

LARISSA LACERDA MORAES

**POLIMORFISMO CROMÁTICO EM *Lathrotriccus euleri*
(CABANIS, 1868) (AVES: PASSERIFORMES)**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Biologia Animal, para obtenção
do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2009**

LARISSA LACERDA MORAES

**POLIMORFISMO CROMÁTICO EM *Lathrotriccus euleri*
(CABANIS, 1868) (AVES: PASSERIFORMES)**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Biologia Animal, para obtenção
do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 29 de setembro de 2009

Prof. Dr. Renato Neves Feio
(co-orientador)

Prof. Dr. Jorge A. Dergam dos Santos
(co-orientador)

Prof. Dr. Leonardo Esteves Lopes

Prof. Dr. Luiz Orlando de Oliveira

Prof. Dr. Rômulo Ribon
(orientador)

"O homem vangloria-se de ter imitado o vôo das aves com uma complicação técnica que elas dispensam".

Carlos Drummond de Andrade

À minha família e meus amigos...

AGRADECIMENTOS

Muitas foram as pessoas que contribuíram para a finalização do presente estudo. Hoje, com o trabalho cumprido, é com grande satisfação que dedico meus agradecimentos especiais a cada uma delas:

À minha família, especialmente Priscila e Wilton, pelo apoio incondicional, exemplo de vida, confiança e referência.

Aos componentes da banca por terem aceitado o convite e pelas contribuições, muito bem vindas.

Ao professor Rômulo Ribon, pela orientação, aprendizado, pelas viagens de campo, equipamentos e materiais didáticos indispensáveis para a realização deste trabalho. Agradeço também pelo seu empenho em conseguir a bolsa de estudo que muito facilitou a realização das coletas.

Ao professor Renato Feio, por ter apoiado, desde o início, a minha carreira na ornitologia. Por ter aceitado me orientar durante o estágio e a monografia e também nos primeiros períodos do mestrado, na ausência de um ornitólogo. Por sempre incentivar meus estudos, confiando a mim trabalhos de campo, palestras e viagens ao rio Doce. Pela co-orientação e pelo clima tão especial e descontraído, mantido no museu de zoologia.

Ao professor Jorge Dergam, pela co-orientação, pelos testes moleculares realizados no Beagle, inclusive me ajudando com a parte prática. E claro, pelos momentos divertidos compartilhados durante os trabalhos no rio Pandeiros.

À professora Elza Fernandes de Araújo, por ter permitido o desenvolvimento das análises moleculares no Laboratório de Genética de Microrganismos.

Ao professor Marcos Raposo, pelas fotos do holótipo prontamente cedidas, fotografadas durante a execução do Projeto "Catálogo de Tipos de Espécies de Aves Brasileiras" (CNPq /Museu Nacional).

Ao professor Marcos Rodrigues por permitir consulta à coleção ornitológica da Universidade Federal de Minas Gerais.

Ao professor Affonso H. Zuin e sua esposa, Débora Zuin, pela gentileza de me enviarem da Alemanha o artigo de descrição do enferrujado, não disponível no meio eletrônico e aos demais pesquisadores que enviaram seus manuscritos.

À professora Gisele Lessa, pelos anos de convivência, apoio e por me confiar o trabalho de Pandeiros.

À empresa Plantar S.A., pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao IBAMA, por ter concedido a permissão de coleta. À gerência da Mata do Paraíso e seus funcionários e ao Sr. Antônio Ferreira por ter permitido a coleta de dados na sua propriedade.

Ao Sr. Geraldo Mattos e ao Sr. José Lélis, pelos ensinamentos práticos em taxidermia. Ao Sr. José Lélis, pelos muitos chumbinhos gastos durante a prática de tiro nos fundos do museu, pelas dicas e pela coleta do primeiro indivíduo de *Lathrotriccus euleri*. Agradeço ainda, por sua disponibilidade em ir à campo comigo, embora dias muito chuvosos tenham impedido os trabalhos de campo.

Ao ornitólogo Carlos Rodrigo Meirelles Abreu, pela coleta e pelas vozes cedidas de dois indivíduos de *Lathrotriccus euleri*.

Ao Véio, por ter me despertado o interesse pelo estudo das aves, e ter ajudado na identificação das primeiras espécies no campus da UFV e na Mata do Paraíso.

Aos meus colegas de mestrado, Dedé e Robertão, por terem compartilhado esses dois anos de aprendizado, angústias e conquistas.

Ao Panda, Rhaíza, João Marcos, Dedé e Jhonny que se esforçaram tantas vezes para acordar cedo (bem cedo) e irem para campo comigo. Agradeço ainda ao Anderson, Camila (Cleo), Diego, Guilherme, Helton, Néia, Pablito, Patrick e Vitim, que vez ou outra participaram dessa aventura também.

Ao Henrique, Diego, Panda e Zé pelas fotografias. Ao Rodolfo, por pacientemente, ter me ajudado com *scanners*, pdfs e programas de computador. Ao Diego, Mário, Rômulo Dângelo e Zé pela ajuda com as análises estatísticas. Ao Fred e Rafael Simões por terem disponibilizado tanto tempo me ajudando com os PCRs e com os géis. À Câmis e Jana, em especial, pela leitura da parte molecular e pelas tantas discussões enriquecedoras acerca desse assunto, totalmente novo para mim.

Ao Jhonny, pessoa superespecial nesses últimos três anos, pela sua cumplicidade, força e, principalmente, paciência durante a realização desse trabalho. Muito obrigada pela sua compreensão!

À família do museu, pela amizade e companheirismo, no dia-a-dia das aulas e nos tantos trabalhos de campo. Pelos ensinamentos herpetofaunísticos, adquiridos

em alguns desses campos, ao acompanhar Finim, Henriqueta, Jhonny, Jussa; e também pelos mastofaunísticos, né Clever, Maressa, Marie Claire, Rodolfo. E, ainda, pelos muitos bate-papos, momentos de descontração e comemoração a cada vitória de algum colega, em meio aos churrascos e as cervejinhas no Helinho.

Às minhas amigas, Câmis, Jana, Ju, Luana e Nívea, pelos seis anos de convívio, pelas festas, almoços e aniversários que passamos juntas.

A todos, muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE TABELAS.....	X
RESUMO	XI
ABSTRACT	XII
1) INTRODUÇÃO.....	1
2) OBJETIVO.....	10
3) MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
3.1) ANÁLISES MORFOLÓGICAS.....	11
3.2) VOCALIZAÇÕES	14
3.3) ANÁLISES MOLECULARES	17
4) RESULTADOS.....	19
4.1) ANALISES MORFOLÓGICAS.....	19
4.2) VOCALIZAÇÕES	24
4.3) ANÁLISES MOLECULARES	26
5) DISCUSSÃO.....	31
6) CONCLUSÃO	40
7) REFERÊNCIAS BIBLIGRÁFICAS	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Procedência dos indivíduos de *Lathrotriccus euleri* depositados nas coleções ornitológicas do MZUFV, município de Viçosa, Minas Gerais e DZ-UFMG, município de Belo Horizonte, Minas Gerais.....13

Figura 2. Indivíduos de *Lathrotriccus euleri* de assoalho da boca e língua laranja (acima) e assoalho da boca e língua rósea (abaixo) em posição ventral, depositados na coleção ornitológica do MZUFV, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

Figura 3. Indivíduos de *Lathrotriccus euleri* de assoalho da boca e língua laranja (acima) e assoalho da boca e língua rósea (abaixo) em posição dorsal, depositados na coleção ornitológica do MZUFV, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

Figura 4. Análise de Componentes Principais (CP1 e CP2) das variáveis morfológicas dos espécimes de *Lathrotriccus euleri* provenientes das coleções ornitológicas DZUFMG, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, MZUFV, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais e de indivíduos capturados em rede de neblina, no município de Viçosa. Triângulos verdes representam indivíduos de língua rósea. Círculos azuis representam indivíduos de língua laranja.....24

Figura 5. Sonogramas dos chamados de 3 notas, de indivíduos de *Lathrotriccus euleri*, Viçosa, Minas Gerais. (A) representa a voz de 1 indivíduo de língua rósea; (B) representa a voz de 1 indivíduo de língua laranja.....25

Figura 6. Perfis de amplificação das 16 amostras de *Lathrotriccus euleri* com os primers OPA-10 (A) e OPY10 (B). **M** corresponde ao marcador ϕ X clivado com HaeIII. Os números indicam as localidades de coleta: 1 = Paula Cândido, 2 = Viçosa, 3 = Ferros, 4 = Ladainha e 5 = Santa Maria do Salto. As letras correspondem à cor da língua dos indivíduos: L = laranja e R = rósea.....28

Figura 7. Dendrograma da análise de agrupamento pelo método hierárquico UPGMA, obtido com base na matriz de dissimilaridade determinado pelo complemento aritmético do índice de similaridade de Jaccard. Os valores da escala representam a porcentagem de diferenciação genética. O indivíduo MZUFV 1657, oriundo de Santa Maria do Salto, apresentou-se isolado dos demais indivíduos. Estão representados localidade e coloração da língua e do assoalho da boca de cada indivíduo.....30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Localidade, número amostral e número de indivíduos de cada padrão de língua.....	11
Tabela 2. Espécimes de <i>Lathrotriccus euleri</i> utilizados para a análise molecular, com dados sobre a coleta e sobre a coloração da língua.....	17
Tabela 3. Dados morfométricos dos espécimes de <i>Lathrotriccus euleri</i> e comparações estatísticas entre padrões de língua. Medidas em centímetros.....	23
Tabela 4. Colaboração das variáveis na formação dos componentes principais.....	24
Tabela 5. Análise descritiva das medidas de frequência (Hz) e tempo (s) para chamados de 3 notas dos 2 padrões fenotípicos de <i>Lathrotriccus euleri</i> , com comparação estatística entre os padrões.....	26
Tabela 6. Nomes, sequências e número de bandas polimórficas obtidas com 18 <i>primers</i> selecionados para as análises de RAPD - PCR, testados nas variantes de cor de língua dos 2 tipos morfológicos de <i>Lathrotriccus euleri</i>	26
Tabela 7. Medidas de dissimilaridade expressas pelo complemento aritmético do índice de similaridade de Jaccard. Os indivíduos estão identificados pelos números de tombo da coleção MZUFV, Viçosa, Minas Gerais.....	29

RESUMO

MORAES, Larissa Lacerda, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Setembro de 2009. **Polimorfismo cromático em *Lathrotriccus euleri* (Cabanis, 1868) (Aves: Passeriformes)**. Orientador: Rômulo Ribon. Co-orientadores: Jorge Abdala Dergam dos Santos e Renato Neves Feio.

O enferrujado (*Lathrotriccus euleri*) (Tyrannidae, Fluvicolinae) foi descrito no gênero *Empidochanes* e posteriormente transferido para o gênero *Empidonax*, um táxon predominantemente norte-americano. A retirada da espécie deste último gênero foi realizada com base em estudos bioquímicos e na estrutura da siringe, sendo criado um novo gênero – *Lathrotriccus* - no qual foi inserida. Este gênero é endêmico da América do Sul e possui apenas duas espécies, *L. griseipectus* e *L. euleri*. O enferrujado é uma ave insetívora de cor geral parda, de ventre mais claro, maxila preta e mandíbula esbranquiçada. Nas regiões dos municípios de Viçosa e Poté, leste do estado de Minas Gerais, sudeste do Brasil, foram detectados espécimes de *L. euleri* com diferenças morfológicas inéditas na literatura. O presente estudo visou descrever a variabilidade fenotípica e molecular de *L. euleri* no leste de Minas Gerais, analisando se a mesma existe dentro do grupo como variação individual, ou como variação interespecífica. A coleta de dados foi realizada principalmente no município de Viçosa, cuja paisagem é um mosaico de fragmentos secundários de Mata Atlântica em meio a uma matriz agropecuária. Foram caracterizadas a morfologia externa de aves vivas e taxidermizadas, as vocalizações e as variações moleculares. Esses dados foram relacionados aos padrões de variação na coloração da língua. *Lathrotriccus euleri* mostrou pequena variação na coloração da plumagem e nenhuma diferença significativa nas medições realizadas entre os indivíduos com cores diferentes de línguas. As vocalizações, também não apresentaram variações significativas entre os dois tipos morfológicos de *L. euleri*. As análises de DNA realizadas pela técnica de RAPD-PCR não permitiram a separação dos dois tipos morfológicos de *L. euleri* em dois grupos. Porém, um indivíduo proveniente de Santa Maria do Salto e que tinha a língua laranja, apresentou padrão molecular divergente dos demais. De acordo com esses resultados, concluiu-se que o enferrujado apresenta 2 morfos para a cor da língua, um róseo e outro laranja não relacionados com o sexo.

ABSTRACT

MORAES, Larissa Lacerda, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2009. **Chromatic Polymorphism in *Lathrotriccus euleri* (Cabanis, 1868) (Aves: Passeriformes)**. Adviser: Rômulo Ribon. Co-advisers: Jorge Abdala Dergam dos Santos and Renato Neves Feio.

Euler's Flycatcher, *Lathrotriccus euleri* (Cabanis, 1868) (Tyrannidae, Fluvicolinae), was originally designated as *Empidochanes* and later as *Empidonax*, a genus with primarily north-american distribution. Biochemical and morphological studies of the syrinx of *E. euleri* withdrew it from the genus *Empidonax* and lead to the creation of a new genus, *Lathrotriccus*, where it was inserted. This genus is endemic of South America and has only two species, *L. griseipectus* e *L. euleri*. Euler's Flycatcher is an insectivorous species with dark grayish brown color, lighter belly, black maxilla and whitish jaw. In Viçosa and Poté counties, east of the state of Minas Gerais, southeastern Brazil, specimens of *L. euleri* with unpublished morphological differences have been found. The present study describes the phenotypic and molecular variability of *L. euleri* in eastern Minas Gerais, analyzing if it does exist as an individual variation within the group, or as an interespecific variation. Data collection was made mainly in municipality of Viçosa, which landscape is a mosaic of secondary Atlantic Forest fragments within an agricultural matrix. External morphology of live and taxidermized birds, as well as calls and molecular variations were characterized. These data were analyzed to verify their relationship to the color of the birds' tongues. *Lathrotriccus euleri* showed little variation in plumage color and no significant difference in measurements among specimens with different tongue colors. Calls, although scarce, also have not shown significant variation among the two morphological types of *L. euleri*. DNA analysis using the RAPD-PCR techniques has not allowed taking apart the two morphological types of *L. euleri* in different groups. Only one specimen, from Santa Maria do Salto, which had orange tongue color, formed a distinct group from the others. According to these results the species has color polymorphism, presenting two morphs for tongue color, one pinkish and other orange.

1) INTRODUÇÃO

A ordem Passeriformes compreende 59,1% do total de aves no mundo (Sibley & Monroe 1993) e é dividida nas subordens Oscines (Passeri) e Suboscines (Tyranni), diagnosticadas principalmente pela estrutura da siringe. Esta ordem é monofilética e a subordem Suboscine assume posição basal dentro do clado (Ericson *et al.* 2003). A subordem Suboscines compreende o maior número das espécies de Passeriformes na região Neotropical (Ricklefs 2002). No Brasil, esta subordem corresponde a cerca de 36% da avifauna e é representada principalmente pelas famílias Tyrannidae, Thamnophilidae e Furnariidae (CBRO 2008).

A família Tyrannidae é endêmica ao hemisfério ocidental e representa a maior família de aves nessa região (Sick 1997). Seus representantes ocupam os mais variados nichos ecológicos, apresentam enorme diversificação morfológica e possuem amplo repertório comportamental (Sick 1997, Fitzpatrick 2004). A maioria das espécies ocorre nas Américas do Sul e Central, embora algumas ocorram na América do Norte (Ridgely & Tudor 1994, Sick 1997). Devido à sua enorme riqueza e complexidade, esta família apresenta muitos problemas taxonômicos (Chesser 2004). Assim, a identificação em campo de algumas espécies similares pode ser muito difícil. Nestes casos, o conhecimento sobre marcas de campo, canto e hábitat é de extrema importância para a identificação em campo (Hilty & Brown 1986). Por exemplo, Lanyon (1978) reporta a dificuldade de taxonomistas em identificar várias espécies do gênero *Myiarchus* devido ao limite tênue entre elas. É o que ocorre também na identificação de *Elaenia* spp., *Phylloscartes* spp., *Phyllomyias* spp. e *Hemitriccus* spp., dentre outros gêneros (Ridgely & Tudor 1994).

Difícil e trabalhosa é, também, a descoberta de espécies crípticas, como por exemplo o estudo de Willis (1992) acerca das espécies de *Chamaeza* do Brasil oriental e o estudo de Zimmer *et al.* (2001) que descrevem uma nova espécie de tiranídeo, o *Suiriri islerorum*. Ambos estudos englobam a pesquisa de caracteres morfológicos e biométricos, mas utilizam a vocalização como ferramenta chave na identificação e separação das espécies. Com a descoberta de muitas espécies crípticas ao longo dos últimos anos e de novas técnicas e metodologias de estudo, destaca-se a importância de se tornar os estudos de campo e de museu cada vez mais criteriosos, conciliando-os com estudos de vocalização, de genética e de análise molecular das populações (Willis 1992).

Estudos sobre coloração de partes moles (não preservadas em coleções científicas) podem ser úteis na taxonomia, porém são bastante escassos. Alguns trabalhos relatam a importância da coloração da íris na diagnose de espécies aparentadas, como é o caso de *Thamnophilus capistratus* (de íris laranja) e *Thamnophilus doliatus* (de íris mais clara, chegando a ser um amarelo-claro) (Assis *et al.* 2007). Em espécies do gênero *Trogon*, como por exemplo *Trogon surrucura* e *Trogon viridis*, a coloração da pálpebra é característica auxiliar para sua identificação, assim como ocorre em espécies do gênero *Ramphastos*, em que a coloração da região perioftálmica pode também ser utilizada como caráter diagnóstico (Sick 1997).

Alguns autores se referem à coloração do assoalho da boca como caráter auxiliar na identificação de espécies próximas. É o caso de *Mionectes macconnelli* e *Mionectes oleagineus* que possuem assoalhos da boca preto e amarelo, respectivamente (relatos de T. Lovejoy em Ridgely & Tudor 1994) e ainda de muitas espécies de *Myiarchus* da América do Sul, que possuem assoalhos da boca de

cores que variam entre o amarelo-claro e o laranja (Lanyon 1978) ou de formas mexicanas, que possuem o assoalho da boca cor de carne ou laranja (Edwards 1972).

De forma complementar à taxonomia tradicional, baseada sobretudo em aspectos morfológicos – forma, tamanho e cor de partes internas e externas – pesquisadores têm utilizado, dados comportamentais, como nidificação (Sheldon & Winkler 1999, Zyskowski & Prum 1999, Londoño & Cadena, 2003) e vocalizações (Isler *et al.* 2001), assim como dados moleculares (Cicero & Johnson 2002, Rice 2005 Tello & Bates 2007, Johansson *et al.* 2008) para estudos taxonômicos em laboratório, de diversos grupos de aves.

A grande maioria dos estudos sobre vocalização existentes até a atualidade tem sido feita com espécies da subordem Oscines e pouquíssimos estudos dessa natureza têm abordado a subordem Suboscines (Lovell & Lein 2004a). A vocalização é aprendida em praticamente todos os Oscines (Kroodsma & Miller 1982), enquanto que nos Suboscines ela parece ser quase totalmente inata (Kroodsma 1984). Como resultado desses diferentes modos de desenvolvimento do canto, pode-se esperar maiores níveis de variação na estrutura do canto em Oscines do que em Suboscines (Kroodsma & Miller 1982, Lein 2008), podendo essa variação ser tanto individual quanto populacional (Kroodsma & Miller 1982, Lein 2008). Estudos sobre o desenvolvimento inato do canto, ou seja, na ausência de aprendizado, de alguns poucos representantes de Suboscines (da família Tyrannidae) serviram de base para que tal tipo de desenvolvimento fosse generalizado para as demais espécies do grupo, devido às variações restritas encontradas em seus cantos (Lein 2008). Kroodsma (2005), ao estudar a vocalização de *Procnias tricarunculata* (Cotingidae, Suboscines), descobriu haver aprendizado do canto nessa espécie. Este mesmo autor indica que H. Fandinho observou a presença de aprendizado também

em *Procnias nudicollis*, uma espécie brasileira, na qual um indivíduo foi registrado imitando a voz de *Gnorimopsar chopi* (Icteridae, Oscines). Porém ao estudar *Empidonax alnorum* e *Empidonax traillii* (Tyrannidae, Suboscines) nenhuma forma de aprendizado foi encontrada (Kroodsma 1984).

Mesmo havendo variações sutis nos cantos e chamados de Suboscines, muitas diferenças individuais e populacionais têm sido descobertas através de gravações analisadas por sonogramas (Fernández-Juricic *et al.* 2009, Lovell & Lein 2004a, Puglisi & Adamo 2004, Lein 2008) e testes de respostas ao *play-back*. Nestes últimos, indivíduos apresentaram respostas diferenciadas quando submetidos a *play-backs* de cantos de vizinhos próximos e de cantos de intrusos (Lovell & Lein 2004b, Lovell & Lein 2005, Wiley 2005). Experimentos dessa natureza também demonstraram variação na vocalização de subespécies vizinhas (Sedgwick 2001).

Coopmans & Krabbe (2000) descobriram uma nova espécie de tiranídeo, *Myiopagis olallai*, baseado principalmente no canto, enquanto Cicero & Benowitz-Fredericks (2000) propuzeram uma filogenia para espécies de *Melospiza*, com base na análise das vozes das espécies do gênero.

Outra forma rápida e preliminar de determinar a existência de espécies dentro de uma amostra surgiu com o desenvolvimento da reação em cadeia da DNA polimerase, conhecida por seu nome em inglês PCR - *Polymerase Chain Reaction* (Saiki *et al.* 1988). O PCR permite a amplificação de grandes quantidades de DNA genômico. Na ausência de informação prévia do genoma da espécie sob estudo, é possível a amplificação de fragmentos de DNA a partir de sequências iniciadoras pequenas (10 bases) de nucleotídeos, em condições pouco exigentes de anelamento. Uma dessas técnicas é chamada RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) (Williams *et al.* 1990). Os marcadores RAPD permitem a análise genética de

diversas espécies a um custo relativamente baixo e de forma bastante simplificada (Hadrys *et al.* 1992). Tipicamente, utiliza-se apenas um tipo de *primer* em cada reação. O *primer* é formado por diferentes combinações das quatro bases nitrogenadas, com um conteúdo de G + C variando entre 50 e 70% (Fritsch & Rieseberg 1996). Essas pequenas sequências nucleotídicas se ligam a sequências complementares em fitas opostas do DNA-alvo, distantes em até 2 kilobases nas reações normais de PCR. Na fase de extensão, os primers permitem a incorporação de nucleotídeos no seu extremo 3', permitindo a amplificação *in vitro* de fragmentos de DNA, com o auxílio da enzima *Taq* polimerase. Os fragmentos de DNA resultantes da reação acima são separados, de acordo com o tamanho de seus fragmentos, por eletroforese em gel de agarose e visualizados a partir de coloração com brometo de etídio (Williams *et al.* 1990).

O RAPD-PCR é utilizado no estudo da diversidade ou do mapeamento genético através da visualização de bandas polimórficas (Williams *et al.* 1990, Dodgson *et al.* 1996), quando a variação nessas bandas representa segregação alélica em *loci* independentes (Clark & Lanigan 1993). Por essas características, estes mesmos autores indicam a técnica de RAPD-PCR como particularmente atrativa também para análises de distância genética e reconstrução filogenética de grupos de organismos.

Além do baixo custo, simplicidade, rapidez e demanda de baixas quantidades de DNA, o RAPD-PCR ainda tem outras vantagens sobre técnicas de isoenzimas e RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Quando se trabalha com a técnica de RAPD é possível obter-se um grande número de marcadores, enquanto que através da técnica de isoenzimas dificilmente mais de 30 *loci* são obtidos para análise (Lacerda *et al.* 2002). Com um elevado número de *primers*, é possível

encontrar marcadores RAPD polimórficos mesmo em espécies com níveis muito baixos de polimorfismo para *loci* isoenzimáticos (Hadrys *et al.* 1992), o que é uma boa ferramenta para o estabelecimento de comparações genéticas em organismos proximamente relacionados (Fritsch & Rieseberg 1996), inclusive para o estudo de espécies crípticas (Black 1993). Além disso, enquanto marcadores isoenzimáticos refletem apenas regiões codificadoras, marcadores RAPD fazem uma amostragem mais abrangente do genoma, refletindo regiões repetitivas e de sequência única, regiões codificadoras e não codificadoras (Hadrys *et al.* 1992, Lynch & Milligan 1994, Fritsch & Rieseberg 1996).

Já comparada à técnica de RFLP, a técnica de RAPD dispensa o uso de reagentes radioativos (Black 1993, Lynch & Milligan 1994, Fritsch & Rieseberg 1996) e seus resultados podem ser observados em um dia (Black 1993). Em contrapartida, os resultados de um RFLP demoram cerca de 5 dias e ainda requerem grandes quantidades de reagentes e muito tempo de manipulação (Black 1993).

Entretanto, muitas são as desvantagens da RAPD-PCR. A técnica não é quantitativa (Black 1993) e a grande maioria dos marcadores RAPD é dominante, ou seja, não é possível diferenciar heterozigotos (uma cópia) de homozigotos (duas cópias) (Williams *et al.* 1990). Raramente pode-se detectar marcadores co-dominantes (Williams *et al.* 1990), e supostamente estes surgem através de pequenas inserções ou deleções na região amplificada (Black 1993). Esta característica talvez seja um dos maiores inconvenientes da técnica, sendo um empecilho, por exemplo, para estudos de cruzamentos de populações naturais, frequências alélicas e genotípicas, nos quais as técnicas de isoenzimas e RFLP se mostram mais eficazes por serem co-dominantes (Lynch & Milligan 1994). Outra desvantagem diz respeito à baixa repetitividade dos resultados. A técnica de RAPD está sujeita a muitos

artefatos, podendo produzir bandas que não representam cópias fiéis dos fragmentos de DNA, ou podem ser resultado de DNA contaminante. Alguns estudos mostram que fatores bioquímicos e físicos afetam a qualidade das reações de PCR levando à formação de bandas artefatuais (Rabouam *et al.* 1999). A falta de repetitividade pode ocorrer devido a pequenas modificações na programação das reações, a variações nas concentrações dos reagentes, à concentração das amostras de DNA e diferentes termocicladores (Black 1993). A repetitividade da técnica também pode ser afetada pelas inserções e deleções (Clark & Lanigan 1993) já citadas anteriormente e por rearranjos acarretando no surgimento de novas bandas ou ainda provocando a ausência de outras (Caetano-Anollés 1993). Isto levou vários pesquisadores a desenvolver metodologias de análise dos dados que contornassem ou reduzissem os problemas da dominância e pudessem extrair o máximo de informações possível a partir de dados de RAPD. Algumas delas utilizam como premissa o fato das populações dos organismos estudados estarem em equilíbrio de Hardy-Weinberg (Clark & Lanigan 1993, Lynch & Milligan 1994) enquanto que outras não requerem esta premissa (Stewart & Excoffier 1996).

Alguns pesquisadores têm optado pela utilização da técnica de AFLP, *Amplified Fragment Length Polymorphism* (Vos *et al.* 1995). A tecnologia necessária para revelar polimorfismo através dessa técnica reúne elementos do PCR e da RFLP (Avisé 2004) e possui vantagens sobre a técnica de RAPD por utilizar *primers* de tamanhos maiores e melhorar a repetitividade (Lacerda *et al.* 2002). Entretanto, esta técnica também apresenta caráter dominante e é bem mais cara e trabalhosa do que a técnica de RAPD (Ferreira & Grattapaglia 1995, Avisé 2004).

O gênero *Lathrotriccus*. O enferrujado (*Lathrotriccus euleri*) (Tyrannidae, Fluvicolinae) foi descrito no gênero *Empidochanes* com base em um exemplar coletado no município de Cantagalo, estado do Rio de Janeiro (Cabanis 1868). No final dos anos 1800 a espécie foi transferida para o gênero *Empidonax*, um táxon predominantemente norte-americano, (Lanyon & Lanyon 1986). A maioria das espécies do gênero *Empidonax* são crípticas, distinguíveis apenas por marcas de campo sutis (Fitzpatrick 2004) e poucos observadores conseguem identificá-las em campo com segurança, apenas visualizando-as (Robbins & Stallcup 1981). Algumas delas são tão semelhantes que os indivíduos não se distinguem nem mesmo analisando-se os caracteres acima citados, e o canto torna-se o melhor caráter taxonômico (Fitzpatrick 2004), como ocorre com *Empidonax alnorum* e *Empidonax trailli*. Essas duas espécies são muito semelhantes morfológicamente e sintópicas em muitos locais dentro de suas áreas de distribuição, que englobam o centro-oeste e nordeste da América do Norte. Porém, o canto dessas espécies difere (*E. alnorum*: descrito em inglês como *fitz-bew* e *E. trailli* como: *fee-bee-o*) (Zink & Fall 1981, Stein 1963) de modo suficiente a permitir sua identificação no campo.

Estudos bioquímicos mostraram que *E. euleri* e *E. griseipectus* eram mais relacionados ao gênero *Cnemotriccus*, estando inapropriadamente incluídos entre os *Empidonax* (Zink & Johnson 1984). Dois anos depois, estudos morfológicos da siringe (número, forma e posição dos ossos e cartilagens) e estudos bioquímicos (enzimas encontradas no coração, fígado e em músculos esqueléticos) realizados com *E. euleri* levaram à sua retirada do gênero *Empidonax* e à criação de um novo gênero, *Lathrotriccus*, no qual foi inserido, passando a se chamar *Lathrotriccus euleri* (Lanyon & Lanyon 1986).

O gênero *Lathrotriccus* é endêmico da América do Sul e possui apenas duas espécies. *Lathrotriccus griseipectus* é restrito a regiões semi-áridas no oeste do Equador e norte do Peru (Fitzpatrick 2004) e considerado ameaçado de extinção, na categoria vulnerável, por possuir populações pequenas e muito fragmentadas devido ao desmatamento exagerado (BirdLife International 2004). Já *Lathrotriccus euleri* é uma das espécies de papa-moscas silvestres mais comuns na América do Sul (Sick 1997). Sua população é grande o suficiente para receber o status de “frequente”, pelo menos em alguns locais dentro da sua área de distribuição (Stotz *et al.* 1996). Ocorre desde a Venezuela até a Bolívia, Paraguai, Argentina e Uruguai, e em todas as regiões do Brasil (Ridgely & Tudor 1994, Stotz *et al.* 1996, Sick 1997), e é subdividida em cinco subespécies: 1) *L. e. euleri* (Cabanis, 1868) do sudeste do Brasil, nordeste da Argentina e Uruguai, que também migra para o norte, chegando à Amazônia brasileira e ao nordeste amazônico do Peru, e Bolívia; 2) *L. e. flaviventris* (Lawrence, 1887), da ilha de Granada; 3) *L. e. lawrencei* (Allen, 1889) de Trinidad, oeste e norte da Venezuela, leste da Colômbia e casualmente no Suriname e Guiana Francesa; 4) *L. e. bolivianus* (Allen, 1889) do sul e sudeste da Venezuela, leste do Equador, leste do Peru, na maior parte do Brasil (exceto Norte e Sudeste) e noroeste da Bolívia, podendo haver migrantes na Colômbia; 5) *L. e. argentinus* (Cabanis, 1868) leste da Bolívia, norte da Argentina e Paraguai, migrando para o norte, chegando em regiões amazônicas tanto do Brasil quanto do Peru (Fitzpatrick 2004).

Lathrotriccus euleri habita o estrato arbustivo e herbáceo tanto do interior como da borda de florestas úmidas primárias e secundárias de regiões tropicais e subtropicais (Ridgely & Tudor 1994, Fitzpatrick 2004). É uma espécie inconspícua, que vive sozinha ou em pares (Ridgely & Tudor 1994, Sick 1997). Como as espécies de *Empidonax*, o enferrujado é um insetívoro pardo, com coloração mais clara nas

coberteiras das asas, conferindo-lhe um padrão de duas faixas beges contrastando com o restante da coloração. O ventre é mais claro que o dorso, a maxila é preta e a mandíbula é esbranquiçada. Os indivíduos dessa espécie estão sujeitos a variações no colorido (tonalidade) da plumagem que levam a problemas taxonômicos complexos em várias subespécies descritas (Hellmayr 1927, Zimmer 1939, Pinto 1944). Machos e fêmeas apresentam o mesmo padrão, não havendo dimorfismo sexual (Ridgely & Tudor 1994, Sick 1997).

Nas regiões de Viçosa e Poté, leste de Minas Gerais, sudeste do Brasil, foram detectados espécimes de *L. euleri* com algumas diferenças morfológicas, ainda não estudadas. Foram encontrados tanto indivíduos com boca e língua laranjas quanto indivíduos com boca e língua róseas. Esse mesmo padrão de coloração dessas partes moles foi relatado para o Rio Grande do Sul (Belton 1985). A pequena variabilidade morfológica é altamente conservativa na sub-ordem Suboscines e, particularmente, em *Empidonax* e *Cnemotriccus*, o mesmo valendo para suas vocalizações. Como *Lathrotriccus* está morfológica e filogeneticamente muito próximo àqueles gêneros, o presente estudo visa descrever a variabilidade fenotípica de *L. euleri* no leste de Minas Gerais, bem como esclarecer dúvidas a respeito do status taxonômico da espécie através de ferramentas moleculares.

2) OBJETIVO

O objetivo desse trabalho foi estudar a variabilidade morfológica e molecular de *Lathrotriccus euleri euleri* no leste de Minas Gerais, analisando se a mesma existe dentro do grupo como variação individual (polimorfismo), ou se trata de variação inter-específica (duas espécies distintas e crípticas com diferenças na cor da

língua). Para tal, foram analisados os padrões de variação, morfometria, coloração da plumagem, vocalização e nos padrões moleculares de indivíduos que apresentaram diferentes colorações de língua.

3) MATERIAIS E MÉTODOS

3.1) Análises Morfológicas

Foram analisados dados morfométricos e dados de coloração de 41 indivíduos. As medidas de *L. euleri* foram adquiridas de: 1) indivíduos coletados em campo; 2) indivíduos presentes em coleções científicas do Departamento de Zoologia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil (DZ-UFMG) e do Museu de Zoologia João Moojen da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil (MZUFV) e de; 3) indivíduos capturados em rede de neblina (12 m, malha 36 mm) (Figura 1, Tabela 1 e Anexo1).

Tabela 1. Localidade, número amostral e número de indivíduos de cada padrão de língua.

Localidade/coleção	Número amostral	Língua laranja	Língua rósea
MZUFV	25	18	7
DZ-UFMG	9	5	4
Viçosa, MG	7	7	-

Os indivíduos foram coletados em 3 fragmentos de Floresta Estacional Semidecidual Submontana (Oliveira-Filho & Fontes 2000) secundária da região de Viçosa, Zona da Mata de Minas Gerais, com cerca de 33% da área coberta por fragmentos de matas secundárias do mesmo tipo e fragmentos escassos de mata

primária bastante perturbados (Ribon *et al.* 2003). Os espécimes foram coletados na Mata da Biologia (20°45'31''S, 42°51'54''), na Estação de Pesquisa, Treinamento e Educação Ambiental, Mata do Paraíso (20°48'07''S, 42°51'29''O), ambas da Universidade Federal de Viçosa, e em um fragmento de propriedade particular, (20°48'36''S, 42°53'45''O).

Esses indivíduos foram coletados com espingarda de ar comprimido (licença do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA, nº13269-1), durante os anos de 2007 e 2008. A coleta ocorreu principalmente nos períodos chuvosos (períodos reprodutivos), época em que a detecção da espécie e a sua coleta se tornam mais fáceis devido à maior atividade dos indivíduos. Todos os espécimes coletados foram depositados na coleção ornitológica do Museu de Zoologia João Moojen da Universidade Federal de Viçosa (MZUFV), Viçosa, Minas Gerais.



Figura 1. Procedência dos indivíduos de *Lathrotriccus euleri* depositados nas coleções ornitológicas do MZUFV, município de Viçosa, Minas Gerais e DZ-UFMG, município de Belo Horizonte, Minas Gerais.

Os indivíduos capturados para marcação também foram provenientes de fragmentos de Mata Atlântica secundária da região de Viçosa. Estes foram capturados através de redes de neblina (12 m, malha 36 mm), anilhados (CEMAVE) nos meses de novembro de 2006, outubro de 2007 e dezembro de 2008, e soltos imediatamente após as medições. Foram medidos os comprimento da cauda, da asa fechada (“chord”), do tarso e do bico (comprimento total e narina-ponta) (Sick 1997), com o auxílio de paquímetro MAUb (precisão de 0,1mm). Cada caráter foi medido três vezes e a média foi usada para as análises. Para o caso específico dos

indivíduos capturados e, posteriormente soltos, apenas uma medida de cada caráter foi realizada.

Para os espécimes recém-coletados, anotou-se a coloração do bico (mandíbula e maxila), língua, íris, cabeça, tarso, asa, dorso e ventre, por observação direta. Para indivíduos tombados em coleções científicas, os dados de coloração da língua e da íris (que são perdidos com a taxidermia), foram obtidos por meio das etiquetas de campo, nos poucos casos em que tal informação estava registrada. As cores foram designadas conforme Munsell[®] (2000).

Para avaliar possíveis diferenças estatísticas entre as variáveis medidas foi realizado um teste *t* de Student (Sokal & Rohlf 1995) e uma Análise de Componentes Principais (PCA). Com esta última análise, o espaço multidimensional (medidas morfométricas) é reduzido através da produção de um pequeno número de variáveis que expliquem a maior parte da variância dos dados (James & McCulloch 1990; Peres-Neto 1995). A PCA também permite avaliar a distribuição dos indivíduos no espaço multidimensional sem a definição *a priori* de grupos (Sokal & Rohlf 1995). Vários indivíduos das coleções científicas e outros que foram capturados e soltos no campo não foram devidamente sexados. Mesmo com um pequeno número de indivíduos sexados, machos e fêmeas foram analisados separadamente *a priori*. Como não houve diferenças estatísticas entre os sexos (Anexos 2 e 3), tanto de indivíduos de assoalho da boca laranja quanto de indivíduos de assoalho da boca róseo, optou-se por trabalhar com machos e fêmeas juntamente, aumentando, assim o tamanho da amostra. O nível de significância adotado foi de 5% para todas as análises.

3.2) Vocalizações

As vocalizações de *L. euleri* foram gravadas principalmente nos períodos chuvosos e de maior atividade vocal das aves, sendo que as gravações ocorreram entre os meses de agosto de 2007 e março de 2009. Essas gravações foram obtidas nos mesmos fragmentos florestais da região de Viçosa citados anteriormente. Na medida do possível, os indivíduos coletados para as análises dos demais caracteres tiveram suas vozes gravadas previamente, para que se pudesse relacionar seus padrões de vocalização às variações morfológicas, já que a observação da coloração do assoalho da boca e da língua com o binóculo era difícil. Ainda foram utilizadas gravações de *L. euleri* de acervos particulares, oriundas de Rio Novo, região da Zona da Mata, e de Ferros, região metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais (Figura 1).

As vocalizações foram gravadas em fita cassete com gravador Sony TCM5000EV e microfone direcional Sennheiser ME66 e digitalizadas a 44 kHz com acurácia de 16-bit. Posteriormente foram produzidos sonogramas com o auxílio do programa Raven versão 1.2.1 para Windows (Charif *et al.* 2004). Um filtro (*bandpass*), fixado entre 1200 kHz e 5000 kHz, foi utilizado para remover ruídos de fundo e facilitar as medições. As vocalizações (cantos e chamados) foram avaliadas de acordo com suas frequências (frequência máxima e mínima de cada nota com valores médios e extremos se $n > 1$). A duração de cada nota também foi avaliada.

Para testar possíveis diferenças estatísticas entre as vocalizações dos dois tipos morfológicos de *L. euleri*, foi realizado um teste *t* de Student (Sokal & Rohlf 1995). O enferrujado emite chamados que variam de uma a seis notas. Com esse elevado repertório vocal, um número suficiente de gravações de cada tipo de voz deveria ser obtido para que se pudesse realizar as análises comparativas. Devido ao pequeno número de vocalizações adquiridas de cada tipo morfológico (cor da

língua), à dificuldade de se determinar a cor do assoalho da boca e da língua dos indivíduos com o binóculo e, ainda, ao fato dessas gravações serem de vozes diferentes, as comparações foram restritas aos chamados de três notas. O nível de significância adotado foi de 5%.

3.3) Análises Moleculares

Para as análises moleculares foram extraídas amostras de fígado de 13 indivíduos de *L. euleri* coletados em campo (os mesmos já citados anteriormente) e de outras quatro amostras do banco de tecidos do MZUFV (Tabela 2, Figura 1). Duas dessas foram retiradas do tecido muscular. Todas as amostras foram fixadas em etanol 92, 8% e estocadas a -20 °C.

Tabela 2. Espécimes de *Lathrotriccus euleri* utilizados para a análise molecular, com dados sobre a coleta e sobre a coloração da língua.

Espécime	Data de Coleta	Localidade/Coordenadas	Sexo	Cor da língua
MZUFV 1657	23/I/2005	Santa Maria do Salto/16°24'74"S, 40°03'69"O	♀	laranja
MZUFV 1791 ¹	30/V/2008	Ferros/19°14'14"S, 42°59'31"O	?	laranja
MZUFV 1792 ^{1,2}	28/V/2008	Ferros/19°13'26"S, 42°54'29"O	?	laranja
MZUFV 1785	15/X/2007	Paula Cândido/ 20°51'35"S, 42°59'11"O	♀	laranja
MZUFV 1788	15/X/2007	Paula Cândido/20°51'35"S, 42°59'11"O	♂	laranja
MZUFV 1789	28/II/2007	Viçosa/20°45'14"S, 42°52'20"O	♀	laranja
MZUFV 1790	26/IX/2008	Viçosa/20°48'36"S, 42°53'45"O	♂	laranja
MZUFV1797	24/IX/2008	Viçosa/20°48'36"S, 42°53'45"O	♂	laranja
MZUFV1798	18/XI/2008	Viçosa/20°45'31"S, 42°51'54"O	♂	laranja
MZUFV1800	30/IX/2008	Viçosa/20°45'31"S, 42°51'54"O	♀	laranja
MZUFV1802	22/X/2008	Viçosa/20°45'31"S, 42°51'54"O	♀	laranja
MZUFV 1752	22/IV/2005	Ladainha/17°43'79"S, 41°43'76"O	♂	rósea
MZUFV 1787	05/IX/2008	Viçosa/20°45'31"S, 42°51'54"O	♀	rósea
MZUFV1793	03/IX/2008	Viçosa/20°45'14"S, 42°52'20"O	♂	rósea
MZUFV1795	15/IX/2008	Viçosa/20°48'36"S, 42°53'45"O	♂	rósea
MZUFV1796	24/IX/2008	Viçosa/20°48'36"S, 42°53'45"O	♀	rósea
MZUFV1801	30/IX/2008	Viçosa/20°45'31"S, 42°51'54"O	♀	rósea

Legenda. As amostras sombreadas correspondem àquelas já existentes no banco de tecidos do MZUFV. ¹Amostras extraídas de tecido muscular. ²Amostra desconsiderada nas análises pela má qualidade da extração.

As extrações do DNA foram processadas a partir de modificações do protocolo de Boyce *et al.* (1989), utilizando-se o detergente CTAB (brometo de cetil-trimetil amônio). O DNA foi ressuspendido em Tris-HCl 1M- EDTA 0,5M pH 8,0 (filtrado e estéril) e estocado a -20 °C. Em seguida, o DNA de cada amostra foi quantificado em espectrofotômetro e estocado novamente até o momento da amplificação.

Para as análises de variabilidade genética, foram avaliados 77 *primers* decaméricos (Operon Technologies) em duas amostras de DNA. Os *primers* selecionados foram escolhidos pela sua capacidade de produção de bandas polimórficas e nítidas.

As reações de RAPD foram processadas em volumes de 25 µL, sendo 24 µL de mistura (17,0 µL de H₂O; 2,5 µL de tampão 10X [500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8,4, 1% Triton X-100, 15 mM MgCl₂]; 1,0 µL de dNTPs (desoxirribonucleotídeos trifosfatados) 20 mM; 2,5 µL de oligonucleotídeo (*primer*) 10 mM; 1,0 µL de Taq polimerase (1 unidade)) e 1 µL de DNA da amostra em concentração aproximada de 25 ng/µL. As reações foram amplificadas em termociclador MJ Research (PTC100), por 45 ciclos de: 94 °C por 30 segundos, 37 °C durante 60 segundos, 54 °C por 30 segundos, 72 °C por 2 minutos e uma extensão final a 72 °C durante 15 minutos. As amostras foram amplificadas simultaneamente com cada *primer*, visando minimizar os problemas de repetitividade (Black 1993).

Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose 1,5%, corados com brometo de etídio e digitalizados por meio de sistema de vídeo Eagle-Eye (Stratagene®).

Os resultados da eletroforese foram utilizados para a construção de uma matriz binária, onde a presença e a ausência de cada banda foi representada pelos números 1 e 0, respectivamente. A matriz binária de dados foi confeccionada a partir dos marcadores RAPD polimórficos, e a análise foi realizada por meio do aplicativo computacional GENES (Cruz 2008). A similaridade entre o par de indivíduos *i* e *j* foi calculada por meio do índice de similaridade de Jaccard, dada pela expressão:

$$S_{ij} = \frac{a}{(a + b + c)}, \text{ em que:}$$

a = número de bandas que os indivíduos *i* e *j* apresentam em comum,

b = número de bandas que apenas o indivíduo *i* apresenta,

c = número de bandas que apenas o indivíduo *j* apresenta.

Para a análise de agrupamento, foi confeccionado um dendrograma pelo método de agrupamento UPGMA, considerando a matriz de divergência obtida pelo complemento do índice de similaridade construída anteriormente.

4) RESULTADOS

4.1) Análises Morfológicas

Coloração. Os 41 indivíduos de *Lathrotriccus euleri* examinados apresentaram coloração da plumagem bastante semelhante, com poucas diferenças individuais. Não houve diferenças de coloração da plumagem relacionada aos exemplares com língua e assoalho da boca rosa ou laranja (Figuras 2 e 3).

Um único indivíduo jovem, da localidade de Santa Maria do Salto, Minas Gerais, apresentou coloração do dorso ferrugínea (10YR 3/4, *dark yellowish brown*), discrepante da coloração dos demais espécimes (Figura 2B).

A coloração do dorso e da cauda é pardacenta (2.5Y 3/2, *very dark grayish brown*), podendo haver mais ou menos ferrugem nas coberteiras da cauda e da asa; a asa é marrom-escura (10YR 2/2, *very dark brown*), com duas barras claras nas coberterias superiores (2.5Y7/6, *yellow*), bordas externas e internas das rêmiges secundárias também claras (2.5Y7/6, *yellow*) e coberteiras axilares amarelo-claras (5Y 8/6, *yellow*); a coloração da cabeça se destaca daquela do dorso, por ser ligeiramente mais escura (10YR 2/2, *very dark brown*); o peito é oliva, (5Y 4/3, *olive*) e o baixo-ventre é amarelo-claro, (5Y 8/6, *yellow*); o tarso é fuligem, (GLE Y1 3/N, *very dark gray*). A maxila é preta (2.5Y 2.5/1, *black*) e a mandíbula esbranquiçada.

Com relação às partes moles, as íris de todos os indivíduos analisados eram marrons, (10R 3/8, *dark red*), enquanto que a língua e assoalho da boca tinham dois padrões distintos. Um laranja, (aproximadamente 10YR 8/8, *yellow*) e outro róseo (7.5R 8/4, *light pink*), não relacionados com o sexo (Anexo 2). Dos 41 indivíduos avaliados, 73,17% possuíram língua laranja e 26,82% língua rósea.



Figura 2. Indivíduos de *Lathrotriccus euleri* de assoalho da boca e língua laranja (acima) e assoalho da boca e língua rósea (abaixo) em posição ventral, depositados na coleção ornitológica do MZUFV, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.



Figura 3. Indivíduos de *Lathrotriccus euleri* de assoalho da boca e língua laranja (acima) e assoalho da boca e língua rósea (abaixo) em posição dorsal, depositados na coleção ornitológica do MZUFV, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

Análises Morfométricas. Não foram encontradas diferenças significativas para as medições realizadas entre os indivíduos de assoalho da boca e língua laranja e os de língua rósea. Apenas o caráter “comprimento de tarso” diferenciou marginalmente os dois grupos (Tabela 3).

Tabela 3. Dados morfométricos dos espécimes de *Lathrotriccus euleri* e comparações estatísticas entre padrões de língua. Medidas em centímetros.

Variável	Língua Laranja (n = 28)		Língua Rósea (n = 10)		F	Teste-t P
	Média	SD	Média	SD		
Asa	6,267500	0,251670	6,347000	0,164590	2,338057	0,183248
Cauda	5,909286	0,356609	6,069000	0,320813	1,235605	0,776271
Tarso	1,390357	0,163741	1,320000	0,093333	3,077791	0,081510
Cúlmen	1,533214	0,086155	1,581000	0,050431	2,918461	0,096050

A Análise de Componentes Principais corroborou os resultados obtidos pelo teste-t ao mostrar grande sobreposição entre os dois tipos morfológicos (Figura 4). O primeiro Componente Principal (CP 1) correspondeu a 72,83% do total da variação e o segundo Componente Principal (CP 2) a 12,10%, explicando um total de 84,93% de variação dentro da amostra.

Os caracteres “cauda” e “asa” foram as variáveis que mais contribuíram para a formação dos componentes principais CP 1 e CP 2 (Tabela 4).

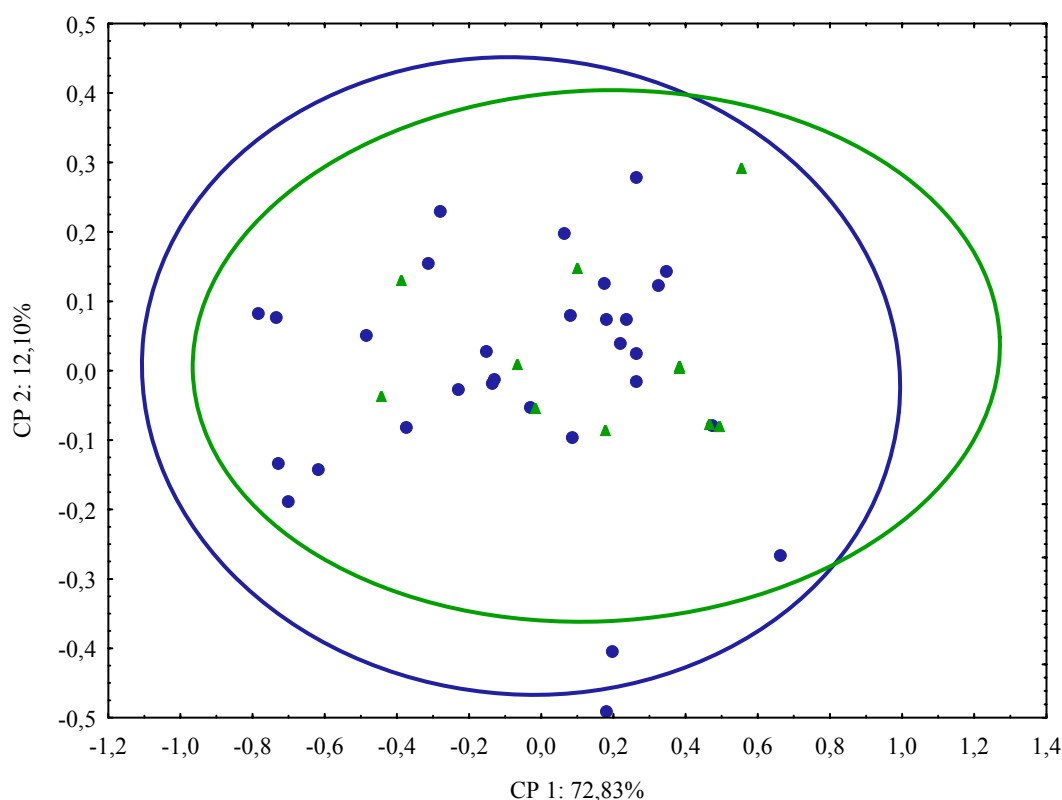


Figura 4. Análise de Componentes Principais (CP1 e CP2) das variáveis morfológicas dos espécimes de *Lathrotriccus euleri* provenientes das coleções ornitológicas DZ-UFGM, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, MZUFV, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais e de indivíduos capturados em rede de neblina, no município de Viçosa. Triângulos verdes representam indivíduos de língua e assoalho da boca rósea. Círculos azuis representam indivíduos de língua e assoalho da boca laranja.

Tabela 4. Contribuição das variáveis na formação dos componentes principais.

Variável	CP 1	CP 2	CP 3	CP 4	CP 5
Asa	0,20	0,13	-0,03	0,00	0,00
Cauda	0,33	-0,08	0,02	0,00	0,00
Tarso	0,00	-0,04	-0,14	0,01	0,01
Cúlmen	-0,01	0,01	0,01	0,08	-0,01

4.2) Vocalizações

Foram obtidas gravações de 48 indivíduos de *Lathrotriccus euleri*. Desses registros de vozes gravadas, apenas 13 tiveram também o registro da cor do assoalho da boca e da língua. Porém, dentre as vocalizações desses 13 indivíduos havia vários tipos diferentes de sons que compõem o repertório vocal da espécie, não sendo possível comparar estatisticamente cada um desses sons entre os dois padrões de cor de língua.

Avaliando o repertório vocal de *L. euleri* encontrado em estudo anterior (Moraes 2007) e as gravações realizadas no presente trabalho, pôde-se observar que os indivíduos tanto de língua e assoalho da boca laranja quanto de língua e assoalho da boca rósea emitem todos os tipos de vocalização registrados, não sendo nenhuma delas específica ou diagnóstica de um dado padrão de coloração da língua e do assoalho da boca.

Auditiva e visualmente, as vocalizações de *L. euleri* são bastante semelhantes (Figura 5). Para o chamado de três notas, não houve distinção entre os dois tipos morfológicos de *L. euleri*, para nenhuma variável avaliada (Tabela 5).

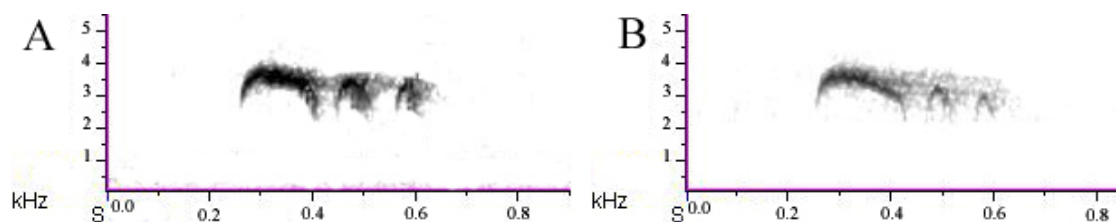


Figura 5. Sonogramas dos chamados de 3 notas, de indivíduos de *Lathrotriccus euleri*, Viçosa, Minas Gerais. (A) representa a voz de 1 indivíduo de língua e assoalho da boca rósea; (B) representa a voz de 1 indivíduo de língua e assoalho da boca laranja.

Tabela 5. Análise descritiva das medidas de frequência (Hz) e tempo (s) para chamados de 3 notas dos 2 padrões fenotípicos de *Lathrotriccus euleri*, com comparação estatística entre os padrões.

Variável	Língua Laranja (n=3)		Língua rósea (n=3)		Teste-t	
	Média	SD	Média	SD	F	P
Frequência menor	2187,678	235,2923	2130,089	379,6264	2,60314	0,555072
Frequência maior	3923,611	51,2384	3910,133	306,4441	35,76937	0,054393
Tempo total	0,391	0,0591	0,556	0,2138	13,10082	0,141836
Tempo-nota1	0,152	0,0382	0,225	0,0752	3,88128	0,409728
Tempo-nota2	0,051	0,0102	0,100	0,0503	24,32468	0,078974
Tempo-nota3	0,056	0,0297	0,063	0,0186	2,53273	0,566135

4.3) Análises Moleculares

Dos 77 *primers* testados, 18 apresentaram bandas polimórficas nítidas e foram, portanto, utilizados para as análises (Tabela 6). Dentre eles, os *primers* OPA-10 e OPY-10 foram os mais efetivos em detectar polimorfismos. Na Figura 6, encontram-se padrões típicos dos produtos de PCR, obtidos com o uso desses *primers* em *Lathrotriccus euleri*.

Tabela 6. Nomes, sequências e número de bandas polimórficas obtidas com 18 *primers* selecionados para as análises de RAPD- PCR, testados nas variantes de cor de língua dos 2 tipos morfológicos de *Lathrotriccus euleri*.

<i>Primer</i>	Sequência de Nucleotídeos (5' → 3')	Número de bandas polimórficas
OPA-10	GTGATCGCAG	13
OPAE-01	TGAGGGCCGT	5
OPC-10	TGTCTGGGTG	5

<i>Primer</i>	Sequência de Nucleotídeos (5' → 3')	Número de bandas polimórficas
OPC-11	AAAGCTGCGG	2
OPD-07	TTGGCACGGG	7
OPD-12	CACCGTATCC	7
OPD-16	AGGGCGTAAG	4
OPE-04	GTGACATGCC	10
OPE-14	TGCGGCTGAG	9
OPE-15	ACGCACAACC	5
OPE-16	GGTGACTGTG	5
OPF-04	GGTGATCAGG	5
OPP-12	AAGGGCGAGT	8
OPQ-04	AGTGCGCTGA	9
OPY-02	CATCGCCGCA	12
OPY-10	CAAACGTGGG	10
OPZ-10	CCGACAAACC	5
OPZ-13	GACTAAGCCC	4

Das 130 bandas computadas, 106 apresentaram polimorfismo, representando 81,54% do total.

De acordo com o índice de similaridade de Jaccard, os indivíduos MZUFV 1787 e MZUFV 1793, ambos de Viçosa, apresentaram a menor porcentagem de diferenciação genética (33%) (Tabela 6). Os par de indivíduos que apresentou a maior porcentagem de diferenciação genética foram MZUFV 1657, de Santa Maria do Salto, e MZUFV 1793, de Viçosa, com 84% (Tabela 7).

As análises de DNA realizadas pela técnica de RAPD-PCR não permitiram a separação dos dois tipos morfológicos de *L. euleri* em dois grupos. Apenas um

indivíduo, de Santa Maria do Salto, que tinha a língua e o assoalho da boca laranja, apresentou padrão molecular divergente dos demais (Figura 6).

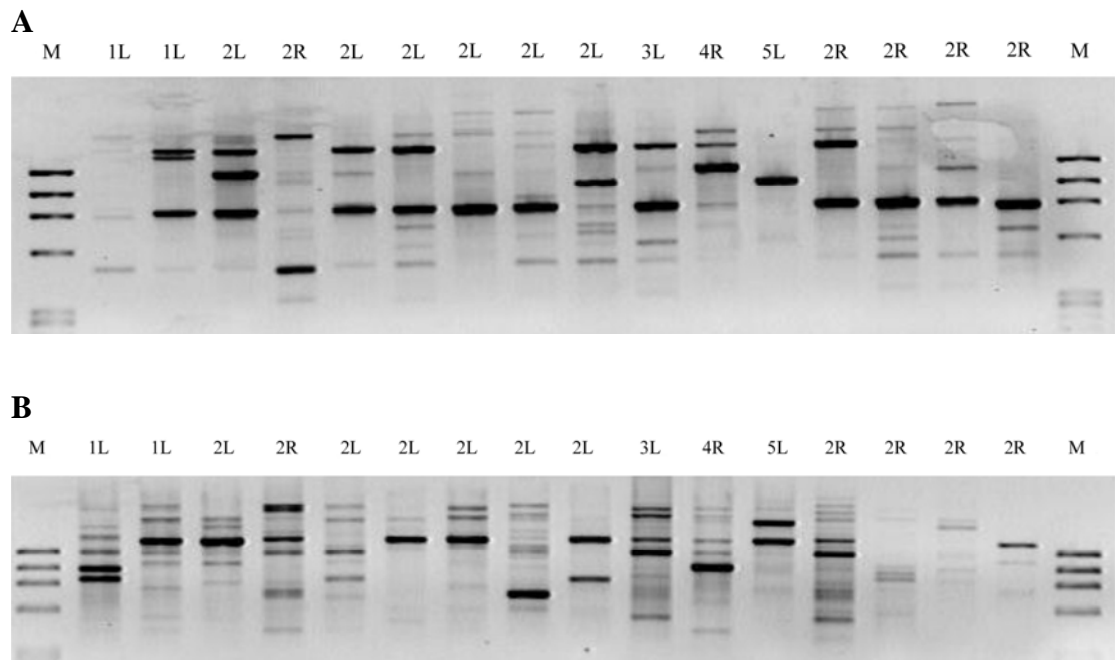


Figura 6. Perfis de amplificação das 16 amostras de *Lathrotriccus euleri* com os primers OPA-10 (A) e OPY10 (B). **M** corresponde ao marcador ϕ X clivado com HaeIII. Os números indicam as localidades de coleta: 1 = Paula Cândido, 2 = Viçosa, 3 = Ferros, 4 = Ladainha e 5 = Santa Maria do Salto. As letras correspondem à cor da língua e do assoalho da boca dos indivíduos: L = laranja e R = rósea.

Tabela 7. Medidas de dissimilaridade expressas pelo complemento aritmético do índice de similaridade de Jaccard. Os indivíduos estão identificados pelos números de tomo da coleção MZUFV, Viçosa, Minas Gerais.

Localidade N° tomo	1785	1788	1789	1793	1787	1795	1796	1797	1789	1800	1801	1802	1798	1791	1752	1657
Paula Cândido – 1785	0,00															
Paula Cândido – 1788	0,49	0,00														
Viçosa – 1789	0,43	0,44	0,00													
Viçosa – 1793	0,45	0,43	0,41	0,00												
Viçosa – 1787	0,38	0,39	0,41	0,33	0,00											
Viçosa – 1795	0,49	0,51	0,51	0,41	0,44	0,00										
Viçosa – 1796	0,51	0,57	0,58	0,53	0,51	0,40	0,00									
Viçosa – 1797	0,43	0,35	0,47	0,43	0,42	0,46	0,42	0,00								
Viçosa – 1789	0,48	0,45	0,47	0,48	0,39	0,48	0,58	0,44	0,00							
Viçosa – 1800	0,47	0,45	0,44	0,40	0,39	0,43	0,50	0,40	0,48	0,00						
Viçosa – 1801	0,39	0,50	0,49	0,51	0,47	0,45	0,48	0,46	0,51	0,50	0,00					
Viçosa – 1802	0,51	0,54	0,50	0,45	0,44	0,45	0,45	0,44	0,47	0,43	0,44	0,00				
Viçosa – 1798	0,52	0,51	0,53	0,50	0,53	0,54	0,55	0,49	0,45	0,53	0,43	0,49	0,00			
Ferros – 1791	0,58	0,48	0,52	0,48	0,50	0,56	0,55	0,43	0,53	0,50	0,52	0,42	0,46	0,00		
Ladainha – 1752	0,41	0,46	0,43	0,39	0,37	0,44	0,55	0,38	0,49	0,38	0,41	0,44	0,55	0,50	0,00	
Santa Maria do Salto – 1657	0,82	0,82	0,79	0,84	0,82	0,82	0,83	0,80	0,81	0,80	0,82	0,83	0,79	0,79	0,79	0,00

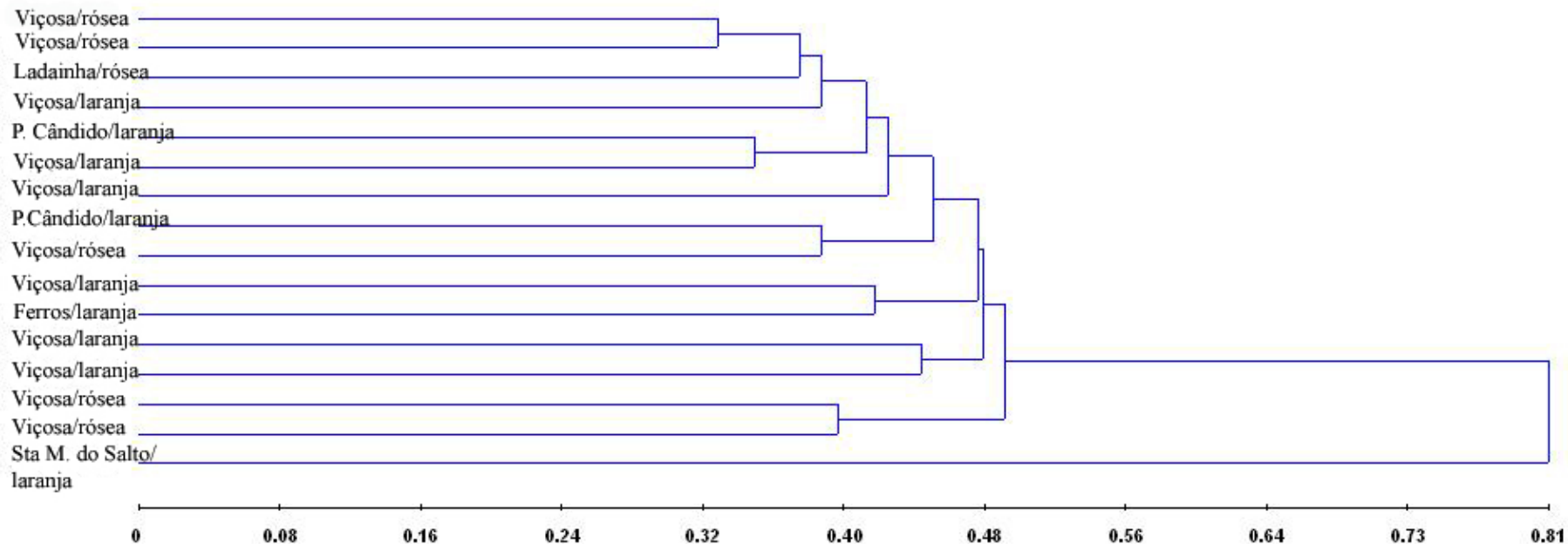


Figura 7. Dendrograma da análise de agrupamento pelo método hierárquico UPGMA, obtido com base na matriz de dissimilaridade determinado pelo complemento aritmético do índice de similaridade de Jaccard. Os valores da escala representam a porcentagem de diferenciação genética. O indivíduo MZUFV 1657, oriundo de Santa Maria do Salto, apresentou-se isolado dos demais indivíduos. Estão representados localidade e coloração da língua e do assoalho da boca de cada indivíduo.

5) DISCUSSÃO

Morfologia. Dos indivíduos analisados, não houve variações na plumagem consistentes com as cores da língua rósea e laranja.

Um único indivíduo de *L. euleri* (MZUFV 1657), coletado no extremo nordeste de Minas Gerais, apresentou padrão de coloração da plumagem distinto dos demais, sendo totalmente ferrugíneo no dorso. Apesar de tratar-se de um jovem (informação presente na etiqueta de campo), o grau de divergência fenotípica também foi corroborado pelos resultados da análise molecular na qual o indivíduo em questão apareceu isolado dos demais, podendo representar uma outra subespécie. Porém, Zimmer (1939) relata que indivíduos jovens de *L. e. lawrencei* e *L. e. bolivianus* (que possuem o dorso esverdeado quando adultos) possuem esse padrão de coloração no dorso mais ferrugíneo, tais como os adultos de *L. e. euleri*. Segundo esse mesmo autor, a plumagem juvenil de *L. e. lawrencei* e *L. e. bolivianus* são muito similares àquelas de *L. e. euleri* e *L. e. argentinus*, podendo a primeira plumagem anual de todas essas subespécies lembrar a de *Lathrotriccus e. euleri*. (LEO) Isto implicaria em complicações na identificação, principalmente pelo fato de que *L. e. euleri* e *L. e. argentinus* migram para áreas de reprodução de *L. e. bolivianus* (Zimmer 1939). Pinto (1944) contraria as afirmações de Zimmer ao identificar indivíduos do interior da Bahia como *L. e. argentinus*. Aparentemente, esta subespécie ocorre no Brasil apenas nos períodos migratórios, nos quais se deslocam para a região amazônica (Ridgely and Tudor 1994, Fitzpatrick 2004).

Nas espécies de *Empidonax* norte-americanas não existe documentação de tamanha variabilidade na coloração e a identificação das espécies em campo é difícil ou impossível com base apenas na coloração. Assim, a distinção se dá por exclusão

das áreas de distribuição, pela vocalização, pela nidificação ou pelo hábitat (Kroodsma 1984, Bull & Farrand 1994).

Vocalização. A não associação dos tipos de vozes registrados com os indivíduos de língua laranja ou rósea, somada à ausência de diferenças estatísticas entre vocalizações de 3 notas dos dois padrões de *L. euleri*, mostram que a espécie possui um elevado repertório vocal, acrescentando informação a Sick (1997) que caracterizou repertório vocal da espécie como composto por um canto de 3 notas e um chamado de 2 notas.

Além de existirem diversos tipos de vocalização compondo o repertório vocal do enferrujado, existem pequenas diferenças entre esses tipos de vozes, tanto nos indivíduos de língua rósea quanto nos de língua laranja, que, embora não testados estatisticamente, são visíveis ao serem analisados no sonograma.

A variação vocal é bastante documentada e esclarecida em Passeriformes Oscines (Mennill & Vehrencamp 2005, Schook *et al.* 2008) mas estudos recentes têm demonstrado variação em Suboscines, inclusive para várias espécies do gênero *Empidonax*, um grupo estreitamente aparentado a *L. euleri*. Lovell & Lein (2004, 2005) observaram diferenças estatísticas entre vozes de *Empidonax alnorum*; Wiley (2005) mostrou diferenças vocais em *E. virescens*; Lein (2008) as observou em *E. fulvifrons*, enquanto que Fernández-Juricic *et al.* (2009) mostraram existir níveis de individualidade vocal em *E. trailli extimus*.

Em estudos anteriores com a mesma espécie, a variabilidade das vozes foi atribuída ao caráter inato (que aparentemente predomina entre os Suboscines) e não ao aprendizado (Kroodsma 1984, Sedwick 2001). Com os avanços do conhecimento sobre vocalização, surgiram outras explicações para essas variações individuais de

voz, como a variabilidade genética dos cantos inatos, diferenças morfológicas na anatomia vocal e discriminação intensificada de vizinhos (Fernández-Juricic *et al.* 2009). Nesse último caso, a vocalização pode facilitar o reconhecimento de vizinhos mais próximos, evitando que o indivíduo despenda energia em conflitos desnecessários com seus familiares (Fernández-Juricic *et al.* 2009). Somente com o estudo de maior número de vocalizações e o entendimento do contexto em que são emitidas será possível a compreensão da variação nas características vocais de *L. euleri*.

Polimorfismo. Os resultados das análises morfométricas, de coloração e de vocalização associadas aos padrões moleculares encontrados mostram que há polimorfismo na coloração da língua entre os indivíduos de *Lathrotriccus euleri*. Apesar de não ter conseguido anilhar e acompanhar indivíduos jovens de *L. euleri* para verificar se essas diferenças de coloração são ontogenéticas, foram coletados indivíduos adultos, com gônadas desenvolvidas, tanto de língua laranja quanto de língua rósea. Belton (1985) também indica que, tanto jovens quanto machos adultos, apresentam coloração da boca laranja, baseado em indivíduos por ele coletados.

Uma espécie é considerada polimórfica quando indivíduos de uma população, de mesma idade e mesmo sexo, apresentam uma das possíveis variantes, que é hereditária e não alterada pelo ambiente (Buckley 1987 *apud* Roulin 2004).

Embora o polimorfismo seja um fenômeno raro entre aves, envolvendo 3,5% das espécies, ocorre entre 61% das ordens, particularmente em Strigiformes (33%), Cuculiformes (12%), Galliformes (9,5%) e Ciconiiformes (9%) (Galeotti *et al.* 2003). Dentre os Passeriformes, há relato de polimorfismo em apenas 0,9% das espécies e, juntamente com Piciformes (1,1%) e Psittaciformes (0,6%), são as ordens

que apresentam o menor número de espécies com esse tipo de variação (Galeotti *et al.* 2003).

Os estudos de polimorfismo de coloração em aves existentes até então são principalmente da plumagem, com poucos relatos sobre a coloração do bico. Sobre este último, Grant *et al.* (1979), ao estudarem a nidificação de seis espécies dos tentilhões-de-Darwin, *Geospiza* spp. e do rouxinol, *Certhidea olivacea*, encontraram polimorfismo na coloração nos ninhegos. Duas categorias quanto à cor do bico desses indivíduos foram identificadas, tanto na mandíbula quanto na maxila dos ninhegos de todas as 7 espécies: uma rosa e outra amarela.

O polimorfismo na plumagem é o tipo mais comum de polimorfismo entre aves e há várias hipóteses propostas para explicar sua manutenção, mecanismos, funções e consequências adaptativas. Entre as hipóteses bem estudadas estão a seleção apostática (seleção dependente de frequência), acasalamentos não-aleatórios e seleção disruptiva (Galeotti *et al.* 2003, Roulin 2004).

A seleção apostática (Clarke 1962, 1969) foi proposta para explicar o polimorfismo existente, principalmente, em aves predadoras como Falconiformes e Charadriiformes (Galeotti *et al.* 2003). De acordo com essa hipótese, numa população é vantajoso para o morfo de uma ave predadora ser diferente da maioria dos demais indivíduos do outro morfo, tal que aquele será menos familiar para suas presas potenciais (Clarke 1962, 1969). Entretanto, Preston (1980), ao estudar o gavião-da-cauda-vermelha, *Buteo jamaicensis*, contesta essa hipótese, argumentando não haver nenhuma evidência de que uma presa possa desenvolver uma imagem do morfo mais comum do predador e, assim, evitá-lo e, ainda, que seria uma mal-adaptação o fato da presa focar apenas na plumagem do predador e não fazer nenhuma associação, por exemplo, à sua silhueta. Corroborando os

questionamentos de Preston (1980), Galeotti *et al.* (2003) enfatizam que em Strigiformes, ordem em que há o maior registro de espécies polimórficas, a grande maioria delas é noturna, mostrando um contexto em que a coloração do predador pouco influenciaria no sucesso de captura de presas.

Para a hipótese do acasalamento não-aleatório, o polimorfismo é utilizado pelos indivíduos para comunicação intraespecífica Galeotti *et al.* (2003) e a sua manutenção pode resultar de preferências na escolha do parceiro, através de seleção sexual ou ainda de acasalamento de escolha negativa. Na seleção sexual, o polimorfismo pode surgir e se manter pela preferência da fêmea por morfos conspícuos e pela taxa de predação menor sobre os morfos crípticos. A preferência pelos morfos mais coloridos é balanceada pelos elevados riscos de predação (Endler 1980) ou pelos altos custos energéticos necessários para a produção e manutenção da coloração exuberante. No acasalamento de escolha negativa, o polimorfismo resulta também da preferência, porém, em ambos os sexos, de se acasalarem com parceiros de morfos distintos de si mesmos (Lowtther *apud* Galeotti *et al.* 2003, Schielzeth 2008). Um exemplo bem estudado é o do tico-tico-de-garganta-branca, *Zonotrichia albicollis*, em que 95% dos casais estudados eram formados por indivíduos de morfos distintos (Lank 2002). Apenas um casal de *L. euleri* pôde ser acompanhado durante o período reprodutivo e, embora macho e fêmea possuíssem línguas laranjas, não foi possível fazer referência ao tipo de acasalamento, podendo inclusive não haver nenhum tipo de escolha na formação do casal.

A hipótese para a seleção disruptiva tem como premissas evolutivas a heterogeneidade do tempo e do espaço, tal como diferenças no clima e no hábitat, como pressões seletivas responsáveis por produzir polimorfismo na coloração de espécies com nichos ecológicos amplos e, tanto efeitos visuais quanto fisiológicos

podem estar relacionados (Galeotti *et al.* 2003). Segundo o mesmo autor, entre os efeitos visuais, a camuflagem pode representar a principal função do polimorfismo. Plumagens de coloração críptica podem evitar a detecção por parte dos predadores (Baker & Parker 1979) e também reduzir a chance de uma ave ser vista pela sua presa (Götmark 1987). Esse mesmo autor, ao estudar gaivotas, sugere que os morfos brancos predominam em águas claras e rasas em dias ensolarados, de habitats abertos, enquanto que morfos escuros poderiam predominar em águas turvas de habitats fechados. Este padrão estaria relacionado com a capacidade dos dois morfos de se camuflarem nos respectivos ambientes em diferentes condições de luminosidade (Götmark 1987). Green & Leberg (2005), ao estudarem o efeito da plumagem das garças *Egretta thula* e *Egretta caerulea* na predação de lagostim, *Procambarus* spp. e do peixe *Gambusia affinis*, demonstram que os efeitos de luminosidade também afetam o sucesso de captura de presas em espécies próximas, porém de coloração distinta. No mesmo estudo, a coloração escura, como a de *Egretta caerulea*, se torna desvantajosa para o forrageamento em áreas abertas.

O balanço entre as colorações clara e escura pode ser determinado pelos benefícios das colorações conspícuas ou crípticas dos predadores ou presas, em uma variedade de habitats ou nas condições de um habitat, entre os quais os níveis de luminosidade parecem desempenhar a principal regra (Galeotti *et al.* 2003). Esses padrões de colorações disruptivas parecem ser um importante fator para explicar a manutenção do polimorfismo em aves, favorecendo o morfo de coloração mais críptica da espécie, dependendo das condições de luminosidade em que esta vive (Galeotti *et al.* 2003). A variação interespecífica na coloração da plumagem entre aves também parece ser uma resposta adaptativa à variação nas condições de luminosidade do ambiente, corroborando essa ideia (McNaught & Owens 2002)

Essa hipótese é uma possível explicação para o polimorfismo observado em *L. euleri*. Embora Aguilar *et al.* (1999) e Sick (1997) indiquem que o enferrujado habita preferencialmente o sub-bosque de matas primárias e secundárias, neste estudo observou-se que os indivíduos variam a altura de forrageamento, chegando a ocupar poleiros mais altos, entre 8 e 10 metros. A presença desses indivíduos em estratos de luminosidade variada pode favorecer a existência daqueles de língua amarela (mais conspícuos) em alturas mais elevadas, onde a intensidade luminosa é maior, e favorecer aqueles de língua rósea (mais crípticos) em locais onde a intensidade luminosa é reduzida. Embora não tenha sido verificado essa variação de distribuição vertical dos indivíduos no ambiente, supõe-se que, dessa forma, eles estariam mais camuflados.

O tentilhão da Austrália, *Erythrura gouldiae* (Estrildidae) apresenta polimorfismo na coloração da cabeça, podendo haver as cores vermelha, preta e amarela, numa mesma população. A cor vermelha e amarela é determinada por um gene autossômico, em que os alelos dominante e recessivo expressam o vermelho e o amarelo, respectivamente (Brush & Seifried 1968). Essas duas cores podem ser mascaradas pela coloração preta, determinada por um gene ligado ao sexo na condição recessiva (Brush & Seifried 1968). Prike & Griffith (2006) estudaram a importância do polimorfismo genético de cor na determinação da hierarquia de dominância entre os machos dessa espécie. Esses autores sugeriram que essa dominância, relacionada a diferenças comportamentais entre os três morfos (com influência no valor adaptativo de cada um deles) contribui na formação de padrões seletivos complexos e, assim, propicia a manutenção desses três fenótipos em frequências relativamente estáveis na população (Prike & Griffith 2006). Entre os indivíduos de *L. euleri* coletados, o morfo de coloração do bico laranja foi o mais

frequente. Possivelmente, esse morfo responde mais fortemente à chama eletrônica (utilizada para atrair os indivíduos) e assume posição dominante na presença do morfo de língua rósea. Neste cenário, o morfo de língua rósea, pode ser subornidado, e aparentaria ser o menos frequente na população, assim como ocorre para *Erythrura gouldiae*, em que o morfo de cabeça amarela é subordinado aos dois outros e bastante raro na população.

Como observado nos estudos acima, o polimorfismo pode provocar efeitos comportamentais se um novo morfo alterar o sucesso de forrageamento, estratégias presa-predador ou interações sociais de uma espécie. Porém, em muitos dos casos, estudos empíricos são realizados para sustentar ou rejeitar hipóteses ecológicas, não envolvendo a interação das condições ecológicas com as bases genéticas e os processos seletivos que levam à manutenção dessa variação (Roulin 2004).

Além dessas especulações, muitos pesquisadores tem dado preferência ao estudo do controle genético do polimorfismo na coloração da plumagem das aves (Roulin 2004). Theron *et al.* (2001) descobriram que uma mutação pontual no gene do receptor da melanocortina-1 é responsável pela coloração quase totalmente preta de cambacicas, *Coereba flaveola*, enquanto que os não mutantes apresentam ventre amarelo e faixa supra-ocular branca. Comparado com o morfo preto, o de coloração amarela mostra um número excessivo de substituições sinônimas (que não alteram a produção de aminoácidos) (Theron *et al.* 2001). Com isso, é relativamente mais fácil surgir um morfo preto numa população em que todos os indivíduos são amarelos, do que surgir um morfo amarelo onde todos os indivíduos são pretos (Roulin 2004). Destaca-se, então, que a evolução de um polimorfismo de coloração não só depende do seu valor seletivo ou de processos estocásticos, mas também de restrições moleculares na produção dos pigmentos necessários (Roulin 2004). Assim como em

Coereba flaveola, o polimorfismo na coloração do bico em *L. euleri* pode ter surgido através de simples mutação e se tornado estável na população.

Na literatura pesquisada, não foram encontradas referências sobre a existência de polimorfismo de cor em língua de aves. Estudos direcionados a essa questão tornam-se necessários para esclarecer quais os mecanismos ecológicos, evolutivos e moleculares que norteiam o polimorfismo em *Lathrotriccus euleri*.

Técnica de RAPD. Em plantas, Rieseberg (1996) aplicou esse método para estudar a homologia entre 3 espécies de girassol. Wolff & Morgan-Richards (1998) o utilizaram para um estudo intrapopulacional da tanchagem, *Plantago major*, obtendo resultados positivos na detecção de polimorfismo e na diferenciação de indivíduos de duas subespécies vindas da Holanda e da Escócia.

Dentre vertebrados, vários estudos envolvendo a metodologia de RAPD-PCR foram desenvolvidos. Dergam *et al.* (2002), estudaram as relações filogenéticas e o grau de parentesco entre as populações de traíras, *Hoplias malabaricus*, na bacia do rio Doce, Brasil. Kimberling *et al.* (1996) pesquisaram a distância genética entre populações da rã-leopardo, *Rana pipiens*, nos Estados Unidos e Dutra *et al.* (2008) estudaram populações de jararaca-do-cerrado, *Bothrops moojeni*, no Brasil. Kulikova *et al.* (2002) estudaram uma população local do faisão-comum, *Phasianus colchicus*, na Ásia, enquanto que Spiridonova *et al.* (2003) avaliaram a diversidade genética de populações dos corvos *Corvus macrorhynchos* e *Corvus corone*. Reyes *et al.* (2009) estudaram o momotídeo, *Momotus mexicanus*, no México. Almeida *et al.* (2000) estudaram populações do rato semi-aquático, *Nectomys squamipes*. Estudos com aplicações conservacionistas também foram propostos, a partir da técnica de RAPD, para a ema, *Rhea americana*, na Argentina (Bouzar 2001) e para

tucanos, *Ramphastos toco*, em cativeiro, no Brasil (Viala *et al.* 2006), bem como estudos baseados em melhoramento genético realizados com o camarão-branco, *Litopenaeus vannamei*, no Brasil (Freitas *et al.* 2007).

Perfis de amplificação de *primers* específicos, como os do RAPD-PCR, são altamente dependentes das condições específicas da reação e os padrões de bandeamento podem, portanto, variar consideravelmente devido a inconsistências em alguns dos parâmetros da reação (Ellsworth *et al.* 1993). Bandas artefactuais, resultantes de trabalhos imprecisos (que levam à não repetitividade da técnica), representam um problema potencial em estudos de variação genética nas populações naturais e devem ser discriminados do polimorfismo verdadeiro para que as aplicações do RAPD possam ser precisas e confiáveis (Ellsworth *et al.* 1993). Então, a presença de bandas indesejadas, no presente estudo, poderiam ter afetado o arranjo final dos indivíduos de *L. euleri*, ao agrupá-los de maneira inadequada. Mesmo com essas limitações parece haver um consenso de que o uso da técnica de RAPD é interessante para a realização de estudos prévios (Avisé 2004), e uma cuidadosa atenção aos detalhes reduzem bastante a possibilidade de se obter bandas de baixa repetitividade (Nei & Kumar 2000). Porém, a falta de divergência consistente entre os 2 morfos neste estudo sugere que todos os indivíduos analisados pertencem à mesma espécie, mesmo o espécime de Santa Maria do Salto.

6) CONCLUSÃO

O enferrujado apresenta dois morfos para a cor da língua, um róseo e outro laranja, não relacionados com o sexo. Dentre a bibliografia pesquisada, nenhum

registro sobre a variação na coloração da língua foi encontrado, sendo este o primeiro relato de polimorfismo dessa natureza, entre as aves.

O enferrujado possui um amplo repertório vocal. Somente com o estudo de um maior número de vocalizações e o entendimento do contexto em que são emitidas, a variação nas características vocais poderá ser melhor compreendida em *L. euleri*.

É consenso de que o uso da técnica de RAPD é interessante para a realização de estudos prévios, porém, devido à sua baixa repetitividade e caráter dominante, o uso de técnicas mais apuradas se faz necessário para a obtenção de resultados complementares. Todos os caracteres analisados sugerem que a variação da coloração do bico encontrada em *L. euleri* corresponde à uma variação intrapopulacional. Faltam ainda estudos complementares para esclarecer quais os mecanismos ecológicos, evolutivos e moleculares norteiam este tipo de polimorfismo.

7) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar, T. M., Leite, L. O. e Marini, M. Â. 1999. Biologia da nidificação de *Lathrotriccus euleri* (Cabanis, 1968) [sic] em fragmentos de mata de Minas Gerais. *Ararajuba* 7: 125-133.
- Allen, J. A. 1889. Descriptions of new species of South American birds with remarks on various other little known species. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 2: 137-151.
- Almeida, F. C., Moreira, M. A. M., Bonvicino, C, R. & Cerqueira, R. 2000. RAPD analysis of *Nectomys squamipes* (Rodentia, Sigmodontinae) populations. *Genetics and Molecular Biology* 23: 793-797.
- Assis, C. P, Raposo, M. A., Stopiglia, R. & Parrini, R. 2007. Validation of *Thamnophilus capistratus* Lesson, 1840 (Passeriformes: Thamnophilidae). *Auk* 124: 665-676.
- Avise, J. C. 2004. *Molecular markers, natural history, and evolution*. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Massachusetts. USA
- Baker, R. R. & Parker, G, A. 1979. The evolution of bird coloration. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 287: 63-130.
- Belton, W. 1985. Birds of Rio Grande do Sul, Brazil, Part 2. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 180:1-242.
- BirdLife International. 2004. *Threatened birds of the world*. Lynx Edicions. Barcelona.
- Black W. C. IV. 1993. PCR with arbitrary primers: approach with care. *Insect Molecular Biology* 2: 1-6.

- Boucart, J. L. 2001. The population genetic structure of the Great Rhea (*Rhea Americana*) in an agricultural landscape. *Biological Conservation* 99: 277-284.
- Brush, A. H. & Seifried, H. 1968. Pigmentation and feather structure in genetic variants of the Gouldian finch, *Poephila gouldiae*. *Auk* 85: 416-430.
- Boyce, T. M., M. E. Zwick, & C. F. Aquadro. 1989. Mitochondrial DNA in the bark weevils: size, structure and heteroplasmy. *Genetics* 123: 825-836.
- Bull, J. e Farrand Jr., J. 1999. *National Audubon Society field guide to North American birds*. National Audubon Society. New York. USA.
- Cabanis, J. L. 1868. Neue Arten der südamerikanischen Gattung *Empidonax* im Berliner Museum. *Journal für Ornithologie* 16: 194-196.
- Caetano-Anollés, G. 1991. Plant genetic control of nodulation. *Annual Review of Microbiology* 45: 345-382.
- Caetano-Anollés, G. 1993. Amplifying DNA with arbitrary oligonucleotide primers. *PCR Methods and Applications* 3: 85-94.
- Charif, R. A., Clark, C. W. & Frisrup, K. M. 2004. *Raven 1.2 User's Manual*. Cornell Laboratory of Ornithology, Ithaca. USA.
- Chesser, R. T. 2004. Molecular Systematics of New World suboscine birds. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 32: 11-24.
- Cicero, C. & Benowitz-Fredericks, Z. M. 2000. Song types and variation in insular populations of lincoln's sparrow (*Melospiza lincolni*), and comparisons with other *Melospiza*. *Auk* 117: 52-64.
- Cicero, C. & Johnson, N. K. 2002. Phylogeny and character evolution in the *Empidonax* group of tyrant flycatchers (Aves: Tyrannidae): A Test of W. E.

- Lanyon's hypothesis using mtDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 22: 289-302.
- CBRO. Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos. 2008. *Listas das aves do Brasil. Versão 5/10/2008*. Disponível em <<http://www.cbro.org.br>>. Acesso em: 10/08/2009.
- Clark, A. G. & Lanigan, C. M. S. 1993. Prospects for estimating nucleotide divergence with RAPDs. *Molecular Biology and Evolution*. 10: 1096-1111.
- Clarke, B. 1962. Natural selection in mixed populations of two polymorphic snails. *Heredity* 17: 319-345.
- Clarke, B. 1969. The evidence for apostatic selection. *Heredity* 24: 347-352.
- Coopmans, P. & Krabbe, N. 2000. A new species of flycatcher (Tyrannidae: *Myiopagis*) from eastern Ecuador and eastern Peru. *Wilson Bulletin* 112: 305-312.
- Cruz, C.D. 2008. *Programa GENES - Diversidade Genética - aplicativo computacional em genética e estatística*. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa. Brasil.
- Dergam, J. A., Paiva, S. R., Schaeffer, C. E., Godinho, A. L. & Vieira, F. 2002. Phylogeography and RAPD-PCR variation in *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Pisces, Teleostei) in southeastern Brazil. *Genetics and Molecular Biology* 25: 379-387.
- Dodgson, J. B., Cheng, H. H. & Okimoto, R. 1996. DNA marker technology: A revolution in animal genetics. *Poultry Science* 76: 1108-1114.
- Dutra, N. C. L., Telles, M. P. C. & Silva Júnior, N. J. 2008. Genetic diversity in populations of the viper *Bothrops moojeni* Hoge, 1966 in Central Brazil using RAPD markers. *Genetics and Molecular Research* 7: 603-613.

- Edwards, E. P. 1972. *A field guide to the birds of Mexico*. USA.
- Ellsworth, D. L., Rittenhouse, K. D. & Honeycutt, R. L. 1993. Artifactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. *Biotechniques* 14: 214-217.
- Endler, J. A. 1980. Natural selection on color patterns in *Poecilia reticulata*. *Evolution* 34: 76-91.
- Ericson, P. G. P., Irestedt, M. & Johansson, U. S. 2003. Evolution biogeography and patterns of diversification in passerine birds. *Journal of Avian Biology* 34: 3-15.
- Fernández-Juricic, E., Del Nevo, A. & Poston, R. 2009. Identification of individual and population-level variation in vocalizations of the endangered Southwestern Willow Flycatcher (*Empidonax traillii extimus*). *Auk* 126: 89-99.
- Ferreira, M. E. & Grattapaglia, D. 1995. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. Embrapa/Cenargen. Brasília. Brasil.
- Fitzpatrick, J. W. 2004. Family Tyrannidae (tyrant flycatchers). In: del Hoyo, J, Elliott, A., Christie, D and Banks, R. (eds) *Handbook of the birds of the world, volume 9: Cotingas to Pipits and Wagtails*. Lynx Edicions e BirdLife International. Barcelona. Spain.
- Freitas, P. D., Calgaro, M, R. & Galetti Jr, P.M. 2007. Genetic diversity within and between broodstocks of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) (Decapoda, Penaeidae) and its implication for the gene pool conservation. *Brazilian Journal of Biology* 67: 939-943.
- Fritsch, P. & Rieseberg, L. H. 1996. The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in conservation genetics. p. 54-73. In: Smith, T. B. & Wayne, R.

- K. (eds). *Molecular genetic approaches in conservation*. Oxford University Press.
- Galeotti, P. Rubolini, D., Dunn, P. O. & Fasola, M. 2003. Colour polymorphism in birds : causes and functions. *Journal of Evolutionary Biology* 16: 635-646.
- Götmark, F. 1987. White underparts in gulls function as hunting camouflage. *Animal Behaviour* 35: 1786-1792.
- Grant, P. R., Boag, P. T. & Schluter, D. 1979. A bill color polymorphism in young Darwin's Finches. *Auk* 96: 800-802.
- Hadrys, H., Balick, M. & Schierwater, B. 1992. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology* 1: 55-63.
- Hellmayr, C. E. 1927. Catalogue of birds of the Americas and the adjacent islands in Field Museum of Natural History. Part V, Tyrannidae. *Field Museum of Natural History Publications, Zoological Series* 13: 1-517.
- Hilty, S. L. & Brown, W. L. 1986 *A guide to the Birds of Colombia*. Princeton University Press. New Jersey. United Kingdom.
- Isler, M. L., Isler, P. R., Whitney, B. M. e Walker, B. 2001. Species limits in Antbirds: the *Thamnophilus punctatus* complex continued. *Condor* 103: 278-286.
- James, F. C. & McCulloch, C. E. 1990. Multivariate analysis in ecology and systematics: Panacea or Pandora's Box? *Annual Review of Ecology and Systematics* 21: 129-166.
- Johansson, U. S., Fjeldsa, J. & Bowie, R. C. K. 2008. Phylogenetic relationships within Passerida (Aves Passeriformes): A review and a new molecular

- phylogeny based on three nuclear intron markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 48: 858-876.
- Kimberling, D. N., Ferreira, A. R., Shuster, S. M. & Keim, P. 1996. RAPD marker estimation of genetic structure among isolated northern leopard frog populations in the south-western USA. *Molecular Ecology* 5: 521-529.
- Kroodsma, D. E. & Miller, E. H (eds).1982. *Acoustic communication in Birds*. Academic Press. New York. USA.
- Kroodsma, D. E. 1984. Songs of the Alder Flycatcher (*Empidonax alnorum*) and Willow Flycatcher (*Empidonax traillii*) are innate. *Auk* 101: 13-24.
- Kroodsma, D. E. 2005. *The singing life of birds: the art and science of listening to birds*. Houghton Mifflin Company. New York. USA.
- Kulikova, I. V., Chelomina, G. N. & Zhuravlev, Yu. N. 2002. RAPD-PCR Analysis of genetic diversity in the Manchurian Pheasant. *Russian Journal of Genetics* 38: 699-703.
- Lacerda, D. R., Acedo, M. D. P., Lemos-Filho, J. P. & Lovato, M. B. 2002. A técnica de RAPD: uma ferramenta molecular em estudos de conservação de plantas. *Lundiana* 3: 87-92.
- Lank, D. B. 2002. Diverse processes maintain plumage polymorphisms in birds. *Journal of Avian Biology* 33: 327-330.
- Lanyon, W. E. 1978. Revision of the *Myiarchus* flycatchers of South America. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 161: 427-628.
- Lanyon, W. E. & Lanyon S. M. 1986. Generic status of Euler's Flycatcher: a morphological and biochemical study. *Auk* 103: 341-350.

- Lein, M. R. 2008. Song variation in Buff-breasted Flycatchers (*Empidonax fulvifrons*). *The Wilson Journal of Ornithology* 120: 256-267.
- Londoño, G. A. & Cadena, C. D. 2003. The nest and eggs of the cinereous mourner (*Laniocera hypopyrra*). *Wilson Bulletin* 115: 115-118.
- Lovell, S. F. & Lein, M. R. 2004a. Song variation in a population of Alder Flycatchers. *Journal of Field Ornithology* 75: 145-151.
- Lovell, S. F. & Lein, M. R. 2004b. Neighbor-stranger discrimination by song in a Suboscine bird, the Alder Flycatcher , *Empidonax alnorum*. *Behavioral Ecology* 15: 799-804.
- Lovell, S. F. & Lein, M. R. 2005. Individual recognition of neighbors by song in a suboscine bird, the Alder Flycatcher , *Empidonax alnorum*. *Behavior Ecology and Sociobiology* 57: 623-630.
- Lynch, M. & Milligan, B. G. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* 3: 91-99.
- McNaught, M. K. & Owens, I. P. F. 2002. Interspecific variation in plumage color among birds: species recognition or light environment. *Journal of Evolutionary Biology* 15: 505-514.
- Mennill, D. J. & Vehrencamp, S. L. 2005. Sex differences in singing and duetting behavior of the neotropical rufous-and-white wrens (*Thryothorus rufalbus*). *Auk* 122: 175-186.
- Moraes, L. L. 2007. Variação fenotípica em *Lathrotriccus euleri euleri* (Cabanis, 1868) (Aves: Tyrannidae) no leste de Minas Gerais. *Monografia*. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.
- Munsell. 2000. *Munsell soil color charts*. Gretag Macbeth, New York. USA.

- Nei, M. & Kumar, S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press. New York. USA
- Oliveira-Filho, A. T. & Fontes, M. A. 2000. Patterns of floristic differentiation among Atlantic Forests in Southeastern Brazil and the influence of climate. *Biotropica* 32: 793-810.
- Pinto, O. M. O. 1944. *Novo Catálogo das Aves do Brasil, segunda parte*. Empresa Gráfica da Revista do Tribunais. São Paulo, Brasil.
- Peres-Neto, P. R. 1995. Introdução às análises morfométricas. *Oecologia Brasiliensis* 2: 57-89.
- Preston, C. R. 1980. Differential perch site selection by color morphs of the red-tailed hawk (*Buteo jamaicensis*). *Auk* 97: 782-789.
- Prike, S. R. & Griffith, S. C. 2006. Red dominates black: agonistic signaling among head morphs in the colour polymorphic Gouldian finch. *Proceedings of the Royal Society B* 273: 949-957.
- Puglisi, L. & Adamo, C. 2004. Discrimination of individual voices in male great bitterns (*Botaurus stellaris*) in Italy. *Auk*: 121: 541-547.
- Rabouam, C., Comes, A. M., Bretagnolle, V., Humbert, J. F., Periquet, G. & Bigot, Y. 1999. Features of DNA fragments obtained by random amplified polymorphic DNA (RAPD) assays. *Molecular Ecology* 8:493-503.
- Reyes, D., Alcalá, R. E., Arias, D. & Osorio-Beristain. 2009. Genetic structuring at a fine scale in the Russet-crowned motmot (*Momotus mexicanus*) in a tropical dry forest in Central Mexico. *Western North American Naturalist* 69: 171-174.

- Ribon, R., Simon, J. E. & Mattos, G. T. 2003. Bird extinctions in Atlantic Forest Fragments of the Viçosa Region, Southeastern Brazil. *Conservation Biology* 17: 1827-1839.
- Rice, N. H. 2005. Further evidence for paraphyly of the Formicariidae (Passeriformes). *Condor* 107: 910-915.
- Ricklefs, R. E. 2002. Splendid isolation: historical ecology of the South American passerine fauna. *Journal of Avian Biology* 33: 207-211.
- Ridgely, R. S. e Tudor, G. (1994). *The birds of South America: the suboscine passerines*. Vol.2. University of Texas Press, Austin, Texas.
- Rieseberg, L. H. 1996. Homology among RAPD fragments in interspecific comparisons. *Molecular Ecology* 5: 99-105.
- Robbins, C. S. e Stallcup, R. W. 1981. Problems in separating species with similar habitats and vocalizations, p. 360-365. In: Ralph, C. J. e Scott, J. M. (eds). *Estimating Numbers of Terrestrial Birds*. Studies in Avian Biology, nº 6.
- Roulin, A. 2004. The evolution, maintenance and adaptative function of genetic colour polymorphism in birds. *Biological Review* 79: 815-848.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich. 1988. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science* 239: 487-491.
- Schielzeth, H., Burger, C., Bolund, E. & Forstmeier, W. 2008. Assortative versus disassortative mating preferences of female zebra finches based on self-referent phenotype matching. *Animal Behaviour* 76: 1927-1934.

- Schook, D. M., Collins, M. D., Jensen, W. E., Willians, P. J., Bader, N. E. & Parker T. H. 2008. Geographic patterns of song similarity in the dickcissel (*Spiza Americana*). *Auk* 125: 953-964.
- Sedgwick, J. A. 2001. Geographic variation in the song of Willow Flycatchers: differentiation between *Empidonax traillii adastus* and *E. t. extimus*. *Auk* 118: 366-379.
- Sheldon F. H. e Winkler, D. W. 1999. Nest architecture and avian systematics. *Auk* 116: 875–877.
- Sibley, C. G. e Monroe, B. L. 1990. *Distribution and taxonomy of birds of the world*. Yale University Press. New Haven. USA.
- Sibley, C. G. e Monroe, B. L. 1993. *A supplement to distribution and taxonomy of birds of the world*. Yale University Press. New Haven. USA.
- Sick, H. 1997. *Ornitologia brasileira*. Nova Fronteira. Rio de Janeiro. Brasil.
- Sokal, R. R. & Rohlf, F. J. 1995. *Biometry*. W. H. Freeman and Company, New York. USA.
- Stewart, C. N. Jr. Excoffier, L. Assessing population genetic structure and variability with RAPD data: Application to *Vaccinium macrocarpon* (American Cranberry). *Journal of Evolutionary Biology* 9:153-171.
- Spiridonova, L. N., Chelomina, G. N. & Kryukov, A. P. 2003. Genetic diversity of the Carrion and Jungle Crows as evidenced by RAPD-PCR analysis. *Russian Journal of Genetics* 39: 1281-1291.
- Stein, R. C. 1963. Isolating mechanisms between populations of Traill's flycatchers. *Proceedings of the American Philosophical Society* 107: 21-50.

- Stotz, D. F., Fitzpatrick, J. W., Parker III, T. A. e Moskovitz, D. K. 1996. *Neotropical Birds, Ecology and Conservation*. University of Chicago Press. Chicago. USA.
- Tello, J. G. & Bates, J. M. 2007. Molecular Phylogenetics of the tody-tyrant and flatbill assemblage of tyrant flycatchers (Tyrannidae). *Auk* 124: 134-154.
- Theron, E., Hawkins, K., Bermingham, E., Ricklefs, R. E. & Mundy, N. I. 2001. The molecular basis of an avian plumage polymorphism in the wild: a melanocortin-1-receptor point mutation is perfectly associated with the melanic plumage morph of the bananaquit, *Coereba flaveola*.
- Viala, V. L., Souza, E. D., Tarosso, L. F. S. & Oliveira, F. P. 2006. Caracterização da variabilidade genética em indivíduos cativos de *Ramphastos toco* (Piciformes: Rhamphastidae) mediante o uso de RAPD como marcador molecular. *Revista Brasileira de Ornitologia* 14: 29-34.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Iornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. & Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407-4414.
- Welsh, J. & McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Molecular Ecology* 18: 7213-7218.
- Wiley, R. H. 2005. Individuality in songs of Acadian Flycatchers and recognition of neighbours. *Animal Behaviour* 70: 237-247.
- Williams, J. G. K., Kubelic, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. & Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.
- Wolff, K & Morgan-Richards, M. 1998. PCR Markers distinguish *Plantago major* subspecies. *Theoretical and Applied Genetics* 96: 282-286.

- Zimmer, J. T. 1939. Studies of Peruvian birds XXX. Notes on the genera *Contopus*, *Empidonax*, *Terenotriccus* and *Myiobius*. *American Museum Novitates* 1042: 1-13.
- Zimmer, K. J., Whittaker, A. and Oren, D. 2001. A cryptic new species of Flycatcher (Tyrannidae: *Suiriri*) from the Cerrado region of Central South America. *Auk* 118: 56-78.
- Zink, R. M. e Fall, B. H. 1981. Breeding distribution, song and habitat of the Alder Flycatcher and Willow Flycatcher in Minnesota. *Loon* 53: 208-214.
- Zink, R. M. e Johnson, N. K. 1984. Evolutionary genetics of flycatchers. Sibling species in the genera *Empidonax* and *Contopus*. *Systematic Zoology* 33: 205-216.
- Zyskowski , K. e Prum, R. O. 1999. Phylogenetic analysis of the nest architecture of neotropical Ovenbirds (Furnariidae). *Auk* 116: 891-911.

Anexo 1. Dados de coleta e morfologia externa dos espécimes de *Lathrotriccus euleri* analisados.

Espécimes ¹	Dados de Coleta/Captura			Medidas (cm)					Coloração				
	Data	Localidade	Sexo	Asa	Cauda	Tarso	Bico		Língua	Mandíbula	Maxila	Tarso	Íris
							C ²	N ³					
MZ-UFV 1432	14/X/2001	Paula Cândido	-	6,06	5,53	1,18	1,52	0,74	laranja	palha	fuligem	fuligem	marrom
MZ-UFV 1458	05/XI/2001	Rio Novo	♂	6,25	5,62	1,24	1,61	0,76	laranja	palha	fuligem	preto	castanha
MZ-UFV 1538	23/X/2003	Ladainha/Fazenda Mumbuca	-	6,28	6,18	1,16	1,56	0,70	rósea	palha	preta	fuligem	marrom
MZ-UFV 1540	23/X/2003	Ladainha/Fazenda Mumbuca	-	6,40	5,99	1,27	1,52	0,65	laranja	palha	preta	preto	marrom-escuro
MZ-UFV 1541	23/X/2003	Ladainha/Fazenda Mumbuca	-	5,97	5,30	1,23	1,52	0,69	laranja	palha	fuligem	fuligem	marrom
MZ-UFV 1596	22/VII/2004	Poté/Fazenda Nossa Senhora de Fátima	-	6,58	6,19	1,20	1,47	0,68	laranja	palha	fuligem	fuligem	marrom-escuro
MZ-UFV 1597	22/VII/2004	Poté/Fazenda Nossa Senhora de Fátima	-	6,25	5,95	1,39	1,48	0,71	laranja	palha	fuligem	fuligem	castanha
MZ-UFV 1657	23/I/2005	Santa Maria do Salto/Fazenda Duas Barras	♀	5,76	5,46	1,26	1,46	0,66	laranja	palha	cinza	fuligem	marrom
MZ-UFV 1752	22/IV/2005	Ladainha/Fazenda Mumbuca	♂	6,47	6,44	1,27	1,65	0,68	rósea	palha	preta	preto	castanha
MZ-UFV 1775	15/VIII/2005	Viçosa/Mata do Paraíso	♂	6,47	6,13	1,26	1,55	0,70	laranja	palha	preta	marrom-escuro	castanha

Dados de Coleta/Captura				Medidas (cm)					Coloração				
Espécimes ¹	Data	Localidade	Sexo	Asa	Cauda	Tarso	Bico		Língua	Mandíbula	Maxila	Tarso	Íris
							C ²	N ³					
MZ-UFV 1785	15/X/2007	Paula Cândido/ Faz. José Firmiano	♀	6,16	5,77	1,38	1,65	0,81	laranja	palha	preta	preto	castanha
MZ-UFV 1787	05/IX/2008	Viçosa/Sítio Sr. Antônio Ferreira	♀	6,21	5,56	1,34	1,66	0,76	rósea	palha	preta	preto	castanha
MZ-UFV 1788	15/X/2007	Paula Cândido/ Faz. José Firmiano	♂	6,42	6,66	1,42	1,61	0,79	laranja	palha	preta	preto	castanha
MZ-UFV 1789	28/II/2008	Viçosa/Museu de Zoologia	♀	5,80	5,41	1,30	1,58	0,71	laranja	palha	preta	preto	castanha
MZ-UFV 1790	26/IX/2008	Viçosa/Sítio Sr. Antônio Ferreira	♂	6,39	6,21	1,18	1,53	0,75	laranja	palha	preta	preto	castanha
MZ-UFV1793	03/IX/2008	Viçosa/Museu de Zoologia	♂	6,51	6,28	1,41	1,61	0,77	rósea	palha	preta	fuligem	castanha
MZ-UFV1795	15/IX/2008	Viçosa/Sítio Sr. Antônio	♂	6,24	5,98	1,32	1,57	0,69	rósea	palha	preta	fuligem	castanha
MZ-UFV1796	24/IX/2008	Viçosa/Sítio Sr. Antônio	♀	6,03	5,61	1,29	1,61	0,67	rósea	palha	preta	fuligem	castanha
MZ-UFV1801	30/IX/2008	Viçosa/Mata da Biologia	♀	6,27	5,90	1,32	1,56	0,71	rósea	palha	preta	fuligem	castanha
DZ-UFMG3291	15/XI/2001	Perdões	-	6,84	6,28	-	1,47	0,8	rósea	rosa-acinzentada	preta	cinza-anegrado	-
DZ-UFMG4091	25/XII/2003	Leme do Prado	♂	6,45	5,98	1,21	1,51	0,85	rósea	rosa-acinzentada	preta	fuligem	-

Dados de Coleta/Captura				Medidas (cm)					Coloração				
Espécimes ¹	Data	Localidade	Sexo	Asa	Cauda	Tarso	Bico		Língua	Mandíbula	Maxila	Tarso	Íris
							C ²	N ³					
DZ-UFGM3575	17/XI/2002	Leme do Prado	♂	6,49	6,49	1,44	1,56	0,82	rósea	rosa-acinzentada	preta	sépia	-
DZ-UFGM2724	14/XI/1999	Cachoeira da Prata	♂	6,52	6,27	1,44	1,52	0,8	rósea	rosa-acinzentada	preta	cinza-escuro	-
MZ-UFV 1791	30/V/2008	Ferros	?	5,84	5,51	1,27	1,58	0,76	laranja	palha	preta	cinza-escuro	castanha
MZ-UFV 1792	28/V/2008	Ferros	?	6,47	6,41	1,32	1,61	0,71	laranja	palha	preta	cinza-escuro	castanha
MZ-UFV1797	24/IX/2008	Viçosa/Sítio Sr. Antônio	♂	6,24	5,84	1,46	1,59	0,68	laranja	palha	preta	fuligem	castanha
MZ-UFV1798	18/XI/2008	Viçosa/Mata da Biologia	♂	6,27	6,08	1,38	1,60	0,65	laranja	palha	preta	fuligem	castanha
MZ-UFV1800	30/IX/2008	Viçosa/Mata da Biologia	♀	6,46	6,17	1,36	1,61	0,66	laranja	palha	preta	fuligem	castanha
MZ-UFV1802	22/X/2008	Viçosa/Mata da Biologia	♀	6,44	-	1,28	1,50	0,63	laranja	palha	preta	fuligem	castanha
DZ-UFGM3574	15/XI/2002	Leme do Prado	♂	6	6,34	1,57	1,50	0,88	laranja	amarelo-rosada	preta	preto	-
DZ-UFGM4089	26/XII/2003	Leme do Prado	♂	6,46	6,07	1,36	1,52	0,81	laranja	amarelo-rosada	preta	preto	-
DZ-UFGM3654	23/XII/2002	Santa Bárbara	-	6,25	5,83	1,49	1,46	0,76	laranja	amarelo-rosada	preta	preto	-
DZ-UFGM3732	18/XI/2002	Leme do Prado	♂	6,59	6,16	1,44	1,57	0,85	laranja	amarelo-rosada	preta	preto	-

Dados de Coleta/Captura				Medidas (cm)					Coloração				
Espécimes ¹	Data	Localidade	Sexo	Asa	Cauda	Tarso	Bico		Língua	Mandíbula	Maxila	Tarso	Íris
							C ²	N ³					
DZ-UFGM3094	07/X/2001	Perdões	-	6,68	6,03	1,37	1,59	0,86	laranja	amarelo-rosada	preta	preto	-
c33243	09/11/2006	Viçosa/Mata do Paraíso	-	6,05	5,2	1,55	1,65	0,75	laranja	palha	preta	fuligem	castanha
c33244	13/11/2006	Viçosa/Mata do Paraíso	-	6,55	6,01	1,9	1,55	0,9	laranja	palha	preta	fuligem	castanha
c33245	13/11/2006	Viçosa/Mata do Paraíso	-	6,35	5,6	1,3	1,55	0,75	laranja	palha	preta	fuligem	castanha
c47537	01/10/2007	Viçosa/Mata do Paraíso	-	6,5	5,9	1,3	1,3	0,8	laranja	palha	preta	fuligem	castanha
c47538	01/10/2007	Viçosa/Mata do Paraíso	-	6,1	6,3	1,5	1,3	0,8	laranja	palha	preta	fuligem	castanha
c47539	19/12/2008	Viçosa/Mata da Biologia	-	6,09	5,65	1,62	1,6	0,74	laranja	palha	preta	fuligem	castanha
c47540	20/12/2008	Viçosa/Mata da Biologia	-	6,33	5,76	1,67	1,46	0,78	laranja	palha	preta	fuligem	castanha

¹Espécimes analisados: **MZ-UFV** = tombados na coleção ornitológica da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais; **DZ-UFGM** = tombados na coleção científica da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais; **c** = indivíduos anilhados e soltos.

²Medida do cúlmen.

³Medida da narina à ponta do bico.

Anexo 2. Análise descritiva da morfometria dos espécimes de *Lathrotriccus eulerei* de assoalho da boca laranja examinados neste estudo e comparações estatísticas entre os sexos. Medidas em centímetros.

Variável	Macho (n = 7)		Fêmea (n = 3)		F	Teste-t P
	Média	SD	Média	SD		
Asa	6,291429	0,156996	6,140000	0,330454	4,430448	0,131628
Cauda	6,125714	0,336148	5,783333	0,380175	1,279110	0,689181
Tarso	1,358571	0,138375	1,380000	0,080000	2,991815	0,543196
Cúlmen	1,570000	0,043589	1,613333	0,035119	1,540541	0,888708

Anexo 3. Análise descritiva da morfometria dos espécimes de *Lathrotriccus eulerei* de assoalho da boca róseo examinados neste estudo e comparações estatísticas entre os sexos. Medidas em centímetros.

Variável	Machos (n = 7)		Fêmeas (n = 3)		F	Teste-t P
	Média	SD	Média	SD		
Asa	6,442857	0,095867	6,170000	0,124900	1,69741	0,520977
Cauda	6,300000	0,255408	5,690000	0,183576	1,93571	0,758284
Tarso	1,358571	0,092273	1,316667	0,025166	13,44361	0,141686
Cúlmen	1,575714	0,050943	1,610000	0,050000	1,03810	1,000000



Anexo 4. Indivíduos de *Lathrotriccus euleri*. Acima, um indivíduo de língua amarela capturado em dezembro de 2008, na Mata da Biologia e, abaixo, um indivíduo de língua rósea coletado em setembro de 2008, no Museu de Zoologia. Ambas localidades no *campus* da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.