig. 1.1). Para a geometria normal, foi utilizada uma fibra ótica bifurcada, com uma ponta ligada à fonte de luz e outra ao espectrofotômetro, e a ponta de leitura foi fixada a um segurador escuro para bloquear a leitura de fontes de luz que não a lâmpada. Para a geometria 45, foram utilizadas duas fibras óticas bifurcadas, sendo que uma estava ligada à fonte de luz e outra ao espectrofotômetro, e ambas as pontas sobressalentes encontravam-se protegidas da entrada de luz. Foi utilizado um segurador de fibra que permitia segurá-las no ângulo desejado e também as isolava da luz ambiente. Em ambos os casos, as fibras encontravam-se a aproximadamente 6mm da superfície da pena, proporcionando uma área de leitura de 2mm.

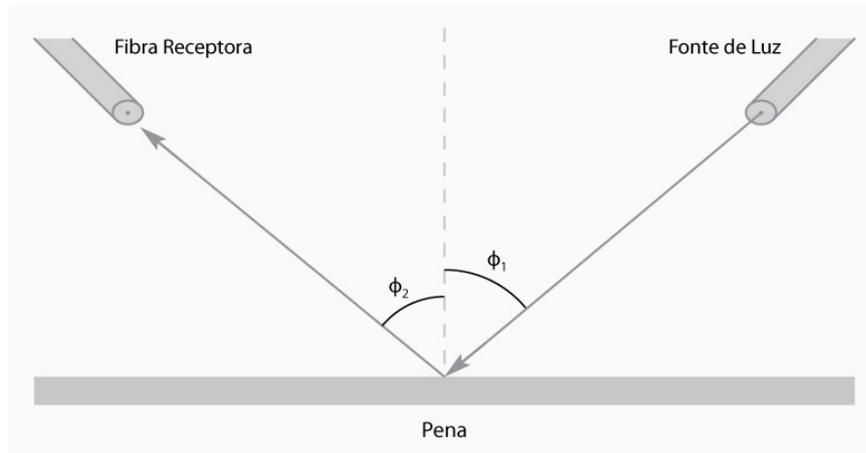


Figura 1.1. Desenho esquemático do sistema de geometria de medição. Os ângulos ϕ_1 e ϕ_2 aumentam de forma especular conforme a fonte de luz se distancia de uma incidência normal (perpendicular à superfície de medição). Medidas tomadas correspondem a 1) Normal: $\phi_1 = \phi_2 = 0$, e 2) 45: $\phi_1 = \phi_2 = 45^\circ$.

As medidas espectrais foram feitas com o programa SpectraSuite (Ocean Optics, Dunedin, Florida). Foram tomadas cinco medidas das penas de cada região do corpo em cada geometria, sendo que cada medida tomada constituía-se da média de 50 leituras individuais, utilizando um tempo de integração de 20 milissegundos e correção de *boxcar* de 30. Dos espectros obtidos, foi utilizada apenas a região entre 320-700nm, correspondendo ao espectro de visão comumente associado às aves (Cuthill 2006, Mullen & Pohland 2008), interpolando a porção decimal ao número inteiro inferior mais próximo, de modo a reduzir o número de pontos utilizado.

Microscopia Eletrônica

De cada um dos machos foram coletadas três barbas inteiras de penas do peito e/ou do manto para submeter à microscopia eletrônica de transmissão. Estas barbas foram preparadas utilizando um protocolo baseado em Andersson (1999), com modificações. As barbas foram

embebidas em solução de 0.25M NaOH por 30 minutos, e após dois banhos em H₂O destilada foram embebidas em mistura de ácido fórmico e etanol (2:3 v/v) por duas horas. Após serem novamente imersas em banho triplo em H₂O destilada, passou-se para a etapa de desidratação em soluções de H₂O destilada com crescentes concentrações de acetona (30%, 50%, 70% e 90% durante 15 minutos cada, finalizando em três imersões de 10 minutos em acetona 100%).

A inclusão em resina Spurr foi feita em soluções de acetona e crescentes concentrações de acetona:resina: 3:1 *overnight*, 2:1 por 6 horas, 1:1 *overnight*, 1:2 por 6 horas, 1:3 *overnight*, e finalmente em resina pura por 6 horas. Após essa etapa, as barbas foram inseridas em blocos de resina com a porção mais distal da barba na ponta do bloco, e deixadas em estufa a 60 °C por 48 horas para polimerizar. Após estudos preliminares, foi constatado que nesse processo as matrizes de queratina e os melanossomas são suficientemente eletrodensos para observação no microscópio, e portanto não foi realizada uma etapa de contraste em uranila e em citrato de chumbo para evitar acúmulo de sujeira no material.

As bárbulas preparadas foram então cortadas em um ultramicrotomo Leica Reichert Supernova (Leica Microsystems, Áustria) utilizando faca de diamante, obtendo-se cortes de 90nm de espessura que foram coletados em telas de 150 mesh. As telas foram observadas e fotografadas em microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM-1011 (80K volts; JEOL, Japão). Foram obtidas micrografias de três bárbulas (buscando pontos mais centrais, distantes de ambas as extremidades) da porção mais distal da barba de cada indivíduo para medição, com aumento de 10.000x. Para as medições, as imagens foram digitalmente aumentadas em 250%, resultando em um aumento final de 25.000x. Três medidas de nanoestruturas foram obtidas das micrografias das bárbulas: espessura do córtex de queratina, espessura da camada externa de melanina, e número de grânulos de melanina na camada externa. O diâmetro dos grânulos de melanina foi obtido dividindo-se a espessura da camada de melanina pelo número

de grânulos na camada. Cada uma dessas medidas foi tomada em seis pontos equidistantes na micrografia, e utilizou-se a média dessas medidas para cada indivíduo.

Modelagem ótica

Para determinar quais estruturas das bárbulas de penas de tiziu são responsáveis pela produção de sua cor, foi utilizado um modelo de matriz de transferência de filme fino (Jellison Jr. 1993). Esse modelo permite prever o comportamento da luz em superfícies reflexivas-refrativas sobrepostas, de espessura ótica (derivada da espessura da camada e de seu índice de refração) conhecida. O resultado obtido é o percentual da luz refletida para cada comprimento de onda, definindo assim o espectro de reflectância teórico para a estrutura em questão, que pode então ser comparado a resultados obtidos experimentalmente.

O modelo é composto de dois tipos de matrizes: as matrizes de interface (I) e de transferência (L). As matrizes de interface levam em consideração a refração na interface entre duas camadas, e é derivada do ângulo de incidência da luz e do índice de refração da luz. A matriz de interface de uma camada j é dada por

$$I_s = \begin{vmatrix} 1 & r_{j,s} \\ r_{j,s} & 1 \end{vmatrix}, \quad I_p = \begin{vmatrix} 1 & r_{j,p} \\ r_{j,p} & 1 \end{vmatrix}, \quad (1)$$

onde s e p correspondem aos componentes da polarização da luz perpendicular e paralelo ao plano de incidência, respectivamente. O comportamento da luz ao encontrar-se com uma interface varia de acordo com a sua polarização, e isso é representado pelo valor de r_j , de acordo com as expressões

$$r_{j,s} = (\tilde{n}_j \cos \phi_{j-1} - \tilde{n}_{j-1} \cos \phi_j) / (n_j \cos \phi_{j-1} + \tilde{n}_{j-1} \cos \phi_j),$$

$$r_{j,p} = (\tilde{n}_{j-1} \cos \phi_{j-1} - \tilde{n}_j \cos \phi_j) / (n_{j-1} \cos \phi_{j-1} + \tilde{n}_j \cos \phi_j),$$
(2)

sendo j a camada do material em questão, $j-1$ a camada imediatamente superior a ela, \tilde{n} o índice de refração complexo (definido por $\tilde{n} = n - ki$, onde n é o índice de refração real do material e k o seu índice de extinção, o componente da refração dependente do comprimento de onda). Como a luz sempre percorre o caminho mais rápido através de um material, o ângulo de incidência ao atingir uma determinada camada depende do ângulo de incidência inicial e do índice de refração do material do qual a camada é feita, e pode ser calculado de acordo com a lei de Snell ($\tilde{n}_{\text{inicial}} \sin \phi_{\text{inicial}} = \tilde{n}_j \sin \phi_j$).

As matrizes de transferência levam em consideração a absorção da luz, sendo derivada da energia da luz (seu comprimento de onda) e da grossura da camada de cada material. A matriz de transferência de uma camada j é dada por

$$L_j = \begin{vmatrix} e^{(ib_j)} & 0 \\ 0 & e^{(-ib_j)} \end{vmatrix}$$
(3)

sendo

$$b_j = (2\pi d_j \tilde{n}_j \cos \phi_j) / \lambda$$
(4)

onde d_j é a espessura da camada j e λ é o comprimento de onda da luz.

A matriz de dispersão total é, então, dada por

$$S_s = \left(\prod_1^N I_{j,s} L_j \right) I_{N+1_s}, \quad S_p = \left(\prod_1^N I_{j,p} L_j \right) I_{N+1_p}. \quad (5)$$

onde N é o número total de camadas, e $I_{(N+1_s)}$ é a interface entre a última camada e o substrato.

A amplitude de reflectividade (r) é dada por

$$r_s = S_{21_s}/S_{11_s}, \quad r_p = S_{21_p}/S_{11_p}, \quad (6)$$

e a reflectância final (R) é

$$R_s = r_s r_s^*, \quad R_p = r_p r_p^*, \quad (7)$$

eliminando assim o componente imaginário. Visto que em nossas análises utilizamos luz não polarizada, a reflectância final pode ser obtida pela média das reflectâncias polarizadas (Srinivasarao 1999). Para cada indivíduo foram utilizados os valores de espessura média das camadas de queratina e melanina, e índices de refração e coeficientes de extinção estimados foram obtidos na literatura para o ar ($n = 1,00$; $k = 0$), a queratina ($n = 1,56$; $k = 0,03$) e a eumelanina ($n = 2,00$; $k = 0,6$) (Land 1972; Brink & van der Berg 2004).

Para averiguar o tipo de organização responsável pela cor produzida nas bárbulas de penas de tiziu, foram testados dois conjuntos de modelos de filme fino, baseados na organização estrutural dos materiais na bárbula. O primeiro conjunto considera que a melanina sob o córtex de queratina encontra-se em uma matriz oca e não é suficientemente organizada para ser considerada um cristal fotônico, sendo portanto responsável somente por

reflexão difusa. Dessa forma, consideramos um conjunto de modelos nos quais há uma interface ar-queratina-ar-queratina. O segundo conjunto de modelos considera que a melanina forma uma camada organizada o suficiente para comportar-se como um cristal fotônico, e então o conjunto de interfaces encontrado é ar-queratina-melanina-queratina.

Cada conjunto de modelos foi composto por quatro modelos hipotéticos distintos, considerando diferentes combinações de interações da luz com os materiais (Fig. 1.2). O primeiro considera todas as interfaces encontradas em uma bábula: ou seja, considera que a luz encontra uma interface ar-queratina, atravessa a camada de queratina, encontra uma interface queratina-melanina, atravessa a camada de melanina, encontrando então a matriz interna de queratina, considerada como o substrato. O segundo modelo considera que a luz atravessa a camada de queratina e encontra as interfaces ar-queratina e queratina-melanina, sendo então totalmente absorvida pelo substrato de melanina. O terceiro modelo considera que a luz encontra a interface ar-queratina, atravessa uma camada transparente de queratina (ou seja, esta camada não afeta seu comportamento), encontra a interface queratina-melanina e atravessa a camada de melanina. Finalmente, o quarto modelo considera também a camada de queratina como transparente, mas considera que apenas as interfaces queratina-melanina, melanina-queratina e a camada de melanina interferem no caminho da luz.

No caso do conjunto de modelos ar-queratina-ar-queratina, substituiu-se os valores de refração da melanina pelos do ar. Embora somente o modelo 1 seja fisicamente relevante (por ser o único realmente possível, dado que a luz não pode evitar certas interfaces ou camadas), os demais modelos servem como base de apoio para a compreensão do efeito dessas camadas e interfaces na coloração resultante.

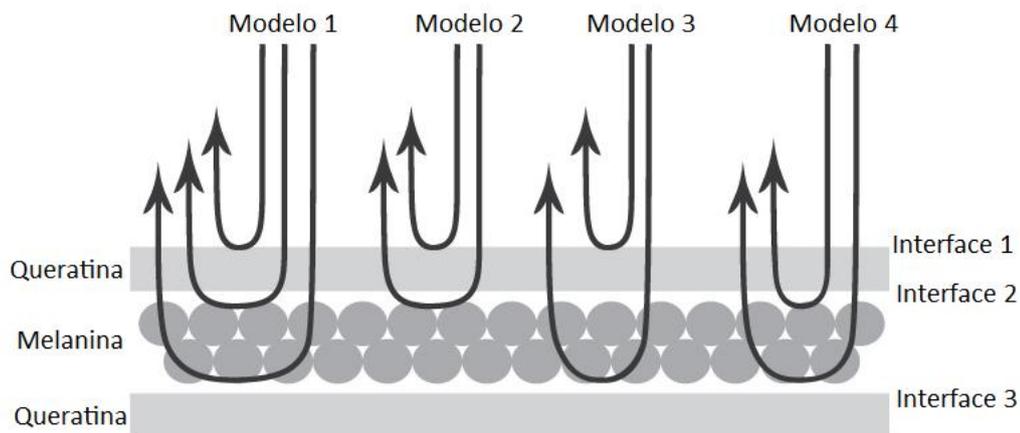


Figura 1.2. Desenho esquemático representando os quatro modelos óticos desenvolvidos (setas representam feixes de luz).

Os modelos foram calculados utilizando-se um *script* desenvolvido nesta dissertação para o programa R (R Development Core Team, 2007; disponível em <http://cran.r-project.org>), que pode ser encontrado no Apêndice I. A escolha do modelo mais apropriado para descrever a produção de cor por bárbulas de tiziu foi feita comparando-se visualmente as curvas obtidas pelos modelos e o espectro de reflectância médio dos espectros individuais de reflectância de penas do dorso dos indivíduos (Brink & van der Berg 2004; Doucet et al. 2006; Shawkey et al. 2007). Uma vez escolhido o melhor modelo, as propriedades óticas dos materiais foram alteradas para verificar se havia uma melhor aderência do espectro obtido ao espectro previsto.

RESULTADOS

Nanoestrutura das bárbulas

Foram obtidas e medidas micrografias de 28 indivíduos, totalizando 84 imagens analisadas. Podemos observar que, de fato, embora alguns grânulos encontrem-se espalhados pelo interior da matriz de queratina, vários destes se organizam em uma única camada sob o

córtex queratinoso (Fig. 1.3). A camada superior de queratina é relativamente fina e uniforme, enquanto a camada de melanina é consideravelmente mais grossa (Tabela 1.1).

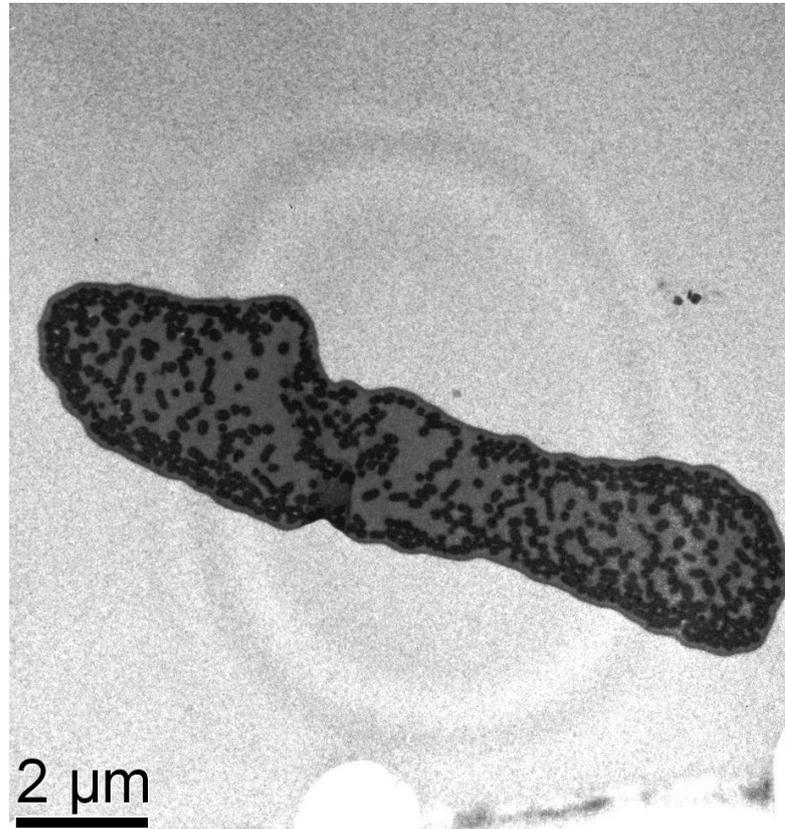


Figura 1.3. Micrografia de uma bárbula de pena negra de macho de tiziu (aumento de 10.000x)

Entre os indivíduos, o número de grânulos na camada de melanina variou entre 1 e 5, sendo que as camadas da maioria dos indivíduos são formadas por 2 a 3 grânulos. Embora a camada seja geralmente constituída de mais de um grânulo de espessura, não há formação de camadas discretas de queratina entre os grânulos, caracterizando de fato a camada de melanina como uma única camada. Esses grânulos encontram-se relativamente contíguos por toda a camada. Aliado a isso constata-se que o diâmetro desses grânulos é menor que 300 nm, o limite inferior do espectro visível para aves, o que confere a regularidade necessária para

que formem uma camada e não ocorra difração de forma independente para cada grânulo. Portanto, essa estrutura pode ser considerada um cristal fotônico unidimensional.

Tabela 1.1. Medidas das nanoestruturas de bárbulas de machos de tiziu, obtidas através de microscopia eletrônica de transmissão. Cada amostra corresponde à média de seis medidas de três bárbulas de cada indivíduo.

Variável	Média \pm EP (N = 28)
Espessura do córtex de queratina (nm)	127,17 \pm 1,95
Espessura da camada de melanina (nm)	416,75 \pm 11,51
Número de grânulos de melanina na camada	2,42 \pm 0,06
Diâmetro dos grânulos de melanina (nm)	177,82 \pm 4,63

Modelagem ótica

Podemos observar nas Figuras 1.4A e 1.4C que nenhum dos modelos considerando os melanossomas como inseridos em uma matriz oca oferece um espectro similar ao obtido através das medidas das penas de machos de tiziu. Entretanto, dois dos modelos que incluem a camada de melanina (modelos 1 e 2, Figs. 1.4B e 1.4D) resultaram em um espectro bastante similar ao obtido empiricamente. O formato da curva e o matiz (comprimento de onda de maior intensidade) dos modelos 1 e 2 se adequam relativamente bem ao espectro medido, além de terem o mesmo comportamento ao mudar o ângulo de incidência da luz: com o aumento do ângulo, há um aumento da saturação e um desvio do pico para comprimentos de onda mais baixos.

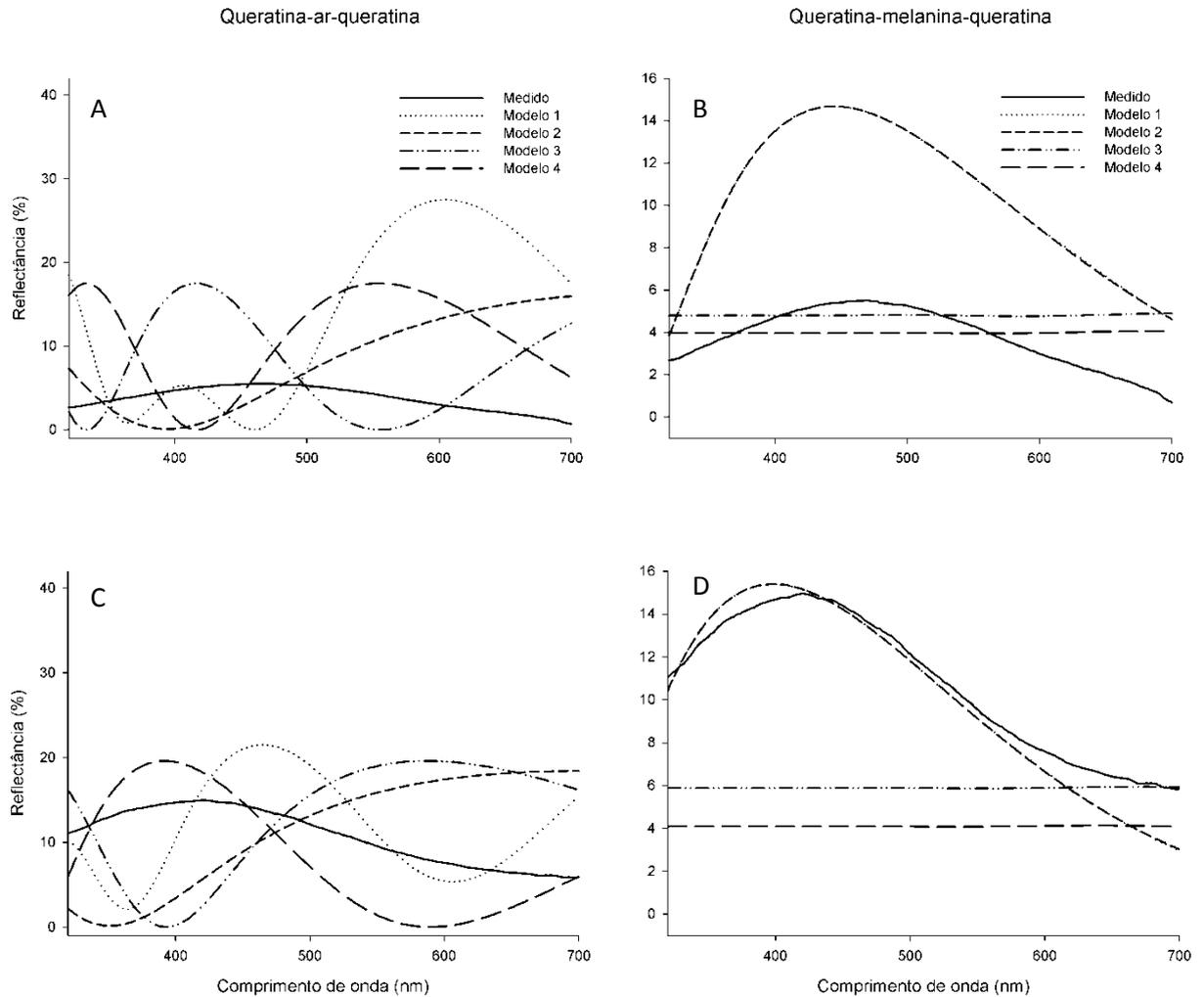


Figura 1.4. Espectros de reflectância obtidos das penas de machos de tiziu (linha sólida) e espectros teóricos obtidos utilizando diferentes modelos de filme fino (linhas tracejadas), considerando uma camada interna de ar (A e C) e de melanina (B e D), nas geometrias de incidência normal (A e B) e 45 (C e D).

A variação de brilho (área embaixo do espectro) entre os espectros medidos pode ser devido à variação na rotação das bárbulas das penas, que provavelmente apresentam brilho máximo perto de 45° (Osorio & Ham 2002). A diferença entre o brilho da curva medida e o esperado resulta do fato do espectro medido ter sido feito em relação a um branco padrão, e também por não terem sido coletados todos os fótons emitidos. Para isso, seria necessária a

utilização de uma esfera de integração, aparelho capaz de direcionar todos os feixes de luz difratados a um único ponto, onde é inserida a fibra receptora.

O fato dos modelos 1 e 2 terem espectros idênticos (e por isso indistinguíveis nas figuras 1.4B e 1.4D) mostra que a camada de melanina é isolante, pois o modelo 2 não considera a sua espessura. Já os modelos 3 e 4, que não consideram a espessura do córtex de queratina, resultaram em espectros bastante diferentes do observado, ressaltando assim o papel da camada de queratina na definição da cor observada.

Visto que há variação inter-individual na quantidade de grânulos de queratina na camada (Fig. 1.5A), e conseqüentemente de sua espessura, o modelo 1 foi calculado novamente, variando-se a espessura da camada de melanina proporcionalmente ao número de grânulos para verificar o efeito dessa variação no espectro resultante. Com isso, é possível observar que dois grânulos são suficientes para isolar completamente essa camada do interior da bábula (Fig. 1.5B). Assim, para uma camada de queratina de espessura média, uma camada de apenas 1 grânulo resulta em uma curva mais saturada e deslocada para comprimentos de onda mais longos (ou seja, em uma cor mais azul), enquanto uma camada com qualquer número de grânulos superior a 2 não altera a cor resultante.

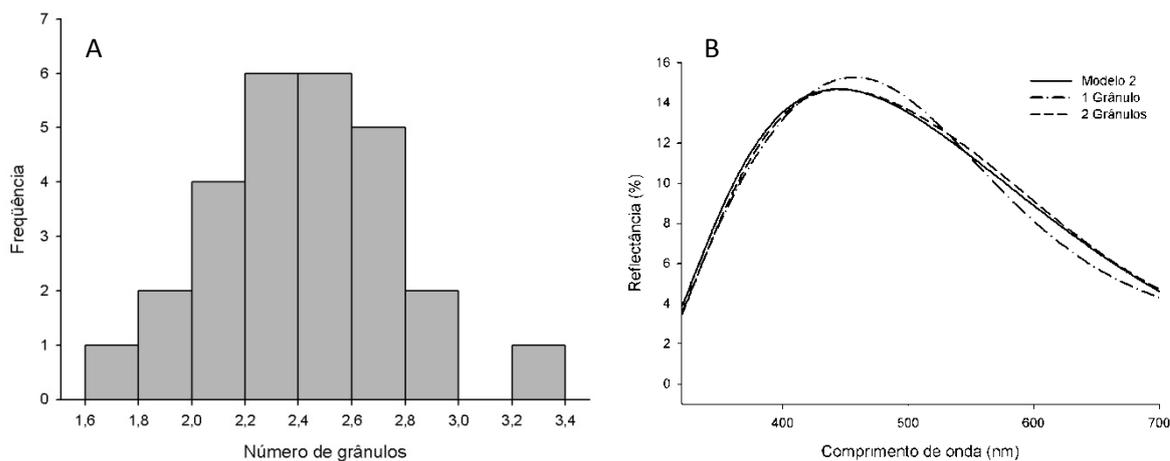


Figura 1.5. A: Distribuição dos indivíduos pelo número médio de grânulos em sua camada de melanina. B: Espectros teóricos de reflectância para bárbulas com espessura média do córtex de queratina encontrado em penas de tiziu, com isolamento total pela camada de melanina (modelo 2, linha sólida) e camadas com espessura de 1 e 2 grânulos de melanina (linhas tracejadas).

Entretanto, existe ainda uma diferença entre os espectros observado e esperado que não pode ser explicado por diferenças na espessura das camadas de queratina e melanina. Visto que as características óticas da queratina em penas de aves estão relativamente bem estabelecidas (Brink & van der Berg 2004, Doucet et al. 2006), foi verificado se mudanças na opacidade da melanina resultariam em uma melhor aderência do modelo ao espectro medido, visto que pouco foi feito nesse sentido desde a sugestão arbitrária do valor de $n = 2,00$ para o índice de refração da eumelanina (Land 1972). Assim, podemos observar na Figura 1.6 que a alteração da opacidade da camada de queratina, representada por variação em seu índice de refração e seu coeficiente de extinção, de fato resulta em melhores modelos preditivos: a redução do índice de refração da melanina resulta em um modelo com matiz mais próximo do observado, enquanto que a alteração do coeficiente de extinção torna a curva do modelo menos saturada e o ponto de inflexão mais alto, obtendo assim um espectro de forma mais aproximada ao observado.

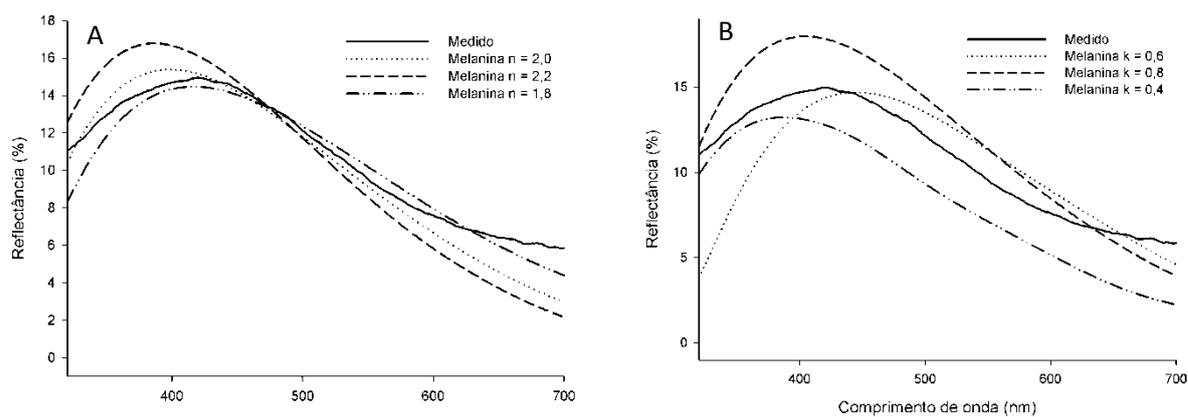


Figura 1.6. Representação do efeito da variação dos parâmetros óticos da melanina (A: índice de refração, B: coeficiente de extinção) nos modelos de filme fino (linhas tracejadas) no potencial preditivo do espectro de reflectância de penas de machos de tiziu (linhas sólidas).

Finalmente, A união dessas duas alterações em um modelo único resulta em uma curva mais aproximada do espectro medido em forma e comportamento, em ambas as geometrias de medição (Fig. 1.7).

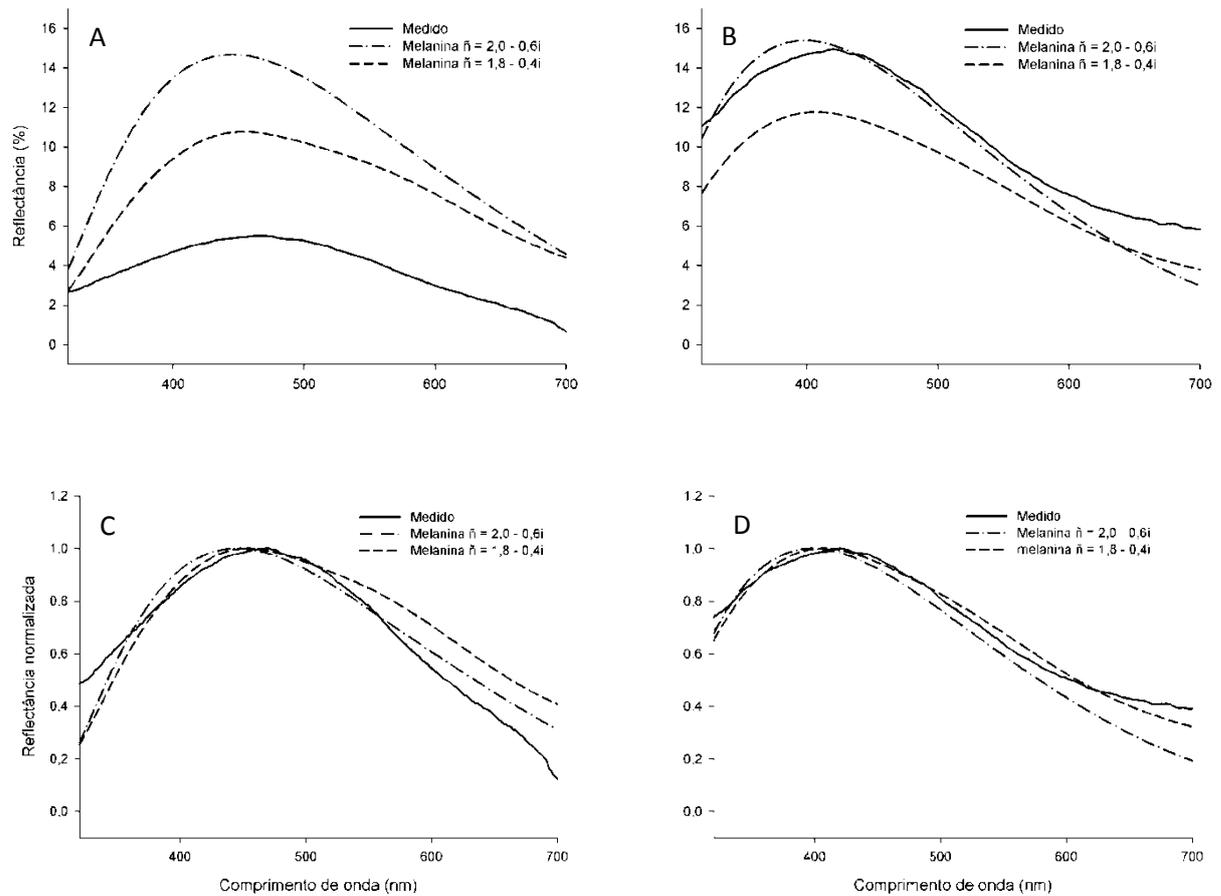


Figura 1.7. Espectros de reflectância obtidos (A e B) e normalizados (C e D) para valores medidos (linha sólida) e teóricos (linhas tracejadas) e diferentes características de opacidade da melanina, nas geometrias de medição normal (A e C) e 45 (B e D).

DISCUSSÃO

A conformação nanoestrutural das bárbulas de tiziu encontrada apresenta-se como uma única camada de queratina que interage com a luz e é responsável pela coloração iridescente dos machos dessa espécie. A modelagem ótica mostrou que as ondas de luz que incidem sobre a camada de melanina só são capazes de penetrá-la e interagir com o córtex de queratina se a camada de melanina for composta por apenas um melanossoma de espessura. Embora essa situação ocorra em algumas partes das bárbulas medidas, a média individual é

superior a esse valor, com uma variação bastante pequena em torno dessa média. Portanto, a interferência construtiva da luz na camada única de queratina, isolada do interior da bárbula por uma camada espessa de melanina, é suficiente para reforçar os comprimentos de onda na faixa do ultravioleta ao azul característicos de sua coloração, não sendo necessários pigmentos ou estruturas adicionais.

Estruturas similares têm sido descritas e confirmadas através do uso de modelos óticos em outras espécies. A singanga (*Bostrychia hagedash*), por exemplo, apresenta uma camada espessa de queratina sobre uma camada simples de grânulos ociosos de melanina (Brink & van der Berg 2004). Essa camada de queratina, por ser quase quatro vezes superior em espessura à camada encontrada em penas de tiziu, resulta em até quatro picos harmônicos no espectro do visível, e embora os grânulos sejam ociosos e, portanto, adicionem múltiplas interfaces potenciais de melanina-ar ao sistema, a luz é totalmente absorvida antes de atravessar a camada externa desses grânulos (Brink & van der Berg 2004). Outras aves, como o pássaro-caramanchão-cetim (*Ptilonorhynchus violaceus*) e diversas espécies de icterídeos com plumagem iridescente, como *Dives warszewiczi* e *Quiscalus major*, apresentam nanoestrutura de bárbula bastante similar à encontrada nesse estudo, e por isso têm um espectro de refletância (e, conseqüentemente, a coloração observada) bastante parecido com o do tiziu (Doucet et al. 2006; Shawkey et al. 2007).

Tanto em casos de plumagem estrutural iridescente quanto não-iridescente, é atribuído à melanina o papel de absorver ondas de luz espalhadas incoerentemente e assim acentuar principalmente a saturação da cor produzida. A correlação encontrada entre a variação de cor de machos de *P. violaceus* e a densidade de grânulos de melanina na camada interna é um exemplo dessa propriedade em penas iridescentes (Doucet et al. 2006). Um caso de leucismo na gralha *Cyanocitta stelleri* parece sugerir esse papel para a melanina também em plumagem estrutural não-iridescente: nessa ave, as penas brancas da ave apresentam estrutura

bidimensional organizada para produzir coloração azul, mas segundo os autores isso não ocorre porque, com a ausência da melanina, não há absorção das ondas espalhadas incoerentemente (Shawkey & Hill 2006).

Entretanto, o fato da camada inferior de melanina em penas iridescentes agir como um substrato e absorver a maior parte da luz que a atinge não significa que não seja relevante a interação da luz com a esta camada. Essa sugestão é reforçada pela inadequação dos modelos que consideram a camada de queratina intercalada por camadas de ar, e dos modelos que consideram a camada de melanina sem a região de interferência desta com a queratina. Mesmo assim, os resultados aqui expostos sugerem ainda que as características óticas da melanina, se alteradas, resultam em espectros mais aproximados do obtido empiricamente.

A queratina, por ser encontrada na cutícula de diversos insetos com coloração estrutural, além das penas de aves, tem sido alvo de diversos estudos que buscam caracterizá-la óticamente, e seu índice de refração encontra-se relativamente bem definido. Porém, mesmo nesse caso o seu coeficiente de extinção foi determinado baseado em dados empíricos apenas recentemente (Brink & van der Berg 2004). Já as propriedades óticas da melanina encontram-se consideravelmente menos estudadas: Land (1972) sugeriu que seu índice de refração fosse em torno de 2,0, e pouco foi feito para melhor aproximar esse valor até que Brink & van der Berg (2004) testaram valores diferentes e sugeriram um coeficiente de extinção mínimo de 0,06. Porém, esse coeficiente foi sugerido com base na espessura da camada de melanina de *B. hagedash*, muito inferior à encontrada no tiziu e em outras espécies (em torno de 70nm). Doucet e colaboradores (2006) também inspecionaram visualmente espectros produzidos ao alterarem essas propriedades óticas, mas não consideraram que as modificações feitas melhoraram o seu modelo.

Se aliarmos a essa conclusão o fato de que a melanina representa, na realidade, uma série de biopolímeros diferentes que podem variar em tamanho e composição química

(McGraw 2006b), e portanto podem ter propriedades óticas levemente distintas, torna-se razoável considerar que espécies diferentes podem exibir plumagens com características óticas também diferenciadas. Além disso, em todos os casos estudados em aves até a presente data, foi descrita a presença conjunta de eumelanina e feomelanina, os dois principais grupos de moléculas de melanina (McGraw 2006b). Esses grupos apresentam propriedades químicas e óticas bastante diferentes: a feomelanina apresenta enxofre em sua composição, elemento químico este não encontrado na eumelanina, e também apresenta absorção de luz cerca de 10-20% inferior à eumelanina em todos os comprimentos de onda (McGraw 2006b).

Visto que essas moléculas são extremamente difíceis de serem extraídas e analisadas bioquimicamente (Ito et al. 2000), aproximações físicas baseadas em observações empíricas, como conduzidas por Brink & van der Berg (2004), Doucet e colaboradores (2006) e no presente trabalho, resultam em um método elegante para obter uma estimativa aproximada que ainda seja útil em estudos físicos e biológicos para essas espécies. Finalmente, é possível também que as propriedades óticas da melanina *per se* sejam realmente iguais em todas as aves e ainda assim a sua camada varie em índice de refração. Isso porque é preciso considerar que os melanosomas encontrados no tiziu são aproximadamente circulares e encontram-se em uma matriz de queratina. Devido a esse formato, a camada resultante não é perfeitamente homogênea, mas inclui também espaços de queratina entre os grânulos. Portanto, mesmo que o índice de refração e o coeficiente de extinção da melanina sejam valores próximos a 2,0 e 0,6, respectivamente, a *camada como um todo* terá um valor intermediário entre estes valores e os da queratina, ponderadas de acordo com sua proporção na camada.

É interessante notar também que, com o acúmulo de informação sobre os mecanismos proximais responsáveis pela produção de cor estrutural em penas de aves, o que antes era tido como um conjunto coeso de formações estruturais está gradualmente sendo classificado com mais detalhes físicos, o que apresenta conseqüências diretas para o entendimento da ecologia

e comportamento de aves. Por exemplo, cores iridescentes são resultado de interferência em cristais fotônicos, na maioria dos casos unidimensionais, ou seja, devido a camadas sobrepostas de substâncias com índices de refração diferentes. Já outras cores estruturais não-iridescentes são resultantes da organização bidimensional ou até mesmo tridimensional das mesmas estruturas envolvidas na produção de coloração iridescente (no geral, ar, queratina e melanina).

Essa diferença de organização é consequência de processos ontogenéticos distintos: para formar filmes finos em bárbulas, melanócitos secretam ativamente melanossomas no interior do córtex da bárbula durante o desenvolvimento da pena. No entanto, as estruturas cristalinas ou quasi-ordenadas encontradas em barbas, responsáveis por cores estruturais não-iridescentes, são auto-organizadas e resultam de processos físicos que emergem da interação dessas moléculas, processo este não mediado por célula alguma (Prum 2006). É possível, portanto, que embora ambos os tipos de coloração descritos acima sejam denominados como “coloração estrutural”, eles resultem de processos ecológicos e tenham funções na sinalização consideravelmente distintos.

O papel da coloração estrutural na seleção sexual, por exemplo, tem sido foco de diversos estudos, os quais não têm demonstrado um padrão claro quanto ao tipo de informação transmitido e de sua interpretação por coespecíficos (Prum 2006; Hill 2006). No entanto, parece que um padrão mais consistente emerge ao considerarmos plumagem iridescente e não-iridescente separadamente, uma vez que a iridescência é produzida pelo empilhamento de películas com índices de refração diferentes, e a coloração não-iridescente resulta de organização das mesmas estruturas de forma não-laminar. Machos de *P. violaceus* apresentam associações entre características da coloração (brilho e reflexão na faixa do ultravioleta), taxa de parasitismo e qualidade corporal (Doucet & Montgomerie 2003). O efeito de parasitas no desenvolvimento de plumagem iridescente também foi verificado em

perus selvagens (*Meleagris gallopavo*; Hill et al. 2005). Como resultado de estresse nutricional, machos de chopim (*Molothrus ather*) apresentaram coloração iridescente menos brilhante e saturada, além de matiz mais alto (McGraw et al. 2002). No próprio tiziu, foi descrita uma relação entre características da cor (brilho e saturação) e condição corporal (Doucet 2002), além do efeito do parasitismo na aquisição de sua plumagem nupcial (Costa & Macedo 2005). Além disso, para diversas espécies com coloração estrutural iridescente, tem sido encontrada uma relação entre características da coloração da plumagem e obtenção de cópulas e sucesso reprodutivo, como no caso do mérion soberbo (*Malurus cyaneus*; Dunn & Cockburn 1999), ou no caso bastante interessante do pavão real (*Pavo cristatus*), em que não só a coloração, mas também a variação na coloração de acordo com a geometria de medição (ou seja, a iridescência medida objetivamente) afetam a obtenção de cópula dos machos (Loyau et al. 2007).

Portanto, existe evidência considerável de que a plumagem estrutural iridescente tem um papel ecológico e de sinalização relevante em várias espécies, sendo um indicador de qualidade dos machos e sendo uma característica que afeta decisões de acasalamento por parte de fêmeas. Dado o conhecimento que tem se acumulado recentemente, é possível especular que fatores que influenciam no desenvolvimento e na organização das camadas responsáveis pela produção dessas cores nas bárbulas refletem a condição desses indivíduos durante o crescimento dessas penas.

Quando consideramos plumagem estrutural não-iridescente, essa relação não é tão clara. Existe evidência de que variação nas nanoestruturas resulta em variação na cor de *Sialia sialis* (Shawkey et al. 2003), e essa variação está associada à condição corporal (Siefferman et al. 2005). Embora machos utilizem informação referente à idade e condição corporal em disputas por sítios de nidificação (Siefferman & Hill 2005), fêmeas não parecem escolher machos com base nessas características (Liu et al. 2007). Existem menos estudos publicados

sobre esse tipo de coloração, mas alguns muito recentes têm sugerido que bactérias podem afetar a coloração, através da degradação de penas (como a melanina, Shawkey et al. 2007). Nesse caso, as variações na cor relacionadas à condição de indivíduos podem não ser resultado de distúrbios durante a produção da pena, mas sim depois que ela foi produzida. O fato de nanoestruturas em penas não-iridescentes se auto-organizarem mesmo na ausência de organelas importantes para a produção da cor (Shawkey & Hill 2006) sugere que esse tipo de coloração não está tão suscetível a distúrbios no desenvolvimento quanto na coloração iridescente. Portanto, a plumagem não-iridescente pode não conter informação confiável a respeito da qualidade dos indivíduos no que se refere à resposta a possíveis distúrbios.

Embora Prum (2006) tenha sugerido essa diferenciação entre plumagens iridescentes e não-iridescentes na relação ontogenia-sinal, tal estudo ainda não foi levado a cabo. As implicações e as hipóteses resultantes da constatação de tais diferenças não poderão ser verificadas sem um conhecimento da morfologia de penas de aves em escala nanométrica, ressaltando assim a importância de estudos que busquem unir informações relativas à produção de cor e ao efeito dessa cor na comunicação entre indivíduos.

Este capítulo buscou oferecer esse tipo de informação para uma espécie que vem sendo utilizada em diversos estudos que consideram o papel da coloração em sua comunicação, comportamento e seleção sexual (e.g. Doucet 2002, Costa & Macedo 2005, Aguilar et al. 2008). Aqui, mostramos como a coloração nessa ave é produzida através da interferência construtiva da luz em uma camada fina de queratina sobre uma camada espessa de melanina. Além disso, sugerimos que o papel da melanina vai além de ser simplesmente um isolante para a luz espalhada, sendo essencial para a produção do espectro com as propriedades observadas, e que suas propriedades óticas, quando alteradas, influenciam na cor resultante e podem oferecer uma melhor adequação do modelo aos dados obtidos por espectrofotometria.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar, T. M., Maia, R., Santos, E. S. A. & Macedo, R. H.** 2008. Parasite levels in blue-black grassquits correlate with male displays but not female mate choice. *Behavioral Ecology*, **19**, 292-301.
- Alonso-Alvarez, C., Doutrelant, C. & Sorci, G.** 2004. Ultraviolet reflectance affects male-male interactions in the blue tit (*Parus caeruleus ultramarinus*). *Behavioral Ecology*, **15**, 805-809.
- Almeida, J. B. & Macedo, R. H.** 2001. Lek-like mating system of the monogamous blue-black grassquit. *The Auk*, **118**, 404-411.
- Andersson, S.** 1999. Morphology of UV reflectance in a whistling-thrush: implications for the study of colour signaling in birds. *Journal of Avian Biology*, **30**, 193-204.
- Badyaev, A. V. & Hill, G. E.** 2002. Paternal care as a conditional strategy: distinct reproductive tactics associated with elaboration of plumage ornamentation in the house finch. *Behavioral Ecology*, **13**, 591-597.
- Banks, A. N.** 2001. For your eyes only? The role of UV in mate choice. *Trends in Ecology and Evolution*, **16**, 473-474.
- Brink, D. J. & van der Berg, N. G.** 2004 Structural colours from the feather of the bird *Bostrychia hagedash*. *Journal of Physics D: Applied Physics*, **37**, 813-818.
- Carvalho, C. B., Macedo, R. H. & Graves, J.** 2006. Breeding strategies of a socially monogamous neotropical passerine: extra-pair fertilizations, behavior and morphology. *The Condor*, **108**, 579-590.
- Costa, F. J. V. & Macedo, R. H.** 2005. Coccidian oocyst parasitism in the blue-black grassquit: influence on secondary sex ornaments and body condition. *Animal Behaviour*, **70**, 1401-1409.

- Cuthill, I. C.** 2006. Color perception. In: *Bird Coloration, Vol. I: Mechanisms and Measurements* (Ed. by G. E. Hill & K. J. McGraw), pp. 3-40. Cambridge: Harvard University Press.
- Cuthill, I. C., Partridge, J. C., Bennett, A. T. D., Church, S. C., Hart, N. S. & Hunt, S.** 2000. Ultraviolet vision in birds. *Advances in the Study of Behavior*, **29**, 159-214.
- Eaton, M. D. & Lanyon, S. M.** 2003. The ubiquity of avian ultraviolet plumage reflectance. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*, **270**, 1721-1726.
- Doucet, S. M.** 2002. Structural plumage coloration, male body size, and condition in the blue-black grassquit. *The Condor*, **104**, 30-38.
- Doucet, S. M. & Montgomerie, R.** 2003. Multiple sexual ornaments in satin bowerbirds: ultraviolet plumage and bowers signal different aspects of male quality. *Behavioral Ecology*, **14**, 503-509.
- Doucet, S. M., Shawkey, M. D., Hill, G. E. & Montgomerie, R.** 2006. Iridescent plumage in satin bowerbirds: structure, mechanisms and nanostructural predictors of individual variation in colour. *Journal of Experimental Biology*, **209**, 380-390.
- Dunn, P. O. & Cockburn, A.** 1999. Extra-pair mate choice and honest signaling in cooperatively-breeding superb fairy-wrens. *Evolution*, **53**, 938-946.
- Figuerola, J., Munoz, E., Gutierrez, R. & Ferrer, D.** 1999. Blood parasites, leucocytes and plumage brightness in the ciril bunting, *Emberiza cirilus*. *Functional Ecology*, **13**, 594-601.
- Gill, F. B.** 1994. Ornithology. 2nd edition. Nova Iorque: W. H. Freeman.
- Greenwalt, C. H., Brandt, W. & Friel, D. D.** 1960a. The iridescent colors of hummingbird feathers. *Proceedings of the American Philosophical Society*, **104**, 249-253.
- Greenwalt, C. H., Brandt, W. & Friel, D. D.** 1960b. Iridescent colors of hummingbird feathers. *Journal of the Optical Society of America*, **50**, 1005-1013.

- Hausmann, F., Arnold, K. E., Marshall, N. J. & Owens, I. P. F.** 2003. Ultraviolet signals in bird are special. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*, **270**, 61-67.
- Hill, G. E.** 2006. Environmental regulation of ornamental coloration. In: *Bird Coloration, Vol. I: Mechanisms and Measurements* (Ed. by G. E. Hill and K. J. McGraw), pp. 507-560. Cambridge: Harvard University Press.
- Hill, G., Doucet, S. M. & Buchholz, R.** 2005. The effect of coccidial infection on iridescent plumage coloration in wild turkeys. *Animal Behaviour*, **69**, 387-94.
- Ito, S., Wakamatsu, K. & Ozeki, H.** 2000. Chemical analysis of melanins and its application to the study of melanogenesis. *Pigment Cell Research*, **13**, 103S-109S.
- Jellison Jr., G. E.** 1993. Data analysis for spectroscopic ellipsometry. *Thin Solid Films*, **234**, 416-422.
- Kinoshita, S. & Yoshioka, S.** 2005a. Fundamental optical processes underlying the structural colors. In: *Structural Colors In Biological Systems: Principles And Applications*. (Ed. by S. Kinoshita & S. Yoshioka), pp. 3-26. Osaka: Osaka University Press.
- Kinoshita, S. & Yoshioka, S.** 2005b. Structural colors in nature: A role of regularity and irregularity in the structure. *ChemPhysChem*, **6**, 1443-1459.
- Land, M.F.** 1972. The physics and biology of animal reflectors. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, **24**, 77-106.
- Li, Y., Lu, Z., Yin, H., Yu, X., Liu, X. & Zi, J.** 2005. Structural origin of the brown color of barbules in male peacock tail feathers. *Physical Review E: Statistical, Nonlinear, And Soft Matter Physics*, **72**, 010902(1-4).
- Liu, M., Siefferman, L. & Hill, G. E.** 2007. Experimental test of female choice relative to male structural coloration in eastern bluebirds. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **61**, 623-630.

- Loyau, A., Gomez, D., Moureau, B., Théry, M., Hart, N. S., Saint Jalme, M., Bennett, A. T. D. & Sorci, G.** 2007 . Iridescent structurally based coloration of eyespots correlates with mating success in the peacock. *Behavioral Ecology*, **18**, 1123-1131.
- McGraw, K. J.** 2006a. Mechanics of carotenoid-based coloration. In: *Bird Coloration, Vol. I: Mechanisms and Measurements* (Ed. by G. E. Hill and K. J. McGraw), pp. 177-242. Cambridge: Harvard University Press.
- McGraw, K. J.** 2006b. Mechanics of melanin-based coloration. In: *Bird Coloration, Vol. I: Mechanisms and Measurements* (Ed. by G. E. Hill and K. J. McGraw), pp. 243-294. Cambridge: Harvard University Press.
- McGraw, K. J.** 2006c. Mechanics of uncommon colors: pterins, porphyrins and psittacofulvins. In: *Bird Coloration, Vol. I: Mechanisms and Measurements* (Ed. by G. E. Hill and K. J. McGraw), pp. 354-398. Cambridge: Harvard University Press.
- McGraw, K. J., Mackillop, E. A., Dale, J. & Hauber, M. E.** 2002. Different colors reveal different information: how nutritional stress affects the expression of melanin- and structurally based ornamental coloration. *Journal of Experimental Biology*, **205**, 3747-3755.
- Mullen, P. & Pohland, G.** 2008. Studies on UV reflection in feathers of some 1000 bird species: are UV-peaks in feathers correlated with VS/UVS cones? *Ibis*, **150**, 59-68.
- Murray Jr, B. G.** 1982. Territorial behaviour of the blue-black grassquit. *The Condor*, **84**, 119.
- Osorio, D. & Ham, A. D.** 2002. Spectral reflectance and directional properties of structural coloration in bird plumage. *Journal of Experimental Biology*, **205**, 2017-2027.
- Part, T. & Qvarnström, A.** 1997. Badge size in collared flycatchers predicts outcome of male competition over territories. *Animal Behaviour*, **54**, 893-899.

- Prum, R. O.** 2006. Anatomy, physics, and evolution of avian structural colors. In: *Bird Coloration, Vol. I: Mechanisms and Measurements* (Ed. by G. E. Hill and K. J. McGraw), pp. 295-355. Cambridge: Harvard University Press.
- Prum, R. O. & Torres, R. H.** 2003. A Fourier tool for the analysis of coherent light scattering by bio-optical nanostructures. *Integrative and Comparative Biology*, **43**, 591-602.
- Prum, R. O., Torres, R., Williamson, S. & Dyck, J.** 1998. Constructive inference of light by blue feather barbs. *Nature*, **396**, 28-29.
- R Development Core Team.** 2007. R: A Language for Data Analysis and Graphics. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Áustria. (Disponível em <http://cran.r-project.org/>)
- Shawkey, M. D. & Hill, G.E.** 2006. Significance of a basal melanin layer to production of non-iridescent structural plumage colour: evidence from an amelanotic stellers jay (*Cyanocitta stelleri*). *Journal of Experimental Biology*, **209**, 1245-1250.
- Shawkey, M. D., Estes, A. M., Siefferman, L. & Hill, G. E.** 2003. Nanostructure predicts intraspecific variation in ultraviolet-blue plumage colour. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*, **270**, 1471-2954.
- Shawkey, M. D., Hauber, M. E., Estep, L. K. & Hill, G. E.** 2006. Evolutionary transitions and structural mechanisms of avian plumage coloration in grackles and allies (Icteridae). *Journal of the Royal Society Interface*, **3**, 777-783.
- Shawkey, M. D., Pillai, S. R., Hill, G. E., Siefferman, L. M. & Roberts, S. R.** 2007. Bacteria as an agent for change in structural plumage color: correlational and experimental evidence. *The American Naturalist* S112-121.
- Siefferman, L. & Hill, G. E.** 2005. UV-blue structural coloration and competition for nest boxes in male eastern bluebirds. *Animal Behaviour*, **69**, 67-72.

- Siefferman, L., Hill, G.E. & Dobson, F.S.** 2005. Ornamental plumage coloration is condition-dependent in eastern bluebirds. *Journal of Avian Biology*, **36**, 428-435.
- Srinivasarao, M.** 1999. Nano-optics in the biological world: Beetles, butterflies, birds and moths. *Chemical Reviews*, **99**, 1935-1961.
- Webber, T.** 1985. Songs, displays and other behavior at a courtship gathering of blue-black grassquit. *The Condor*, **87**, 543-546.
- Yezerinac, S. M. & Weatherhead, P. J.** 1997. Extra-pair mating, male plumage coloration and sexual selection in yellow warblers (*Dendroica petechia*). *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*, **264**, 527-532.
- Yin, H., Shi, L., Li, Y., Quin, Y., Dong, B., Meyer, S., Liu, X., Zhao, L. & Zi, J.** 2006. Iridescence in the neck feathers of domestic pigeons. *Physical Review E: Statistical, Nonlinear, And Soft Matter Physics*, **72**, 051916(1-6).
- Yoshioka, S. & Kinoshita, S.** 2002. Effect of macroscopic structure in iridescent color of the peacock feathers. *FORMA*, **17**, 169-181.
- Yoshioka, S. & Kinoshita, S.** 2005. Structural color of peacock feathers. In: *Structural colors in biological systems: Principles and applications*. (ed. by S. Kinoshita & S. Yoshioka), pp. 195-203. Osaka: Osaka University Press.
- Yoshioka, S., Nakamura & E., Konoshita, S.** 2007. Origin of two-color iridescence in rock dove's feather. *Journal of the Physical Society of Japan*, **76**, 013801(1-4).
- Zi, J., Yu, X., Li, Y. Hu, X., Xu, C., Wang, X., Liu, X. & Fu, R.** 2003. Coloration strategies in peacock feathers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **100**, 12576–12578.

Capítulo 2

Grandões ou apressadinhos: vias alternativas para a expressão de ornamentos em machos de tiziu (*Volatinia jacarina*)

INTRODUÇÃO

Diversas características fenotípicas apresentam-se como um desafio à teoria de seleção natural, pois resultam em um gasto de energia que poderia ser diretamente alocado à reprodução ou à sobrevivência, ou ainda, resultam em maior conspicuidade para predadores. A teoria de seleção sexual (Dawin 1871) apresentou uma explicação para a evolução de tais características, sugerindo que podem evoluir quando resultam em vantagens reprodutivas a um indivíduo quando competindo contra outros do mesmo sexo, ou quando aumentam as chances de ser selecionado por indivíduos do outro sexo para o acasalamento.

Diversos modelos teóricos sugerem que tais características devem evoluir quando contêm algum tipo de informação sobre o indivíduo que pode ser acessado pelos demais. Dentre as hipóteses originadas desses modelos, a hipótese da desvantagem (Zahavi 1975) é provavelmente a que mais tem sido testada e difundida. Essa hipótese sugere que ornamentos sexuais são custosos e que, portanto, somente indivíduos em melhor condição corporal ou de qualidade genética superior são capazes de arcar com os custos relacionados a essas características. Assim, demais coespecíficos podem extrair informação desses ornamentos para tomar decisões. Diversos taxa de aves apresentam cores brilhantes e chamativas, que têm sido atribuídas à seleção sexual (Andersson 1994). Existem duas formas básicas de produção dessas cores: por pigmentos, que absorvem e refletem diferenciadamente os comprimentos de onda, ou por nanoestruturas de diferentes índices de refração, que podem

causar interferência na luz refletida de forma a reforçar determinados comprimentos de onda. A plumagem pigmentar carotenóide é a que tem sido mais estudada no contexto da seleção sexual. Diversos estudos têm demonstrado que indivíduos que apresentam plumagem com cor mais brilhante e saturada são mais velhos (Inouye 2001), possuem melhor condição corporal (Hill & Montgomerie 1994) ou menor carga parasitária (Hörak et al. 2004), e que essa informação é utilizada por machos na determinação de hierarquias de dominância (Wolfenbarger 1999) e/ou por fêmeas na escolha de parceiro (Marchetti 1998). O conteúdo de informação que a plumagem carotenóide possui vem do fato de que este composto orgânico precisa ser adquirido pela alimentação, e além de ser alocado em ornamentos também possui função imunológica (McGraw 2006). Dessa forma, apenas indivíduos com maior habilidade de forrageamento, com os melhores territórios, ou em melhores condições imunológicas serão capazes de investir em ornamentos coloridos e brilhantes.

No caso da plumagem de coloração estrutural, a evidência quanto ao conteúdo de informação que possui e a como essa informação é utilizada ainda é ambígua. Embora alguns estudos tenham demonstrado uma relação entre características da coloração e condição corporal (Keyser & Hill 1999), carga parasitária (Hill et al. 2005) e dominância (Siefferman & Hill 2005), suas possíveis funções em interações sociais ainda são pouco conhecidas, com alguns estudos relatando influência da coloração na escolha de parceiros (Loyau et al. 2007) e outros não (Liu et al. 2007). A evidência de mecanismos proximais envolvidos na variação das características de coloração estrutural também é mais escassa que para coloração por pigmentos (entretanto, ver Shawkey et al 2003 e Doucet et al. 2006). O que se sugere é que distúrbios de desenvolvimento podem resultar em diferenças na organização das estruturas responsáveis pela produção de cor (Prum 2006), sendo esta a base teórica que sugere a plumagem estrutural como uma característica ornamental cuja expressão é dependente da condição do indivíduo.

Este estudo tem como objetivo testar a relação entre características da coloração e a condição corporal em machos do tiziu (*Volatinia jacarina*). Machos desta espécie apresentam características de plumagem, ecológicas e comportamentais que os tornam ideais para tal avaliação. Durante o período reprodutivo, machos dessa espécie mudam para uma plumagem nupcial negra-iridescente, produzida por nanoestruturas das bárbulas das penas. Também nesse período, machos defendem pequenos territórios onde executam seu *display*, que se constitui de um salto vertical acompanhado de um canto (Almeida & Macedo 2001). Essa conspícua exibição visual, aliado a um estudo que demonstrou que cerca de metade dos filhotes de uma população foram provenientes de cópulas extra-par (Carvalho et al. 2006), sugere que os machos provavelmente estão sujeitos a forte pressão de seleção sexual, que resulta em ornamentos corporais e comportamentais exuberantes.

Para outra população dessa espécie, foi demonstrada uma relação entre a taxa de crescimento das penas, uma medida da condição corporal durante a muda, e características da coloração de machos (Doucet 2002). Este estudo visa expandir esses resultados, testando (1) a associação entre condição e coloração, medidas aqui diretamente na estação reprodutiva; (2) a relação entre condição e a coloração da mancha branca, que não foi testada em estudos anteriores, e (3) se o investimento individual na muda para a plumagem nupcial, que foi demonstrada estar relacionada à carga parasitária de indivíduos (Costa & Macedo 2005), está relacionado à condição corporal e às características de sua coloração. As expectativas, frente a esses objetivos, são de que machos devem exibir uma associação positiva entre sua condição corporal e a exuberância de sua plumagem (tanto a negra quanto a mancha branca), e que uma boa condição corporal esteja refletida em uma muda mais antecipada na estação reprodutiva.

METODOLOGIA

Área de estudos e coleta de amostras

O estudo foi conduzido em um pomar abandonado, inserido em uma matriz de cerrado preservado na Fazenda Água Limpa (15°56'S 47°56'W), uma fazenda experimental de propriedade da Universidade de Brasília. A área, de aproximadamente 2,6 há, foi escolhida devido ao fato de tizius reproduzirem-se em grandes densidades em ambientes alterados ou em estágios iniciais de sucessão (Sick 1997). Nela, foi demarcado *grid* utilizando-se 86 estacas individualmente numeradas e distantes em 20m umas das outras.

A captura de machos foi realizada durante duas estações reprodutivas, sendo a primeira entre 04 de novembro de 2005 e 22 de janeiro de 2006 e a segunda entre 13 de novembro de 2006 e 10 de janeiro de 2007. Durante esse período, indivíduos foram capturados com o auxílio de três a cinco redes de neblina, armadas diariamente na área de estudos. Em ambos os anos, esforços de captura foram concentrados no período entre a chegada de migração e o estabelecimento de territórios, quando indivíduos encontram-se forrageando ativamente em bandos grandes, facilitando assim sua captura. Todos os indivíduos capturados foram marcados com uma anilha metálica numerada do CEMAVE, além de uma combinação única de três anilhas plásticas coloridas. O procedimento de captura incluiu também medidas da asa e do tarso esquerdos, da cauda e da narina, feitas com o auxílio de um paquímetro (precisão de 0,01mm), e pesagem (utilizando um dinamômetro de mola Pesola®, precisão de 0,2g).

No caso dos machos, dados referentes à plumagem nupcial e ornamentos sexuais foram também coletados. A cobertura de plumagem nupcial foi medida em quatro regiões do corpo (cabeça, manto, região do uropígio e peito) contando-se quantas das oito secções de um disco plástico transparente estavam preenchidas por plumagem negra quando este era

sobreposto ao corpo da ave. Uma estimativa do percentual de plumagem nupcial foi obtida através de uma média, ponderada para as quatro partes medidas, da divisão do número de partes preenchidas por plumagem negra pelo número total de partes do disco. Para análise espectral, foram coletadas três penas da plumagem nupcial da cabeça, do manto e do peito de cada macho, além de duas penas brancas de cada uma das manchas subaxilares. Essas penas foram fixadas com fita crepe a um cartão de papel com a identificação do indivíduo e da região do corpo de onde foram coletadas, e o cartão por sua vez foi embalado em papel alumínio e mantido em ambiente fresco e seco.

Espectrofotometria

Para as análises espectrais, as penas coletadas de cada região do corpo de cada indivíduo foram conjuntamente fixadas com fita crepe a um papel camurça negro, de forma a simular a organização dessas penas no corpo do pássaro. Dados de reflectância foram obtidos através de um espectrofotômetro Ocean Optics USB4000 e uma fonte de luz de xenônio pulsante PX-2 (Ocean Optics, Dunedin, Florida), que fornece iluminação no espectro ultravioleta e no visível para humanos (250-750nm).

As medidas de reflectância foram tomadas em relação a um branco padrão WS-1-SS (Ocean Optics, Dunedin, Florida) e em duas geometrias de medição: perpendicular à superfície das penas, ou seja, tanto a luz incidente quanto a reflexão medida em paralelo à normal, e com ambas as fibras de emissão e coleta de luz em ângulos opostos de 45° à normal. No primeiro caso, foi utilizada uma fibra ótica bifurcada, com uma ponta ligada à fonte de luz e outra ao espectrofotômetro, sendo a ponta de leitura fixada a um segurador escuro para impedir a leitura de fontes de luz que não a lâmpada. Já para o ângulo de 45°, foram utilizadas duas fibras óticas bifurcadas, sendo que uma estava ligada à fonte de luz e outra ao espectrofotômetro, e ambas as pontas sobressalentes encontravam-se protegidas da entrada

externa de luz. Foi utilizado um segurador de fibra que permitia segurá-las no ângulo desejado e também as isolava da luz ambiente. Em ambos os casos, as fibras encontravam-se a aproximadamente 6mm da superfície da pena, proporcionando uma área de leitura de 2mm.

As medidas espectrais foram tomadas com o programa SpectraSuite (Ocean Optics, Dunedin, Florida). Foram feitas cinco medidas de cada região do corpo em cada geometria, sendo que cada medida constituía-se da média de 50 leituras individuais, com um tempo de integração de 20 milissegundos e correção de *boxcar* de 30. Dos espectros obtidos, foi utilizada apenas a região entre 320-700nm, correspondendo ao espectro de visão comumente associado às aves (Cuthill 2006; Mullen & Pohland 2008), interpolando-se a porção decimal ao número inteiro inferior mais próximo, de modo a reduzir o número de pontos utilizados.

Características da coloração

As propriedades espectrais de reflectância das penas de cada parte do corpo foram então resumidas em estimativas de brilho, saturação e matiz (Montgomerie 2006). Brilho médio (B_{med}) foi calculado como a soma da média do percentual de reflectância em cada comprimento de onda. A intensidade de reflectância no comprimento de onda de máxima reflexão ($I = R_{\lambda_{max}}$) também foi utilizada como uma medida de brilho. O comprimento de onda de máxima reflexão (λ_{max}) foi utilizado para caracterizar o matiz da cor. Para caracterizar a saturação da cor, três medidas foram utilizadas: contraste (diferença das intensidades de reflectância máxima e mínima; $C = R_{\lambda_{max}} - R_{\lambda_{min}}$), croma ultravioleta (reflectância no espectro ultravioleta dividido pela reflectância total; $R_{uv} = R_{320-400nm}/R_{320-700nm}$) e croma azul (reflectância na faixa do azul dividida pela reflectância total; $R_{azul} = R_{400-500nm}/R_{320-700}$). Essas faixas de coloração foram utilizadas por representarem a faixa de reflexão de maior interesse, uma vez que é onde estão os picos de reflectância da maior parte dos machos de tiziu com plumagem nupcial. Além disso, essas faixas consideram as

intersecções dos espectros de sensibilidade para Passeriformes (Bowmaker et al. 1997) e de que a reflectância no espectro do UV ter notória influência em interações sexuais intra-específicas (Dias 2006).

Os valores citados foram calculados para cada indivíduo e em cada parte do corpo baseado no espectro médio das cinco medidas tomadas. Visto que a reflectância em diferentes ângulos e nas diferentes partes do corpo de cada indivíduo estão associadas de forma linear, para evitar problemas de multicolineariedade apenas as características de plumagem do manto na geometria 45 foram utilizadas para definir a plumagem negra nas análises. As penas dessa região do corpo são maiores e apresentam bárbulas em maior densidade, facilitando a medição e provendo maior replicabilidade das medidas (Quesada & Senar 2006). Esse ângulo foi escolhido por ser o que retorna espectro com brilho máximo, provavelmente devido à rotação das bárbulas em relação ao eixo da barba (Osorio & Ham 2002). Talvez por esse mesmo motivo, essa configuração de medição retornou os espectros mais brilhantes e saturados também para a mancha branca, que não é iridescente (Santos et al. 2007).

No caso da plumagem subaxilar branca, foram utilizados apenas o brilho médio e o contraste, este último como estimativa de lividez, ou de “quão branco” é o espectro, considerando que contrastes maiores indicam maior desvio dessa cor. As seis características de coloração da plumagem negra foram, então, inseridas em uma análise de componentes principais (PCA), de modo a minimizar a influência das correlações entre elas e reduzir a dimensionalidade das variáveis. Os valores dos dois primeiros componentes foram utilizados para as análises subsequentes (Tabela 2.1).

Tabela 2.1. Coeficientes para os dois primeiros componentes de uma análise de componentes principais para seis variáveis relativas às características do espectro de reflexão de penas do manto de machos de tiziu.

Variável	PC1	PC2
B _{med}	0,828	0,527
I	0,879	0,474
λ_{\max}	-0,786	0,566
C	0,919	0,321
R _{uv}	0,824	-0,426
R _{azul}	0,824	-0,427
Variância explicada (%)	71,03	21,51

O componente 1 apresentou forte influência positiva do contraste, da intensidade máxima, dos cromas UV e azul e do brilho, além de uma influência negativa do matiz. Dessa forma, indivíduos com valores altos desse componente apresentam plumagem mais brilhante, mais saturada e com pico em comprimentos de onda mais baixo, enquanto indivíduos com valores baixos apresentam plumagem sem brilho ou definição cromática. Esse componente foi considerado, então, como um valor de coloração. O segundo componente, por sua vez, apresentou influência positiva principalmente do matiz, do brilho e da intensidade máxima, e influência negativa de ambos os cromas UV e azul. Essa medida foi considerada, assim, a inversa da proporção UV-azul no espectro. Os componentes juntos explicaram mais de 92% da variação total dos dados.

Análises estatísticas

Utilizou-se como medida de qualidade dos indivíduos um índice obtido dividindo-se a medida de massa pela medida do tarso (Costa & Macedo 2005, Aguilar et al. 2008). Assim, valores altos indicam indivíduos proporcionalmente mais pesados, e valores baixos indicam indivíduos proporcionalmente mais leves, independentemente do tamanho. Uma vez que há também uma relação positiva entre a data de captura e o percentual de plumagem nupcial apresentado pelo indivíduo, foi calculado um índice de muda baseado na regressão deste percentual (transformado pela função arcoseno, de modo a normalizar sua distribuição e tornar linear sua relação com o tempo) pelo tempo (Senar 2004). Assim, valores altos desse índice indicam indivíduos em estágio de muda mais avançado que o esperado, e valores baixos indicam indivíduos com muda mais lenta para a plumagem nupcial.

De modo a controlar para variações anuais, foram utilizados valores padronizados para a distribuição de Z (média = 0, desvio padrão = 1) para as características de coloração, calculados separadamente para cada ano. As relações entre as variáveis que caracterizam o espectro de reflectância das penas de machos de tiziu foram correlacionadas com seus índices de condição corporal e de plumagem nupcial. Somente uma variável apresentou distribuição diferente da normal (PC1; teste de Shapiro-Wilk, $W = 0,92$, $p = 0,005$). Como não foi possível transformar sua distribuição de modo a aproximá-la da normal, foram utilizadas correlações não-paramétricas de Spearman entre essa variável e as demais; em todos os outros casos, foram utilizadas correlações paramétricas de Pearson. Para diminuir as chances de erro do tipo I (refutar uma hipótese nula quando ela de fato é real), foram feitas correções seqüenciais de Bonferroni (Holm 1979), considerando-se as correlações entre cada característica morfológica e o conjunto de características de cada uma das áreas do corpo (iridescente e mancha branca) como testes da mesma hipótese, conforme recomendação de Montgomerie (2006).

Todas as análises foram conduzidas no programa R (ver. 2.6.1; R Development Core Team 2007), disponível gratuitamente em <http://cran.r-project.org>. Exceto quando indicado o contrário, os testes foram bi-caudais e os resultados estão apresentados na forma de média \pm erro padrão. Nos casos em que o teste não se apresentou significativo, os resultados são indicados na forma $p > \alpha'$, sendo α' o nível de significância ajustado devido à correção de Bonferroni.

RESULTADOS

Foram capturados e utilizados nas análises 43 machos, sendo 28 durante o primeiro ano e 15 durante o segundo. O espectro de reflectância das penas do dorso de machos apresentou saturação no espectro ultravioleta e azul (Fig. 2.1), sendo que nove machos (21%) apresentaram matiz no ultravioleta, 31 (72%) na faixa azul, e três (7%) em comprimentos de onda maior que 600nm (classificados como “negros” ou “marrons”; Tabela 2.2). A remoção desses indivíduos não alterou os resultados das análises e, portanto, eles foram mantidos.

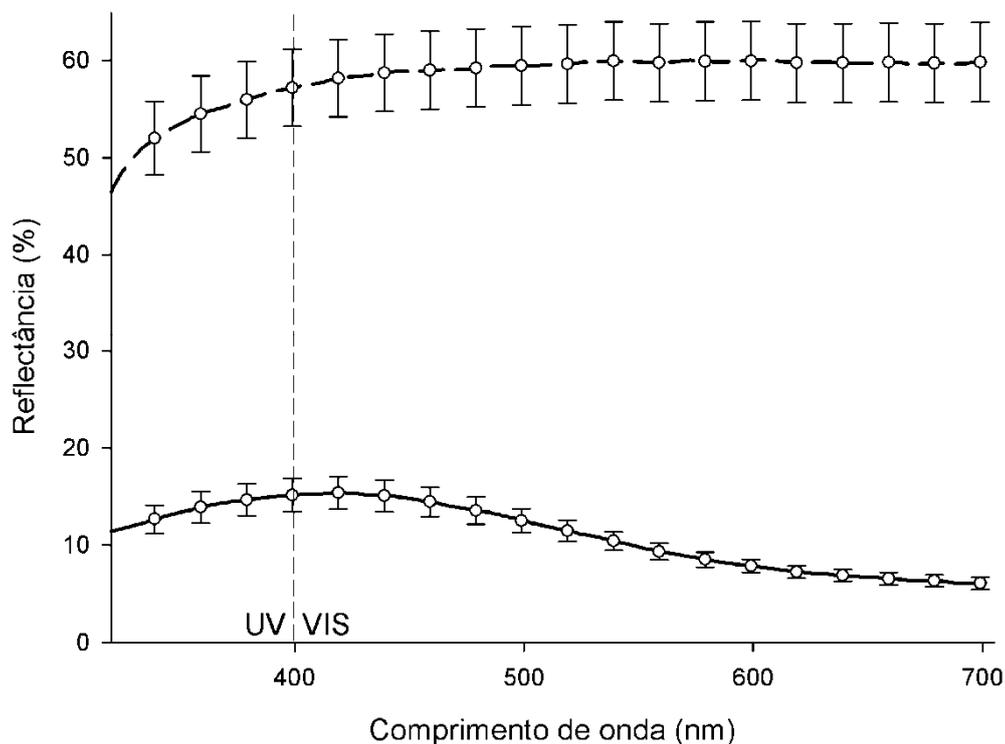


Figura 2.1. Espectro médio de reflectância de penas negras do manto (linha contínua) e de penas da mancha branca (linha tracejada) de machos de tiziu, medidos a 45° (N = 43, barras de erro representam intervalo de confiança de 95%).

Tabela 2.2. Valores (média ± EP) para as variáveis das características de coloração de penas negras do manto e da mancha branca de machos de tiziu.

Variável	Plumagem Negra (N = 43)	Mancha branca (N = 43)
B _{med} (%)	11,02 ± 0,54	58,10 ± 1,93
C (%)	10,38 ± 0,59	14,25 ± 0,69
I (%)	15,83 ± 0,81	
λ _{max} (nm)	432,71 ± 11,57	
R _{uv} (%)	25,88 ± 0,65	
R _{azul} (%)	34,29 ± 0,51	

O valor de coloração (PC1) das penas negras do manto de machos de tiziu está positivamente associado à condição corporal dos indivíduos ($r_s = 0,36$; $p = 0,019$; Fig. 2.2). Assim, machos em melhor condição corporal apresentam plumagem mais brilhante, saturada e com intensidade máxima em comprimentos de onda mais baixos. A proporção de UV-azul (PC2), entretanto, não está relacionada à condição corporal, e nem estão as medidas referentes à mancha branca (todas $p > 0,025$).

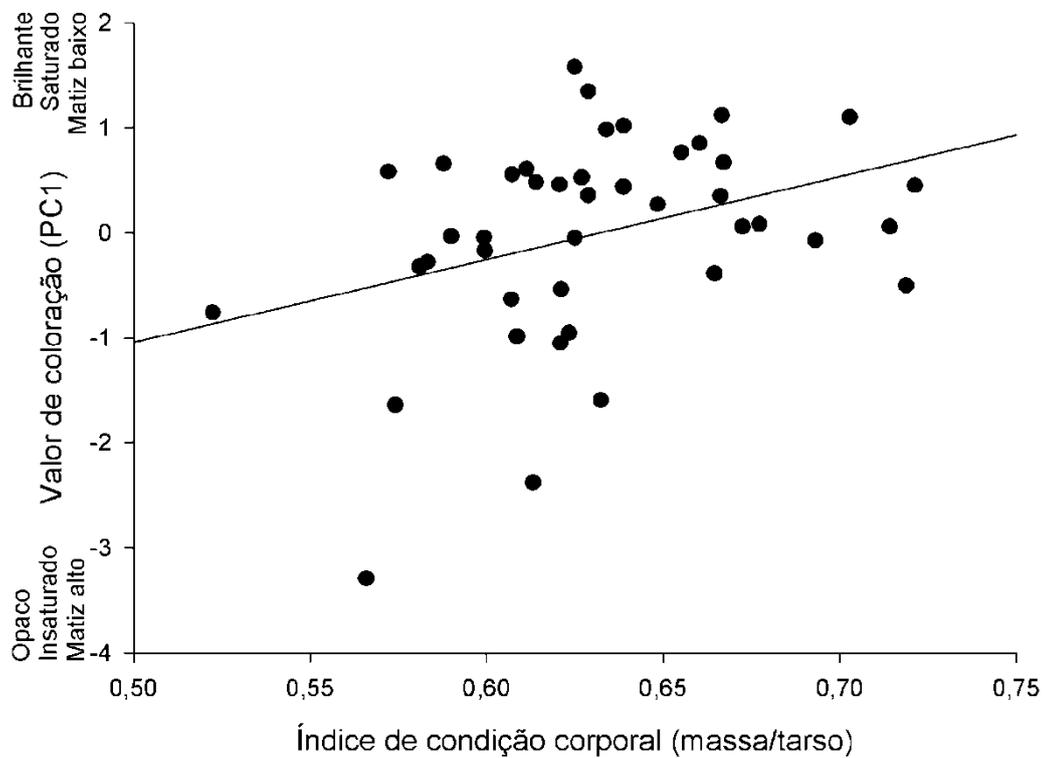


Figura 2.2. Relação entre o índice de condição corporal e características espectrais da plumagem de penas negras do manto de machos de tiziu ($r_s = 0,36$, $p = 0,019$).

Quando comparado ao índice de plumagem, o valor de PC1 também apresentou relação positiva significativa ($r_s = 0,65$, $p < 0,001$; Fig. 2.3). Ou seja, machos que estão proporcionalmente mais adiantados na muda para a plumagem negra apresentam plumagem

mais brilhante, saturada, e com intensidade máxima em comprimentos de onda mais baixos. A associação negativa encontrada entre o índice de plumagem e o contraste da mancha branca não se manteve significativa após a correção de Bonferroni ($r = -0,32$, $p = 0,036 > 0,025$; Fig. 2.4).

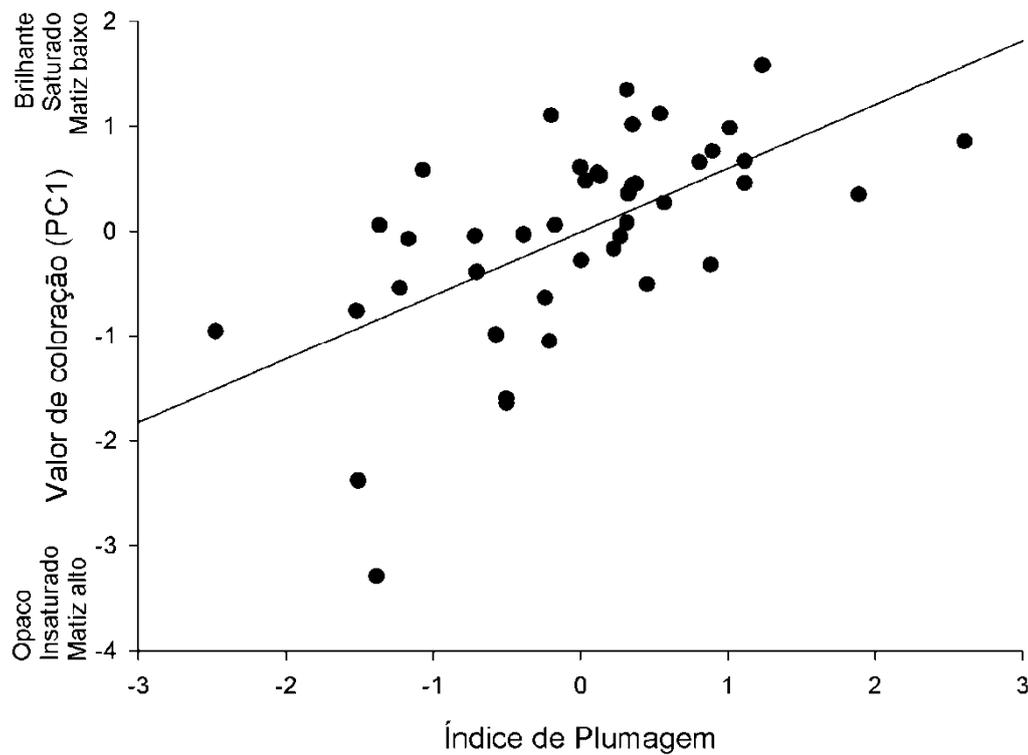


Figura 2.3. Relação entre o índice de plumagem e características espectrais da plumagem de penas negras do manto de machos de tiziu ($r_s = 0,65$, $p < 0,001$).

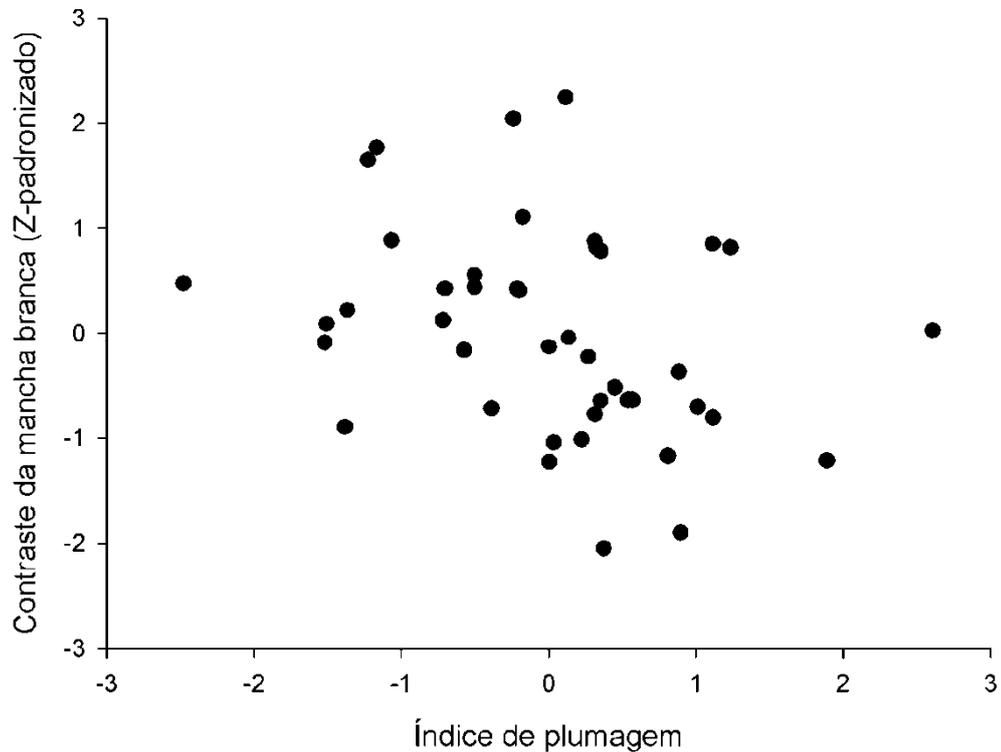


Figura 2.4. A relação entre o índice de plumagem e o contraste na mancha branca de machos de tiziu não se manteve significativa após a correção de Bonferroni ($r = -0,32$, $p = 0,036 > 0,025$).

Entretanto, a relação entre o valor de coloração e ambos os índices, de condição corporal e de plumagem, não se deve ao fato dessas duas características estarem relacionadas ($r = 0,25$, $p = 0,10$; Fig. 2.5). Assim, embora tanto machos em melhor condição corporal quanto aqueles que estão mais adiantados em sua muda para a plumagem nupcial apresentem uma cor mais brilhante e saturada, não são os machos em melhor condição corporal que se apresentam em estágios mais avançados de muda.

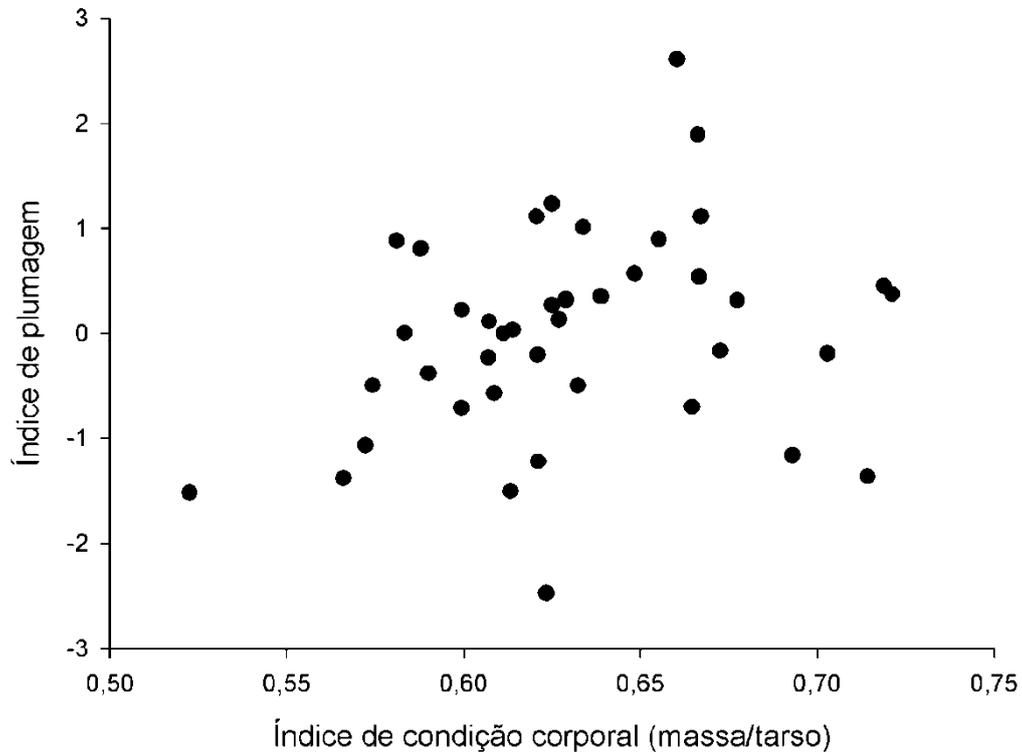


Figura 2.5. Não foi encontrada relação entre o índice de condição corporal e o índice de plumagem em machos de tiziu ($r = 0,35$, $p = 0,10$).

DISCUSSÃO

Nesse capítulo, foi encontrado que características espectrais da plumagem estrutural de machos de tiziu estão relacionadas às suas características morfológicas durante a época reprodutiva. Foi encontrada uma relação positiva entre a condição corporal dos machos durante o início da estação reprodutiva e a elaboração de sua plumagem nupcial, sugerindo que machos em melhor condição são aqueles que apresentam cores mais brilhantes, saturadas, e concentradas na faixa do ultravioleta. Dessa forma, esses resultados sugerem que a variação na coloração entre os indivíduos é uma característica que pode estar sendo utilizada por machos e fêmeas dessa espécie para avaliar a condição de seus co-específicos.

Além disso, os resultados sugerem que existe uma relação ainda mais estreita entre o índice de plumagem e as características de coloração. O índice de plumagem é uma medida relativa de investimento em plumagem nupcial, indicando quão distante está um indivíduo na progressão de sua muda do esperado ao longo do tempo. A relação encontrada sugere que indivíduos em estágio relativamente mais avançado de muda são também aqueles que apresentam coloração mais elaborada. Há também uma tendência destes indivíduos produzirem manchas brancas mais lívidas, mas essa tendência não se manteve significativa após correções para múltiplos testes.

Entretanto, as relações encontradas não são artefatos de uma possível relação entre a condição corporal dos indivíduos e seu investimento em plumagem nupcial, uma vez que essas duas características não estão correlacionadas. Assim, os indivíduos em melhor condição corporal não possuem características de coloração mais elaboradas por investirem de forma diferenciada na muda para a plumagem nupcial, sugerindo que existem duas vias diferentes que podem resultar em uma plumagem mais elaborada.

O tiziu foi uma das primeiras espécies para a qual foi sugerida uma relação entre condição corporal e ornamentação da plumagem estrutural (Doucet 2002). Nesse estudo, foi encontrada uma relação entre o tamanho das barras de crescimento de penas da cauda, uma medida estimada de condição corporal durante a muda, e um componente extraído de uma PCA muito similar ao encontrado aqui. Também foi encontrada uma relação entre a condição corporal e o percentual de plumagem nupcial dos indivíduos, diferente do que foi encontrado no presente estudo.

No entanto, diversas diferenças entre o estudo citado e o presente estudo precisam ser ressaltadas. Além do tamanho amostral, quase quatro vezes menor que o aqui utilizado, o estudo de Doucet (2002) foi conduzido fora do período reprodutivo dos tizius para aquela região. Como a muda para plumagem nupcial é realizada no início da estação reprodutiva, a

taxa de crescimento das penas de vôo foi utilizada como estimativa da condição corporal (Grubb 1989) dos tizius durante a muda. Entretanto, como em diversas outras aves que realizam muda entre plumagem básica e nupcial, a muda de penas coberteiras (que caracterizam a plumagem como nupcial ou não) não é realizada ao mesmo tempo que a muda das penas de vôo (Humphrey & Parkes, 1959). Então, é possível que essa estimativa não seja a mais correta. Mesmo assim, é aceitável considerar que padrões relativos de muda nupcial e de penas de vôo sejam intra-individualmente consistentes, validando dessa forma sua comparação inter-individual.

A relação entre condição corporal e percentual de plumagem nupcial, encontrada por Doucet (2002) mas não neste estudo, pode indicar diferenças na regulação da muda para a plumagem nupcial e novamente para a básica. Embora seja possível que indivíduos em melhor condição corporal não invistam mais no desenvolvimento de plumagem nupcial, pode haver vantagens para esses indivíduos associadas à sua manutenção por um período mais longo fora da estação reprodutiva. Já foi demonstrado, por exemplo, que resultados de interações entre machos de *Poecile atricapillus* fora da época reprodutiva são determinados pelo tamanho da mancha negra que possuem na cabeça, e que machos dominantes apresentam maior sucesso reprodutivo (Otter et al. 1998). Fêmeas dessa espécie também acessam a dominância do macho por esta característica, e aquelas pareadas com machos mais dominantes apresentam maior sucesso reprodutivo (Otter et al. 1999).

Uma vez que manter características indicadoras de dominância pode incorrer em custos sociais (por aumentar a agressividade de outros machos dominantes), uma associação entre qualidade e o ornamento sinalizador é esperada (Mateos & Carranza 1997). Entretanto, a evidência de que plumagem estrutural apresenta essa função sinalizadora ainda é pouco clara. No pássaro-azul-de-garganta-canela (*Sialia sialis*), por exemplo, a plumagem estrutural atua em interações intra-sexuais durante o período reprodutivo, definindo quem ocupa primeiro as

cavidades usadas como ninhos (Siefferman & Hill 2005). Já no chapim azul (*Cyanistes (Parus) caeruleus*), ornamentos de coloração estrutural não são usados fora do período reprodutivo para determinar hierarquia (Vedder et al., no prelo), embora durante o período reprodutivo machos com maior reflectância no ultravioleta sejam menos atacados em interações agonísticas (Alonzo-Alvarez et al. 2004).

O presente estudo sugere, entretanto, que as características de coloração de machos de tiziu estão diretamente associadas à sua condição corporal no início da estação reprodutiva, período no qual realizam muda para plumagem nupcial. Dessa forma, é possível que a cor produzida pela plumagem nupcial do tiziu seja um indicador honesto de qualidade individual (Zahavi 1975). Entretanto, indivíduos que não estavam necessariamente em melhor condição corporal, mas que estavam em estágios avançados de muda, também apresentavam cores mais saturadas e brilhantes. Visto que não há relação direta entre condição corporal e o índice de plumagem, essa evidência isolada poderia sugerir que a relação honesta entre o sinal e seu conteúdo não se mantenha.

No entanto, existem evidências contra esse argumento. É necessário lembrar que a muda para a plumagem nupcial é um evento custoso, que resulta em um fenótipo associado à reprodução. Em um estudo anterior com essa espécie, foi demonstrado que parasitas podem afetar a condição corporal de indivíduos e também o investimento em plumagem nupcial, mas que não há relação entre a condição corporal e a plumagem (Costa & Macedo 2005). Esses resultados sugerem que parasitas podem afetar diretamente o investimento na plumagem nupcial, e não indiretamente, por afetar sua condição corporal. Portanto, a taxa de muda ou o período no qual o indivíduo executa esse investimento podem refletir a qualidade individual.

Primeiramente, pode haver uma associação entre um componente genético e o índice de plumagem que um indivíduo apresenta. Nessa situação, não haveria um efeito ambiental marcante sobre a aquisição da plumagem nupcial, o que pode explicar sua dissociação da

condição corporal (Hill 2006). Entretanto, se há esse vínculo genético e se fêmeas preferem essa característica, os machos com esse(s) gene(s) irão produzir mais descendentes, que também apresentarão essa característica (“*sexy son hypothesis*”; Weatherhead & Robertson 1979). Como essa característica não pode ser “copiada” por indivíduos que não possuem esse(s) gene(s), a relação honesta entre a característica fenotípica e o genótipo desejado é mantida (Kokko et al. 2002).

Outra possibilidade é que a capacidade de executar uma muda para a plumagem nupcial mais cedo ou mais rapidamente esteja associada com a idade. Em aves, conforme indivíduos ganham experiência, são capazes de defender melhores territórios e forragear com maior eficácia, o que é refletido em uma muda realizada mais cedo (Heise & Moore 2003). Se esse for o caso no tiziu, apenas indivíduos mais velhos ou mais experientes (que apresentariam índice de plumagem superior), e indivíduos com maior qualidade corporal, seriam capazes de exibir a plumagem ornamental. Se considerarmos que a idade pode ser um indicador de qualidade, representando que o indivíduo é capaz de sobreviver e reproduzir por um período maior (Andersson 1994), co-específicos poderiam obter informações gerais de qualidade através de características de reflectância da plumagem de machos de tiziu. Dados os resultados apresentados no capítulo três, é provável que este seja o caso na espécie estudada.

Finalmente, é possível que as vias de desenvolvimento de uma plumagem mais ornamentada, tal como encontradas para o tiziu, representem estratégias de alocação de recursos dependentes do contexto ou da história de vida de indivíduos (Badyaev & Qvörnstrom 2002). Quando o investimento em uma característica sexual secundária varia de acordo com a história de vida, ou com o contexto social ou ecológico, a seleção natural pode favorecer um desenvolvimento destes ornamentos que seja sensível a esse contexto (Emlen & Nijhout 2000; Badyaev 2006). No caso da plumagem de aves, o investimento em cores ou ornamentos tem que ser balanceado em relação ao investimento em cuidado parental, sucesso

reprodutivo e à expectativa de reprodução futura (Svensson & Nilsson 1997). Portanto, a expressão de um mesmo ornamento pode se dar por vias distintas se indivíduos estão em contextos diferentes.

A prolactina, hormônio responsável pela regulação do cuidado parental, é também a responsável pela regulação da muda em aves (Dawson & Sharp 1998), podendo ser, então, um mediador proximal desse balanço de investimento. No tentilhão comum (*Carpodacus mexicanus*), foi demonstrado que machos que reproduziram e que não reproduziram em um determinado ano apresentaram vias diferentes de expressão de seus ornamentos (babador vermelho; Badyaev & Vleck 2007). Machos não-reprodutivos entraram em muda com maior qualidade corporal, mas taxas mais baixas de prolactina na circulação. Nesses machos, foi encontrada uma relação positiva entre condição corporal e características de sua coloração, definida por pigmentos carotenóides. No entanto, machos que reproduziram entraram em muda em condição corporal pior, mas devido aos níveis circulantes de prolactina foram também capazes de desenvolver uma plumagem bastante ornamentada. Dessa forma, devido ao controle hormonal, indivíduos de baixa condição corporal podem produzir ornamentos tão exuberantes quanto indivíduos em boa condição, dependendo do seu status reprodutivo anterior.

Nessa mesma espécie, foi encontrada também uma relação entre a história de vida e a via de expressão do mesmo ornamento. Em indivíduos jovens, que geralmente têm menor chance de reproduzir, há uma associação forte entre a expressão do ornamento e sua condição corporal; no entanto, à medida que os indivíduos envelhecem, essa associação vai gradualmente diminuindo até ser virtualmente inexistente (Badyaev & Duckworth, 2003). Provavelmente, devido à citada mediação hormonal, machos mais velhos e com maior chance de reproduzir não dependem de um investimento direto na muda para obterem ornamentos elaborados. Infelizmente, a relação entre ornamentos, hormônios e reprodução não é

conhecida no tiziu, mas é provável que uma mediação similar possa resultar em vias alternativas para o desenvolvimento da plumagem estrutural de machos.

Pouco se conhece da relação entre muda e características de coloração de plumagem, especialmente estrutural. Também no citado *C. mexicanus*, foi encontrada uma relação entre o início da muda e a coloração, sendo que machos que iniciam a muda mais cedo apresentam plumagem mais brilhante (Hill & Montgomerie 1994). No único estudo realizado experimentalmente até o momento, foi demonstrado que a aceleração da taxa de muda no pardal francês (*Petronia petronia*) resultou em um babador amarelo menor e menos brilhante (Serra et al. 2007).

Embora diversos estudos usem a taxa de crescimento de penas como indicador de condição corporal durante a muda em estudos de plumagem estrutural (e.g. Keyser & Hill 2000; Doucet 2002; Doucet & Montgomerie 2003), não há estudos que relacionem variação na taxa ou no momento de início da muda a variações em suas características de coloração. Somente um estudo até o momento verificou experimentalmente um efeito negativo da privação de alimentos durante a muda em características espectrais de cores estruturais em penas de aves (McGraw et al. 2002). Porém, não foi feito um acompanhamento dos indivíduos em relação ao seu padrão de investimento em penas estruturais, não havendo assim como saber se o estresse nutricional afetou essa característica. Este, portanto, é o primeiro estudo a sugerir que indivíduos em estágios relativamente mais avançados de muda apresentam cores estruturais mais brilhantes e saturadas. Estudos futuros devem buscar entender que mecanismos ecológicos, sociais e de história de vida são responsáveis por favorecer essa condição, assim como os mecanismos proximais e endocrinológicos que regulam o investimento na plumagem estrutural por machos de tiziu.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar, T. M., Maia, R., Santos, E. S. A. & Macedo, R. H.** 2008. Parasite levels in blue-black grassquits correlate with male displays but not female mate choice. *Behavioral Ecology*, **19**, 292-301.
- Almeida, J. B. & Macedo, R. H.** 2001. Lek-like mating system of the monogamous blue-black grassquit. *The Auk*, **118**, 404-411.
- Alonso-Alvarez, C., Doutrelant, C., & Sorci, G.** 2004. Ultraviolet reflectance affects male-male interactions in the blue tit (*Parus caeruleus ultramarinus*). *Behavioral Ecology*, **15**, 805-809.
- Andersson, M.** 1994. Sexual Selection. Nova Jersey: Princeton University Press.
- Badyaev, A. V.** 2006. Colorful phenotypes of colorless genotypes: towards a new evolutionary synthesis of animal color displays. In: *Bird Coloration Vol. II: Function and Evolution* (Ed. by G. E. Hill and K. J. McGraw), pp. 349-379. Cambridge: Harvard University Press.
- Badyaev, A.V. & Qvörnstrom, A.** 2002. Putting sexual traits into the context of an organism: a life-history perspective in the studies of sexual selection. *The Auk*, **119**, 301-310.
- Badyaev, A.V. & Duckworth, R. A.** 2003. Context-dependent sexual advertisement: plasticity in development of sexual ornamentation throughout the lifetime of a passerine bird. *Journal of Evolutionary Biology*, **16**, 1065-1076.
- Badyaev, AV & Vleck, CM.** 2007. Context-dependent development of sexual ornamentation: implications for a trade-off between current and future breeding efforts. *Journal of Evolutionary Biology*, **20**, 1277-1287.

- Bowmaker, J. K., Heath, L. A., Wilkie, S. E. & Hunt, D. M.** 1997. Visual pigments and oil droplets from six classes of photoreceptor in the retinas of birds. *Vision Research*, **37**, 2183-2194.
- Carvalho, C. B., Macedo, R. H. & Graves, J.** 2006. Breeding strategies of a socially monogamous neotropical passerine: extra-pair fertilizations, behavior and morphology. *The Condor*, **108**, 579-590.
- Costa, F. J. V. & Macedo, R. H.** 2005. Coccidian oocyst parasitism in the blue-black grassquit: influence on secondary sex ornaments and body condition. *Animal Behaviour*, **70**, 1401-1409.
- Cuthill, I. C.** 2006. Color perception. In: *Bird Coloration, Vol. I: Mechanisms and Measurements* (Ed. by G. E. Hill & K. J. McGraw), pp. 3-40. Cambridge: Harvard University Press.
- Darwin, C.** 1871. *The descent of man and selection in relation to sex*. Londres: Murray.
- Dawson, A. & Sharp, P. J.** 1998. The role of prolactin in the development of photorefractoriness and post-nuptial molt in the European Starling (*Sturnus vulgaris*). *Endocrinology*, **139**, 485-490.
- Dias, R. I.** 2006. The role of ultraviolet wavelength in sexual selection. *Revista Brasileira de Ornitologia*, **14**, 191-195.
- Doucet, S. M.** 2002. Structural plumage coloration, male body size, and condition in the blue-black grassquit. *The Condor*, **104**, 30-38.
- Doucet, S. M. & Montgomerie, R.** 2003. Multiple sexual ornaments in satin bowerbirds: ultraviolet plumage and bowers signal different aspects of male quality. *Behavioral Ecology*, **14**, 503-509.

- Doucet, S. M., Shawkey, M. D., Hill, G. E. & Montgomerie, R.** 2006. Iridescent plumage in satin bowerbirds: structure, mechanisms and nanostructural predictors of individual variation in colour. *Journal of Experimental Biology*, **209**, 380-390.
- Emlen, D. J., Nijhout, H. F.** 2000. The development and evolution of exaggerated morphologies in insects. *Annual Review of Entomology*, **45**, 661-708.
- Grubb, T. C.** 1989. Ptilochronology: feather growth bars as indicators of nutritional status. *The Auk*, **106**, 314-320.
- Heise, C. D. & Moore, F. R.** 2003. Age-related differences in foraging efficiency, molt, and fat deposition of gray catbirds prior to autumn migration. *The Condor*, **105**, 496-504.
- Hill, G. E.** 2006. Environmental regulation of ornamental coloration. In: *Bird Coloration, Vol. I: Mechanisms and Measurements* (Ed. by G. E. Hill and K. J. McGraw), pp. 507-560. Cambridge: Harvard University Press.
- Hill, G. E., & Montgomerie, R.** 1994. Plumage colour signals nutritional condition in the House Finch. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*, **258**, 47-52.
- Hill, G., Doucet, S. M. & Buchholz, R.** 2005. The effect of coccidial infection on iridescent plumage coloration in wild turkeys. *Animal Behaviour*, **69**, 387-94.
- Holm, S.** 1979. A simple sequential rejective multiple test procedure based on a modified Bonferroni test. *Biometrika*, **75**, 383-386.
- Hõrak, P., Saks, L., Karu, U., Ots, I., Surai, P. F. & McGraw, K. J.** 2004. How coccidian parasites affect health and appearance of greenfinches. *Journal of Animal Ecology*, **73**, 935-947.
- Humphrey, P. S. & Parkes, K. C.** 1959. An approach to the study of molts and plumages. *The Auk*, **76**, 1-31.

- Inouye, C.Y., Hill, G. E., Stradi, R. D., Montgomerie, R.** 2001. Carotenoid pigments in male house finch plumage in relation to age, subspecies, and ornamental coloration. *The Auk*, **118**, 900-915.
- Keyser, A. J. & Hill, G. E.** 2000. Structurally based plumage coloration is an honest signal of quality in male blue grosbeaks. *Behavioral Ecology*, **11**, 202-209.
- Kokko, H., Brooks, R., McNamara, J. M., & Houston, A.I.** 2002. The sexual selection continuum. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*, **266**, 771-777.
- Liu, M., Siefferman, L. & Hill, G. E.** 2007. Experimental test of female choice relative to male structural coloration in eastern bluebirds. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **61**, 623–630.
- Loyau, A., Gomez, D., Moureau, B., Théry, M., Hart, N. S., Saint Jalme, M., Bennett, A. T. D. & Sorci, G.** 2007 . Iridescent structurally based coloration of eyespots correlates with mating success in the peacock. *Behavioral Ecology*, **18**, 1123-1131.
- Marchetti, K.** 1998. The evolution of multiple male traits in the Yellow-browed Leaf Warbler. *Animal Behavior*, **55**, 361-376.
- Mateos, J. & Carranza, J.** 1997. The role of bright plumage in male-male interactions in the Ring-necked Pheasant. *Animal Behaviour*, **54**, 1205-1214.
- McGraw, K. J.** 2006. Mechanics of carotenoid-based coloration. In: *Bird Coloration, Vol. I: Mechanisms and Measurements* (Ed. by G. E. Hill and K. J. McGraw), pp. 177-242. Cambridge: Harvard University Press.
- McGraw, K. J., Mackillop, E. A., Dale, J. & Hauber, M. E.** 2002. Different colors reveal different information: how nutritional stress affects the expression of melanin- and structurally based ornamental coloration. *Journal of Experimental Biology*, **205**, 3747-3755.

- Montgomerie, R.** 2006. Analyzing colors. In: *Bird Coloration, Vol. I: Mechanisms and Measurements* (Ed. by G. E. Hill and K. J. McGraw), pp. 90-147. Cambridge: Harvard University Press.
- Mullen, P. & Pohland, G.** 2008. Studies on UV reflection in feathers of some 1000 bird species: are UV-peaks in feathers correlated with VS/UVS cones? *Ibis*, **150**, 59-68.
- Osorio, D. & Ham, A. D.** 2002. Spectral reflectance and directional properties of structural coloration in bird plumage. *Journal of Experimental Biology*, **205**, 2017-2027.
- Otter, K. L., Ratcliffe, K., Michaud, D. & Boag, P.T.** 1998. Do female Black-capped Chickadees prefer high-ranking males as extra-pair partners? *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **45**, 25-36.
- Otter, K., Ramsay, S. M. & Ratcliffe, L.** 1999. Enhanced reproductive success of female black-capped chickadees mated to high-ranking males. *The Auk*, **116**, 345-354.
- Prum, R. O.** 2006. Anatomy, physics, and evolution of avian structural colors. In: *Bird Coloration, Vol. I: Mechanisms and Measurements* (Ed. by G. E. Hill and K. J. McGraw), pp. 295-355. Cambridge: Harvard University Press.
- Quesada, J. & Senar, J.C.** 2006. Comparing plumage colour measurements obtained directly from live birds and from collected feathers: the case for the great tit *Parus major*. *Journal of Avian Biology*, **37**, 609-616.
- R Development Core Team.** 2007. R: A Language for Data Analysis and Graphics. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Áustria. (Disponível em <http://cran.r-project.org/>).
- Santos, S. I. C. O., De Neve, L., Lumeij, J. T. & Förschler, M. I.** 2007. Strong effects of various incidence and observation angles on spectrometric assessment of plumage colouration in birds. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **61**, 1499-1506.

- Senar, J. C.** 2004. Mucho más que plumas (Monografies del Museu de Ciències Naturals vol. 2). Barcelona: Museo de Ciencias Naturales.
- Serra, L., Griggio, M., Licheri, D. & Pilastro, A.** 2007. Moults speed constrains the expression of a carotenoid-based sexual ornament. *Journal of Evolutionary Biology*, **20**, 2028-2034.
- Shawkey, M. D., Estes, A. M., Siefferman, L. & Hill, G. E.** 2003. Nanostructure predicts intraspecific variation in ultraviolet-blue plumage colour. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*, **270**, 1471-2954.
- Sick, H.** 1997. Ornitologia Brasileira, Segunda Edição. Rio de Janeiro: Nova Fronteira.
- Siefferman, L. & Hill, G. E.** 2005. UV-blue structural coloration and competition for nestboxes in male eastern bluebirds. *Animal Behaviour*, **69**, 67-72.
- Svensson, E. & Nilsson, J.-A.** 1997. The trade-offs between molt and parental care: a sexual conflict in the blue tit? *Behavioral Ecology*, **8**, 92-98.
- Vedder, O., Korsten, P., Magrath, M. J. L., Komdeur, J.** No prelo. Ultraviolet does not signal social status in free-living blue-tits: an experimental test. *Behavioral Ecology*.
- Weatherhead, P. J., & Robertson, R. J.** 1979. Offspring quality and the polygyny threshold: 'The sexy son hypothesis'. *American Naturalist*, **113**, 201-208.
- Wolfenbarger, L.L.** 1999. Is the red coloration of male Northern Cardinals beneficial during the nonbreeding season? A test of status signaling. *The Condor*, **101**, 655-663.
- Zahavi, A.** 1975. Mate selection – a selection for a handicap. *Journal of Theoretical Biology*, **53**, 204-214.

Capítulo 3

Características de plumagem variam com idade, filopatria e estação reprodutiva em machos de tiziu (*Volatinia jacarina*)

INTRODUÇÃO

Em diversas espécies de aves dicromáticas, a diferenciação de coloração entre os sexos se dá de maneira relacionada à idade. Na maioria dos casos, machos realizam muda após o primeiro ano de vida, quando adquirem sua maturidade sexual, mantendo essa plumagem adulta desse momento em diante. Entretanto, mesmo nesse caso diferenças quantitativas na plumagem de indivíduos, principalmente machos, podem existir com relação à idade (Hill 1996). Essa variação de plumagem é conhecida como “relativa à idade” (*age-related*). Em casos menos frequentes, machos mais jovens apresentam uma diferença qualitativa de plumagem em relação a machos mais velhos, mantendo a plumagem críptica da fêmea após atingirem idade adulta, podendo ser ou não acompanhado de um atraso na maturação sexual; essa relação entre dicromatismo e idade é conhecida como “maturação atrasada de plumagem” (*delayed plumage maturation*; Hill 1996). Em alguns píprídeos, como *Chiroxiphia linearis*, a aquisição da plumagem adulta completa pode demorar até cinco anos (McDonald 1989; Doucet et al. 2007).

Diversas espécies que apresentam maturação de plumagem atrasada passam ainda por mudas anuais completas ou parciais, alternando uma plumagem similar à da fêmea (básica ou pré-nupcial) quando fora da estação reprodutiva, e a plumagem de macho adulto (alternativa ou nupcial; Humphrey & Parkes 1959) durante a época de reprodução. Diversas hipóteses tem sido propostas e amplamente testadas quanto ao valor adaptativo de atrasar a plumagem

adulta ou de reverter à plumagem básica quando fora do período reprodutivo. As duas que mais têm recebido atenção sugerem que machos jovens ou quando fora do período reprodutivo obtêm vantagens de se parecer com fêmeas por serem tratados como tal (hipótese do mimetismo de fêmea; Rohwer et al. 1980), ou que machos podem sinalizar sua posição de subordinado ou como reprodutivamente inativo, e que portanto não representam ameaça a outros machos (hipótese da sinalização de status; Lyon & Montgomerie 1986). Embora as possíveis vantagens de se atrasar a maturação da plumagem tenham recebido bastante atenção recente, pouca atenção tem sido dada à possível variação quantitativa relacionada à idade na plumagem nupcial. Especialmente em espécies que realizam muda da plumagem pré-nupcial para nupcial anualmente, essa variação pode ser inclusive similar à variação relativa à idade que ocorre em espécies que não apresentam maturação atrasada de plumagem.

Em diversas espécies de aves, machos mais velhos aumentam seu sucesso reprodutivo por conseguirem obter mais cópulas extra-par e também por sofrerem menos perda de paternidade em seus próprios ninhos (Kempnaers et al. 1992; Richardson & Burke 1999; Bitton et al. 2007). Considerando que machos de maior qualidade são capazes tanto de sobreviver mais quanto de investirem mais em ornamentos sexuais (Jennions et al. 2001), diversos desses ornamentos podem evoluir para representarem sinais honestos de qualidade (Andersson 1994). Em aves, essa associação tem sido bastante estudada em relação ao canto, que geralmente apresenta características (e.g. tamanho de repertório, número de elementos) mais desenvolvidas em indivíduos mais velhos (Gil et al. 2001). Mais recentemente, diversos estudos tem buscado relacionar a variação de características de plumagem à idade (Siefferman et al. 2005; Delhey & Kempnaers 2006; Bitton & Dawson no prelo).

Em estudos dessa natureza, é importante combinar abordagens diferentes para entender as verdadeiras fontes de variação da população. Diversos autores (Gil et al. 2001; Siefferman et al. 2005) têm recomendado fortemente o uso combinado de dados transversais

(comparando indivíduos de diferentes classes etárias durante uma mesma época; *cross-sectional*), longitudinais (monitorando determinados indivíduos ao longo de múltiplos anos) e de taxa de retorno. Análises transversais podem revelar diferenças entre classes etárias, mas não consideram a possibilidade dessas diferenças serem causadas por uma mortalidade diferenciada associada à característica sendo considerada. Já as análises longitudinais permitem que se verifique como essas alterações se dão ao longo do tempo, mas não consideram contrastes populacional entre classes etárias em um dado momento. Finalmente, análises de retorno oferecem indicativos da taxa de sobrevivência associada à característica, mas pode ser confundida pela probabilidade de dispersão estar também relacionada à característica. Assim, a combinação dessas metodologias oferece a possibilidade de identificar o contraste entre classes etárias, a contribuição genética e ambiental à variação da característica ao longo do tempo, e os custos de mortalidade associados à expressão do ornamento.

O tiziu, *Volatinia jacarina*, apresenta maturação atrasada de plumagem, sendo que fêmeas têm plumagem parda com o peito branco salpicado de marrom e machos reprodutivos possuem plumagem estrutural iridescente negra-azulada, com manchas brancas subaxilares. Essa plumagem se desenvolve durante o início da estação reprodutiva, quando machos migram para o Brasil Central; fora desse período, eles efetuam muda para uma plumagem críptica similar à da fêmea, embora a maioria dos machos retenha algumas manchas de plumagem nupcial durante todo o ano (entre 17-25% em algumas regiões do corpo; Doucet 2002).

Na época reprodutiva, defendem territórios bastante pequenos e aglomerados (Murray Jr. 1982; Almeida & Macedo 2001), onde executam seu chamativo *display*, caracterizado por um salto vertical curto acompanhado do canto. Nesse contexto, é bem provável que tanto a plumagem negra quanto a mancha branca apresentem características de sinalização e que

sejam de extrema importância na comunicação intra-específica. Estudos anteriores demonstraram que características espectrais da plumagem negra estão associadas à condição corporal durante a muda (Doucet 2002) e que o total de plumagem negra apresentado por um indivíduo está associado à sua carga parasitária (Costa & Macedo 2005). Entretanto, nenhum estudo até o momento demonstrou função de sinalização da mancha branca. O presente estudo tem, portanto, o objetivo de avaliar como características da plumagem de machos de tiziu, tanto da plumagem negra quanto da mancha branca, estão associadas à idade dos indivíduos. Para isso, combinamos dados que possibilitaram a realização de análises transversais, longitudinais e de probabilidade de retorno à área de estudos, para testar as hipóteses de que (1) machos mais velhos são capazes de investir em uma plumagem nupcial mais brilhante e saturada; (2) ao longo do tempo, machos investem mais em plumagem nupcial, que também apresenta as características citadas, e (3) machos de plumagem de melhor qualidade têm maior probabilidade de retorno à área de estudos no ano após sua captura.

METODOLOGIA

Área de estudos e coleta de amostras

O estudo foi conduzido em um pomar abandonado, inserido em uma matriz de cerrado preservado na Fazenda Água Limpa (15°56'S 47°56'W), uma fazenda experimental de propriedade da Universidade de Brasília, visto que tizius são conhecidos por reproduzirem-se em grandes densidades em ambientes alterados ou em estágios iniciais de sucessão (Sick 1997). Nessa área, de aproximadamente 2,56ha, foi demarcado *grid* utilizando-se 86 estacas individualmente numeradas e distantes em 20m umas das outras. A captura de machos foi realizada durante três estações reprodutivas, sendo a primeira entre 04 de novembro de 2005 e 22 de janeiro de 2006 (estação reprodutiva 1), a segunda entre 13 de novembro de 2006 e 10

de janeiro de 2007 (estação reprodutiva 2), e a terceira entre 04 de novembro de 2007 e 07 de janeiro de 2008 (estação reprodutiva 3).

Durante esse período, indivíduos foram capturados com o auxílio de 3 a 5 redes de neblina, armadas diariamente na área de estudos. Em todos os anos, esforços de captura foram concentrados no período entre a chegada de migração e o estabelecimento de territórios, pois durante esse tempo, indivíduos encontram-se forrageando ativamente em bandos grandes, facilitando assim sua captura. Todos os indivíduos capturados foram marcados com uma anilha metálica numerada do CEMAVE, além de uma combinação única de três anilhas plásticas coloridas. O procedimento de captura incluiu também medidas da asa e do tarso esquerdos, da cauda e da narina, feitas com o auxílio de um paquímetro (precisão de 0,01mm), e pesagem utilizando um dinamômetro de mola (Pesola®, precisão de 0,2g). No caso dos machos, dados referentes à plumagem nupcial e ornamentos sexuais foram também coletados. A cobertura de plumagem nupcial foi medida na cabeça, no manto, na região do uropígio e no peito, contando-se quantas partes de um disco plástico transparente, dividido em oito partes iguais estavam preenchidas por plumagem negra quando este era sobreposto a diferentes partes do corpo da ave. Uma estimativa do percentual de plumagem nupcial foi obtido através de uma média, ponderada para as quatro partes medidas, da divisão do número de partes preenchidas por plumagem negra pelo número total de partes do disco. Para análise espectral, foram coletadas três penas da plumagem nupcial da cabeça, do manto e do peito de cada macho, além de duas penas brancas de cada uma das manchas subaxilares. Essas penas foram fixadas com fita crepe a um cartão de papel com a identificação do indivíduo e da região do corpo de onde foram coletadas, e o cartão por sua vez foi embalado em papel alumínio e mantido em ambiente fresco e seco. Quando indivíduos foram recapturados em anos posteriores, os mesmos procedimentos foram executados, de maneira cega a informações de anos anteriores.

Machos de tiziu não podem ser classificados etariamente com base em características morfológicas. Além disso, as taxas de filopatria e de sobrevivência à migração são desconhecidas para essa espécie. Portanto, esse estudo também tenta esclarecer essas questões pela primeira vez. Os dados abaixo sugerem que, embora a taxa de retorno não seja muito alta, ela permanece a mesma ao longo dos anos, e portanto é uma estimativa razoável e válida para esse estudo. É possível que, devido à baixa sobrevivência ou a mudanças na escolha de local de reprodução, a taxa de retorno seja efetivamente baixa, e assim, que novas capturas representem realmente indivíduos reproduzindo pela primeira vez ou relativamente jovens. Assim, utilizamos o status de captura como um substituto de idade nas análises, onde “nova captura” se refere a indivíduos relativamente jovens, e “recaptura” indica indivíduos relativamente velhos.

Espectrofotometria

Para as análises espectrais, as penas coletadas de cada região do corpo de cada indivíduo foram conjuntamente fixadas com fita crepe a um papel camurça negro, de forma a simular a organização dessas penas no corpo do pássaro. A reflectância dessas penas foi então medida utilizando-se um espectrofotômetro Ocean Optics USB4000 e uma fonte de luz de xenônio pulsante PX-2 (Ocean Optics, Dunedin, Florida), que fornece iluminação no espectro ultravioleta e no visível para humanos (250-750nm).

As medidas de reflectância foram tomadas em relação a um branco padrão WS-1-SS (Ocean Optics, Dunedin, Florida) e em duas geometrias de medição: perpendicular à superfície das penas, ou seja, tanto a luz incidente quanto a reflexão medida em paralelo à normal, e com ambas as fibras de emissão e coleta de luz em ângulos opostos de 45° à normal. No primeiro caso, foi utilizada uma fibra ótica bifurcada, com uma ponta ligada à fonte de luz e outra ao espectrofotômetro, sendo a ponta de leitura fixada a um segurador escuro para

impedir a leitura de fontes de luz que não a lâmpada. Já para o ângulo de 45°, foram utilizadas duas fibras óticas bifurcadas, sendo que uma estava ligada à fonte de luz e outra ao espectrofotômetro, e ambas as pontas sobressalentes encontravam-se protegidas da entrada externa de luz. Foi utilizado um segurador de fibra que permitia segurá-las no ângulo desejado e também as isolava da luz ambiente. Em ambos os casos, as fibras encontravam-se a aproximadamente 6mm da superfície da pena, proporcionando uma área de leitura de 2mm.

As medidas espectrais foram tomadas com o programa SpectraSuite (Ocean Optics, Dunedin, Florida). Foram feitas cinco medidas de cada região do corpo em cada geometria, sendo que cada medida constituía-se da média de 50 leituras individuais, com um tempo de integração de 20 milissegundos e correção de *boxcar* de 30. Dos espectros obtidos, foi utilizado apenas a região entre 320-700nm, correspondendo ao espectro de visão comumente associado às aves (Cuthill 2006; Mullen & Pohland 2008), interpolando-se a porção decimal ao número inteiro inferior mais próximo, de modo a reduzir o número de pontos utilizado.

Características da coloração

As propriedades espectrais de reflectância das penas de cada parte do corpo foram então resumidas em estimativas de brilho, saturação e matiz (Montgomerie 2006). Brilho médio (B_{med}) foi calculado como a soma da média do percentual de reflectância em cada comprimento de onda. A intensidade de reflectância no comprimento de onda de máxima reflexão ($I = R_{\lambda_{max}}$) também foi utilizada como uma medida de brilho. O comprimento de onda de máxima reflexão (λ_{max}) foi utilizado para caracterizar o matiz da cor. Para caracterizar a saturação, três medidas foram utilizadas: contraste (diferença das intensidades de reflectância máxima e mínima; $C = R_{\lambda_{max}} - R_{\lambda_{min}}$), croma ultravioleta (reflectância total no espectro ultravioleta dividido pela reflectância total; $R_{uv} = R_{320-400nm}/R_{320-700nm}$) e croma azul (reflectância total na faixa do azul dividida pela reflectância total; $R_{azul} = R_{400-500nm}/R_{320-700}$).

Essas faixas de coloração foram utilizadas por representarem a faixa de reflexão de maior interesse, uma vez que é onde está o pico de reflectância da maior parte dos machos de tiziu com plumagem nupcial. Além disso, essas faixas consideram as intersecções dos espectros de sensibilidade para Passeriformes (Bowmaker et al. 1997) e de que a reflectância no espectro do UV ter notória influência em interações sexuais intra-específicas (Dias 2006).

Esses valores foram calculados sobre o espectro médio das cinco medidas para cada parte do corpo de cada indivíduo. No caso da plumagem subaxilar branca, apenas o brilho médio e o contraste (como estimativa de lividez, ou de “quão branco” é o espectro, considerando que contrastes maiores indicam maior desvio dessa cor) foram utilizados. Para evitar problemas de multicolineariedade apenas as características de plumagem do manto na geometria de 45° foram utilizadas para definir a plumagem negra nas análises, visto que a reflectância em diferentes ângulos e partes do corpo para cada indivíduo estão associadas de forma linear. A medição nessa região do corpo é facilitada e também provê maior replicabilidade entre as medidas pelo fato de que as penas dessa região do corpo são maiores e apresentam bárbulas em maior densidade (Quesada & Senar 2006). Esse ângulo foi escolhido por ser o que retorna espectro com brilho máximo, provavelmente devido à rotação das bárbulas em relação ao eixo da barba (Osorio & Ham 2002). Talvez por esse mesmo motivo, essa configuração de medição retornou os espectros mais brilhantes e saturados também para a mancha branca, que não é iridescente (Santos et al. 2007).

Para caracterizar objetivamente a iridescência dos indivíduos, ou seja, a variação nas propriedades espectrais devido aos ângulos de incidência e observação, seguimos uma versão modificada da metodologia proposta por Loyau e colaboradores (2007). Assim, calculamos a diferença (Δ) entre as seis características espectrais medidas para cada par de geometrias de incidência. Valores altos de iridescência de matiz, por exemplo, significam que o

comprimento de onda para o qual houve a maior reflectância variou muito entre as duas geometrias de medição consideradas.

As seis características de coloração da plumagem negra-azulada e as seis características de iridescência foram, então, inseridas em análises de componentes principais (PCA) separadas, de modo a minimizar a influência das correlações entre elas e reduzir o número de variáveis inseridas nos modelos. Os valores para os dois primeiros componentes foram utilizados para as análises subseqüentes. Por utilizarem bancos de dados levemente distintos, os componentes foram calculados separadamente para as análises longitudinais (que incluiu apenas dados de captura e recaptura dos indivíduos que foram recapturados), e para as análises transversais e de retorno (que incluíram tanto indivíduos capturados apenas uma vez quanto indivíduos recapturados). Ainda assim, os resultados foram extremamente similares e, portanto, para efeito de simplificação, somente os coeficientes da PCA das análises transversais são exibidos.

Para as características de coloração (Tabela 3.1), o componente 1 apresentou forte influência positiva do contraste, da intensidade máxima, do brilho e dos cromas UV e azul, além de uma influência negativa do matiz. Dessa forma, indivíduos com valores altos desse componente apresentam plumagem mais brilhante, mais saturada e com pico em comprimentos de onda mais baixo, enquanto indivíduos com valores baixos apresentam plumagem sem brilho ou definição cromática. Esse componente foi considerado, então, como um valor de coloração. O segundo componente, por sua vez, apresentou influência positiva principalmente do matiz, do brilho e da intensidade máxima, e influência negativa de ambos os cromas UV e azul. Essa medida foi considerada, assim, a inversa da proporção UV-azul no espectro. Os componentes juntos explicaram mais de 91% da variação total dos dados.

Tabela 3.1. Coeficientes para os dois primeiros componentes de uma análise de componentes principais para seis variáveis relativas às características do espectro de reflexão de penas do manto de machos de tiziu.

Variável	PC1 _{cor}	PC2 _{cor}
B _{med}	0,843	0,505
I	0,888	0,455
λ_{\max}	-0,678	0,663
C	0,922	0,336
R _{uv}	0,794	-0,460
R _{azul}	0,798	-0,407
Variância explicada (%)	67,92	23,19

As características de iridescência variaram de forma diferente (Tabela 3.2). Houve um grande peso positivo das variáveis diferença de intensidade máxima, de brilho e de contraste no componente 1, e por isso esse componente foi denominado “diferença de brilho”. Indivíduos que tiveram valor alto nesse componente apresentam uma variação maior no brilho medido de acordo com a incidência de luz, enquanto indivíduos com valores baixos apresentaram brilho homogêneo, independente da geometria de medição. O segundo componente, teve forte influência positiva do matiz e do croma azul, e influência negativa do croma ultravioleta. Assim, esse componente foi denominado “diferença de matiz”, pois valores altos representam espectro com reflectância e pico concentrados na faixa do azul, enquanto valores baixos representam espectro com reflectância e picos concentrados no ultravioleta. Juntos, esses componentes explicam mais de 70% da variação dos dados.

Tabela 3.2. Coeficientes para os dois primeiros componentes de uma análise de componentes principais para seis variáveis relativas à variação com a geometria de medição das características do espectro de reflexão de penas do manto de machos de tiziu.

Variável	PC1 _{iri}	PC2 _{iri}
ΔB	0,967	0,090
ΔI	0,989	0,108
$\Delta \lambda_{\max}$	-0,188	0,713
ΔC	0,965	0,055
ΔR_{uv}	-0,050	-0,558
ΔR_{azul}	-0,208	0,672
Variância explicada (%)	48,77	21,58

Análises estatísticas

Como medida de qualidade dos indivíduos, foi obtido um índice de massa corporal, dividindo-se a medida de massa pela medida do tarso (Costa & Macedo 2005, Aguilar et al. 2008). Assim, valores altos indicam indivíduos proporcionalmente mais pesados, e valores baixos indicam indivíduos proporcionalmente mais leves, controlando para o tamanho. Visto que há também uma relação positiva entre a data de captura e o percentual de plumagem nupcial apresentado pelo indivíduo, foi calculado um índice de muda baseado na regressão do percentual (transformado pela função arcoseno, de modo a normalizar sua distribuição e tornar sua relação com o tempo linear) pelo tempo (Senar 2004). Assim, valores altos desse índice indicam indivíduos em estágio de muda mais avançado que o esperado, e valores baixos indicam indivíduos com muda mais lenta para a plumagem nupcial.

Para averiguar se existem diferenças em características da plumagem relacionadas à idade, foi realizada uma análise longitudinal e uma transversal. Na análise transversal,

somente os indivíduos capturados durante a estação reprodutiva 2 foram consideradas. Isso porque na estação reprodutiva 1 só havia novas capturas (visto que foi o primeiro ano de trabalho na área), e somente machos recapturados da estação 3 foram analisados. Foram realizadas análises de variância (ANOVA) individuais para cada característica de coloração e de iridescência, além do coeficiente de muda e o índice de condição corporal, com essas características como variáveis dependentes e o status de captura (captura ou recaptura) como a variável independente.

Para as análises longitudinais, foram utilizados os dados dos 3 anos referentes aos indivíduos que foram capturados em um deles e recapturados em algum ano seguinte. Foram utilizados modelos lineares de efeitos mistos (*mixed-effects linear models*) para cada característica de plumagem e de condição corporal, considerando-as como variáveis resposta em cada modelo, e considerando status de captura (captura ou recaptura) como o fator intra-individual e a estação reprodutiva de captura como fator inter-individual. Assim, foi possível controlar a influência da variação referente a diferenças populacionais anuais sobre as características analisadas. A interação entre esses fatores também foi considerada para averiguar se as diferenças entre indivíduos são consistentes, ou se variam dependendo do ano de captura. No caso de uma diferença significativa entre anos, foram realizados testes t de Student (com correção seqüencial de Bonferroni, Holm 1979) como post-hoc para determinar os anos cujas médias diferiram.

Finalmente, para verificar a existência de um viés de retorno ou de sobrevivência associado às características de plumagem e de condição corporal, foi realizada uma análise da probabilidade de retorno baseada nas características de coloração e iridescência dos indivíduos. Para isso, utilizamos machos das estações reprodutivas 1 e 2 que foram capturados em um ano subsequente (retorno), e machos dos mesmos anos que não foram recapturados (não-retorno). A análise escolhida foi um modelo linear generalizado

(*generalized linear model*; GLM) com função de ligação logit da família binomial; essa análise é o equivalente em GLM para a regressão logística. A variável resposta binária foi retorno ou não-retorno (0/1), e as variáveis explicativas incluídas foram características de coloração (PC1_{cor} e PC2_{cor}), de iridescência (PC1_{iri} e PC2_{iri}), condição corporal e o índice de plumagem. O modelo foi simplificado por passos, adicionando ou removendo variáveis (*stepwise*) de acordo com sua contribuição ao potencial explicativo do mesmo. Uma vez que as variáveis de característica de coloração variaram entre os anos, foram utilizados valores padronizados para a distribuição de Z (média = 0, desvio padrão = 1) calculados separadamente para cada ano.

Todas as análises foram conduzidas no programa R (ver. 2.6.1; R Development Core Team 2007), sendo que para os modelos mistos foi utilizado também o pacote `nlme` (ver. 3.1-83; Pinheiro et al. 2007). Ambos encontram-se disponíveis gratuitamente em <http://cran.r-project.org>. Exceto onde indicado o contrário, os testes foram bi-caudais e os resultados estão apresentados na forma de média ± erro padrão.

RESULTADOS

No total, foram considerados nas análises machos ($N_{\text{total}}= 58$) filopátricos no sítio de estudo, ou seja, aqueles capturados mais de uma vez em anos diferentes ou que foram capturados e avistados na área em um mesmo ano. Dos 28 machos capturados durante a primeira estação reprodutiva, 10 foram observados novamente em algum ano subsequente (6 na segunda estação e 4 na terceira). Quinze machos foram capturados pela primeira vez na estação reprodutiva 2, sendo que cinco destes foram observados e capturados novamente no ano seguinte. Dessa forma, podemos calcular uma taxa de retorno geral de aproximadamente 26% (sendo 21,5% no primeiro ano e 33,3% no segundo) .

Em relação às análises transversais, machos recapturados na estação reprodutiva 2 (N=6) diferiram dos machos capturados pela primeira vez (N=15) nesse mesmo ano em diversas características de plumagem (Fig. 3.1). No geral, machos recapturados apresentaram índice de plumagem mais alto ($F_{1,18} = 5,99$, $p = 0,024$; Fig. 3.2A), cores mais brilhantes e saturadas ($PC1_{cor}$; $F_{1,19} = 8,93$, $p = 0,008$; Fig. 3.2B) e maior diferença de brilho devido à iridescência ($PC1_{iri}$; $F_{1,19} = 17,68$, $p < 0,001$; Fig. 3.2C), além de uma mancha branca mais brilhante ($F_{1,19} = 12,41$, $p = 0,002$, Fig. 3.2D). Não há diferenças entre as classes etárias na condição corporal, na proporção de reflectância na faixa UV-azul ($PC2_{cor}$) ou na diferença de matiz devido à iridescência ($PC2_{iri}$; todos $p > 0,05$).

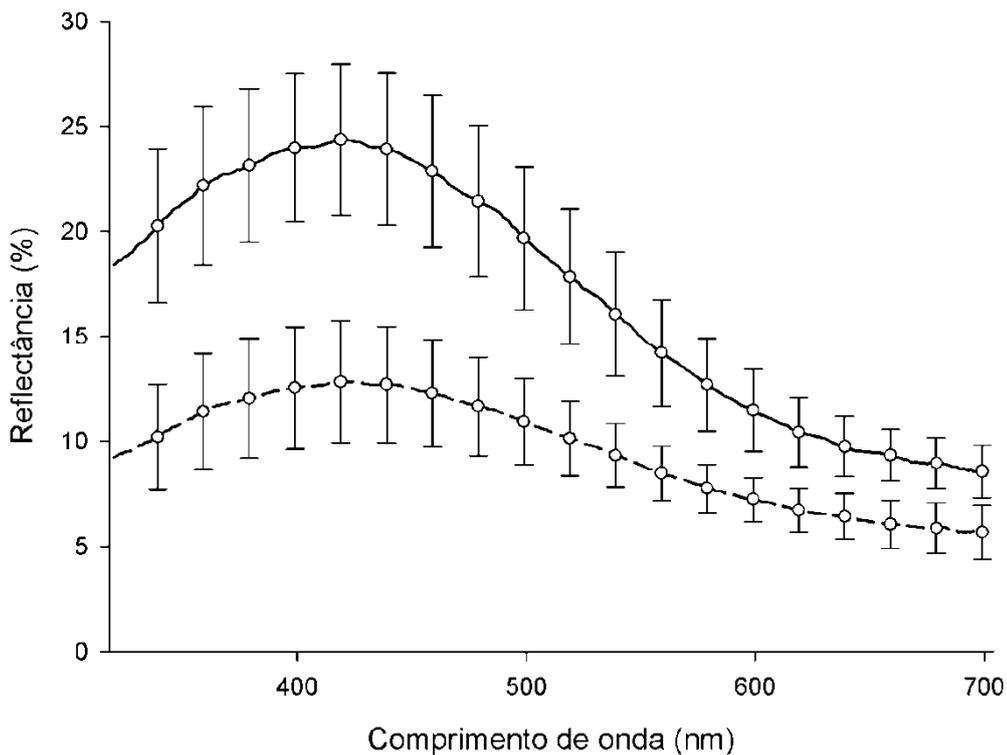


Figura 3.1. Espectros de reflectância para machos recapturados (linha contínua) e machos capturados pela primeira vez (linha tracejada) durante a estação reprodutiva 2 (dados usados para a análise transversal). Barras de erro representam intervalo de confiança de 95%.

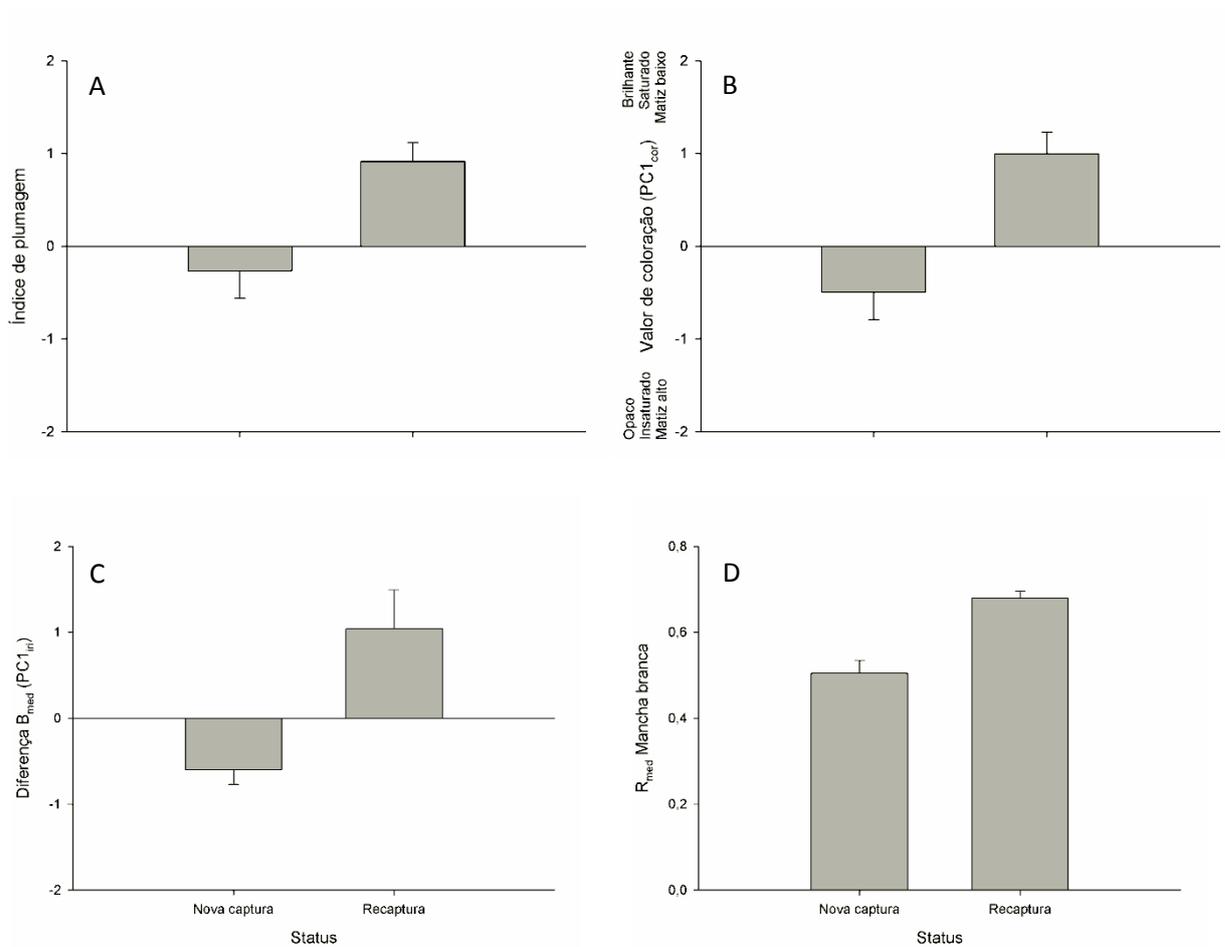


Figura 3.2. Índice de plumagem (A), Valor de coloração (B), diferença de brilho (C) e brilho da mancha branca (D) para machos de tiziu que foram capturados pela primeira vez ou recapturados durante a estação reprodutiva 2 (Nova captura: $N_A = 14$, $N_{B-D} = 15$; Recaptura: $N_{A-D} = 6$).

Quando comparamos as diversas capturas de um mesmo indivíduo ao longo do tempo (análises longitudinais), apenas o índice de plumagem varia entre capturas ($F_{\text{status}1,10} = 11,53$, $p = 0,007$; Fig. 3.3). Assim, conforme os indivíduos envelhecem, apresentam índice de plumagem mais alto, ou seja, são capazes de iniciar a muda mais cedo ou de executá-la com maior rapidez. Todas as demais características, incluindo condição corporal e características de coloração, não foram variaram de forma estatisticamente significativa.

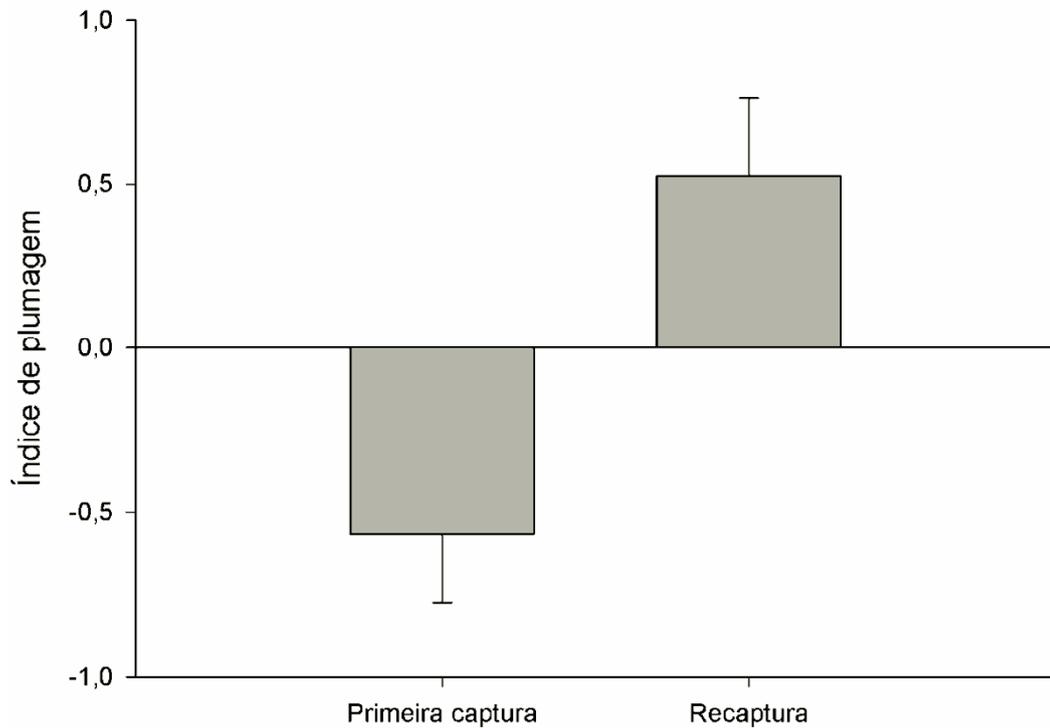


Figura 3.3. Variação no índice de plumagem de indivíduos quando capturados pela primeira vez e quando recapturados em um ano seguinte.

Independente do status de captura (nova captura ou recaptura), houve diferença relacionada à estação reprodutiva nas variáveis $PC1_{cor}$, $PC1_{iri}$, e condição corporal (Tabela 3.3). Entretanto, não foi possível identificar, através de testes post-hoc, a direção dessa diferença. Em nenhuma das análises houve influência da interação entre ano e status de captura, sugerindo que essa variação anual afetou da mesma forma indivíduos quando capturados pela primeira vez e quando recapturados. Dessa forma, essas características de plumagem e de condição corporal sofreram variação relacionada ao ano de estudo, provavelmente devido à variações ambientais, e independente do status de captura.

Tabela 3.3. Características de plumagem e condição corporal ao longo das três estações reprodutivas, analisadas para todos os indivíduos (independente de sua condição de captura). Valores estatísticos referem-se aos valores obtidos para o fator tempo nos modelos lineares de efeitos mistos (para efeito do status de captura, ver texto; todas as interações N.S.). Valores em negrito são significativos.

Característica	N*	Estação	Média ± EP	F	gl (n,d)	P
		Reprodutiva				
PC1 _{cor}	9	1	0,39 ± 0,34	6,75	1,11	0,025†
	10	2	0,17 ± 0,37			
	9	3	-0,23 ± 0,27			
PC2 _{cor}	9	1	0,07 ± 0,35	1,85	1,11	0,201
	10	2	0,26 ± 0,33			
	9	3	-0,35 ± 0,30			
PC1 _{iri}	9	1	0,19 ± 0,26	10,33	1,11	0,008†
	10	2	0,08 ± 0,35			
	9	3	-0,29 ± 0,37			
PC2 _{iri}	9	1	-0,38 ± 0,33	0,76	1,11	0,401
	10	2	0,13 ± 0,30			
	9	3	0,24 ± 0,36			
R _{med} (mancha branca)	9	1	0,60 ± 0,05	1,49	1,11	0,248
	10	2	0,62 ± 0,03			
	9	3	0,58 ± 0,04			
C _(mancha branca)	9	1	15,41 ± 1,34	0,04	1,11	0,851
	10	2	17,91 ± 2,09			
	9	3	14,81 ± 1,33			

Índice de plumagem	9	1	-0,47 ± 0,25	1,28	1,10	0,284
	9	2	0,09 ± 0,34			
	9	3	0,36 ± 0,34			
Condição corporal	9	1	0,65 ± 0,02	5,94	1,11	0,033†
	10	2	0,64 ± 0,01			
	9	3	0,59 ± 0,02			

* Número de indivíduos (novas capturas e recapturas agrupados) em cada ano. O N pode variar caso indivíduos tenham fugido durante a coleta de dados antes de determinada característica ser medida.

† Testes post-hoc (testes t de Student com correção seqüencial de Bonferroni) não conseguiram identificar onde estavam as diferenças entre os grupos (todos $p > 0,017$).

A análise da probabilidade de retorno indicou que o $PC2_{cor}$, representando a proporção da reflectância na faixa UV-azul, está associado à chance de um dado macho retornar à área de estudos no ano seguinte ($\chi^2 = 4,78$, $gl = 1$, $p = 0,029$; Tabela 3.4). Indivíduos com valores maiores dessa variável (ou seja, reflectância *menos* concentrada na faixa UV-azul) têm maior probabilidade de serem recapturados em anos posteriores na área de estudos (Fig. 3.4).

Tabela 3.4. Modelo GLM para a probabilidade de retorno de machos de tiziu, baseado em características de plumagem, usando função de ligação logit da família binomial.

Variável (N = 43)	Estimativa do parâmetro	EP	Z	p
(Constante)	-0,68	±0,34	-1,99	0,046
$PC2_{cor}$	0,76	±0,37	2,04	0,041

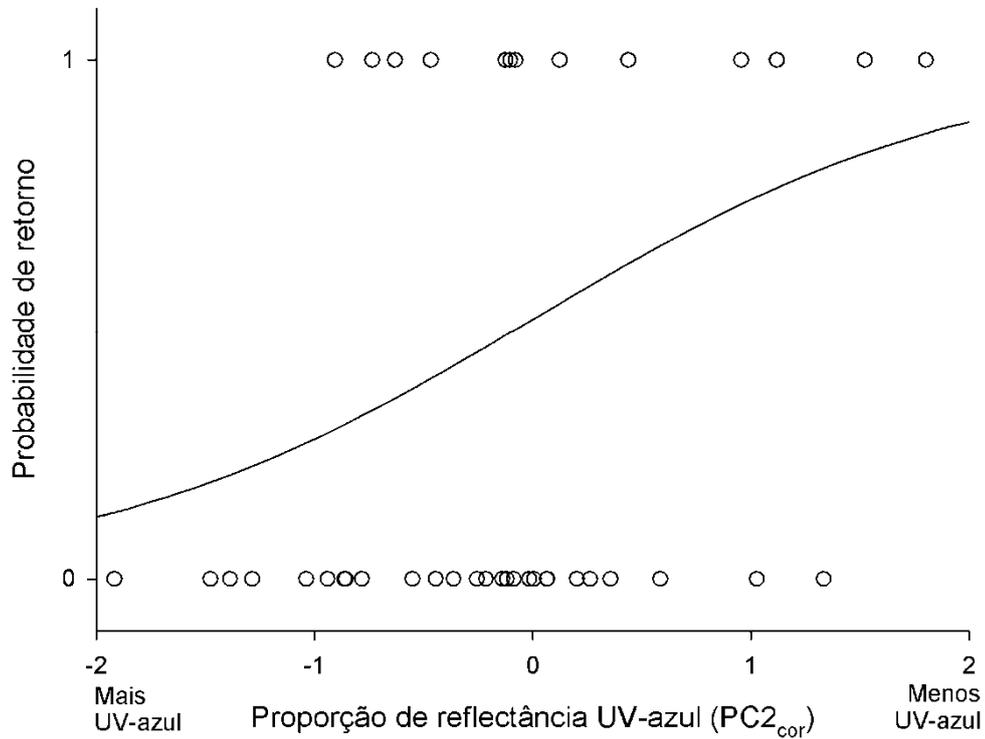


Figura 3.4. Relação entre a probabilidade de um macho capturado pela primeira vez ser reavistado na área de estudos e a proporção da faixa UV-azul em seu espectro de reflectância.

DISCUSSÃO

Nesse capítulo, demonstramos que diversas características de plumagem do tiziu variam de acordo com o status de captura, medida usada como indicador de idade, em nível populacional. A análise transversal indicou que machos recapturados, quando comparados com machos capturados pela primeira vez (e provavelmente mais jovens), apresentam plumagem mais brilhante, mais saturada e concentrada em comprimentos de onda baixos (faixa do UV-azul). Além disso, a plumagem iridescente desses machos varia mais em brilho de acordo com o ângulo de incidência da luz, e suas manchas brancas apresentam maior reflectância.

Machos recapturados apresentavam-se em estágio de muda para a plumagem nupcial mais avançado que novas capturas, e as análises longitudinais indicam também que essa característica variou intra-individualmente de forma consistente ao longo do tempo. Isso sugere que, conforme indivíduos vão ficando mais velhos, são capazes de executar muda mais rapidamente ou iniciá-la mais cedo na estação reprodutiva. Entretanto, demais características de plumagem de um mesmo indivíduo não variaram de forma consistente entre anos. Ainda, de forma aparentemente contraditória, os resultados sugerem que indivíduos de plumagem com espectro de reflectância menos concentrado na faixa UV-azul têm maior probabilidade de retornar à área de estudos no ano seguinte.

Os resultados apresentados sugerem que a condição da plumagem nupcial do tiziu é um indicativo de idade dos indivíduos. Essa informação pode estar sendo acessada por outros indivíduos da espécie, que podem considerá-la ao tomar decisões a respeito de interações agonísticas (no caso de outros machos) ou relativas à corte e à cópula (no caso de fêmeas). Esse aspecto foi estudado no meriön soberbo (*Malurus cyaneus*), onde machos mais velhos adquirem plumagem nupcial vários meses antes que machos jovens (Mulder & Magrath 1994), e essa característica afeta drasticamente o sucesso reprodutivo de indivíduos através do aumento da probabilidade de se obter cópulas extra-par (Dunn & Cockburn 1999). Na andorinha *Tachycineta bicolor*, machos mais velhos e com plumagem mais reflexiva também tem uma probabilidade maior de obter cópulas extra-par (Bitton et al. 2007).

Diversos estudos e modelos teóricos sugerem que idade pode ser considerada uma medida de qualidade genética por refletir o fato de o indivíduo ter conseguido sobreviver mais tempo sob as condições às quais a população está sujeita (Andersson 1994). Essa característica pode ser particularmente importante em espécies migratórias, que estão sujeitas às intempéries da migração. De fato, é provável que aves migratórias estariam sujeitas a maior pressão de seleção sexual devido a essas dificuldades, fato este que seria refletido em uma

relação entre taxas de cópulas extra-par e distância de migração (Spottiswoode & Møller 2004). Dessa forma, tem sido sugerido também que a evolução de cores e plumagens ornamentais em aves pode estar relacionada a condições migratórias, que estariam selecionando indivíduos de maior qualidade genética e características que indiquem essa condição (Fitzpatrick 1994).

Este estudo é o primeiro a relatar diferenças individuais consistentes em relação à mancha branca e à iridescência. Os resultados sugerem que machos mais velhos apresentam mancha branca mais brilhante, além de uma variação maior de brilho da plumagem negra resultante do ângulo de incidência da luz. A função da iridescência na comunicação animal ainda é controversa e se encontra em estágios iniciais de discussão (Prum 2006). No caso do tiziu, a relação encontrada e o conhecimento de seu comportamento podem sugerir passos iniciais no esclarecimento do papel da iridescência na comunicação visual das aves. Vukusic e colaboradores (2001) sugeriram que a intermitente variação de brilho e matiz resultante de escamas iridescentes da borboleta *Ancyluris meliboeus* pode resultar em um aumento do estímulo visual, sendo um estímulo intra-específico que ajuda a chamar a atenção do receptor. Durante a execução de seu *display*, o tiziu não só salta verticalmente, como também gira em torno de seu eixo corporal, expondo sua plumagem negra a diversos ângulos de incidência da luz. Além disso, com o abrir-e-fechar de suas asas, as manchas subaxilares aparecem e somem, contrastando contra a plumagem negra. Portanto, essa movimentação resulta no piscar do branco das manchas contra o fundo negro do corpo, além da variação intermitente na iridescência da plumagem negra, e pode ter a função de estimular o sistema sensorial de fêmeas próximas, atraindo sua atenção e aumentando a sua chance de ser escolhido como parceiro reprodutivo. Se esse for o caso, machos mais velhos apresentam uma vantagem em relação aos mais jovens por apresentarem maior diferença de brilho devido à iridescência, além de manchas brancas que refletem mais a luz incidente.

Curiosamente, as análises longitudinais não corroboraram os resultados das análises transversais; quando analisamos a variação intra-individual, somente o índice de plumagem variou com a idade, e nenhuma outra característica apresentou a variação esperada. Além disso, houve também variação nas características de coloração dos indivíduos com o tempo, independente de sua idade. Algumas explicações são possíveis para essa dicotomia. Primeiramente, é preciso considerar que a metodologia utilizada pode ter diminuído o poder de algumas análises estatísticas. Além do tamanho de amostra limitado, não foi possível definir exatamente a idade dos indivíduos, mas apenas inferir uma idade relativa à dos demais indivíduos da população. Isso se torna um problema particularmente no caso de espécies tropicais, que são considerados longevos (embora a maioria dos estudos seja com espécies não migratórias; Stutchsbury & Morton 2001). Portanto, indivíduos agrupados como “recapturas” podem corresponder a várias faixas etárias, e a variação das características de plumagem pode não ser linear ao longo delas. Esse é o caso no pássaro-azul-de-garganta-canela (*Sialia sialis*), por exemplo, no qual foi demonstrado que embora diversas características de plumagem estrutural e de melanina variem com a idade, a variação é consideravelmente maior do primeiro para o segundo ano de vida, estabilizando após essa idade (Siefferman et al. 2005). O mesmo padrão foi encontrado para o chapim-azul (*Cyanistes (Parus) caeruleus*), onde tanto para machos quanto para fêmeas a magnitude das diferenças etárias de coloração não é a mesma entre indivíduos no primeiro e no segundo ano de vida, e entre indivíduos no segundo ano ou com idade superior a dois anos (Delhey & Kempenaers 2006).

Outra possibilidade é que essas características de plumagem sejam extremamente suscetíveis a uma regulação ambiental (Hill 2006). Foi encontrado para o tiziu que características da plumagem variaram no tempo para a população, e essa variação afetou tanto novas capturas quanto recapturas. Esse cenário sugere que características espectrais da

plumagem estão associadas tanto à qualidade genética do indivíduo quanto aos fatores ecológicos e sociais que regulam sua expressão. Portanto, ainda que a variação entre indivíduos de acordo com a idade possa ser identificada facilmente, a consistência intra-individual fica menos evidente devido a flutuações resultantes de diferenças ecológicas e ambientais. Embora ainda se conheça pouco sobre a regulação ambiental de características da plumagem estrutural, alguns estudos com o cardeal-azul *Guiraca caerulea* (Keyser & Hill 2000), o chopim *Molothrus ather* (McGraw et al. 2002), além do próprio tiziu (Doucet 2002), têm sugerido que a condição corporal durante a muda influencia as características de coloração da plumagem. Se esse for o caso, a expressão desse ornamento de forma dependente do contexto ecológico durante seu desenvolvimento é esperada e uma baixa consistência individual é coerente com as predições teóricas.

No caso particular de plumagem iridescente, a produção de cor está relacionada à organização das estruturas de queratina, melanina e ar em camadas delgadas responsáveis pela interferência diferenciada nos distintos comprimentos de onda (Prum 2006; Shawkey et al. 2006). Variações nanoestruturais nas camadas de queratina e melanina estão associadas a variações no matiz e no croma UV, respectivamente, em machos do pássaro-caramanchão-cetim (*Ptilonorhynchus violaceus*, Doucet et al. 2006). Já o brilho parece estar associado à quantidade e ao desgaste de bárbulas na pena, tanto nessa espécie quanto no *S. sialis*, que produz coloração estrutural não-iridescente (Shawkey et al. 2003; Doucet et al. 2006). Após a produção da pena, processos de abrasão, desgaste e acúmulo de sujeira podem também contribuir para a variação inter-individual da coloração estrutural resultante (Osorio & Ham 2002). Além disso, existem evidências correlacionais e experimentais de que bactérias queratinolíticas podem também interferir nas características espectrais dessas cores (Shawkey et al. 2007).

Nossos resultados indicam que indivíduos com coloração menos concentrada na faixa do UV-azul apresentam maior probabilidade de retorno. Duas explicações são possíveis para esse padrão. Primeiramente, é possível que indivíduos azulados tenham maior propensão a mudar de área de reprodução a cada ano ou de dispersar. Embora esta possibilidade seja pouco provável, não existe informação sobre padrões de migração e dispersão em tizius, sendo este o primeiro trabalho a sugerir uma taxa de retorno, de aproximadamente 20-30%. É possível que machos com diferentes níveis de investimento em plumagem nupcial tenham sucesso reprodutivo diferenciado em áreas e anos diferentes, influenciando decisões a respeito de retornar ou buscar uma área diferente e resultando em uma dispersão não-aleatória em relação a essa característica. Assim sendo, essa hipótese não pode ser descartada.

Outra possibilidade é que exista uma diferença na taxa de mortalidade associada à coloração da plumagem. Modelos de seleção sexual sugerem que, se uma característica ornamental tem um alto custo de produção, a expressão desses ornamentos estará negativamente associada à sobrevivência (Grether 1997; Kokko et al. 2002). Quando apenas alguns poucos machos muito ornamentados fecundam diversas fêmeas e são responsáveis pela maior parte da paternidade em uma população, uma estratégia estável pode ser a de diminuir o investimento em reprodução futura para investir em ornamentos custosos no presente momento (Kokko et al. 2002). Embora no tiziu as características sexuais que influenciam na escolha da fêmea ainda sejam pouco conhecidas (Aguilar et al. 2008; Dias 2007), a assimetria no sucesso reprodutivo entre machos pode ser bastante grande, pois a taxa de cópulas extra-par é extremamente elevada (50% dos filhotes em 63% dos ninhos; Carvalho et al. 2006), resultando em uma variância no sucesso reprodutivo mais de duas vezes maior que a variância social (R.H.F. Macedo, dados não publicados).

A relação entre sobrevivência e ornamentos de plumagem, principalmente plumagem estrutural, ainda é pouco conhecida e controversa. No chapim-azul (*Cyanistes (Parus)*

caeruleus), foi encontrada uma relação positiva entre a sobrevivência anual e o componente ultravioleta do espectro de reflectância da plumagem estrutural da cabeça (Sheldon et al. 1999; Griffith et al. 2003). Entretanto, nessa mesma espécie, mas numa população mais ao sul, nenhuma relação entre características de plumagem e sobrevivência foi encontrada (Delhey & Kempenaers 2006). Já na andorinha *Tachycineta bicolor*, há uma probabilidade de retorno associada a uma plumagem azul, em que indivíduos com matiz mais alto (verde) e plumagem menos brilhante têm menos chance de retornar; essa diferença é atribuída a uma menor chance de sobrevivência desses indivíduos (Bitton & Dawson, no prelo). No entanto, em experimento realizado com o galo-lira (*Tetrao tetrix*), implantes de testosterona resultaram em plumagem estrutural ornamental menos desenvolvida (devido a uma alocação maior de recursos para reprodução) e em menor sobrevivência (Siitari et al. 2007). Assim, é possível que no tiziu a expressão de plumagem saturada na faixa do UV-azul seja muito custosa e resulte em uma taxa de sobrevivência anual menor dos machos que invistam fortemente em sua ornamentação.

Diferenças etárias de qualidade individual podem refletir uma mortalidade diferenciada (sendo a idade um indicativo direto de qualidade genética) ou de aprendizado e conseqüente aumento de eficiência de forrageio ou territorialidade (sendo nesse caso um indicativo indireto de qualidade). Existem evidências em diversas espécies de aves para este aumento de eficiência. Pode-se citar, por exemplo, o pássaro-gato-cinzento (*Dumatella carolinensis*), espécie em que indivíduos no primeiro ano de vida apresentam menor eficiência de forrageamento que indivíduos a partir do segundo ano, e portanto apresentam menores taxas de acúmulo de gordura (Heise & Moore 2003). Dessa forma, se a produção de cor no tiziu está associada à qualidade genética do indivíduo ou ao estresse de desenvolvimento a que ele está sujeito, esse tipo de coloração pode ser uma indicação honesta de qualidade individual. Por sua vez, a condição do indivíduo pode estar associada à sua

capacidade de defender um território, forragear e migrar, que em última instância estão refletidos em sua idade e probabilidade de sobrevivência. Os resultados obtidos sugerem ainda que características da coloração podem sinalizar a idade do indivíduo e sua chance de sobrevivência, além de estarem sujeitas a fortes pressões ambientais em sua expressão. Nesse cenário, é possível que se pressões seletivas reforcem sua expressão dependente de contexto, sendo que aparentemente o investimento em ornamentação pode incorrer em custos de sobrevivência ou retorno em um ano posterior.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar, T. M., Maia, R., Santos, E. S. A. & Macedo, R. H.** 2008. Parasite levels in blue-black grassquits correlate with male displays but not female mate choice. *Behavioral Ecology*, **19**, 292-301.
- Almeida, J. B. & Macedo, R. H.** 2001. Lek-like mating system of the monogamous blue-black grassquit. *The Auk*, **118**, 404-411.
- Andersson, M.** 1994. Sexual Selection. Nova Jersey: Princeton University Press.
- Bitton, P.- P. & Dawson, R.** no prelo. Age-related differences in plumage characteristics of male tree swallows: hue and brightness signal different aspects of individual quality. *Journal of Avian Biology*.
- Bitton, P.- P., O'Brien, E. L. & Dawson, R.** 2007. Plumage brightness and age predict extrapair fertilization success of tree swallows, *Tachycineta bicolor*. *Animal Behavior*, **74**, 1777-1784.
- Bowmaker, J. K., Heath, L. A., Wilkie, S. E. & Hunt, D. M.** 1997. Visual pigments and oil droplets from six classes of photoreceptor in the retinas of birds. *Vision Research*, **37**, 2183-2194.

- Carvalho, C. B., Macedo, R. H. & Graves, J.** 2006. Breeding strategies of a socially monogamous neotropical passerine: extra-pair fertilizations, behavior and morphology. *The Condor*, **108**, 579-590.
- Costa, F. J. V. & Macedo, R. H.** 2005. Coccidian oocyst parasitism in the blue-black grassquit: influence on secondary sex ornaments and body condition. *Animal Behaviour*, **70**, 1401-1409.
- Cuthill, I. C.** 2006. Color perception. In: *Bird Coloration, Vol. I: Mechanisms and Measurements* (Ed. by G. E. Hill & K. J. McGraw), pp. 3-40. Cambridge: Harvard University Press.
- Delhey, K., Kempenaers, B.** 2006. Age differences in blue tit *Parus caeruleus* plumage colour: within-individual changes or colour-biased survival? *Journal of Avian Biology*, **37**, 339-348.
- Dias, R. I.** 2006. The role of ultraviolet wavelength in sexual selection. *Revista Brasileira de Ornitologia*, **14**, 191-195.
- Dias, R. I. S. C.** 2007. Efeito de manipulações experimentais na biologia reprodutiva e comportamento de tiziu (*Volatinia jacarina*): da seleção de parceiros à disponibilidade de alimentos. *Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal*, Universidade de Brasília, Brasília.
- Doucet, S. M.** 2002. Structural plumage coloration, male body size, and condition in the blue-black grassquit. *The Condor*, **104**, 30-38.
- Doucet, S. M., Shawkey, M. D., Hill, G. E. & Montgomerie, R.** 2006. Iridescent plumage in satin bowerbirds: structure, mechanisms and nanostructural predictors of individual variation in colour. *Journal of Experimental Biology*, **209**, 380-390.

- Doucet, S. M., McDonald, D. B., Foster, M. S. & Clay, R. P.** 2007. Plumage development and molt in long-tailed manakins, *Chiroxiphia linearis*: variation according to sex and age. *The Auk*, **124**, 29-43.
- Dunn, P. O. & Cockburn, A.** 1999. Extra-pair mate choice and honest signaling in cooperatively-breeding superb fairy-wrens. *Evolution*, **53**, 938-946.
- Fitzpatrick, S.** 1994. Colourful migratory birds: evidence for a mechanism other than parasite resistance for the maintenance of 'good genes' sexual selection. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*, **1349**, 155-160.
- Gil, D., Cobb, J. L. S. & Slater, P. J. B.** 2001. Song characteristics are age dependent in the willow warbler, *Phylloscopus trochilus*. *Animal Behaviour*, **62**, 689-694.
- Grether, G. F.** 1997. Survival cost of an intrasexually selected ornament in a damselfly. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*, **264**, 207-210.
- Griffith, S. C., Örnborg, J., Russel, A. F., Andersson, S. & Sheldon, B. C.** 2003. Correlations between ultraviolet coloration, overwinter survival and offspring sex ratio in the blue tit. *Journal of Evolutionary Biology*, **16**, 1045-1054.
- Heise, C. D. & Moore, F. R.** 2003. Age-related differences in foraging efficiency, molt, and fat deposition of gray catbirds prior to autumn migration. *The Condor*, **105**, 496-504.
- Hill, G. E.** 1996. Subadult plumage in the house finch and tests of models for the evolution of delayed plumage maturation. *The Auk*, **113**, 858-874.
- Hill, G. E.** 2006. Environmental regulation of ornamental coloration. In: *Bird Coloration, Vol. I: Mechanisms and Measurements* (Ed. by G. E. Hill and K. J. McGraw), pp. 507-560. Cambridge: Harvard University Press.
- Holm, S.** 1979. A simple sequential rejective multiple test procedure based on a modified Bonferroni test. *Biometrika*, **75**, 383-386.

- Humphrey, P. S. & Parkes, K. C.** 1959. An approach to the study of molts and plumages. *The Auk*, **76**, 1-31.
- Jennions, M. D., Møller, A. P. & Petrie, M.** 2001. Sexually selected traits and adult survival: a meta-analysis. *Quarterly Review of Biology*, **76**, 3-36.
- Kempnaers, B., Verheyen, G. R., Vandenbroeck, M., Burke, T., Vanbroeckhoven, C. & Dhondt, A. A.** 1992. Extra-pair paternity results from female preference for high-quality males in the blue tit. *Nature*, **357**, 494-496.
- Keyser, A. J. & Hill, G. E.** 2000. Structurally based plumage coloration is an honest signal of quality in male blue grosbeaks. *Behavioral Ecology*, **11**, 202-209.
- Kokko, H., Brooks, R., McNamara, J. M., & Houston, A.I.** 2002. The sexual selection continuum. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*, **266**, 771-777.
- Loyau, A., Gomez, D., Moureau, B., Théry, M., Hart, N. S., Saint Jalme, M., Bennett, A. T. D. & Sorci, G.** 2007. Iridescent structurally based coloration of eyespots correlates with mating success in the peacock. *Behavioral Ecology*, **18**, 1123-1131.
- Lyon, B. E. & Montgomerie, R. D.** 1986. Delayed plumage maturation in passerine birds: reliable signaling by subordinate males? *Evolution*, **40**, 605-615.
- McDonald, D. B.** 1989. Cooperation under sexual selection: age-graded changes in a lekking bird. *American Naturalist*, **134**, 709-730.
- McGraw, K. J., Mackillop, E. A., Dale, J. & Hauber, M. E.** 2002. Different colors reveal different information: how nutritional stress affects the expression of melanin- and structurally based ornamental coloration. *Journal of Experimental Biology*, **205**, 3747-3755.

- Montgomerie, R.** 2006. Analyzing colors. In: *Bird Coloration, Vol. I: Mechanisms and Measurements* (Ed. by G. E. Hill and K. J. McGraw), pp. 90-147. Cambridge: Harvard University Press.
- Mulder, R. A. & Magrath M. J. L.** 1994 Timing of prenuptial molt as a sexually selected indicator of male quality in superb fairy-wrens (*Malurus cyaneus*). *Behavioral Ecology*, **05**, 393-400.
- Mullen, P. & Pohland, G.** 2008. Studies on UV reflection in feathers of some 1000 bird species: are UV-peaks in feathers correlated with VS/UVS cones? *Ibis*, **150**, 59-68.
- Murray Jr, B. G.** 1982. Territorial behaviour of the blue-black grassquit. *The Condor*, **84**, 119.
- Osorio, D. & Ham, A. D.** 2002. Spectral reflectance and directional properties of structural coloration in bird plumage. *Journal of Experimental Biology*, **205**, 2017-2027.
- Pinheiro, J. C., Bates, D. M., DebRoy, S. & Sarkar, D.** 2007. NLME: linear and nonlinear mixed effects models. R Package Version 3.1–83. (Disponível em <http://cran.r-project.org/>).
- Prum, R. O.** 2006. Anatomy, physics, and evolution of avian structural colors. In: *Bird Coloration, Vol. I: Mechanisms and Measurements* (Ed. by G. E. Hill and K. J. McGraw), pp. 295-355. Cambridge: Harvard University Press.
- R Development Core Team.** 2007. R: A Language for Data Analysis and Graphics. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Áustria. (Disponível em <http://cran.r-project.org/>).
- Richardson, D. S. & Burke, T.** 1999. Extra-pair paternity in relation to male age in Bullock's orioles. *Molecular Ecology*, **8**, 2115- 2126.
- Rohwer, S., Fretwell, S. D. & Niles, D. M.** 1980. Delayed plumage maturation in passerine plumages and the deceptive acquisition of resources. *American Naturalist*, **115** 400-437.

- Santos, S. I. C. O., De Neve, L., Lumeij, J. T. & Förchler, M. I.** 2007. Strong effects of various incidence and observation angles on spectrometric assessment of plumage colouration in birds. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **61**, 1499-1506.
- Senar, J. C.** 2004. Mucho más que plumas (Monografies del Museu de Ciències Naturals vol. 2). Barcelona: Museo de Ciencias Naturales.
- Shawkey, M. D., Estes, A. M., Siefferman, L. & Hill, G. E.** 2003. Nanostructure predicts intraspecific variation in ultraviolet-blue plumage colour. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*, **270**, 1471-2954.
- Shawkey, M. D., Hauber, M. E., Estep, L. K. & Hill, G. E.** 2006. Evolutionary transitions and structural mechanisms of avian plumage coloration in grackles and allies (Icteridae). *Journal of the Royal Society Interface*, **3**, 777-783.
- Shawkey, M. D., Pillai, S. R., Hill, G. E., Siefferman, L. M. & Roberts, S. R.** 2007. Bacteria as an agent for change in structural plumage color: correlational and experimental evidence. *The American Naturalist* S112-121.
- Sheldon, B. C., Andersson, S., Griffith, S. C., Örnborg, J. & Sendecka, J.** 1999. Ultraviolet variation influences blue tit sex ratios. *Nature*, **402**, 874-877.
- Sick, H.** 1997. Ornitologia Brasileira, Segunda Edição. Rio de Janeiro: Nova Fronteira.
- Siefferman, L., Hill, G. E., Dobson, F. S.** 2005. Ornamental plumage coloration and condition are dependent on age in eastern bluebirds *Sialia sialis*. *Journal of Avian Biology*, **36**, 428-435.
- Siitari, H., Alatalo, R. V., Halme, P., Buchanan, K. L., Kilpimaa, J.** 2006. Color signals in the black grouse (*Tetrao tetrix*): signal properties and their condition dependency. *American Naturalist*, **169**, S81-S92.
- Spottiswoode, C. & Møller, A. P.** 2004. Extrapair paternity, migration, and breeding synchrony in birds. *Behavioral Ecology*, **15**, 41-57.

Stutchbury, B. J. M. & Morton, E.S. 2001. Behavioral Ecology of Tropical Birds. London: Academic Press.

Vukusic, P., Sambles, J. R., Lawrence, C. R. & Wootton, R. J. 2001. Structural colour: now you see it – now you don't. *Nature*, **410**, 36.

Apêndice I

Script para cálculo de matrizes do modelo ótico de filme fino

Script desenvolvido no programa R (R Development Core Team, 2007) para calcular as matrizes envolvidas nos modelos óticos de filme fino do capítulo 1. O comando deve ser copiado e colado na interface do R, criando uma função que pode ser chamada com o comando `Rmed`. Abaixo do *script*, seguem também exemplos de como rodar a função e de como exportar os espectros resultantes para um documento de texto delimitado por tabulação, para utilização em outros programas.

As únicas variáveis necessárias para rodar o modelo são as espessuras da camada de queratina e de melanina (no modelo, d_1 e d_2 , respectivamente). Os índices complexos de refração apresentam valores padrão (apresentados no texto), mas podem ser modificados com alteração dos valores de n_0 (substrato, considerado o ar), n_1 (queratina) e n_2 (melanina). O ângulo de incidência padrão do modelo é zero (paralelo à normal), mas pode ser modificado, bastando para isso alterar o valor de ag_0 .

```
#INICIO DO SCRIPT
Rmed<- function(ag0=0,n0=1,n1=1.56-0.03*1i,n2=2.0-0.6*1i, n3=1.56-
0.03*1i,d1,d2)
{
m1s<-NULL
m2s<-NULL
m3s<-NULL
m4s<-NULL

m1p<-NULL
m2p<-NULL
m3p<-NULL
m4p<-NULL

for (wl in 320:700)
{
#ÂNGULOS DE INCIDÊNCIA COMPLEXOS (PELA LEI DE SNELL; ÂNGULOS EM RADIANOS)
ag1<- asin(n0*sin(ag0)/n1)
```

```

ag2<- asin(n0*sin(ag0)/n2)
ag3<- asin(n0*sin(ag0)/n3)

#MATRIZES DE INTERFERÊNCIA
#ar-queratina
r1p<-(n0*cos(ag0)-n1*cos(ag1))/(n0*cos(ag0)+n1*cos(ag1))
I1p<- matrix(c(1,r1p,r1p,1),nrow=2,ncol=2)
r1s<-(n1*cos(ag0)-n0*cos(ag1))/(n1*cos(ag0)+n0*cos(ag1))
I1s<- matrix(c(1,r1s,r1s,1),nrow=2,ncol=2)

#queratina-melanina
r2p<-(n1*cos(ag1)-n2*cos(ag2))/(n1*cos(ag1)+n2*cos(ag2))
I2p<- matrix(c(1,r2p,r2p,1),nrow=2,ncol=2)
r2s<-(n2*cos(ag1)-n1*cos(ag2))/(n2*cos(ag1)+n1*cos(ag2))
I2s<- matrix(c(1,r2s,r2s,1),nrow=2,ncol=2)

#melanina-queratina
r3p<-(n2*cos(ag2)-n3*cos(ag3))/(n2*cos(ag2)+n3*cos(ag3))
I3p<- matrix(c(1,r3p,r3p,1),nrow=2,ncol=2)
r3s<-(n3*cos(ag2)-n2*cos(ag3))/(n3*cos(ag2)+n2*cos(ag3))
I3s<- matrix(c(1,r3s,r3s,1),nrow=2,ncol=2)

#MATRIZES DE TRANSFERÊNCIA
#queratina
b1<-(2*pi*d1*n1*cos(ag1))/w1
L1<- matrix(c(exp(b1*1i),0,0,exp(b1*-1i)),nrow=2,ncol=2)

#melanina
b2<-(2*pi*d2*n2*cos(ag2))/w1
L2<- matrix(c(exp(b2*1i),0,0,exp(b2*-1i)),nrow=2,ncol=2)

#MATRIZES TOTAIS DE DISPERSÃO
SCAT1s<-I1s%%L1%%I2s%%L2%%I3s
SCAT2s<-I1s%%L1%%I2s
SCAT3s<-I1s%%L2%%I3s
SCAT4s<-I2s%%L2%%I3s

SCAT1p<-I1p%%L1%%I2p%%L2%%I3p
SCAT2p<-I1p%%L1%%I2p
SCAT3p<-I1p%%L2%%I3p
SCAT4p<-I2p%%L2%%I3p

#AMPLITUDE DE REFLECTIVIDADE
ref1s<-SCAT1s[2,1]/SCAT1s[1,1]
ref2s<-SCAT2s[2,1]/SCAT2s[1,1]
ref3s<-SCAT3s[2,1]/SCAT3s[1,1]
ref4s<-SCAT4s[2,1]/SCAT4s[1,1]

ref1p<-SCAT1p[2,1]/SCAT1p[1,1]
ref2p<-SCAT2p[2,1]/SCAT2p[1,1]
ref3p<-SCAT3p[2,1]/SCAT3p[1,1]
ref4p<-SCAT4p[2,1]/SCAT4p[1,1]

#REFLECTÂNCIA FINAL
REF1s<-ref1s%%Conj(ref1s)
REF2s<-ref2s%%Conj(ref2s)
REF3s<-ref3s%%Conj(ref3s)
REF4s<-ref4s%%Conj(ref4s)

REF1p<-ref1p%%Conj(ref1p)
REF2p<-ref2p%%Conj(ref2p)

```

```

REF3p<-ref3p*%Conj (ref3p)
REF4p<-ref4p*%Conj (ref4p)

#MODELOS
m1s<-c (m1s,REF1s*100)
m2s<-c (m2s,REF2s*100)
m3s<-c (m3s,REF3s*100)
m4s<-c (m4s,REF4s*100)

m1p<-c (m1p,REF1p*100)
m2p<-c (m2p,REF2p*100)
m3p<-c (m3p,REF3p*100)
m4p<-c (m4p,REF4p*100)

}
model.1s<-as.numeric (m1s)
model.2s<-as.numeric (m2s)
model.3s<-as.numeric (m3s)
model.4s<-as.numeric (m4s)

model.1p<-as.numeric (m1p)
model.2p<-as.numeric (m2p)
model.3p<-as.numeric (m3p)
model.4p<-as.numeric (m4p)

model.1<-(model.1s+model.1p)/2
model.2<-(model.2s+model.2p)/2
model.3<-(model.3s+model.3p)/2
model.4<-(model.4s+model.4p)/2

#TABELA DE DADOS
wavelength<-320:700
tfilm<-data.frame (wavelength,model.1,model.2,model.3,model.4)

#GRÁFICOS E RESULTADO
plot (wavelength,model.1,typ="l",ylim=c (0,25), xlab="Comprimento de onda
(nm)",ylab="Reflectância (%)", col="darkblue" ,lwd=2)
points (model.2~wavelength, typ="l", ,lty=2, col="red" ,lwd=2)
points (model.3~wavelength, typ="l", ,lty=3, col="green" ,lwd=2)
points (model.4~wavelength, typ="l", ,lty=4, col="blue" ,lwd=2)
legend ("topright",legend=c ("Modelo 1","Modelo 2", "Modelo 3","Modelo 4"),
lty=c (1,2,3,4), lwd=2, col=c ("darkblue","red","green","blue"))

tfilm
}
#FIM DO SCRIPT

#EXEMPLO DE COMO RODAR A FUNÇÃO
tiziou.45<-Rmed (d1=126.17,d2=416.75, ag0=0.7850)
tiziou.45

#EXEMPLO DE COMO EXPORTAR A TABELA DE DADOS
write.table (tiziou.45, "c:/gassquit45.txt", sep="\t")

```