



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA

**Efeito da Disponibilidade de Alimento no Investimento Maternal de *Volatinia jacarina*  
(Aves: Thraupidae)**



**Ingrid Toledo Paneczko**

**Orientação: Profa. Dra. Regina Helena Ferraz Macedo**

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

**BRASÍLIA, 31 DE MARÇO DE 2016**

## Sumário

<b>Agradecimentos</b> .....	iii
<b>Resumo</b> .....	v
<b>Abstract</b> .....	vi
<b>1. Introdução</b> .....	7
<b>2. Metodologia</b> .....	10
2.1. Objeto de Estudo.....	10
2.2. Área de Estudo.....	11
2.3. Coleta de Dados em Campo.....	12
2.4. Extração de Hormônios em Laboratório.....	14
2.5. Variáveis Utilizadas e Análises Estatísticas .....	15
<b>3. Resultados</b> .....	16
<b>4. Discussão</b> .....	18
<b>5. Referências</b> .....	24

## Agradecimentos

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Mestrado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia pelo apoio logístico.

À Animal Behavior Society (ABS) pelo apoio financeiro, o que permitiu que uma parte desse trabalho fosse apresentada em congresso internacional.

A orientação da professora Regina H. F. Macedo, cujo apoio logístico e moral foram imprescindíveis para a conclusão desse trabalho e para o meu aperfeiçoamento tanto científico quanto humano.

Ao Diego Gil e alunos do Laboratory of Behavioral Endocrinology pela ajuda com as análises da concentração de testosterona.

Ao professor Jader Marinho-Filho e alunos do Laboratório de Mamíferos pelo empréstimo do freezer para o congelamento dos ovos utilizados nas análises de testosterona.

Ao professor Neander Heming pelo auxílio com o programa R e com o script que gerou o mapa da área de estudo.

Ao diretor e funcionários da Fazenda Água Limpa, UnB, pela autorização de trabalho e por garantir a minha segurança em campo.

Aos meus ajudantes de campo: Carlos Biagolini, Gisele Spíndola, Marcus Paulo Pereira e todas as pessoas que se dispuseram a acordar cedo para acompanhar o meu trabalho.

Aos amigos do laboratório: Graziela Pascoli, Guilherme Álvares, Julia Borges, Leonardo Castilho, Milene Gaiotti, Pedro Diniz, Pedro de Moraes, Pedro Ribeiro, Renata Alquezar e Rodrigo Borges, que ajudaram em várias etapas desse trabalho e me proporcionaram novas amizades.

Aos amigos de Brasília: Elba Militão, Júlia Machado, Pedro Lucas, Roberto Ricart e Samia Gomes pelos momentos maravilhosos e apoio incondicional em momentos difíceis.

Aos meus amigos de longa data, em especial Aline Sabes, André Bina, “Bob” Tarrafil, Bruna Cavalini, Camila Pereira, Cassius Nakabashi, Luiza Menezes, Marcus Vinicius de Souza e Pavel Dodonov, pelo carinho e companheirismo constante ao longo dos anos mesmo que estivessem longe de mim.

À minha querida amiga e confidente Julia Rodrigues (agora Julia Severo) por me ajudar com a formatação desse texto e também pelas incontáveis conversas e risadas ao longo dos anos.

À minha família por ajudar a me manter em Brasília durante a duração do Mestrado e por torcer incansavelmente pelo meu sucesso.

## Resumo

As condições ambientais influenciam o fenótipo da mãe que, por sua vez, influencia o fenótipo e a aptidão (*fitness*) de seus filhotes através dos “efeitos maternos”. Nesse sentido, fatores ambientais são cruciais na determinação do *fitness* da fêmea e condições adversas podem limitar a capacidade da fêmea em investir na reprodução. Um dos fatores que possivelmente limitam o investimento reprodutivo das fêmeas é a disponibilidade de alimento no ambiente. A escassez de alimento pode acarretar em ovos menores e de baixa qualidade em termos de alocação de andrógenos, tentativas reprodutivas com um número menor de ovos e filhotes menores e mais suscetíveis a doenças. Utilizando o tiziu (*Volatinia jacarina*) como modelo, foi verificado se: 1) a disponibilidade de alimento influencia a capacidade da fêmea em investir nos ovos (tamanho, peso, número de ovos por ninho e concentração de testosterona) e filhotes (tamanho e peso), e 2) se os parâmetros morfométricos dos ovos (volume e peso) estão relacionados ao conteúdo interno dos ovos (peso da gema e concentração de testosterona) e à qualidade dos filhotes (tamanho e peso). A disponibilidade de alimento não explicou nenhuma das variáveis medidas, indicando que outros fatores podem ser mais relevantes na capacidade da fêmea em investir na reprodução, tais como predação, idade e condição corporal da fêmea, endoparasitismo, interações sociais e qualidade do macho. Os parâmetros morfométricos dos ovos estão correlacionados ao peso da gema, mas não à concentração de testosterona, o que sugere que outros fatores podem estar influenciando a alocação diferencial de testosterona entre as fêmeas. Não foi encontrada relação entre os parâmetros morfométricos dos ovos e qualidade dos filhotes, o que pode indicar que o cuidado parental é um fator importante no crescimento dos filhotes. Mais estudos relacionados à alocação de testosterona nos ovos podem auxiliar na identificação tanto dos fatores que influenciam o investimento reprodutivo da fêmea de *V. jacarina*, quanto das consequências do investimento diferencial para a sobrevivência e *fitness* da prole.

**Palavras-chave:** efeitos maternos, investimento reprodutivo, disponibilidade de alimento, concentração de testosterona.

## Abstract

Environmental conditions influence the mother's phenotype, which in turn influences the offsprings' phenotype and fitness through "maternal effects". Thus, environmental factors are crucial in determining female's fitness and adverse conditions may limit the female's capacity of investing in reproduction. One of the factors that possibly limits female reproductive investment is food availability in the environment. Food limitation may result in smaller eggs, low quality eggs in terms of androgen allocation, smaller clutch sizes, smaller nestlings and offspring that are more susceptible to diseases. Using the blue-black grassquit (*Volatinia jacarina*) as a model, we verified if: 1) food availability influences female capacity to invest in eggs (individual size and weight, clutch size and testosterone concentration) and offspring (size and weight), and if 2) egg morphometric parameters (volume and weight) are related to the egg's internal contents (yolk weight and testosterone concentration) and to offspring quality (size and weight). Food availability explained none of the variables measured, indicating that other factors may be more relevant in female capacity of investing in reproduction, such as predation, female age, female body condition, endoparasitism, social interactions and male quality. The egg's morphometric parameters are correlated to the yolk weight, but not to testosterone concentration, which suggests that other factors may be influencing the testosterone differential allocation among females. No relationship was found between the egg's morphometric parameters and offspring quality, which may indicate that parental care is an important factor in offspring growth. More studies concerning the egg's testosterone allocation may lead to identification of the factors that influence blue-black grassquit female reproductive investment and consequences of this differential investment to offspring survival and fitness.

**Key words:** maternal effects, reproductive investment, food availability, testosterone concentration.

## 1. Introdução

No ambiente natural, as aves devem distribuir suas reservas energéticas entre sobrevivência e reprodução (Martin 1987). Entretanto, essa distribuição não ocorre da mesma forma para machos e fêmeas. Por produzirem gametas grandes e altamente energéticos (óvulos), o investimento reprodutivo inicial das fêmeas é maior do que o dos machos, cujos gametas (espermatozoides) são pequenos e de baixo custo energético, o que sugere que o investimento reprodutivo das fêmeas está limitado ao número de gametas que elas são capazes de produzir (Bateman 1948). Hayward e Gillooly (2011) estimaram que o custo de produção de óvulos pode chegar a mais de três vezes o custo de produção de espermatozoides. Dado o alto custo inicial na produção de gametas para as fêmeas, portanto, é possível que a quantidade de energia alocada pela fêmea na reprodução afete o fenótipo de sua prole. A influência do fenótipo da mãe no fenótipo de sua prole é conhecida como “efeitos maternos” (Räsänen e Kruuk 2007). As condições ambientais influenciam o fenótipo da mãe que, por sua vez, influencia o fenótipo e a aptidão (*fitness*) de seus filhotes, possivelmente criando um mecanismo adaptativo que gera plasticidade fenotípica na prole ao longo de várias gerações, se os efeitos maternos envolvidos estiverem sob o efeito da seleção natural (Mousseau e Fox 1998). Nesse sentido, fatores ambientais são cruciais na determinação do *fitness* da fêmea e condições adversas podem limitar a capacidade da fêmea em investir na reprodução.

Um dos fatores que possivelmente limitam o investimento reprodutivo das fêmeas é a disponibilidade de alimento no ambiente. Martin (1987) compilou uma série de evidências em aves que mostram que a escassez de alimento é refletida em parâmetros reprodutivos, tais como qualidade dos ovos, tamanho da ninhada e qualidade dos filhotes. Estudos mais recentes têm relatado resultados semelhantes (e.g. Reynolds et al. 2003, Nooker et al. 2005, Djerdali et al. 2008), apesar de nem sempre ser esse o caso (Christians 2002), e os conceitos e limitações na metodologia empregados nos estudos que avaliam os efeitos da disponibilidade de alimento na reprodução vêm sendo objeto de discussão (Martin 2004). Tal preocupação se refere principalmente a metodologias que envolvem suplementação alimentar (Nager 2006, Harrison et al. 2010), método comumente utilizado para controlar experimentalmente a disponibilidade de alimento.

A limitação da fêmea pode começar na formação do ovo, a primeira etapa na reprodução das aves que demanda alocação de energia e nutrientes (Martin 1987). Ovos maiores são frequentemente associados a maiores taxas de eclosão e maiores taxas de crescimento, maturação e sucesso da prole (revisado em Martin 1987) e evidências da relação entre tamanho do ovo e qualidade da prole foram reafirmadas em revisões mais recentes (Christians 2002, Krist 2011). Apesar de muitos estudos com suplementação alimentar terem falhado em identificar uma relação entre disponibilidade de alimento e tamanho do ovo dada a alta repetibilidade e alta herdabilidade desse traço (Christians 2002), alguns estudos foram

bem sucedidos. Por exemplo, em um estudo com *Pica pica*, Högstedt (1981) verificou que pares suplementados antes e durante a estação reprodutiva produziram ovos maiores do que pares não suplementados. Tal resultado foi corroborado em outro estudo com a mesma espécie, onde fêmeas em territórios suplementados produziram ovos maiores do que fêmeas em territórios não suplementados, mesmo quando efeitos de qualidade do macho foram considerados (De Neve et al. 2004).

Entretanto, não apenas a quantidade, mas também a qualidade do alimento, deve ser levada em consideração em estudos envolvendo suplementação alimentar (revisado em Nager 2006). Por exemplo, Ramsay e Houston (1997) compararam o investimento reprodutivo de três grupos de *Cyanistes caeruleus*: (1) um grupo não suplementado (controle), (2) um grupo suplementado de forma a suprir apenas necessidades energéticas (gordura animal), e (3) um grupo suplementado de forma a suprir tanto a demanda energética como a demanda por nutrientes necessários para a formação do ovo (ovo cozido). O grupo que foi suplementado com ovo cozido produziu ovos maiores em relação aos outros dois grupos, com o grupo que foi suplementado com gordura animal não apresentando diferença em relação ao controle (Ramsay e Houston 1997). Adicionalmente a um aumento do tamanho do ovo, Bolton et al. (1992) também verificaram um aumento no tamanho da ninhada em fêmeas com um suplemento de qualidade superior.

O tamanho não é a única forma de avaliar a qualidade do ovo. Schwabl (1993) forneceu as primeiras evidências de que ovos de aves contêm concentrações variáveis de hormônios andrógenos de origem materna e que esses hormônios atuam no desenvolvimento da prole, e desde então vários pesquisadores têm estudado o efeito da alocação de andrógenos em ovos de aves (Gil 2008). A testosterona pode conferir tanto vantagens (e.g. aumento nas taxas de crescimento e *begging*), quanto desvantagens (e.g. imunossupressão) aos filhotes (revisado em Gil 2008), e as consequências da alocação de andrógenos nos ovos dependerá das condições ambientais pós-eclosão da prole, tais como a disponibilidade de alimento (Gil 2008). Foram encontrados apenas dois estudos que se propuseram a estabelecer uma relação direta entre disponibilidade de alimento e deposição de testosterona nos ovos, ambos com espécies da família Laridae. No estudo de Verboven et al. (2003), fêmeas de *Larus fuscus* suplementadas depositaram menos testosterona em seus ovos do que fêmeas não suplementadas. Os filhotes derivados dos ovos com menos testosterona não tiveram taxas menores de crescimento e sobrevivência; entretanto, a influência de competição entre filhotes em uma mesma ninhada foi experimentalmente excluída, e esse fator poderia ter influenciado no sucesso de filhotes com menos testosterona (Verboven et al. 2003). Gasparini et al. (2007) suplementaram fêmeas de *Rissa tridactyla* antes e durante a postura dos ovos e posteriormente induziram a formação de uma segunda ninhada ao retirar experimentalmente os ovos da primeira. Não houve diferença na deposição de testosterona dos ovos da primeira ninhada entre o grupo suplementado e o não suplementado, porém, fêmeas suplementadas depositaram menos testosterona em seus ovos na segunda ninhada do que fêmeas não suplementadas (Gasparini et al. 2007). Os autores sugerem que a concentração de

testosterona funciona como um mecanismo de compensação para que fêmeas de baixa qualidade (não suplementadas) facilitem o desenvolvimento da prole, apesar dos custos associados a altas concentrações de testosterona a longo prazo para os filhotes (Gasparini et al. 2007).

Alternativamente à qualidade do ovo, fêmeas também podem modificar o número de ovos em uma ninhada de acordo com a disponibilidade de alimento no ambiente (Martin 1987, revisado em Nager 2006), mas evidências mistas têm gerado polêmica sobre o uso desse parâmetro reprodutivo em estudos envolvendo escassez de alimento (Martin 1987, Martin 1995, Martin 2004). Alternativamente ao número de ovos em uma única tentativa reprodutiva, o número de tentativas reprodutivas durante uma estação reprodutiva parece ser mais fortemente associado à disponibilidade de alimento (Martin 1987, Martin 1995). Estudos com Passeriformes mostraram que a suplementação alimentar aumentou a probabilidade das fêmeas em investir em uma segunda tentativa reprodutiva (Simons e Martin 1990, Nagy e Holmes 2005).

Por fim, os efeitos da escassez de alimento também podem ser vistos diretamente nos filhotes (Martin 1987). Por exemplo, Moreno et al. (2008) suplementaram fêmeas de *Ficedula hypoleuca* e controlaram o efeito da incubação ao trocar as ninhadas do grupo suplementado com as do grupo controle. Os filhotes cujas mães foram suplementadas apresentaram um maior comprimento de tarso e níveis maiores de imunoglobulina, um anticorpo de origem maternal importante na defesa contra patógenos (Moreno et al. 2008). A qualidade dos filhotes pode ser medida não só através do investimento da fêmea nos ovos, como também na frequência de alimentação dos filhotes pelos pais. Em um ambiente com baixa disponibilidade de alimento, os pais podem ter uma baixa qualidade corporal, e isso se refletiria na capacidade dos mesmos em alimentar os filhotes, resultando em uma maior mortalidade de filhotes no ninho ou então mais filhotes saindo do ninho em piores condições (Martin 1987).

Em suma, os efeitos da abundância de alimento sobre características dos ovos (e.g. número, tamanho) (revisado em Martin 1987, Nager 2006) e sobre os filhotes (revisado em Martin 1987) são amplamente estudados, porém os efeitos desse mesmo fator em relação à variação de substâncias na gema, tais como andrógenos, ainda são desconhecidos. Além disso, estudos envolvendo a escassez de alimento e/ou o investimento maternal em aves neotropicais são escassos, se comparados com a literatura disponível para aves de regiões temperadas (Martin 1996). Se as taxas de disponibilidade de alimento e investimento maternal compõem partes importantes da história de vida das aves (Martin 1987, Groothuis et al. 2005), é imprescindível que mais estudos sobre esses temas sejam realizados em regiões tropicais. Do contrário, a influência desses fatores sobre a história de vida das aves pode ser mal compreendida devido a generalizações errôneas (Martin 1996) baseadas primariamente nas características de espécies típicas da zona temperada (Martin 2004).

O presente estudo teve como objetivo verificar se a disponibilidade de alimento no ambiente está limitando o investimento reprodutivo de fêmeas de tizius (*Volatinia jacarina* Linnaeus 1766; ver item 2.1), avaliando tanto parâmetros dos ovos quanto parâmetros dos

filhotes. Pequenos Passeriformes, como os tizius, são um bom modelo para estudos com disponibilidade de alimento, pois sua capacidade de armazenar energia é pequena, o que faz com que suas reservas energéticas dependam grandemente da disponibilidade de alimento no ambiente (Martin 2004). Além disso, ovos de aves em geral são eficientes para quantificar o investimento de fêmeas na reprodução, uma vez que os hormônios presentes nos ovos são de origem maternal (Groothuis et al. 2005). Adicionalmente ao primeiro objetivo, também foi verificado se o conteúdo dos ovos e os parâmetros dos filhotes estão relacionados aos parâmetros morfométricos dos ovos. O termo “filhote” será utilizado ao longo desse trabalho para se referir ao período que compreende desde a eclosão dos ovos até a saída da prole do ninho.

Em relação ao primeiro objetivo, nesse estudo testei as seguintes hipóteses ( $H$ ) e suas respectivas predições ( $p$ ):

$H_1$ : A disponibilidade de alimento limita a capacidade da fêmea em investir em ovos;  
 $p_1$ : Territórios com mais alimento terão ninhos com ovos maiores e mais pesados;  
 $p_2$ : Territórios com mais alimento terão ovos com gemas mais pesadas e com uma concentração maior de testosterona;  
 $p_3$ : Territórios com mais alimento terão ninhos com um número de ovos maior do que territórios com menos alimento.

$H_2$ : A disponibilidade de alimento limita a capacidade da fêmea em investir nos filhotes.  
 $p_4$ : Territórios com mais alimento terão filhotes maiores e mais pesados.

Em relação ao segundo objetivo, testei as seguintes hipóteses ( $H$ ) e suas respectivas predições ( $p$ ):

$H_3$ : O conteúdo interno dos ovos está relacionado aos parâmetros morfométricos dos ovos;  
 $p_5$ : Ovos maiores e mais pesados terão gemas mais pesadas;  
 $p_6$ : Ovos maiores e mais pesados terão uma maior concentração de testosterona.

$H_4$ : Os parâmetros dos filhotes estão relacionados aos parâmetros morfométricos dos ovos.  
 $p_7$ : Ninhos com ovos maiores produzirão filhotes maiores e mais pesados.

## 2. Metodologia

### 2.1. Objeto de Estudo

Os tizius (*Volatinia jacarina*, Aves: Thraupidae) têm uma distribuição que se estende desde o México até grande parte da América do Sul, englobando todo o território brasileiro (Sick 1977). Habitam vegetações abertas e capinzais altos (Sick 1977), geralmente com algum

grau de perturbação (Almeida e Macedo 2001), e alimentam-se principalmente de sementes de gramíneas (Carvalho et al. 2007). O dimorfismo sexual é acentuado durante a estação reprodutiva, com os machos apresentando uma plumagem nupcial negro-azulada brilhante e faixas brancas abaixo das asas, enquanto as fêmeas e juvenis são pardos (Sick 1977). Na região central do Brasil, a estação reprodutiva dos tizius ocorre entre novembro e abril (Carvalho et al. 2007), quando os mesmos migram para a área. Os machos comumente se estabelecem em territórios pequenos (13 a 72,5 m<sup>2</sup>; Almeida e Macedo 2001) agrupados de acordo com a estrutura da vegetação e a disponibilidade de alimento (Dias et al. 2009). Dentro dos territórios, frequentemente no início da manhã e no fim da tarde (Carvalho et al. 2007), os machos executam um display constituído por uma sequência de saltos verticais associados a vocalizações curtas (Sick 1997). Estas aves formam pares socialmente monogâmicos (Almeida e Macedo 2001; Carvalho et al. 2006), porém ocorrem altas taxas de cópula extra-par (Carvalho et al. 2006, Manica 2013). Os ninhos são pequenos (aproximadamente 7,5 cm) e crípticos, localizados entre 10 a 50 cm do chão, em gramíneas ou arbustos (Almeida e Macedo 2001) e as posturas tipicamente têm de dois a três ovos, postos em intervalos de aproximadamente 24h (Carvalho et al. 2007). Ambos os períodos de incubação e da eclosão até a saída do filhote do ninho duram aproximadamente 10 dias (Carvalho et al. 2007).

## 2.2. Área de Estudo

A Fazenda Água Limpa (FAL), está situada a aproximadamente 25 km do centro da cidade de Brasília, Distrito Federal, na região central do Brasil, e compreende uma área de aproximadamente 2000 hectares de cerrado (15°56' S, 47°56' W) do tipo *sensu strictu* intercalada com áreas de cultivo. A estação chuvosa se dá entre os meses de outubro e março. A área utilizada no estudo compreende os arredores de uma barragem e é cortada ao longo de sua extensão por uma estrada de terra (Figura 1). A vegetação é constituída predominantemente de herbáceas invasoras, com arbustos e árvores pequenas dispersas ao longo da área.



**Figura 1:** Área utilizada no estudo. À esquerda, é possível ver a barragem. Uma estrada de terra divide a área total em duas. Imagem gerada no Google Maps a partir dos pacotes *dismo* (Hijmans et al. 2015) e *rgdal* (Bivand et al. 2015) do software R (R Core Team 2015).

### 2.3. Coleta de Dados em Campo

A coleta de dados em campo se deu entre os meses de outubro de 2014, quando os primeiros tizius foram avistados na área, e março de 2015, após o último ninho encontrado ter sido abandonado. No período em que os machos ainda não haviam estabelecido território, durante os primeiros três meses de coleta de dados, os esforços de campo se concentraram na captura de adultos com redes de neblina três vezes por semana. Os indivíduos capturados foram marcados com uma combinação única de anilhas coloridas e seus dados posteriormente incluídos no banco de dados do Laboratório de Comportamento Animal (UnB). A partir do início de janeiro, quando os machos começaram a executar os displays, cada território foi monitorado por aproximadamente 30 minutos e os poleiros utilizados para display foram marcados com fitas coloridas para facilitar a identificação das áreas que poderiam conter ninhos ao longo da estação reprodutiva. Quando identificada a presença de uma fêmea pareada com o macho, o território era monitorado pelo menos a cada dois dias.

A busca por ninhos se deu de forma ativa e a localização de cada ninho foi marcada com GPS. Para cada ovo encontrado, foram medidos em campo o máximo comprimento e a máxima largura com o uso de um paquímetro eletrônico. Ovos considerados “frescos” (menos de 48 horas de idade; ver parágrafo seguinte) foram coletados e posteriormente congelados a -20°C para análise de hormônios, sendo substituídos por ovos falsos para estimular a continuação da postura pela fêmea. Os mesmos foram retirados quando constatado que não houve postura nos últimos dois dias de monitoramento. Os ovos falsos foram confeccionados

com massa de epóxi e pintados com tinta acrílica no mesmo padrão de manchas que um ovo real (Figura 2). Para determinar a idade dos ovos, foram utilizados dois ninhos fora da área de estudo, cujas datas de postura eram previamente conhecidas, como piloto para adaptar o método utilizado por Westerkov (1950). Os ovos-teste foram mergulhados em um recipiente com água uma vez por dia durante todo o período de incubação, e a sua posição na coluna d'água foi fotografada (Figura 3). Ovos com menos de 48 horas desde a postura (Figura 3a) afundaram completamente e permaneceram em posição horizontal, sendo considerados como frescos. Entre o 3º e 4º dias de incubação, os ovos permaneceram no fundo do recipiente, porém em posição vertical (Figura 3b). A partir do 5º dia de incubação, os ovos passaram a flutuar em uma posição vertical (Figura 3c) que se manteve nos dias seguintes. Os ninhos cujos ovos não foram coletados continuaram a ser monitorados diariamente para a coleta de dados com os filhotes. A idade dos filhotes foi contada a partir do dia em que o primeiro filhote eclodiu (dia 1). Nos dias 3 e 7, foram medidos para cada filhote o peso, com uma pesola de 10g, e o comprimento do tarso, com paquímetro eletrônico.



**Figura 2: Comparação de um ovo real (acima) com um ovo falso de epóxi (abaixo).**



**Figura 3: Método para estimar a idade do ovo a partir de sua posição na coluna d'água (Westerkov 1950). (a) Menos de 48 horas: ovo afundado em posição horizontal. (b) 3 dias: ovo afundado em posição vertical. (c) 4 a 10 dias: ovo boiando em posição vertical.**

No início do mês de março foi feita uma estimativa da disponibilidade de alimento em cada território, com um procedimento baseado no utilizado por Dias e Macedo (2011). Esse procedimento foi feito apenas após o abandono do último ninho ativo encontrado para evitar a possibilidade de abandono do ninho pelos pais. Um quadrante de 1mx1m feito com canos de PVC foi utilizado como parcela. Para cada ninho, foram utilizadas três parcelas de 1 m<sup>2</sup>, uma obrigatoriamente com o ninho como centro, e as outras duas na direção de dois pontos cardeais escolhidos aleatoriamente, a um metro da parcela central. Dentro de cada parcela, foi contabilizado o número de varas de gramíneas que continham colmos de sementes ou vestígios de produção de sementes (e.g. colmos secos). Em todas as parcelas medidas, a espécie de gramínea predominante foi *Urochloa* sp.

#### 2.4. Extração de Hormônios em Laboratório

Os ovos previamente congelados foram pesados e suas cascas foram retiradas. Foram então deixados em temperatura ambiente para descongelar até que a gema pudesse ser separada da clara. As gemas, então, foram pesadas e novamente congeladas em tubos de eppendorf até o momento da análise da concentração de testosterona, que foi feita em parceria com o Laboratory of Behavioral Endocrinology, encabeçado pelo Dr. Diego Gil (Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid), na Espanha.

As gemas foram descongeladas e seu conteúdo misturado com uma espátula para garantir que a concentração de andrógenos se igualasse por toda a amostra. Para cada gema, uma amostra variando entre 80 e 120 mg foi separada e pesada em uma balança de precisão, e posteriormente diluída em 1 ml de água destilada em um tubo de ensaio. As amostras diluídas resultantes foram homogeneizadas em um vórtex até que a gema se dissolvesse por completo (aproximadamente uma hora), após o qual foram novamente congeladas até a continuação da análise. Em cada amostra, foram adicionados 4 ml de uma solução de éter (30% éter petróleo e 70% éter dietílico) e as novas misturas foram homogeneizadas em vórtex por cinco minutos e colocadas em uma centrífuga pré-resfriada a 4°C em velocidade média (3.0 G) por cinco minutos. Depois de centrifugadas, as amostras foram depositadas em um banho de propanol com gelo seco (-20°C) para que a parte não desejada do material congelasse no

fundo do tubo, enquanto que o material em suspensão foi separado em um segundo tubo de ensaio e deixado em um banho de água quente a 50°C para evaporar durante aproximadamente 30 minutos. Para garantir a eficiência da extração, esse processo de diluição em éter até a fase do banho de propanol foi repetido para a primeira série de tubos, sendo o material em suspensão novamente separado nos mesmos tubos de ensaio que foram deixados no banho de água quente. Quando a segunda série de tubos evaporou completamente (cerca de uma hora), foi adicionado a cada tubo 1 ml de etanol 90% e as amostras foram homogeneizadas em vórtex e congeladas a -20°C por uma noite. Posteriormente, as novas amostras foram colocadas na centrífuga pré-resfriada (4°C) por 10 minutos. O material decantado foi novamente separado do material em suspensão, que foi transferido para um terceiro tubo de ensaio. O etanol das amostras da terceira série de tubos foi evaporado com o auxílio de uma máquina de secagem por hélio durante 30 minutos. O material restante foi diluído em 500µl de buffer (*steroid free serum*, Diagnostics Biochem Canada) e homogeneizado em vórtex por 5 minutos. A concentração de testosterona foi determinada a partir de enzima-imunoensaio (ELISA, Diagnostics Biochem Canada, Ontario, Canadá).

## 2.5. Variáveis Utilizadas e Análises Estatísticas

Os valores de máximo comprimento (L) e máxima largura do ovo (B) foram transformados em uma única medida de volume (V), de acordo com a fórmula de Hoyt (1979):

$$V = (0.51) \times LB^2$$

sendo 0.51 um coeficiente de volume generalizado para a maioria das espécies (Hoyt, 1979). Para os filhotes, foi criada uma variável de qualidade do filhote com os dados obtidos no terceiro dia pós-eclosão, dividindo o peso pelo comprimento de tarso de cada filhote (índice peso/tarso). Dados coletados no sétimo dia a partir da data de eclosão foram desconsiderados devido ao baixo tamanho amostral (N=4). Para excluir as variáveis que não eram independentes entre si (e.g. variáveis de ovos ou filhotes de um mesmo ninho), foi feita uma média entre os componentes de cada ninho. Para a disponibilidade de alimento, foi usada uma média das três medidas para cada ninho (média de colmos).

Todas as análises foram feitas no software R (R Core Team 2015). Para testar a primeira predição, foram feitos (1) um modelo linear simples com a média dos colmos e a média do volume do ovo, e (2) um modelo linear simples com a média dos colmos e a média do peso do ovo usando a função *varFixed* (pacote *nlme*, Pinheiro et al. 2015) para ajustar a heterocedasticidade dos resíduos. Para o teste da predição 2, foram feitos dois modelos lineares simples com a média de colmos, um utilizando a média do peso da gema e o outro a média da concentração de testosterona. O modelo linear utilizado para a predição 3 não convergiu devido ao baixo N amostral de ninhos com um (N=4) ou três (N=3) ovos, então os ninhos foram separados em categorias de acordo com o tamanho da ninhada (um, dois ou três ovos) e foi feita uma média geral para cada categoria. Para o teste da quarta predição, foi feito um modelo linear simples com a média do índice peso/tarso do filhote e a média de colmos

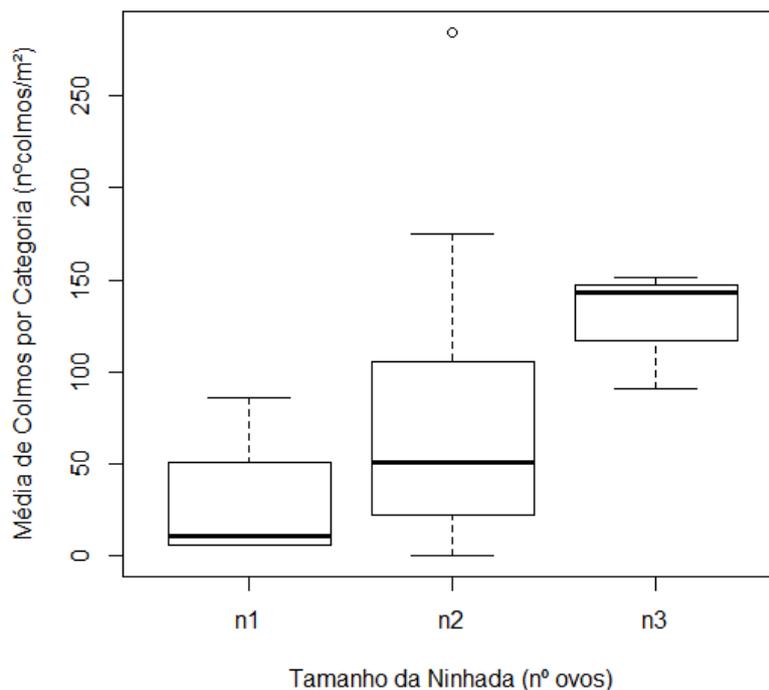
para cada ninho. Para os testes da quinta e sexta predições, foram feitos dois modelos mistos cada, um para o volume do ovo e outro para o peso total do ovo, utilizando o ninho como fator aleatório e o intercepto aleatório. Volume e peso do ovo não foram inseridos em um mesmo modelo porque estão correlacionados (correlação de Pearson:  $R=0.9500$ ,  $p<0.0100$ ). Por fim, para o teste da predição 7, foi feito um modelo linear simples com o log da média do índice peso/tarso dos filhotes e a média do volume dos ovos de cada ninho usando função *varFixed* (pacote *nlme*, Pinheiro et al. 2015) para ajustar a heterocedasticidade dos dados.

### 3. Resultados

Um resumo dos valores encontrados para cada variável se encontra na Tabela 1. O primeiro ninho ativo foi encontrado no dia 15 de janeiro de 2015 e o último ninho ativo foi encontrado em 03 de março do mesmo ano. Foram encontrados 47 ninhos, dos quais 40 foram utilizados nesse estudo. Dos 40 ninhos, a maioria apresentou uma ninhada de dois ovos ( $N=31$ ; 77,5%), e uma menor parte apresentou três ovos ( $N=3$ ; 7,5%) ou apenas um ovo ( $N=4$ ; 10%), totalizando 75 ovos. A média de colmos para cada tamanho de ninhada está ilustrada na Figura 4. Apenas 63 dos 75 ovos tiveram o comprimento e largura medidos em campo. Dois ninhos (5%) foram encontrados já com filhotes e 15 ninhos (37,5%) tiveram seus ovos coletados ( $N=28$  ovos) para análise de hormônios. Dos 18 ninhos (40%) que chegaram à fase de eclosão, seis (15%) apresentaram um ovo inviável e apenas 12 (30%) ninhos sobreviveram até o terceiro dia após a eclosão, totalizando assim 20 filhotes cujos dados foram coletados. Os parâmetros de um ninho foram desconsiderados devido à incerteza da idade dos filhotes, sendo apenas 18 filhotes utilizados nas análises.

Variável	N amostral	Média±Desvio Padrão
Máximo Comprimento do Ovo	63	16.64±1.14 mm
Máxima Largura do Ovo	63	12.45±0.48 mm
Volume do Ovo	63	1319.34±149.73 mm <sup>3</sup>
Peso Total do Ovo	29	1.49±0.16 g
Peso da Gema	28	0.32±0.04 g
Concentração de Testosterona (T)	27	6.79±3.23 pg T/mg gema
Comprimento do Tarso do Filhote (dia 3)	18	8.02±0.99 mm
Peso Total do Filhote (dia3)	18	3.40±0.76 g
Índice de Qualidade do Filhote (peso/tarso)	18	0.43±0.11 g/mm
Média de Colmos por Território	40	71.58±64.83 colmos/m <sup>2</sup>

**Tabela 1: Variáveis medidas durante o estudo e seus respectivos N amostrais, médias e desvios padrão.**



**Figura 4: Média de colmos por categorias divididas de acordo com o tamanho de ninhada: um ovo (n1; N=4,  $\bar{x}$ =28.58±38.53), dois ovos (n2; N=31,  $\bar{x}$ =70.72±65.77) e três ovos (n3; N=3,  $\bar{x}$ =128.56±32.50).**

Em oposição às predições 1, 2 e 4, não foi encontrada relação entre a média de colmos por território e as médias das variáveis de volume total do ovo (N=32; coeficiente=0.02506±0.04, p=0.9840), peso total do ovo (N=15; coeficiente=0.00054±0.00, p=0.4526), peso da gema (N=15; coeficiente=0.00003±0.00, p=0.823), concentração de testosterona (N=15; coeficiente=-0.00005±0.00, p=0.4526) e índice peso/tarso do filhote (N=11, coeficiente=0.00059±0.00, p=0.328). Ao passo que o peso da gema é proporcional ao volume (N=28; coeficiente=0.00013±0.00, p=0.0031) e ao peso total (N=28; coeficiente=0.17290±0.04, p=0.0010) do ovo (Figura 5), como o esperado da predição 5. A concentração de testosterona (predição 6) não está relacionada com o volume (N=28; coeficiente=0.76985±4.71, p=0.8726) ou com o peso (N=28; coeficiente=2.41007±5.73, p=0.6450) do ovo. Por fim, a relação entre o índice peso/tarso do filhote e o volume do ovo (predição 7) não foi significativa (N=9; coeficiente=0.00047±0.00, p=0.3195).

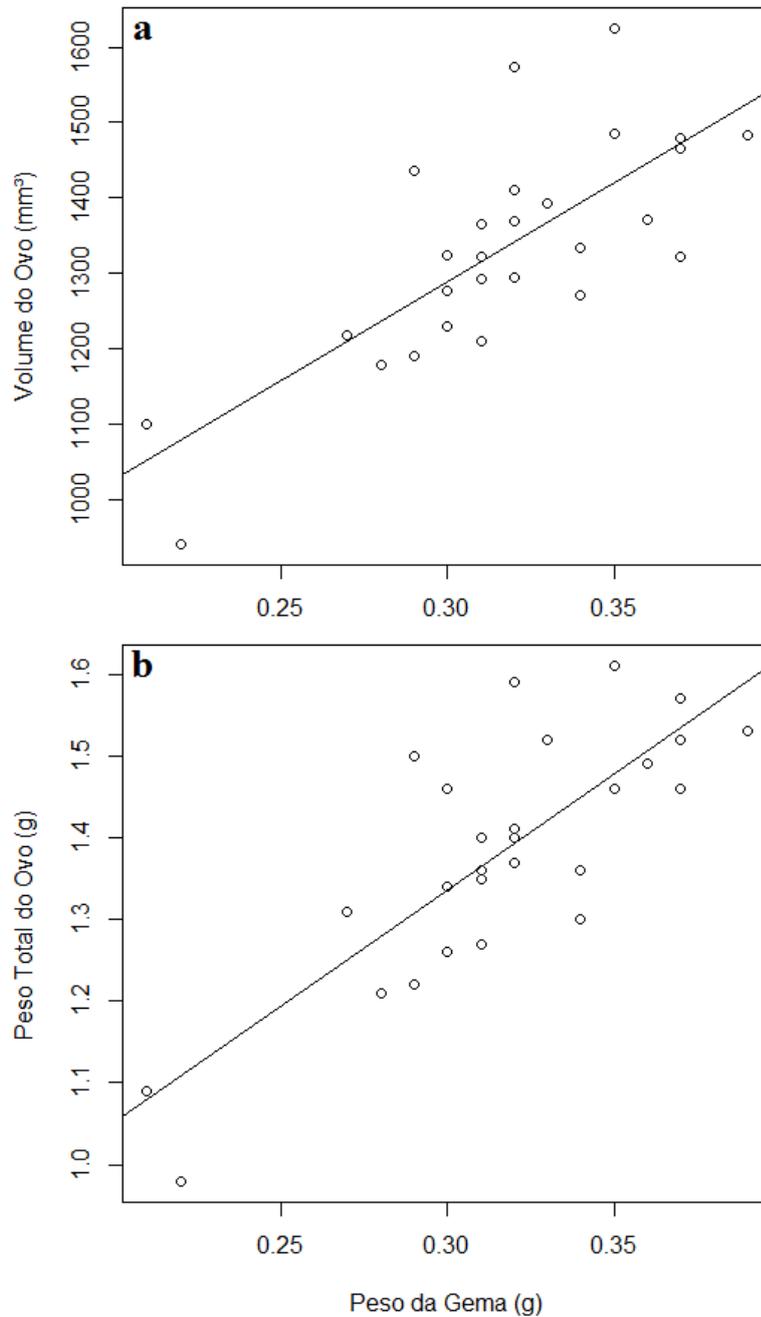


Figura 5: Peso da gema em relação ao volume (a) e peso total (b) do ovo de *V. jacarina*.

#### 4. Discussão

O fenótipo e o *fitness* dos filhotes estão sujeitos à influência do fenótipo da mãe através dos chamados “efeitos maternos” (Räsanen e Kruuk 2007) que, por sua vez, podem ser moldados pelas condições ambientais vivenciadas pela mãe (Mousseau e Fox (1998). Por exemplo, Gil et al. (2004a) manipularam o tamanho da ninhada em que fêmeas de *Taeniopygia*

*guttata* cresceram, gerando condições estressantes, e mostraram que tal estresse durante os primeiros estágios de vida de fêmeas pode influenciar sua subsequente capacidade em investir na reprodução. Fêmeas que vieram de ninhadas maiores e, portanto, mais estressantes, depositaram menos testosterona em seus ovos do que as fêmeas que cresceram em ninhadas menores (Gil et al. 2004a). Além de condições estressantes nos primeiros estágios de vida, outro fator ambiental que potencialmente influencia a capacidade das fêmeas em investir na reprodução e que vem sendo amplamente estudado é a disponibilidade de alimento (revisado em Martin 1987).

No presente estudo, não foram encontradas evidências de que a disponibilidade de alimento pode ser um fator limitante na produção de ovos pelas fêmeas de tizius, uma vez que não foi encontrada relação entre a média de colmos e o volume, peso total, peso da gema e concentração de testosterona nos ovos. Em um estudo envolvendo a comparação entre pares de tizius suplementados com sementes e pares não suplementados, Dias e Macedo (2011) encontraram evidências sugerindo que uma maior abundância de sementes pode afetar o investimento reprodutivo. No entanto, nesse mesmo trabalho sugerem que a predação pode ser uma pressão seletiva maior do que a disponibilidade de alimento para a espécie. A predação de ninhos nos trópicos pode chegar a mais de 80% (revisado em Stutchbury e Morton 2001) e altas taxas de predação foram registradas para tizius (71%, Aguilar et al. 2008a) na mesma área que o presente estudo, o que favorece a hipótese da predação como a pressão seletiva mais importante para os tizius. Durante o estudo, espécies de aves conhecidamente predadoras de ninhos (gralha-do-campo, *Cyanocorax cristatellus*, e anú-preto, *Crotophaga ani*) eram vistas quase que diariamente em áreas contendo ninhos de tiziu ativos (obs. pessoal). Ainda que fêmeas investissem mais em seus ovos em territórios melhores, a conspicuidade do display dos machos poderia anular o esforço reprodutivo diferencial das fêmeas ao aumentar a probabilidade de detecção do ninho por predadores orientados visualmente (Dias et al. 2010). Machos de tizius em territórios suplementados exibiram uma maior taxa de comportamentos agonísticos – aumentando o grau de atividade do macho, portanto – e os ninhos dos territórios suplementados sofreram maiores taxas de predação do que os ninhos não suplementados (Dias e Macedo 2011). As altas taxas de predação também podem explicar por que não foram encontradas evidências de que a disponibilidade de alimento influencia a qualidade dos filhotes. A hipótese de que a predação de ninhos aumenta com a atividade parental foi primeiramente proposta por Skutch (1949) e desde então tem recebido evidências favoráveis (e.g. Martin et al. 2000). É possível que fêmeas em territórios melhores não tenham aumentado a taxa de visitação ao ninho para evitar predação, apesar de evidências sugerirem o contrário em outro estudo (Dias e Macedo 2011).

É importante salientar, entretanto, que o período do estudo foi marcado pelos efeitos do El Niño, que provocaram um atraso nas chuvas e, potencialmente, uma redução na disponibilidade de alimento durante as primeiras semanas da estação reprodutiva (obs. pessoal), o que poderia limitar igualmente o investimento reprodutivo de todas as fêmeas. Dias e Macedo (2011) relataram que o grupo de tizius suplementado teve ninhadas maiores do que

o grupo não suplementado, o que sugere um investimento reprodutivo maior por parte das fêmeas em territórios com mais disponibilidade de alimento. Apesar do número amostral baixo de ninhos com três ovos não ter permitido uma comparação estatística, os dados do presente estudo parecem seguir a tendência de que as fêmeas aumentam o tamanho da ninhada de acordo com a qualidade do território e o baixo número de ninhos com três ovos encontrados pode ser uma evidência dessa limitação geral na qualidade dos territórios. Além disso, em mais de uma ocasião foi observado mais de um casal forrageando na mesma área (obs. pessoal), o que pode indicar que as fêmeas se alimentam fora dos territórios defendidos pelos seus respectivos machos pareados. Os territórios suplementados no estudo de Dias e Macedo (2011) receberam mais visitas de fêmeas do que territórios não suplementados, o que sugere que fêmeas podem ter acesso ao recurso de territórios melhores e, portanto, a sua capacidade em investir na reprodução não refletiria necessariamente a disponibilidade de recursos do território onde o ninho se encontra. O presente estudo também se limitou a estimar a disponibilidade de alimento a partir de sementes de gramíneas, mas foram observados pais alimentando os filhotes com insetos (obs. pessoal) e essa fonte adicional de nutrientes pode ser crucial no desenvolvimento dos filhotes.

As características dos ovos podem não ter sido influenciadas pela disponibilidade de alimento no ambiente e a predação pode ser o fator que melhor explica o investimento reprodutivo da fêmea. No entanto, devem existir outros fatores, intrínsecos (idade, tamanho corporal, endoparasitas) ou extrínsecos (contexto social e qualidade do macho) à qualidade da fêmea, que também podem influenciar seu investimento na reprodução. De forma geral, o desempenho reprodutivo das aves melhora com a idade (revisado em Forslund e Pärt 1995). Em algumas espécies de aves marinhas, fêmeas mais velhas produziram ovos maiores até aproximadamente oito (Davis 1975) e nove (Furness 1983) anos de idade, enquanto que em um estudo com *Sturnus vulgaris*, fêmeas mais velhas depositaram mais andrógenos em seus ovos do que fêmeas de um ano de idade (Pilz et al. 2003). Não há estudos que indiquem o tempo médio de sobrevivência do tiziu, mas existe evidência de uma recaptura ocorrida em 2015 de um adulto que havia sido anilhado na estação reprodutiva de 2010 (P. de Moraes, comunicação pessoal: Laboratório de Comportamento Animal, UnB), indicando que o tiziu pode viver mais do que cinco anos. Tal evidência sugere que na história de vida da espécie seja possível um indivíduo se engajar em várias tentativas reprodutivas e adquirir experiência com a reprodução ao longo dos anos. Alternativamente, o tamanho dos ovos pode diminuir com o aumento da idade (Swennen e Van der Meer 1992).

A existência de uma relação entre a condição corporal da fêmea (tamanho e massa) e qualidade do ovo é bastante polêmica e de forma geral a condição corporal da fêmea parece explicar muito pouco da variação intraespecífica no tamanho do ovo (Christians 2002). No entanto, alguns estudos foram bem sucedidos em detectar tal relação. Por exemplo, Dufva (1996) relatou que fêmeas menores puseram ovos menores independentemente da quantidade de parasitas sanguíneos nas fêmeas. Além disso, fêmeas com menor tamanho corporal podem ser mais propensas a abandonar o ninho (Smith et al. 1993). Parasitas intestinais também

prejudicam a condição corporal e o display de machos de tiziu (Costa e Macedo 2005, Aguilar et al. 2008b), mas ainda não há estudos que avaliem o efeito de endoparasitas na condição corporal e investimento reprodutivo da fêmea. Fêmeas mais infectadas com endoparasitas podem produzir ovos (Dufva 1996) e ninhadas (Marzal et al. 2005) menores, apesar de nem sempre ser esse o caso (Sanz et al. 2001).

O contexto social da fêmea pode influenciar o quanto ela investe na reprodução. Evidências de que o contexto social influencia características sexuais (plumagem nupcial) dos machos de tizius já foram documentadas (Maia et al. 2012) e a possibilidade de influenciar também o investimento reprodutivo das fêmeas é alta, visto que os tizius se distribuem em territórios altamente agrupados (Dias et al. 2009) e o sucesso reprodutivo varia de acordo com a distância entre os ninhos (Aguilar et al. 2008a, Dias et al. 2009). De forma geral, estudos têm encontrado uma correlação positiva entre densidade social e alocação de andrógenos nos ovos (revisado em Groothuis et al. 2005). Interações sociais podem aumentar a produção de testosterona na fêmea e esse aumento se refletiria na concentração de testosterona do ovo, mas a vantagem dessa alocação diferencial não é clara em espécies altriciais (Groothuis et al. 2005). Além de fatores diretamente relacionados à fêmea, a qualidade dos machos pode influenciar a alocação de recursos da fêmea na reprodução. Machos mais atraentes podem produzir prole de melhor qualidade genética ou promover à fêmea mais vantagens na forma de territórios de melhor qualidade ou cuidado parental (Møller e Thornhill 1998). Portanto, fêmeas podem elevar suas chances de obter sucesso reprodutivo ao produzir ovos maiores (Cunningham e Russell 2000), ninhadas maiores (Alonso-Alvarez et al. 2012) ou depositar maiores quantidades de nutrientes nos ovos (Gil et al. 1999, Gil et al. 2004b, Safran et al. 2008, Garcia-Fernandez et al. 2010) quando pareadas com machos de melhor qualidade (revisado em Sheldon 2000). Alternativamente, fêmeas também podem alocar mais recursos nos ovos para compensar atributos que indicam baixa qualidade do macho, tais como baixa resistência a parasitas (Saino et al. 2002) e baixa viabilidade da prole (Bluhm e Gowaty 2004).

O tiziu é uma espécie com alto dimorfismo sexual durante a estação reprodutiva, quando os machos adquirem uma plumagem negro-azulada e executam displays elaborados para atrair fêmeas (Sick 1977), o que sugere que os machos estão sujeitos à seleção sexual pelas fêmeas. Apesar de alguns estudos não terem encontrado evidências de que fêmeas selecionam machos a partir de traços morfológicos (Carvalho et al. 2006, Aguilar et al. 2008b), é possível que as fêmeas invistam mais na reprodução não em relação aos machos com quem pareiam durante a estação reprodutiva, mas em relação aos machos extra-par. A existência dessa hipótese é justificada pela alta taxa de cópulas extra-par em tizius (63% dos ninhos; Carvalho et al. 2006).

No presente estudo, foi estabelecida uma correlação positiva entre parâmetros externos (volume e peso) e o peso do conteúdo interno (gema) do ovo, mas não à qualidade (concentração de testosterona), o que corrobora os resultados de outros estudos (e.g. Pilz et al. 2003, Safran et al. 2008). A alocação diferencial de hormônios independente do tamanho do ovo sugere que características externas do ovo nem sempre refletem o real investimento da

fêmea no mesmo. No presente estudo, foi encontrada uma alta variação na alocação de testosterona entre ninhadas de fêmeas diferentes, traço particularmente notável em Passeriformes (Gil 2008). A deposição de testosterona nos ovos é custosa para as fêmeas (Gil et al. 1999) e a alta variação na concentração de testosterona entre as fêmeas pode indicar que existe algum fator influenciando a alocação diferencial de recursos para os ovos. Em uma extensa revisão sobre o papel dos hormônios nos ovos das aves, Gil (2008) enumera uma variedade de fatores que podem influenciar a deposição de andrógenos nos ovos pela fêmea, tais como os já citados acima para explicar o investimento geral da fêmea na reprodução (e.g. qualidade da fêmea, contexto social e qualidade do macho). É preciso, entretanto, avaliar não só os fatores que podem levar a fêmea a depositar mais ou menos andrógenos nos ovos, mas também as consequências da concentração maior ou menor de testosterona nos filhotes.

Enquanto que a testosterona pode diminuir o tempo de incubação e aumentar as taxas de crescimento, *begging* e sobrevivência dos filhotes, dentre outros fatores, o sistema imune pode ficar comprometido (revisado em Gil 2008), gerando um *trade-off* entre níveis de testosterona e imuno-competência. Nesse sentido, a estratégia de vida das fêmeas pode ser essencial na modulação do fenótipo da prole de acordo com as forças seletivas do ambiente para cada espécie, pois os efeitos da concentração de testosterona vão depender das condições ambientais (competição, disponibilidade de alimento, endoparasitas) após a eclosão dos filhotes (Gil 2008). Se a predação de ninhos for a maior pressão seletiva atuando sobre os tizius, pode-se esperar que (1) as fêmeas alocarão mais testosterona em seus ovos para acelerar o crescimento dos filhotes, uma vez que os filhotes saem mais rápido do ninho quando sujeitos a altas taxas de predação (Remeš e Martin 2002), ou (2) as fêmeas alocarão menos testosterona em seus ovos para diminuir a frequência de *begging* dos filhotes, atraindo menos atenção dos predadores. Além disso, durante o período do estudo, foram observados vários filhotes parasitados por bernes (obs. pessoal), o que pode favorecer uma menor deposição de andrógenos nos ovos pelas fêmeas para que o efeito imunossupressor da testosterona não diminua drasticamente a taxa de sobrevivência dos filhotes. Alternativamente às consequências da alocação de testosterona na prole, as fêmeas podem modular a concentração de testosterona nos ovos em função do custo do cuidado parental dos filhotes, uma vez que altas concentrações de testosterona podem aumentar o grau de atividade dos filhotes (Müller et al. 2007).

Por fim, não foi encontrada uma relação entre a qualidade (volume) do ovo e a qualidade (índice peso/tarso) do filhote, mas o baixo tamanho amostral (N=9) utilizado nas análises estatísticas não é suficiente para uma conclusão definitiva. Ovos maiores são frequentemente associados a maiores taxas de eclosão, peso, crescimento e sobrevivência dos filhotes e várias revisões ao longo dos anos têm compilado resultados semelhantes ou pelo menos parciais em relação a esses parâmetros (e.g. Martin 1987, Wilson 1991, Christians 2002, Krist 2011), mas outros fatores podem ser mais relevantes na qualidade dos filhotes, como por exemplo, a concentração de testosterona, discutida no parágrafo acima, o cuidado parental e a infestação de parasitas na mãe. Meathrel et al. (1993) demonstraram que o

cuidado parental pode ser mais importante do que tamanho do ovo e condição corporal dos pais em uma espécie de ave marinha. Porém, em experimentos com redução experimental de parasitas sanguíneos em Passeriformes, a condição corporal da mãe foi benéfica para os filhotes, com fêmeas menos parasitadas tendo ninhadas com maiores taxas de eclosão, saída dos filhotes do ninho (Marzal et al. 2005, Knowles et al. 2010) e provisão de alimento aos filhotes (Knowles et al. 2010). Como mencionado na discussão anteriormente, não há estudos que avaliem o efeito de endoparasitas na condição corporal da fêmea, mas Aguilar et al. (2007) encontraram uma taxa muito maior de infestação por parasitas intestinais nas fêmeas do que nos machos. Esses parasitas intestinais comprometem a condição corporal dos machos (Costa e Macedo 2005, Aguilar et al. 2008b), então é provável que o maior número de parasitas intestinais encontrados nas fêmeas também afetem a condição corporal das mesmas.

Em suma, não foram encontradas evidências substanciais que indiquem uma limitação na capacidade da fêmea em investir na reprodução a partir da disponibilidade de alimento no ambiente. Fatores que não foram considerados nesse trabalho, tais como a atenção ao ninho e a importância dos insetos na alimentação dos filhotes, podem fornecer mais pistas sobre a influência da disponibilidade de alimento no investimento reprodutivo de tizius. É possível, ainda, que a disponibilidade de alimento no ambiente não afete diretamente o investimento reprodutivo dessa espécie, mas se avaliada junto ao risco de predação, possa exercer uma influência maior do que a esperada se esses dois fatores fossem avaliados separadamente (e.g. Zanette et al. 2006).

Em contrapartida aos resultados obtidos na avaliação da influência da disponibilidade de alimento no ambiente, a alta variação na concentração de testosterona entre as fêmeas abre muitas possibilidades, não só em relação aos fatores que influenciam o investimento reprodutivo da fêmea, como também às consequências do investimento diferencial para a sobrevivência e *fitness* da prole. Para a primeira opção – as *causas* do investimento diferencial entre fêmeas –, o tiziu apresenta uma série de características que podem ser determinantes na quantidade de recursos alocada para a reprodução pela fêmea. Uma delas é o alto grau de agrupamento de territórios durante a estação reprodutiva: como as fêmeas se comportam diante de mais ou menos interações com outros membros da espécie, e como interações sociais influenciam seu investimento reprodutivo? Outra característica da espécie que também fornece perguntas interessantes é a qualidade não só do macho com quem as fêmeas formam pares socialmente monogâmicos durante a estação reprodutiva, como também a qualidade do macho com quem as fêmeas se engajam em cópulas extra-par. Como a fêmea seleciona ambos os machos, se há de fato uma seleção por parte da fêmea, e qual é a relevância de ambos os machos no investimento reprodutivo da mesma? Para a segunda opção – as *consequências* do investimento diferencial entre fêmeas –, é preciso primeiramente avaliar os efeitos de diferentes concentrações de testosterona diretamente nos filhotes e como esses efeitos interagem diante de outros fatores ambientais (e.g. como endo- e ectoparasitismo) antes de verificar as consequências a longo prazo. De qualquer forma, ainda há muito o que se considerar para estudos futuros envolvendo o investimento de fêmeas de tizius na reprodução.

## 5. Referências

- Aguilar, T.M., R.I. Dias, A.C. Oliveira, and R.H. Macedo. 2008a. Nest-site selection by Blue-black Grassquits in a Neotropical savanna: do choices influence nest success? *Journal of Field Ornithology* 79:29-31.
- Aguilar, T.M., R. Maia, E.S.A. Santos, and R.H. Macedo. 2008b. Parasite levels in blue-black grassquits correlate with male displays but not female mate preference. *Behavioral Ecology* 19:292-301.
- Almeida, J.B., and R.H. Macedo. 2001. Lek-like mating system of the monogamous Blue-black Grassquit. *The Auk* 118:404-411.
- Alonso-Alvarez, C., L. Pérez-Rodríguez, M.E. Ferrero, E.G. de Blas, F. Casas, and F. Mougeot. 2012. Adjustment of female reproductive investment according to male carotenoid-based ornamentation in a gallinaceous bird. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 66:731-742.
- Bateman, A.J. 1948. Intra-sexual selection in *Drosophila*. *Heredity* 2: 349-368.
- Bivand, R., T. Keitt, and B. Rowlingson. 2015. rgdal: Bindings for the Geospatial Data Abstraction Library. R package version 0.9-2. URL <http://CRAN.R-project.org/package=rgdal>.
- Bluhm, C. K., and P.A. Gowaty. 2004. Reproductive compensation for offspring viability deficits by female mallards, *Anas platyrhynchos*. *Animal Behaviour* 68:985-992.
- Bolton, M., D. Houston, and P. Monaghan. 1992. Nutritional constraints on egg formation in the Lesser Black-Backed Gull: An experimental study. *Journal of Animal Ecology* 61:521-532.
- Carvalho, C.B.V., R.H. Macedo, and J.A. Graves. 2006. Breeding strategies of a socially monogamous Neotropical passerine: extra-pair fertilizations, behavior and morphology. *The Condor* 108:579-590.
- Carvalho, C.B.V., R.H. Macedo, and J.A. Graves. 2007. Reproduction of Blue-black Grassquits in central Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 67:275-281.
- Christians, J.K. 2002. Avian egg size: variation within species and inflexibility within individuals. *Biological Reviews* 77:1-26.
- Costa, F.J.V., and R.H. Macedo. 2005. Coccidian oocyst parasitism in the blue-black grassquit: influence on secondary sex ornaments and body condition. *Animal Behaviour* 70:1401-1409.
- Cunningham, E.J.A., and A.F. Russell. 2000. Egg investment is influenced by male attractiveness in the mallard. *Nature* 404:74-77.
- Davis, J.W.F. 1975. Age, egg-size and breeding success in the Herring Gull *Larus argentatus*. *Ibis* 117:460-473.
- De Neve, L., J.J. Soler, M. Soler, T. Pérez-Contreras, M. Martín-Vivaldi, and J.G. Martínez. 2004. Effects of a food supplementation experiment on reproductive investment and a post-mating sexually selected trait in magpies *Pica pica*. *Journal of Avian Biology* 35:246-251.

- Dias, R.I., L. Castilho, and R.H. Macedo. 2010. Experimental evidence that sexual displays are costly for nest survival. *Ethology* 116:1001-1019.
- Dias, R.I., M. Kuhlmann, L.R. Lourenço, and R.H. Macedo. 2009. Territorial clustering in the Blue-black Grassquit: reproductive strategy in response to habitat and food requirements? *The Condor* 111:706-714.
- Dias, R.I., and R.H. Macedo. 2011. Nest predation versus resources in a Neotropical passerine: constraints of the food limitation hypothesis. *Ornis Fennica* 88:30-39.
- Djerdali, S., F.S. Tortosa, L. Hillstrom, and S. Doumandji. 2008. Food supply and external cues limit the clutch size and hatchability in the White Stork *Ciconia ciconia*. *Acta Ornithologica* 43:145-150.
- Dufva, R. 1996. Blood parasites, health, reproductive success, and egg volume in female Great Tits *Parus major*. *Journal of Avian Biology* 27:83-87.
- Forslund, P., and T. Pärt. 1995. Age and reproduction in birds – hypotheses and tests. *Trends in Ecology & Evolution* 10:374-478.
- Furness, R.W. 1983. Variations in size and growth of Great skua *Catharacta skua* chicks in relation to adult age, hatching date, egg volume, brood size and hatching sequence. *Journal of Zoology* 199:101-116.
- Garcia-Fernandez, V., B. Guasco, A. Tanvez, A. Lacroix, M. Cucco, G. Leboucher, and G. Malacarne. 2010. Influence of mating preferences on yolk testosterone in the Gray Partridge. *Animal Behaviour* 80:45-49.
- Gasparini, J., T. Boulinier, V.A. Gill, D. Gil, S.A. Hatch, and A. Roulin. 2007. Food availability affects the maternal transfer of androgens and antibodies into eggs of a colonial seabird. *Journal of Evolutionary Biology* 20:874-880.
- Gil, D. 2008. Hormones in avian eggs: physiology, ecology and behavior. *Advances in the Study of Behavior* 38:337-398.
- Gil, D., J. Graves, N. Hazon, and A. Wells. 1999. Male attractiveness and differential testosterone investment in Zebra Finch eggs. *Science* 286:126-128.
- Gil, D., C. Heim, E. Bulmer, M. Rocha, M. Puerta, and M. Naguib. 2004a. Negative effects of early developmental stress on yolk testosterone levels in a passerine bird. *The Journal of Experimental Biology* 207:2215-2220.
- Gil, D., G. Leboucher, A. Lacroix, R. Cue, and M. Kreuzera. 2004b. Female canaries produce eggs with greater amounts of testosterone when exposed to preferred male song. *Hormones and Behavior* 45:64-70.
- Groothuis, T.G.G., W. Müller, N. von Engelhardt, C. Carere, and C. Eising. 2005. Maternal hormones as a tool to adjust offspring phenotype in avian species. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 29:329-352.

- Harrison, T.J.E., J.A. Smith, G.R. Martin, D.E. Chamberlain, S. Bearhop, G.N. Robb, and S.J. Reynolds. 2010. Does food supplementation really enhance productivity of breeding birds? *Oecologia* 164:311-320.
- Hayward, A., and J.F. Gillooly. 2011. The cost of sex: quantifying energetic investment in gamete production by males and females. *PLoS ONE* 6: 4 pp.
- Hijmans, R.J., S. Phillips, J. Leathwick, and J. Elith. 2015. *dismo: Species Distribution Modeling*. R package version 1.0-12. URL <http://CRAN.R-project.org/package=dismo>.
- Högstedt, G. 1981. Effect of additional food on reproductive success in the Magpie (*Pica pica*). *Journal of Animal Ecology* 50:219-229.
- Hoyt, D.F. 1979. Practical methods of estimating volume and fresh weight of bird eggs. *The Auk* 96:73-77.
- Knowles, S.C.L., V. Palinauskas, and B.C. Sheldon. 2010. Chronic malaria infections increase family inequalities and reduce parental fitness: experimental evidence from a wild bird population. *Journal of Evolutionary Biology* 23:557-569.
- Krist, M. 2011. Egg size and offspring quality: a meta-analysis in birds. *Biological Reviews* 86:692-716.
- Maia, R., L. Brasileiro, R.V. Lacava, and R.H. Macedo. 2012. Social environment affects acquisition and color of structural nuptial plumage in a sexually dimorphic tropical passerine. *PLoS ONE* 7: 9 pp.
- Manica, L.T. 2013. Seleção sexual, características sexuais multimodais e cópulas extra-par em tizius (*Volatinia jacarina*). Tese de doutorado, Programa de Pós-graduação em Ecologia, Universidade de Brasília, Brasil.
- Martin, T.E. 1987. Food as a limit on breeding birds: a life-history perspective. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18:453-487.
- Martin, T.E. 1995. Avian life history evolution in relation to nest sites, nest predation, and food. *Ecological Monographs* 65:101-127.
- Martin, T.E. 1996. Life history evolution in tropical and south temperate birds: what do we really know? *Journal of Avian Biology* 27:263-272.
- Martin, T.E. 2004. Avian life-history evolution has an eminent past: does it have a bright future? *The Auk* 121:289-301.
- Martin, T.E., J. Scott, and C. Menge. 2000. Nest predation increases with parental activity: separating nest site and parental activity effects. *Proceedings of the Royal Society of London B* 267:2287-2293.
- Marzal, A., F. de Lope, C. Navarro, and A.P. Møller. 2005. Malarial parasites decrease reproductive success: an experimental study in a passerine bird. *Oecologia* 142:541-545.
- Meathrel, C.E., J.S. Bradley, R.D. Wooller, and I.J. Skira. 1993. The effect of parental condition on egg-size and reproductive success in Short-tailed Shearwaters *Puffinus tenuirostris*. *Oecologia* 93:162-164.

- Moreno, J., E. Lobato, J. Morales, S. Merino, J. Martínez-De La Puente, and G. Tomás. 2008. Pre-laying nutrition mediates maternal effects on offspring immune capacity and growth in the Pied Flycatcher. *Oecologia* 156:727-735.
- Mousseau, T.A., and C.W. Fox. 1998. The adaptive significance of maternal effects. *Trends in Ecology and Evolution* 13:403-407.
- Müller, W., C.K. Lessells, P. Korsten, and N. von Engelhardt. 2007. Manipulative signals in family conflict? On the function of maternal yolk hormones in birds. *The American Naturalist* 169:E84-E96.
- Møller, A.P., and R. Thornhill. 1998. Male parental care, differential parental investment by females and sexual selection. *Animal Behaviour* 55:1507-1515.
- Nager, R.G. 2006. The challenges of making eggs. *Ardea* 94:323-346.
- Nagy, L.R., and R.T. Holmes. 2005. Food limits annual fecundity of a migratory songbird: an experimental study. *Ecology* 86:675-681.
- Nooker, J.K., P.O. Dunn, and L.A. Whittingham. 2005. Effects of food abundance, weather, and female condition on reproduction in Tree Swallows (*Tachycineta bicolor*). *The Auk* 122:1225-1238.
- Pilz, K.M., H.G. Smith, M.I. Sandell, and H. Schwabl. 2003. Interfemale variation in egg yolk androgen allocation in the European Starling: do high-quality females invest more? *Animal Behaviour* 65:841-850.
- Pinheiro, J., D. Bates, S. DebRoy, D. Sarkar, and R Core Team. 2015. nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3.1-120. URL <http://CRAN.R-project.org/package=nlme>.
- R Core Team. 2015. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. URL <http://www.R-project.org/>.
- Ramsay S.L., and D.C. Houston. 1997. Nutritional constraints on egg production in the Blue Tit: a supplementary feeding study. *Journal of Animal Ecology* 66:649-657.
- Räsänen, K., and L.E.B. Kruuk. 2007. Maternal effects and evolution at ecological time-scales. *Functional Ecology* 21:408-421.
- Remeš, V., and T.E. Martin. 2002. Environmental influences on the evolution of growth and developmental rates in passerines. *Evolution* 56:2505-2518.
- Reynolds, S.J., S.J. Schoech, and R. Bowman. 2003. Nutritional quality of prebreeding diet influences breeding performance of the Florida Scrub-jay. *Oecologia* 134:308-316.
- Safran, R.J., K.M. Pilz, K.J. McGraw, S.M. Correa, and H. Schwabl. 2008. Are yolk androgens and carotenoids in Barn Swallow eggs related to parental quality? *Behavioral Ecology and Sociobiology* 62:427-438.

- Saino, N., V. Bertacche, R.P. Ferrari, R. Martinelli, A.P. Møller, and R. Stradi. 2002. Carotenoid concentration in Barn Swallow eggs is influenced by laying order, maternal infection and parental ornamentation. *Proceedings of the Royal Society of London B* 269:1729-1733.
- Sanz, J.J., E. Arriero, J. Moreno, and S. Merino. 2001. Interactions between hemoparasite status and female age in the primary reproductive output of Pied Flycatchers. *Oecologia* 126:339-344.
- Schwabl, H. 1993. Yolk is a source of maternal testosterone for developing birds. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90:11446-11450.
- Sheldon, B.C. 2000. Differential allocation: tests, mechanisms and implications. *Trends in Ecology and Evolution* 15:397-402.
- Sick, H. 1977. *Onitologia Brasileira*. Ed. Nova Fronteira, Rio de Janeiro.
- Simons, L.S., and T.E. Martin. 1990. Food limitation of avian reproduction: an experiment with the Cactus Wren. *Ecology* 71:869-876.
- Skutch, A.F. 1949. Do tropical birds rear as many young as they can nourish? *Ibis* 91:430-455.
- Smith, H.G., U. Ottosson, and T. Ohlsson. 1993. Interclutch variation in egg mass among starlings *Sturnus vulgaris* reflects female condition. *Ornis Scandinavica* 24:311-316.
- Stutchbury, B.J.M., and E.S. Morton. 2001. *Behavioral Ecology of Tropical Birds*. Academic Press, San Diego.
- Swennen, C., and J. Van der Meer. 1992. Variation in egg size of Common Eiders. *Ardea* 80:363-373.
- Verboven, N., P. Monaghan, D.M. Evans, H. Schwabl, N. Evans, C. Whitelaw, and R.G. Nager. 2003. Maternal condition, yolk androgens and offspring performance: a supplemental feeding experiment in the Lesser Black-backed Gull (*Larus fuscus*). *Proceedings of the Royal Society of London B* 270:2223-2232.
- Westerskov, K. 1950. Methods for determining the age of game bird eggs. *The Journal of Wildlife Management* 14:56-67.
- Wilson, H.R. 1991. Interrelationships of egg size, chick size, posthatching growth and hatchability. *World's Poultry Science Journal* 47:5-20.
- Zanette, L., M. Clinchy, and J.N.M. Smith. 2006. Combined food and predator effects on songbird nest survival and annual reproductive success: results from a bi-factorial experiment. *Oecologia* 147:632-640.