

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

E BIOLOGIA MOLECULAR

Produção e percepção da coloração em vertebrados:

três estudos de caso

Josmael Corso

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Genética e Biologia Molecular da UFRGS
como requisito parcial para a obtenção do grau de
Doutor em Ciências (Genética e Biologia Molecular)

Orientador: Prof. Thales Renato Ochotorena de Freitas (UFRGS)

Coorientador: Prof. Nelson Jurandi Rosa Fagundes (UFRGS)

Porto Alegre

Outubro de 2015

Produção e percepção da coloração em vertebrados: três estudos de caso

Josmael Corso

Aprovada por:

Dr. Daniel A. S. Graichen (UFSM)

Membro titular da Banca examinadora

Dr. Rodrigo Ligabue Braun (Centro de Biotecnologia, UFRGS)

Membro titular da Banca examinadora

Dra. Gislene Lopes Gonçalves (Departamento de Genética, UFRGS)

Membro titular da Banca examinadora

Dra. Maria Cátira Bortolini (PPGBM, UFRGS)

Membro titular da Banca examinadora

Porto Alegre, outubro de 2015

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho foi desenvolvido no Departamento de Genética, Laboratório de Citogenética e Evolução Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e no Grupo de Genética Evolutiva do Departamento de Zoologia da Universidade de Cambridge (Inglaterra), contando com o auxílio financeiro de:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS);
- Recursos financeiros da Murray Edwards College.

*À minha família que me oportunizou desfrutar
desse fantástico fenômeno da natureza: a vida*

*À Bruna que me oportunizou compartilhar
desse fantástico fenômeno da natureza: a vida*

Agradecimentos

Embora haja somente um nome nessa tese, ela é em diversas formas produto de esforço colaborativo. Incontável é o número de indivíduos que auxiliaram técnica e emocionalmente na trajetória do doutorado que culmina, em parte, neste material redigido.

Agradeço à natureza por ser fonte inesgotável de admiração e curiosidade.

Ao orientador Thales Renato Ochotorena de Freitas pela oportunidade e liberdade em desenvolver uma pesquisa autoral.

Ao coorientador Nelson Jurandi Rosa Fagundes pela enorme ajuda com tudo, e foi muita coisa. Talvez o maior agradecimento merecido é a inspiração acadêmica, ímpar e exemplar em muitos sentidos. Extremamente grato.

Aos colegas que conheci e convivi no Laboratório de Citogenética e Evolução: Darlise Lopes, Fabrício Bertuol, Gisele Oliveira, Sandra Büllau, Mayara Medeiros, Tatiane Noviski, Lívia Müller, Paula Roratto, Jorge Bernardo-Silva, Graziela Iob, Bruna Szyrwelski, Caroline Espinosa, Leonardo Leipnitz, Carla Lopes, Claiton Martins-Ferreira, Renan Maestri, Daniel Galiano, Bruno Busnelo, pelas ajudas nos procedimentos de laboratório, com programas e pelos cafés. Em especial ao Diego Hepp que juntos muito quebramos a cabeça. À Andressa Nuss por ajuda com extrações de DNA.

À Gislene Gonçalves pelos ensinamentos e inspiração que começaram no mestrado.

Ao Departamento de Genética da UFRGS pelo suporte e estrutura física. Em especial ao Elmo, Lúcia e ao Luciano pela extrema eficiência e paciência que desenvolvem suas atividades e atendimento a comunidade acadêmica da pós-graduação.

Aos professores do Departamento de Genética da UFRGS, em especial aos professores Aldo Mellender de Araújo e Francisco Mauro Salzano pelas suas trajetórias e envolvimento com a ciência para além de suas disciplinas.

Aos colegas e amigos que conheci no PPGBM, em especial ao André Klein, Leonardo Luvison e Ronaldo Paesi, pelos imensos “brainstorming” científicos e pela oportunidade de oferecer o curso de extensão em biologia evolutiva.

Ao apoio financeiro concedidos pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) em forma de bolsa e pela inesquecível experiência que o Ciências Sem Fronteiras me oportunizou de vivenciar a Universidade de Cambridge. Aos Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pelos recursos financeiros cedidos para o desenvolvimento técnico das pesquisas.

Aos pesquisadores Eduardo Eizirik (PUCRS), Alexandra Schneider (PUCRS), Cristina Yumi Miyaki (USP) e ao Luís Fábio Silveira (USP).

Ao pesquisador Nicholas Mundy (Cambridge) por, além de ter me recebido em seu grupo de pesquisa, ter me oportunizado entrar em contato com pesquisas incríveis e fazer repensar minha relação com a ciência e os espaços de produção dela. Também gostaria de agradecer os pesquisadores e demais profissionais que conheci no Departamento de Zoologia da Universidade de Cambridge: Sir Peter Lawrence (FRS), Nan Hu, Jose Casal-Jimenez, Jimena Berni, Tracey Brazier, Anastasia Nezhentseva, Chris Jiggins e a Caroline Pluck.

Igualmente preciso agradecer os colegas temporários do período na Universidade de Cambridge: Thanh-Lan Gluckman, Adi Saxena, Dareen AlMojil, Ana Pinharanda, Leonor Miller Fleming, Pedro Saavedra, Maik Drechsler, Paul Stephen Brooks. Em particular ao Krzysztof Chris Kozak por apresentar vários lugares para se beber bem. Além destes ao pessoal que conheci em atividades recreativas: Angel Sas, Jose Manuel Herrera Martin Niño e ao Sixto Roller.

Aos grandes amigos que sempre instigaram reflexões que vão além da ciência de bancada: João Botton, José e Greice Stoltz, Fernando M Quintela, Vagner Camilotti, Maurício Bohrer, Daiana Vivan, Victor Lisboa, Alice Dalmaso, Bianca Zimmermann, Bruno Madalozzo e ao Cleber Petró.

Sempre ficam por fim aqueles agradecimentos que deviam ser do início. Mas, agora entendo por que esses ficam por aqui. Porque depois de todas as disciplinas cursadas, PCR falhados, análises feitas, textos redigidos e tese entregue, tudo acaba. Menos os sentimentos recebidos das pessoas que amamos e nos amam, esses perduram depois da tese. Assim, o agradecimento à família e a companheira, permanece por aqui como uma lembrança que esses sentimentos, embora nas últimas linhas, não têm fim.

SUMÁRIO

RESUMO.....	10
ABSTRACT	12
CAPÍTULO I	14
INTRODUÇÃO GERAL.....	14
1. Genótipo e fenótipo.....	15
2. Função adaptativa da coloração	16
3. Coloração da plumagem em aves	17
3.1. Base molecular da coloração.....	20
4. A percepção da coloração: células visuais e pigmentos visuais	24
4.1. Base molecular da percepção da coloração	27
5. Modelos de estudos.....	31
5.1. Família Ramphastidae	31
5.2. Peru (<i>Meleagris gallopavo</i>)	32
5.3. Uacari branco (<i>Cacajao calvus</i>)	33
6. Objetivos	35
CAPÍTULO II	36
ARTIGO DE DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA - O gene <i>MC1R</i> e a pigmentação dos animais	36
CAPÍTULO III	44

ARTIGO CIENTÍFICO- Evolution of Dark Colour in Toucans (Ramphastidae): A Case for Gradualism in Molecular Adaptation?	44
CAPÍTULO IV	77
ARTIGO CIENTÍFICO - Genetic variation in the bronze locus (<i>MC1R</i>) in turkeys from Southern Brazil	77
CAPÍTULO V	90
ARTIGO CIENTÍFICO - Highly polymorphic colour vision in a New World Monkey with red facial skin, the bald uakari (<i>Cacajao calvus</i>)	90
CAPÍTULO VI	116
DISCUSSÃO GERAL	116
CAPÍTULO VII	122
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	122

RESUMO

A espécie humana sempre foi fascinada pela variação de cor exibida pelos animais. Atualmente, investigações genéticas têm permitido que os pesquisadores caracterizem os mecanismos moleculares envolvidos na produção de pigmentos que afetam fenótipos de cor bem como na percepção de tal variação de cor entre diferentes espécies. Essa tese apresenta três investigações sobre esses assuntos. Na primeira, foi estudada a base molecular para a evolução da cor de plumagem em Ramphastidae. Essa família de aves inclui tucanos, araçarís e saripocas, possuindo uma ampla variação em plumagem. Foi encontrada seleção positiva no gene do receptor da melanocortina-1 (*MC1R*) no ramo que leva ao gênero *Ramphastos*, sugerindo que a plumagem mais escura nessas espécies foi favorecida pela seleção natural. Interessantemente, três de cinco substituições de aminoácido encontradas nesse gênero foram associadas ao melanismo em outras espécies de aves. No segundo estudo, uma análise do gene *MC1R* foi feita em perus domésticos (*Meleagris gallopavo*) brancos e pigmentados. Esse gene é um dos pelo menos cinco locos genéticos conhecidos que determinam a cor da plumagem nessa espécie, e três alelos funcionais já foram caracterizados (*B*, *b⁺*, *b¹*). Os resultados mostraram que as aves brancas têm alguma diversidade genética em nível de DNA, mas quase todos os alelos foram *b⁺*, com um único alelo *b¹* encontrado, sugerindo que essas aves têm um valor limitado para o cruzamento

e desenvolvimento de novas variedades coloridas. Entre as aves coloridas, os resultados mostraram que a classificação fenotípica da plumagem feita pelos criadores brasileiros não é preditiva para os alelos que podem ser encontrados no gene *MC1R*. Finalmente, no terceiro estudo a base molecular da visão colorida em uacari (*Cacajao calvus*) foi explorada. Essa é uma espécie de primata do Novo Mundo que exibe uma distintiva face avermelhada intensa, um sistema social complexo, e uma dieta especializada. O loco da opsina ligado ao cromossomo X foi caracterizado, e os resultados revelaram a ocorrência de extensivo polimorfismo molecular e o maior número de alelos funcionais (seis) já encontrados em uma espécie de primata. Esse achado provavelmente deriva de seleção para visão tricromática, talvez mediada por seleção sexual. Em conjunto, esses resultados mostram a importância de estudos moleculares que permitam uma melhor compreensão da evolução e manutenção da variação biológica associada à produção e percepção de cores em diferentes grupos de vertebrados.

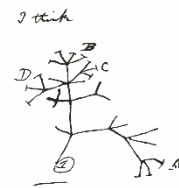
ABSTRACT

Humans have been always fascinated by body color variation in animals. Current genetic investigations have allowed researchers to characterize the molecular mechanisms involved in the production of pigments affecting color phenotypes, as well as in the perception of such color variation among different species. This thesis presents three investigations concerning these subjects. In the first, the molecular basis for the evolution of plumage coloration in Ramphastidae was studied. This bird family includes toucans and toucanets, showing wide plumage variation. Positive selection in the melanocortin-1 receptor (*MC1R*) gene was found in the branch leading to the genus *Ramphastos*, suggesting that the darker plumage in these species was favored by natural selection. Interestingly, three out of five aminoacid substitutions found in this genus have been associated to melanism in other bird species. In the second study, an analysis of the *MC1R* gene was performed in white and pigmented domestic turkeys (*Meleagris gallopavo*). This gene is one of the at least five genetic loci known to determine plumage color in this species, and three functional alleles have been identified (*B*, *b⁺*, *b¹*). The results showed that white birds have some genetic diversity at the DNA level, but almost all alleles were *b⁺*, with a single *b¹* allele found, suggesting that these birds have a limited value for breeding new color varieties. Among colored birds, the results showed that the plumage phenotypic classification used by Brazilian breeders is not predictive of the alleles

that can be found in the *MC1R* gene. Finally, in the third study, the basis of color vision in uakari (*Cacajao calvus*) was explored. This is a species of New World primate exhibiting a distinctive intense red face, a complex social system, and a specialized diet. The X-lined Opsin locus was characterized, and the results revealed the occurrence of extensive molecular polymorphism and the largest number of functional alleles (six) ever found for a primate. This finding possibly derives from selection for trichromatic vision, perhaps mediated by sexual selection. Taken together, these results show the importance of molecular studies allowing a better understanding of the evolution and maintenance of biological variation associated to color production and perception in different vertebrate groups.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL



Mudança é um dos mais expressivos processos da evolução. A ciência tem buscado entender essa mudança a partir de perguntas há muito tempo feitas e que começam a ganhar algumas respostas que, embora parciais, são fundamentais para compreensão dos mecanismos que guiam a evolução e por que determinadas variações continuam a ser mantidas.

Na última década ocorreram expressivos trabalhos investigativos sobre o papel dos mecanismos genéticos na diversidade fenotípica encontrada na natureza. Auxiliados pela explosão de tecnologias moleculares na exploração de genomas completos e na busca de genes candidatos, oportunizaram-se novas perspectivas para o estudo de características que vão muito além da genética mendeliana. Entretanto, são pontuais os trabalhos que relacionam a variação genotípica com a fenotípica e em sua maioria são concentrados em espécies domésticas (Hoekstra, 2006). Alguns trabalhos encontraram assinaturas de seleção em regiões genômicas que abrigam genes responsáveis por regular características fenotípicas, tais como a coloração do corpo e a visão (Amaral *et al.*, 2011).

1. Genótipo e fenótipo

Um dos desafios da biologia evolutiva é determinar mecanismos moleculares capazes de gerar variação natural na morfologia, fisiologia e comportamento, ou seja, no fenótipo de um organismo (Hubbard *et al.*, 2010; Roulin e Ducrest, 2013). Estabelecer a relação entre genótipo e fenótipo pode elucidar os mecanismos que moldam variação fenotípica dentro das populações e como esses afetam os padrões de mudança evolutiva (Hubbard *et al.*, 2010).

A descoberta e a compressão do papel de genes que atuam sobre o fenótipo é apenas um primeiro passo para examinar a geração de diferenças de aptidão (*fitness*) entre os indivíduos, e como e porque as frequências alélicas variam entre as populações, possibilitando também verificar a velocidade na qual tais genes evoluem (Roulin e Ducrest, 2013). A frequência genotípica muda de uma geração para outra e é influenciada por vários fatores tanto a níveis populacionais como moleculares (Lehtonen, 2010). Acessar informações sobre a base genética de características fenotípicas é, portanto, essencial para compreender por que determinados genes evoluem e se mantêm em uma determinada espécie, e como e por que um determinado fenótipo evolui repetidamente em espécies de parentesco distante (evolução convergente) (Orr, 2005). Assim, o estudo de gene, ou genes, que atuam sobre um determinado fenótipo, a exemplo da coloração e da visão, permitem investigar o valor adaptativo desse fenótipo e de que modo a seleção mantém a variação (Melin *et al.*, 2012; Roulin e Ducrest, 2013).

2. Função adaptativa da coloração

A coloração do corpo dos animais possui diversas funções, sendo importante para: a comunicação intraespecífica (por exemplo, coloração ornamental na escolha de parceiro e na disputa intrasexual); interações interespecíficas (coloração aposemática e críptica para evitar predadores) (Nachman *et al.*, 2003; Papaj e Newsom, 2005; Stevens *et al.*, 2006; Hill, 2006; Protas e Patel, 2008; Steiner *et al.*, 2009); exploração de recursos alimentares (Tso *et al.*, 2002, Roulin e Wink, 2004). A coloração do corpo e os pigmentos de cor podem ter outras funções adaptativas, como fotoproteção, resistência estrutural, resistência microbiana e termoregulação (Goldstein *et al.*, 2004; Protas e Patel, 2008). A coloração também pode ser influenciada por fatores ambientais, incluindo efeitos nutricionais, maternos e sanitários (Hubbard *et al.*, 2010). Entre as aves, a coloração da plumagem serviu de modelo teórico a muitos campos, como: a seleção sexual, a diferenciação geográfica, a especialização, a adaptação, ao dimorfismo sexual e a evolução dos polimorfismos (Roulin, 2004; Mundy, 2005).

Uma característica adaptativa pode melhorar a capacidade de um indivíduo para encontrar alimento, se proteger, escapar de predadores, reproduzir, e dessa forma manter-se na geração seguinte. A trajetória evolutiva e o potencial adaptativo de uma população, espécie ou caractere é dependente da quantidade de diversidade genética no *pool* gênico de uma população/espécie. Assim, torna-se

necessário mensurar a quantidade e a natureza da variação genética em populações naturais (Futuyma, 1998; Reed e Frankham, 2003; Lehtonen, 2010).

Um estudo aprofundado da função adaptativa de um determinado fenótipo a partir da identificação dos mecanismos de variação da morfologia e comportamento pode oferecer importantes informações sobre o processo de divergência populacional e de especiação (Linnen *et al.*, 2009; Hubbard 2010). Em relação à função das características da coloração deve ser considerado a condição da percepção dos sinais visuais emitidos pelos organismos, uma vez que diferenças fenotípicas mensuráveis apenas são biologicamente significativas se a alteração fenotípica pode ser percebida pelo receptor (Hubbard 2010).

3. Coloração da plumagem em aves

As aves são o grupo com maior diversidade de coloração entre os vertebrados. A deslumbrante variação da coloração da plumagem não passou despercebida e há tempos atrai a atenção dos ecólogos e biólogos evolutivos (Mundy, 2005). A coloração nesse grupo tem figurado proeminentemente em muitos processos, incluindo a seleção sexual, a diferenciação geográfica, especialização, evolução do dimorfismo sexual e a evolução dos polimorfismos (Roulin, 2004). A cor dos tegumentos, como bico, pernas e plumagem possuem

espectros que vão da luz visível ao ultravioleta (UV) conferindo diversas funções desde atrair parceiros até evitar predadores (Roulin e Ducrest, 2013).

Não apenas em aves, mas em todos os seres vivos a coloração do corpo é geralmente resultado da combinação de três elementos (i) a estrutura de células ou tecidos, (ii) pigmentos biológicos presentes nessas estruturas e (iii) a absorção e dispersão da luz associadas aos primeiros itens. A coloração estrutural é o mecanismo de produção de cor formada pela interação entre a luz incidente e a nanoestrutura das barbas e bárbulas das penas (itens i-iii) (Alba *et al.*, 2012). A coloração pigmentar é resultado da absorção seletiva de luz pelos pigmentos depositados nas penas (itens ii-iii) (Prum, 2006).

As penas são a característica mais distintiva em uma ave e estão entre os órgãos estruturais mais complexos encontrados nos vertebrados. As penas são tegumentos da epiderme que possuem a mesma composição química presente em aves, alguns répteis e dinossauros terópodos (dinossauros bípedes) (Prum e Brush, 2002; Zhang *et al.*, 2010; Carney *et al.*, 2012; Roulin e Ducrest, 2013). A partir de um folículo na pele as penas crescem e são altamente vascularizadas durante o seu desenvolvimento, porém uma vez maduras as penas serão compostas de tecido não-vivo (Prum, 2006). A nanoestrutura da pena geralmente confere um limite de coloração entre o UV e turquesa e coloração iridescente (Prum 2006; Carney *et al.*, 2012).

As aves possuem três principais classes de pigmentos que conferem cor as penas: a) Melanina; b) Carotenoides; c) Porfirinas. A maioria das espécies de aves possui melanina, que por sua vez, se divide em dois tipos de pigmentos: eumelanina, que confere cor marrom, cinza ou preta às penas; e feomelanina, representado por colorações castanho-avermelhados (Zhang *et al.*, 2010; Alba *et al.* 2012; Roulin e Ducrest, 2013). O pigmento melanina confere resistência a estrutura da pena, muitas vezes é reservado para as penas de voo, inclusive algumas aves possuem apenas a ponta das asas com a coloração escura (Carney *et al.*, 2012). As penas brancas são causadas por uma falta de pigmentação e são muito mais fracas do que as penas pretas, devido à falta de melanina (De La Hera *et al.*, 2010).

Plumagens vermelhas, laranjas e amarelas são primariamente formadas pela deposição de carotenoides. Esta classe de pigmentos não pode ser sintetizada *de novo* e sua presença depende da aquisição através da dieta de plantas e invertebados (Goodwin, 1984; McGraw 2006; Steffen e McGraw 2009; Olsson *et al.*, 2013). Após a ingestão, os carotenoides são transportados para vários tecidos do corpo onde se acumulam e desempenham diferentes funções biológicas). Os carotenoides também são necessários para a síntese de vitaminas e agem como antioxidantes para o sistema imune (McGraw 2006).

O pigmento porfirina confere coloração rosa, marrom, verde, além da vermelha. Essa classe de pigmentos é encontrada em poucas famílias de aves,

como das corujas e bacurau (Toral *et al.*, 2008). A coloração vermelha também pode ser obtida a partir de outros pigmentos, porém raros, como psittacofulvins. Este pigmento possui as mesmas propriedades bioquímicas de reflexão de luz e solubilidade dos carotenoides, o que fazia com que se acreditasse que ambos eram adquiridos pela alimentação e incorporados em tecidos periféricos, como as penas, através da corrente sanguínea (McGraw e Nogare, 2004). Entretanto, este pigmento endógeno é exclusivo da ordem Psittaciformes, não sendo encontrado em nenhum outro taxón na natureza (Berg e Bennett, 2010). A presença de plumagem verde visualizada em diversas espécies de Psittaciformes é resultado da combinação do pigmento psittacofulvina com a reflexão da luz sobre a microestrutura das penas, tornando essa formação exclusiva do grupo (Berg e Bennett, 2010).

3.1. Base molecular da coloração

A diversidade de coloração do corpo tanto intra como interespecífica possui forte componente genético. A abordagem por genes candidatos que controlam a coloração da pele, pelos e penas podem revelar-se úteis para fornecer informações sobre a evolução da coloração em si.

Até o presente são conhecidas dezenas de genes que podem alterar um dado fenótipo, em particular a coloração (Hofreiter e Schöneberg, 2010). Porém, a

escolha de um gene candidato passa por importantes critérios, definitivamente o mais significativo é encontrar genes que somente afetam a coloração, ou seja, sem efeitos pleiotrópicos. Desse modo seria possível observar a seleção exercida sobre um caractere e sua ação sobre a evolução (Roulin e Ducrest, 2013). Entre os diversos genes envolvidos na variação da coloração do corpo (e.g., *MC1R*, *ASIP*, *TYR*, *TYRP1*, *SLC45A2*, *MITF* and *EDNRB2*) tem recebido maior atenção e concentração de trabalhos o gene *receptor de melanocortina-1 (MC1R)* (Roulin e Ducrest, 2013; Lin e Fisher, 2007; Mundy, 2005).

O gene *MC1R* é expresso em melanócitos (melanóforos) de desenvolvimento de penas e pelos, executando o controle da síntese de melanina (Haitina *et al.*, 2007). Em vertebrados, como mencionado previamente, esse receptor atua como um interruptor para a síntese de dois tipos básicos de pigmentos: eumelanina (marrom escuro/preta) e feomelanina (creme claro/amarelo/vermelho) (Mundy, 2005; Takeuchi *et al.*, 1996). O receptor intermedeia o sinal de transdução do hormônio estimulante do melanóforo (α -*MSH*) e da proteína sinalizadora *agouti* (*ASIP*). Ao se ligar ao receptor *MC1R*, a α -*MSH* aumenta a produção de eumelanina em relação à feomelanina pela elevação do nível intracelular de AMP cíclico (cAMP) desencadeando a via de síntese de eumelanina (Hoekstra, 2006). Recentemente, outros genes foram relacionados às alterações de densidade e distribuição de pigmentos nos melanócitos, a seguir mencionados (Skoglund e Höglund, 2010). Intracelularmente, o aminoácido tirosina

é oxidado, por uma reação catalisada pela enzima tirosinase (TYR), em dopaquinona. A dopaquinona segue dois caminhos distintos: a) se o nível de cAMP se mantém elevado ocorre ação das enzimas específicas de eumelanina, como a proteína relacionada a tirosinase-1 (TYRP1) e a dopachrome tautomerase (DCT) produzindo e depositando eumelanina nos melanócitos; b) se o nível de cAMP é reduzido pela ligação do ASIP ao receptor MC1R, ocorre redução da produção de eumelanina e aumento da produção de feomelanina (Hoekstra, 2006). Uma representação esquemática da síntese dos diferentes tipos de melanina está representada na Figura 1.

Estudos com vertebrados domésticos demonstram que o melanismo é muitas vezes mediado por substituições de aminoácidos na proteína do gene *MC1R* e que espécies com reduzida funcionalidade do receptor são associadas com aumento da produção de eumelanina (Theron *et al.*, 2001; Eizirik *et al.*, 2003; Hoekstra, 2006). Estudos recentes afirmam que alterações no gene de *tirosinase* (*TYR*), *proteína relacionada à tirosinase-1* (*TYRP1*) e *dopachrome tautomerase* (*DCT*) são frequentemente associadas às mudanças fenotípicas ao longo do eixo amarelo-marrom. Enquanto estudos com o *receptor melanocortina-1* (*MC1R*) tem determinado a mudança fenotípica na pigmentação claro-escuro (Skoglund e Höglund, 2010).

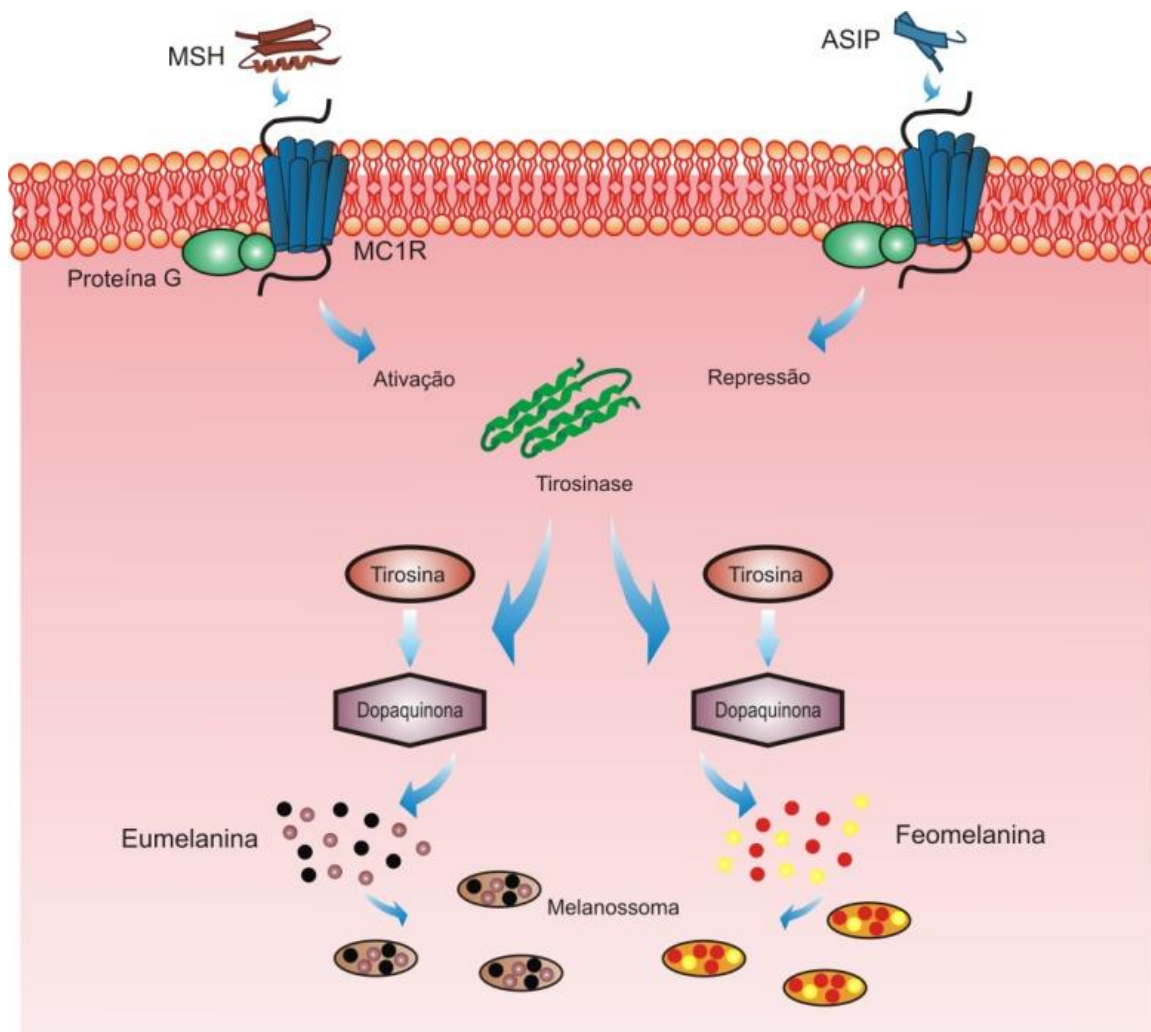


Figura 1. Representação simplificada da melanogênese. O gene *receptor de melanocortina-1 (MC1R)* expressa a proteína receptora transmembranar em melanócitos de penas e pelos executando o controle da síntese dos pigmentos de melanina. De acordo com o ligante que se conecta a proteína receptora irá desencadear uma cascata de sinais produzindo os pigmentos de melanina. Se o ligante for o hormônio estimulante de melanócitos (α -MSH) desencadeia ativação da tirosinase (*TYR*) que irá oxidar o aminoácido tirosina em dopaquinona que pela ação de outras enzimas produzirá pigmentos escuros do tipo eumelanina. Se a proteína antagonista ASIP se liga ao receptor MC1R ocorre redução da atividade da enzima tirosinase ocorrendo a produção de pigmentos claros do tipo feomelanina. Modificado de Corso e Hepp, 2013.

4. A percepção da coloração: células e pigmentos visuais

Na retina dos vertebrados são encontrados dois tipos de células fotorreceptoras, os cones e os bastonetes. Os fotorreceptores contêm pigmentos visuais formados pelas proteínas chamadas opsinas e por um cromóforo conhecido como retinal, derivado da vitamina A (Figura 2).

As opsinas são responsáveis pela absorção dos fótons de luz e pela ativação dos fotorreceptores nos quais ocorrerá a transdução da informação luminosa em sinal eletroquímico que será transmitido para as células pós-receptoras (Bonci, 2011). Os bastonetes contêm um tipo diferente de opsina, a rodopsina, que é ativada com pouca luz e, portanto, está na base da nossa visão escotópica (visão no escuro). Bastonetes são caracterizados por uma elevada sensibilidade, mas uma lenta resposta e a adaptação ao escuro, enquanto cones têm baixa sensibilidade, porém uma rápida resposta e rápida adaptação a pouca luz (Shichida e Matsuyama, 2009). A proteína opsina é transmembranar composta por 360 aminoácidos e com sete domínios, sendo que na sétima hélice se encontra o cromóforo, conjunto de átomos com muitos elétrons capazes de absorver energia ou luz visível (Shapley, 2012). A diferença de picos de absorção de luz dos cones é atribuída à variação na sequência de aminoácidos que formam as opsinas (Shichida e Matsuyama, 2009).

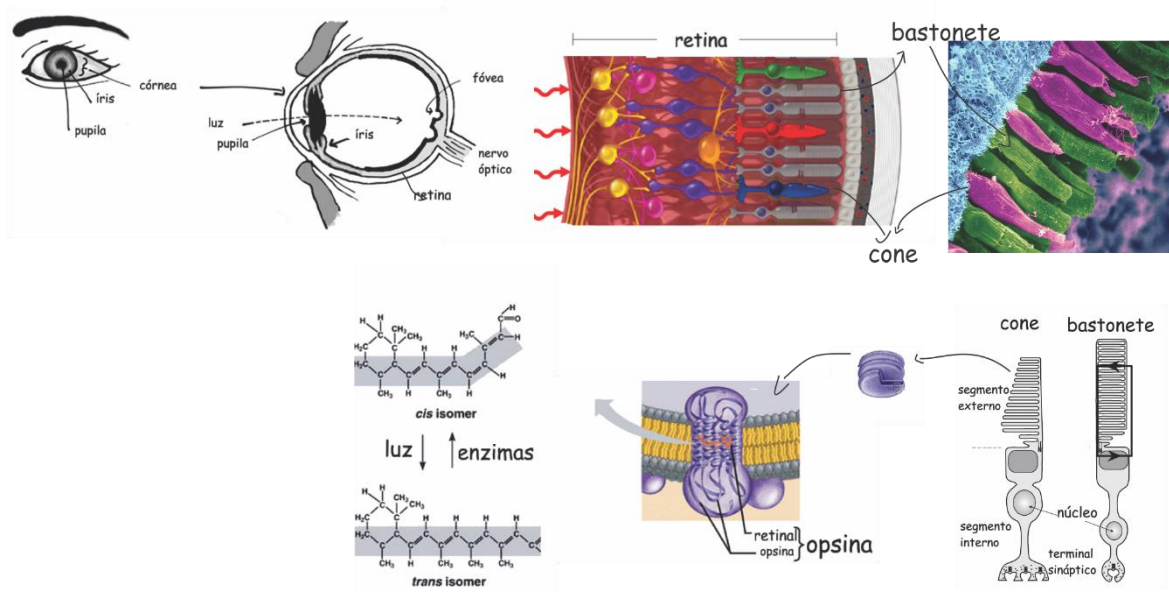


Figura 2. A retina dos vertebrados apresenta uma camada de células fotorreceptoras, que possuem dois formatos: os cones e os bastonetes. As células fotorreceptoras do tipo cone possuem pigmentos visuais formados por proteínas chamadas opsinas e por um cromóforo conhecido como retinal, derivado da vitamina A. Células fotorreceptoras do tipo bastonetes, possuem uma opsina diferente, chamada de rhodopsina. Ambas proteínas são responsáveis pela absorção da luz. O estímulo da absorção da luz altera a conformação da estrutura da molécula retinal gerando o envio de sinal para o nervo óptico. Modificado das fontes: www.chm.bris.ac.uk; Sharpe, L. T., Stockman, A., Jägle, H., & Nathans, J. (1999) Color vision: From Genes to Perception.

Os vertebrados possuem um único tipo de bastonete e podem ter dois ou três tipos de cones classificados conforme seu espectro de absorção de luz (λ_{max}). Estes por sua vez correspondem a genes que produzem a proteína opsina distribuídos em três loci (loco L, M, S): cone S (Short-Wave Sensitive- SWS) possui maior sensibilidade na faixa de comprimentos de onda curtos, $\sim 420\text{nm}$, corresponde a absorção de luz na faixa do azul (blue); o cone L (Long-Wave

Sensitive- LWS) possui maior sensibilidade na faixa de comprimentos de onda longos, ~560nm, corresponde a absorção de luz na faixa do vermelho (red); cone M (Middle-Wave Sensitive - MWS) possui maior sensibilidade na faixa de comprimentos de onda médios, ~530 nm, absorção de luz na faixa verde (green); os bastonetes por sua vez possuem sensibilidade ao redor de ~495 nm (Jacobs, 2007) (Figura 3).

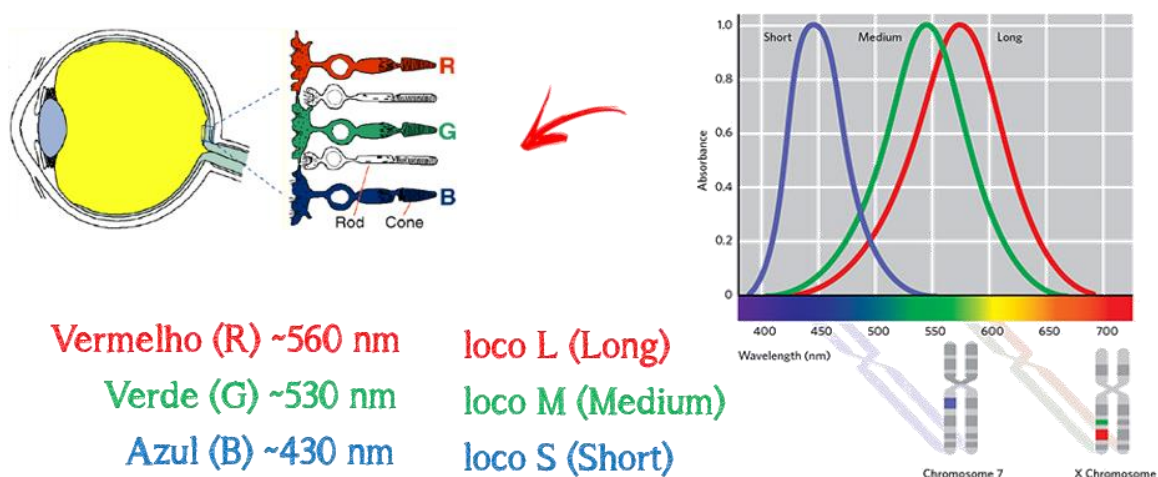


Figura 3. Na retina são encontrados dois ou três tipos de cones que correspondem a genes que produzem a proteína opsina distribuídos em três loci. Os genes da opsina localizado no loco L e M absorvem comprimentos de luz na faixa do vermelho e verde estão no cromossomo X. O gene da opsina localizado no loco S absorve o comprimento de luz na faixa do azul está localizado no cromossomo 7.

4.1. Base molecular da percepção da coloração

Os vertebrados possuem diferentes genes que expressam as proteínas opsinas, sendo classificados conforme seu espectro de absorção (λ_{\max}) em cinco classes (Hunt *et al.*, 2009): a) *Rh1*, rodopsinas com absorção em torno de 500 nm; b) *Rh2*, rodopsina com absorção entre 470-510 nm; c) *SWS-1*, pigmentos com absorção de comprimentos de onda curtos, entre 360-420 nm; d) *SWS-2*, pigmentos com absorção de comprimentos de onda curtos, entre 440-460 nm; e) *LWS*, pigmentos com absorção de comprimentos de onda longos, entre 510-560 nm (em primatas do novo mundo chamados de *LWS/MWS*). O processo evolutivo da visão colorida dos vertebrados possibilitou que o grupo dos peixes, anfíbios, répteis e aves discriminassem mais estímulos luminosos do que mamíferos. Os ancestrais dos mamíferos perderam duas classes de genes, *SWS2* e *Rh2* (Trezise e Collin, 2005; Jacobs, 2009; Jacobs, 2013) e a grande maioria dos mamíferos apresentam apenas dois genes de opsina *LWS* e *SWS1* (SurrIDGE *et al.*, 2003; Jacobs, 2013) (Figura 4).

Em mamíferos, os genes da opsina estão localizados em dois cromossomos: a) o gene que expressa a opsina *LWS* está localizado no cromossomo X; b) gene que expressa a opsina *SWS* está situado no cromossomo autossômico 7 (Jacobs, 2007; Jacobs, 2009; Jacobs, 2013). Ao longo da evolução dos primatas do Velho Mundo (Catarrhini), e do gênero *Alouatta*, surgiu uma duplicação do gene *LWS*, criando o gene *MWS*, de modo que ambos genes da opsina estão alocados no

cromossomo X (Figura 5). A expressão desses dois genes, *MWS* e *LWS*, separadamente permitiram a presença de uma população de cones na retina com características diferentes. Esses dois genes, juntamente com o *SWS1*, permitiram que os primatas machos e as fêmeas tivessem visão tricromática (Figura 5, Jacobs, 2009; Jacobs, 2013). Por outro lado, os primatas do Novo Mundo (Platyrrhini) possuem um sistema distinto de determinação da visão em cores, pois nesse grupo, não há a duplicação do loco *LWS*, sendo conhecido por gene *LWS/WS* (Jacobs, 2007; Bunce *et al.*, 2011). Assim, as fêmeas homozigotas para cromossomo X irão expressar apenas um tipo de pigmentos visuais que compõem a população de cones da retina. Elas, assim como os machos, terão visão dicromática, pela soma da expressão do gene *SWS* e do *LWS/MWS* (Figura 5, Hunt *et al.*, 1998; Bonci *et al.*, 2013). Já a fêmeas heterozigotas para o gene da opsina que carregam dois alelos distintos irão desativar aleatoriamente um dos cromossomos X e, com isso, a população de cones da retina irá expressar as duas formas alélicas do gene da opsina. Esse sistema permite que fêmeas heterozigotas tenham visão tricromática (Figura 5, Bonci *et al.*, 2013).

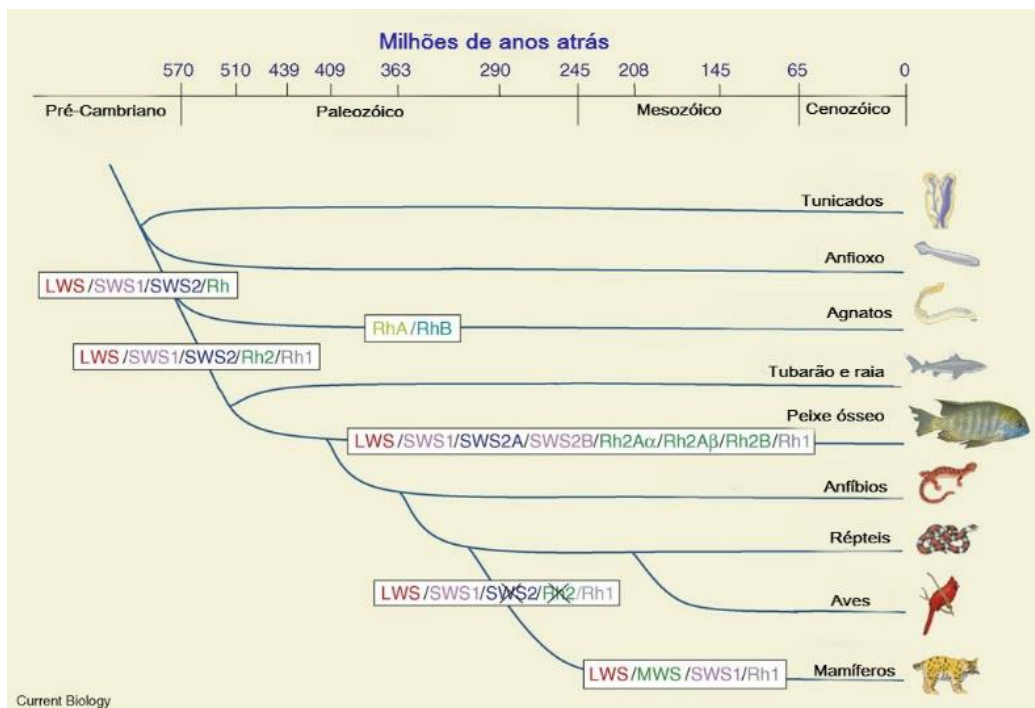


Figura 4. Reconstrução da história evolutiva dos genes de opsinina em vertebrados. Os ancestrais dos mamíferos perderam duas classes de genes opsinina, *SWS2* e *Rh2*. A grande maioria dos mamíferos apresentam apenas dois genes de opsinina, a opsinina *LWS* e *SWS1*. Modificado de Trezise e Collin, 2005.


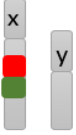

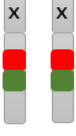

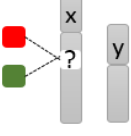

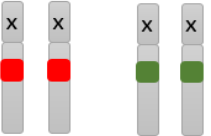

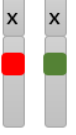
Primatas do Velho Mundo			
	SWS Cromossomo Y	LWS e MWS Cromossomo X	Visão
Macho			Tricromática
Fêmea			Tricromática
Primatas do Novo Mundo			
Macho			Tricromática
Fêmea homozigota			Dicromática
Fêmea heterozigota			Tricromática

Figura 5. Em primatas do velho mundo e do novo mundo o gene da opsina expresso pelo loco S (SWS) está localizado no cromossomo autossômico 7. Primatas do velho mundo possuem dois genes da opsina expresso pelo loco L e M localizados no cromossomo X. Machos (com um X) e fêmeas (com dois X), possuem três genes de opsina, possuem visão tricromática. Primatas do novo mundo possuem apenas um loco para o gene da opsina localizados no cromossomo X. Conseqüentemente, fêmeas homozigotas para cromossomo X irão expressar apenas um gene de opsina, L ou M, assim como os machos, portanto terão visão dicromática. Fêmeas heterozigotas vão expressar dois genes de opsina, L e M, e terão visão tricromática.

5. Modelos de estudos

5.1. Família Ramphastidae

A família Ramphastidae (Aves, Piciformes) inclui tucanos, araçarís, saripocas encontradas principalmente na região Neotropical compondo um dos maiores símbolos desta região (Patané *et al.*, 2009). A família é composta por cinco gêneros e aproximadamente 46 espécies (Gill e Donsker, 2012). Os tucanos são aves facilmente reconhecidas pelo seu bico, grande tamanho e coloração, araçarís e toucanetes por sua vez são menores, porém possuem um bico de grandes dimensões (Sigríst, 2009).

Espécies de Ramphastidae variam consideravelmente na coloração, de tal modo que este é o principal caractere utilizado para distinguir as espécies. A plumagem em *Ramphastos* é em grande parte preta com algumas manchas brancas ou à base de carotenoides. Algumas espécies formam pares simpátricos notavelmente semelhantes um ao outro na plumagem (Weckstein, 2005). *Selenidera* inclui espécies dicromáticas com grandes variações de cor entre as partes do corpo, todos os membros são verdes na parte superior do corpo e vermelho nas penas caudais. Todos os machos possuem a garganta, a coroa, pescoço e peito com preto intenso, enquanto a grande maioria das fêmeas varia do cinza ao marrom nessas porções (BirdLife International, 2014). Já *Pteroglossus* é o grupo com a maior diversidade de coloração entre os seus membros, e inclui aves

de coloração desde o amarelo ao preto, com grandes variações de manchas de cor pelo corpo (Sick, 2007; Sigrist, 2009).

5.2. Peru (*Meleagris gallopavo*)

O peru (*Meleagris gallopavo*) é uma espécie de interesse agropecuário amplamente utilizado para produção de carne. Assim como a galinha, é um membro da família Phasianidae e pertence a ordem dos Galliformes. Todos os perus domésticos descendem dos perus selvagens América do Sul e Norte. São conhecidas sete subespécies selvagens identificadas pela distribuição geográfica e por diferenças de plumagem (Aslam *et al.*, 2012). Considera-se que a domesticação do peru foi desenvolvida na região mexicana onde foram encontrados indícios de cerca de 2000 anos em sítios Maia (Speller *et al.*, 2010; Aslam *et al.*, 2014;).

O peru doméstico moderno foi reconhecido pela American Standard of Perfection (APA) em 1971 sendo registrada como uma única raça com oito variedades definidas principalmente pela cor da plumagem: Bronze, Narragansett, White Holland, Spanish Black, Blue Slate, Beltsville Small White, Bourbon Red e Royal Palm (APA, 2001).

Estudos clássicos sobre a coloração da plumagem em perus selvagens (*Meleagris gallopavo*) caracterizaram os fenótipos como sendo produto de pelo menos cinco locos, em resposta ao gradiente de coloração dessa espécie

(Robertson *et al.*, 1943). Entre esses, o loco bronze foi o único caracterizado desde o ponto de vista molecular, sendo associado ao gene receptor de melanocortina-1 (*MC1R*) (Vidal *et al.*, 2010). Em perus selvagens o loco bronze apresenta três alelos com ordem de dominância B (preto) $>$ b^+ (bronze selvagem) $>$ b^1 (bronze com asas pretas). O peru doméstico da linhagem White Holland amplamente utilizada na produção comercial de carne, apresenta plumagem branca homogênea, a barba enegrecida, bico róseo, garganta e barbicha com cor branca rosada (Canul, 2011). A plumagem branca é consequência da ação de um loco epistático C no qual o genótipo cc torna a ave branca independentemente dos alelos presentes no loco bronze (Robertson *et al.*, 1943). O papel do gene *MC1R* na regulação do fenótipo bronze para algumas variedades de perus selvagens foi determinado. Contudo, não existem informações sobre a variação genética presente em linhagens comerciais, se ela poderia ser explorada em cruzamentos com fim ornamental.

5.3. Uacari branco (*Cacajao calvus*)

O uacari pertence à família Pitheciidae, de primatas endêmicos da região Amazônica que são incomuns em vários aspectos. Os uacaris-brancos (*Cacajao calvus*) são considerados os primatas menos conhecidos da Amazônia, foram descritos pela primeira vez em 1847 pelo zoólogo francês Isidore Geoffroy Saint-

Hilaire e citados em poucas outras observações pelo naturalista inglês Henry Walter Bates, na década de 1850, na região de Tefé (Amazonas).

O primata possui diversos nomes populares como uacaris, acaris e macaco inglês. Mais notavelmente, o uacari-branco *C. calvus*, é a única espécie de primatas do novo mundo que possui coloração sexual de vermelho intenso na face, semelhante a algumas espécies de primatas do velho mundo (Catarrhine). No rosto e nas orelhas dos uacaris-brancos são encontrados poucos pelos, sem melanina e uma coloração vermelha escarlate intensa nos machos em relação as fêmeas, em parte por conta da musculatura e irrigação sanguínea na região facial (Hershkovitz, 1987; Bowler e Bodmer 2009;). Além disso, a cor geral da pelagem é laranja avermelhada ou dourada avermelhada (Hershkovitz, 1987). Essa espécie tem um sistema social único para primatas do novo mundo vivendo em sociedades do tipo fissão-fusão, podendo formar grupos muito grandes de até 200 indivíduos (Bowler e Bodmer 2009; Bowler *et al.*, 2012;). Essa espécie possui uma dieta especializada com elevada proporção de sementes e frutos imaturos de casca muito dura que geralmente são desprezados por outros macacos (Bowler e Bodmer, 2011; Barnett *et al.*, 2013;). Devido às suas características peculiares, a visão colorida pode ser de grande importância. Em particular a coloração facial de vermelho intenso pode atuar na seleção sexual de parceiros. Até o presente, não há nenhuma informação sobre o sistema visual em uacaris e, de fato, esse é o único gênero de primatas do novo mundo em que essa característica permanece inexplorada.

6. Objetivos

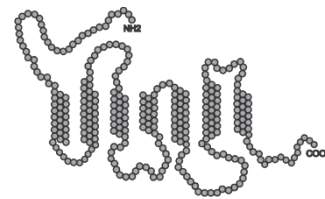
O estudo tem por finalidade avaliar a variabilidade em genes importantes na determinação e percepção da coloração a partir de modelos de espécies animais buscando a relação entre fenótipo e genótipo moldada por processos evolutivos.

Assim, os objetivos específicos do presente trabalho foram:

- a) Análise do gene *receptor de melanocortina-1 (MC1R)* em Ramphastidade para avaliar sua possível relação com a variação da cor da plumagem no espectro claro/escuro e na compreensão dos mecanismos evolutivos envolvidos nessa relação;
- b) Análise do gene *MC1R* em perus comerciais e de “quintais” para avaliar a variação molecular presente em indivíduos de fenótipo branco, bem como se as categorias fenotípicas empregadas no sul do Brasil são preditoras da variação no loco bronze (*MC1R*);
- c) A caracterização do sistema visual do uacari-branco, qual a frequência de alelos do gene da opsina, e quais suas implicações evolutivas.

CAPÍTULO II

ARTIGO DE DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA



O gene *MC1R* e a pigmentação dos animais

Josmael Corso¹, Diego Hepp^{1,2}

¹Doutorandos no Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

²Técnico de Laboratório no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul – IFRS Campus Porto Alegre

Manuscrito publicado no periódico 'Genética na Escola'

Vol. 8 | Nº 2 | 2013

UM GENE

O gene *MC1R* e a pigmentação dos animais

Josmael Corso¹, Diego Hepp^{1,2}

¹ Doutorandos no Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

² Técnico de Laboratório no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul - IFRS Campus Porto Alegre

Autor para correspondência: josmaelcorso@gmail.com

As cores observadas nos animais são resultantes da presença de pigmentos nos tecidos biológicos. Por ser uma característica de grande variabilidade, a coloração dos animais é alvo de estudos que buscam a compreensão a respeito dos mecanismos responsáveis por seu controle e diversidade. O mais estudado dos pigmentos, a melanina - sintetizada nos melanócitos - desempenha papéis importantes na proteção contra a radiação UV, na camuflagem e na seleção sexual. O gene *MC1R* (*receptor da melanocortina-1*) apresenta um papel central na regulação da produção de melanina em diversos animais, incluindo os humanos.

UM GENE

A MELANINA E A COLORAÇÃO DOS ORGANISMOS

Desde o surgimento da genética clássica com os estudos de Gregor Mendel (1822-1884) com ervilhas, seus principais avanços foram motivados pela observação de características diversificadas e notáveis nos indivíduos das populações. A partir dessas observações, buscou-se compreender o papel do material genético na morfologia, na fisiologia e no comportamento dos seres, ou seja, nas manifestações fenotípicas. Entretanto, por muito tempo, estudos relacionando o genótipo com o fenótipo dos organismos foram escassos, principalmente devido à dificuldade em identificar o gene ou genes responsáveis por variações fenotípicas. Soma-se a isto o fato da maioria dos fenótipos ser multifatorial, ou seja, resultam da interação entre diversos genes e fatores ambientais, além de fatores socioculturais, o que dificulta estudos relativos a eles.

A coloração da pele, dos cabelos e dos olhos dos animais é determinada principalmente pela presença do pigmento melanina. A via de síntese da melanina ocorre em células especializadas, denominadas melanócitos, a partir de um precursor, o aminoácido tirosina envolvendo uma série de reações enzimáticas, com a participação chave da enzima tirosinase. O pigmento é formado em organelas especializadas denominadas melanossomas (Figura 1) e, a seguir, ele é transferido para células adjacentes ao melanócito, tais como os queratinócitos da pele ou as células do folículo piloso, que determinarão a pigmentação observada nesses tecidos.

Melanossomas são organelas especializadas das células conhecidas como melanócitos, que contêm o pigmento melanina. Apresentam colorações e estruturas internas diferentes, dependendo do tipo de pigmento presente.

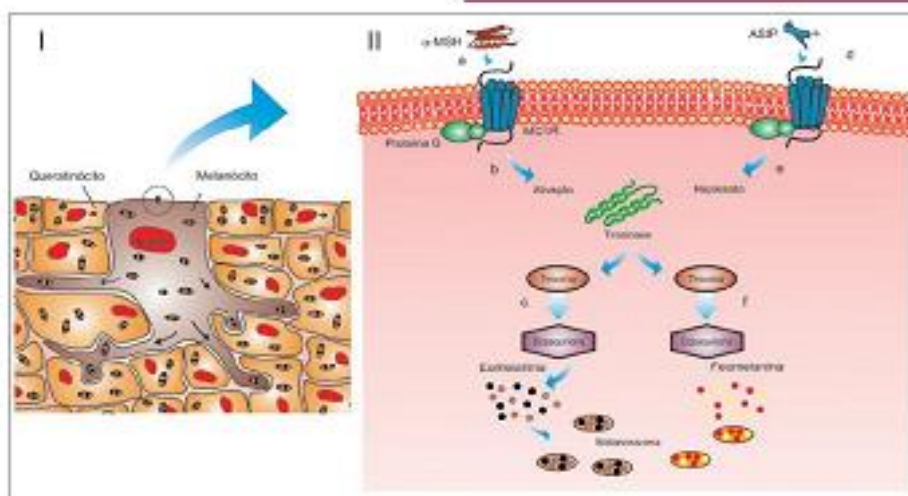


Figura 1. Mecanismo de pigmentação: (I) - Esquema da interação entre as células do tipo melanócitos e os queratinócitos circundantes. A melanina produzida pelos melanócitos e armazenada nas organelas melanossomas é movida até prolongamentos da célula, sendo transferida através de exocitose para as células vizinhas, conferindo pigmentação ao tecido; (II) - Representação simplificada da melanogênese demonstrando os mecanismos de produção dos dois tipos de pigmentos de melanina: (a) ligação do hormônio estimulante de melanócitos (α -MSH) ao receptor de melanocortina-1 (MC1R) faz com que (b) a proteína G acoplada ao receptor MC1R desencadeie a ativação da enzima tirosinase; (c) aminoácido tirosina é oxidado pela tirosinase à dopaquinona que pela ação de outras enzimas produz pigmentos eumelanina. (d) proteína sinalizadora agouti (ASIP) se liga ao receptor MC1R; (e) redução da atividade da enzima TYR; (f) ação reduzida das enzimas resulta na produção de pigmentos feomelanina.

Dois tipos de melanina podem ser produzidos nos melanócitos: a eumelanina - de coloração marrom ou preta; e a feomelanina - de coloração creme, amarela ou vermelha. A quantidade relativa desses dois tipos de pigmentos sintetizada pelos melanócitos determina a coloração do corpo de todos os vertebrados conhecidos desde o menor dos peixes, o guppy, a um dos mais robustos ma-

míferos, os elefantes, incluindo a coloração da pele e dos cabelos dos seres humanos.

O controle da produção dos dois tipos de melanina, tanto no que se refere ao tipo de pigmento quanto à sua quantidade, envolve diversos genes. Variações nesses genes resultam em diferentes fenótipos existentes entre as espécies e mesmo entre indivíduos de uma mesma espécie.

Êxons são segmentos de DNA de um gene eucariótico cujas sequências nucleotídicas correspondentes permanecem no RNA mensageiro maduro. Durante o *splicing* do RNA mensageiro, segmentos denominados introns são removidos e os êxons são covalentemente ligados uns aos outros gerando o RNA mensageiro maduro.

Proteínas G são proteínas formadas por três subunidades (alfa - α , beta - β e gama - γ), localizadas no interior da membrana plasmática e acopladas a receptores de membrana. Após serem ativadas pelos receptores, as proteínas G realizam transdução do sinal, ou seja, estimulam outras enzimas a realizar uma resposta intracelular ao estímulo.

Domínios transmembrânicos

são regiões das proteínas que atravessam a membrana plasmática das células, ligando o meio extracelular ao intracelular.

O estudo da rota metabólica da produção dos pigmentos demonstrou que os mecanismos envolvidos são altamente conservados nos diferentes grupos de vertebrados, tornando essa característica muito importante para estudos genéticos. A variação existente na coloração dos animais possibilita uma oportunidade para o estudo da base genética da diversidade fenotípica e do modo como mudanças nos fenótipos podem afetar a evolução dos organismos. A coloração é uma característica de fácil observação, permitindo avaliar as mudanças causadas por mutações e a distinção entre os diferentes alelos presentes nos indivíduos.

O GENE MC1R

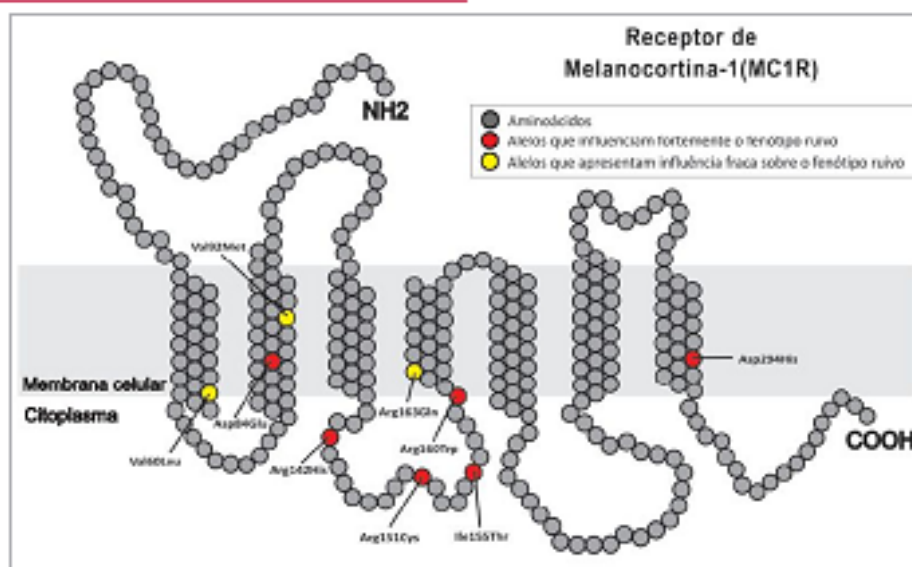
Recentemente foram identificados diversos genes que contribuem significativamente para a variação na pigmentação dos animais. Além do gene *TYR*, responsável pela produção da enzima tirosinase, estão envolvidos na pigmentação os genes *MC1R*, *ASIP*, *OCA2*, *TYRP1* e *DCT*, entre outros, cada um possuindo funções em diferentes etapas do me-

tabolismo e com influência no fenótipo da pigmentação do organismo.

O gene receptor de melanocortina-1 (*MC1R*) é o mais amplamente estudado. Na espécie humana, o gene está localizado no cromossomo 16, na região q24.3. Este gene possui apenas um **êxon**, transcrito em um RNA mensageiro de 3099 pares de bases, destes, 951 nucleotídeos correspondem à região que codifica para os 317 aminoácidos que compõem a proteína *MC1R*. As sequências restantes correspondem às regiões 5' e 3' não traduzidas do gene.

A proteína codificada pelo gene *MC1R* é um receptor presente na membrana plasmática dos melanócitos. Este receptor é um receptor de membrana que se acopla à **proteína G**. O *MC1R* atua como um importante agente na pigmentação dos animais, em especial dos vertebrados. A proteína *MC1R* promove a conexão entre os meios intracelular e extracelular e apresenta um domínio N-terminal, sete **domínios transmembrânicos** e um domínio carboxi-terminal (Quadro 1).

Quadro 1.
Gene: Receptor de melanocortina-1
Símbolo: *MC1R*
Proteína: codifica a síntese da proteína *MC1R*
Organização: um êxon
Família: Receptores de membrana acoplados a proteína G, com sete domínios transmembrânicos
Tamanho: 3.099 nucleotídeos, com uma região codificadora de 951 nucleotídeos
Proteína: 317 aminoácidos
Localização: na espécie humana, cromossomo 16, região q24.3



UM GENE

O MC1R ATUA COMO UM INTERRUPTOR NA SÍNTESE DE MELANINA

A síntese de melanina ocorre por meio de uma série de eventos nos quais o MC1R representa um papel fundamental. A regulação da produção de melanina é iniciada com a ligação de uma molécula **ligante** no receptor MC1R. Dois tipos de ligantes antagonísticos podem interagir com MC1R: o hormônio estimulante de melanócitos (α -MSH), se-

cretado pela glândula pituitária, e a proteína sinalizadora agouti (ASIP) sintetizada pelo gene *ASIP*. Quando o hormônio α -MSH se liga ao receptor MC1R, a proteína G, que está fisicamente acoplada ao receptor, localizada na superfície interna da membrana da célula, desencadeia uma **cascata de sinais** que resulta na ativação da tirosinase e de outras enzimas e na produção de eumelanina. A tirosinase é essencial para a síntese de melanina, pois realiza a **oxidação** do aminoácido tirosina em dopaquinona e, após

Cascatas de sinais são mecanismos celulares nos quais a ligação de um ligante a um receptor induz a produção de mensageiros secundários que ativam diversas outras proteínas, resultando na ampliação da resposta ao estímulo.

Ligantes são moléculas, geralmente pequenas, que interagem com sítios de ligação de proteínas receptoras a fim de transmitir um sinal biológico. Exemplos: inibidores, ativadores, hormônios e neurotransmissores.

Oxidação é a reação química em que uma molécula sofre a perda de elétrons e aumenta sua reatividade.



Polimerização é a produção de grandes moléculas repetitivas (polímeros) por meio de reações de adição de unidades básicas menores ou monômeros.

Alelo dominante é a versão do gene que se manifesta fenotipicamente no heterozigoto, ocultando por completo o fenótipo correspondente ao alelo recessivo.

uma sequência de reações químicas, ocorre a **polimerização** do pigmento escuro eumelanina (Figura 1 a-c). Se a proteína ASIP se ligar ao receptor MC1R, a atividade da tirosinase é diminuída, a produção do pigmento eumelanina reprimida e a de feomelanina é ativada (Figura 1 d-f).

Investigações do papel do gene *MC1R* na pigmentação de diferentes espécies demonstraram que modificações neste gene podem causar alterações estruturais na proteína receptora que interferem no seu funcionamento regular. Determinadas mutações provocam o aumento da produção de pigmentos escuros, do tipo eumelanina, devido à ativação constante do receptor. Tais mutações originam **alelos dominantes**, ou seja, os animais que possuem pelo menos uma cópia do alelo com estas mutações terão o fenótipo escuro. Outras alterações na sequência do gene *MC1R* produzem receptores não funcionais levando à redução da produção de eumelanina com aumento da produção de feomelanina, o que resulta em fenótipos de cor clara. Os alelos que contêm essas modificações normalmente são recessivos em relação aos demais, pois são necessárias duas cópias para que o fenótipo associado a eles se manifeste.

MC1R E A VARIAÇÃO NA PIGMENTAÇÃO HUMANA. E OS RUIVOS COM ISSO?

Ao caminharmos pelas ruas observamos pessoas com variados tons de pele e de cabelos, algumas com cabelos loiros e outras com diversas tonalidades de castanho a preto. As pessoas com pele morena ou negra produzem principalmente pigmento do tipo eumelanina, possuindo também uma maior capacidade de bronzeamento quando expostas ao sol. Já as pessoas com cabelos ruivos, loiros, pele clara ou com sardas produzem em maior proporção feomelanina e tendem a bronzear-se com menor facilidade. A pigmentação é importante na proteção da pele contra danos causados pela radiação ultravioleta (UV) do sol, um dos principais causadores de tumores de pele. Uma vez que o pigmento feomelanina não protege a pele contra a UV, as pessoas

com mais feomelanina têm um risco aumentado de danos na pele causada pela exposição solar devem se proteger ainda mais.

Nas populações humanas foram identificadas diversas variantes para o gene *MC1R* e várias delas foram associadas ao aumento do risco de câncer de pele, por codificarem proteínas não funcionais que aumentam os efeitos citotóxicos causados pela radiação UV. Esses alelos apresentam em suas sequências de bases alterações que causam as substituições do aminoácido arginina por cisteína no códon 151 (Arg151Cys), da arginina por triptofano no códon 160 (Arg160Trp) e da asparagina por histidina no códon 294 (Asp294His). Estudos recentes demonstraram que algumas combinações de variações do gene *MC1R* e dos genes causadores de câncer, *CDKN2A* e *BRAF* (nos quais 40 e 60%, respectivamente, dos pacientes com melanoma possuem mutação), resultam em maior risco para desenvolvimento de melanomas, independente do tom de pele clara ou escura. Assim sendo, o risco pode estar aumentado tanto em pessoas com a produção elevada de eumelanina ou de feomelanina. Além disso, os estudos sugerem que as variações no gene *MC1R* que produzem pigmento feomelanina quando associadas à mutação no gene *BRAF* podem aumentar o risco de câncer de pele mesmo na ausência de fatores ambientais, como a exposição à UV, devido a mecanismos de danos oxidativos inerentes à produção desse pigmento.

O fenótipo ruivo ocorre em cerca de 2% da população mundial, e está presente em maior frequência na Irlanda, país em que ocorre em 12% das pessoas. Historicamente, as pessoas que apresentavam traços físicos de ruivos foram cercadas por mitos. Na Europa já foram temidas, discriminadas e consideradas predestinadas à agressividade. Entretanto, foram também admiradas, como no caso da rainha Elizabeth I (1533-1603) (Figura 2a), e retratadas pela arte como na pintura 'O nascimento de Vênus' (Nascita di Venere - 1486) (Figura 2b) do famoso artista Sandro Botticelli (1445-1510). Na atualidade, ainda são lembradas e notadas, especialmente no caso de celebridades como Nicole Kidman.



UM GENE



Figura 2.
(a) Rainha Elizabeth I ("Damley Portrait", cerca de 1575);



(b) O nascimento de Vênus (Sandro Botticelli, cerca de 1486). Fontes: National Portrait Gallery, London: NPG 2082; http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Sandro_Botticelli_-_La_nascita_di_Venere_-_Google_Art_Project.jpg.

Há pouco mais de uma década, pesquisas genéticas revelaram que o fenótipo dos ruivos está associado a alguns alelos do gene *MC1R*. Apesar de ser considerada uma característica recessiva em relação aos demais tipos de pigmentação humana, não existe apenas um alelo responsável pelo fenótipo

ruivo. Dentre as variações do gene *MC1R*, encontradas na espécie humana, nove diferentes alelos foram associados à ocorrência de cabelos ruivos e pele clara, sendo que seis desses (Asp84Glu, Arg142His, Arg151Cys, Ile155Thr, Arg160Trp e Asp294His) influenciam fortemente o fenótipo, enquanto



outros três alelos (Val60Leu, Val92Met e Arg163Gln) influenciam fracamente o fenótipo (Quadro 1). Esses alelos provocam diferentes alterações estruturais no receptor, podendo afetar sua resposta ao hormônio α -MSH, alterando a atividade do receptor e gerando um extenso gradiente de pigmentação nos ruivos, como é possível visualizar pela diversidade de tons de cabelos e pele observada entre os indivíduos com esse fenótipo.

Os aspectos aqui abordados demonstram que o *MC1R* é um gene de extrema importância para o estudo da genética da pigmentação. Por estar presente em diversos grupos de organismos torna possível a realização de análises genéticas comparativas auxiliando no entendimento da regulação dos fenótipos, além de possibilitar a descoberta de novas interações deste gene com outras características genéticas.

PARA SABER MAIS

DESSINIOTI, C.; ANTONIOU, C.; KATSAMBAS, A.; STRATIGOS, A.J. Melanocortin-1 receptor variants: functional role and pigmentary associations. *Photochemistry and Photobiology*, v. 87, p. 978-987, 2011.

HOEKSTRA, H.E. Genetics, development and evolution of adaptive pigmentation in vertebrates. *Heredity*, v. 97, p. 222-34, 2006.

HUBBARD, J.K.; UY, J.A.C.; HAUBER, M.E.; HOEKSTRA, H.E.; SAFRAN, R.J. Vertebrate pigmentation: from underlying genes to adaptive function. *Trends in Genetics*, v.26, p.231-239, 2010.

MITRA, D.; LUO, X.; MORGAN, A.; WANG, J.; HOANG, M.P.; LO, J.; GUERRERO, C.R.; LENNERZ, J.K.; MIHM, M.C.; WARGO, J.A. An ultraviolet-radiation-independent pathway to melanoma carcinogenesis in the red hair/fair skin background. *Nature*, v. 491(7424), p. 449-453, 2012.

NETTO, R.C.M. Dominante ou recessivo. *Genética na Escola*, v. 7(2), p.28-33, 2012.

VALENZUELA, R.K.; HENDERSON, M.S.; WALSH, M.H.; GARRISON, N.A.; KELCH, J.T.; COHEN-BARAK, O.; ERICKSON, D.T.; JOHN MEANEY, F.; BRUCE WALSH, J.; CHENG, K.C.; ITO, S.; et al. Predicting phenotype from genotype: normal pigmentation. *Journal of Forensic Sciences*, v. 55(2), p. 315-22, 2010.



CAPÍTULO III

ARTIGO CIENTÍFICO



Evolution of Dark Colour in Toucans (Ramphastidae): A Case for Gradualism in Molecular Adaptation?

Josmael Corso¹, Nicholas I. Mundy ², Nelson J. R. Fagundes^{1*}, Thales R. O. de Freitas¹

¹Departament of Genetics, Institute of Biosciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

²Department of Zoology, University of Cambridge, Downing Street, Cambridge CB2 3EJ, UK

*Corresponding Author:

Nelson J.R. Fagundes

Departamento de Genética – UFRGS

Caixa Postal 15053

91501-970 Porto Alegre, RS Brazil

nelson.fagundes@ufrgs.br

Manuscrito submetido ao periódico ‘Proceedings of the Royal Society B’

Abstract

In the last decades researchers have been able to determine the molecular basis of some phenotypes, to test if there are evidence of natural selection upon them, and to recognize that the same genes or genetic pathways could be associated with convergent traits. Colour traits are often subject to natural selection because even small changes in these traits could generate a large implication to fitness of an organism as due camouflage, sexual selection or other mechanisms. The *melanocortin-1 receptor* locus (*MC1R*) is frequently associated with intraspecific coat colour variation in vertebrates, but it has been far harder to demonstrate that this locus is involved in adaptive interspecific colour differences. Here, we investigate the contribution of the *MC1R* gene to the colour diversity found in toucans (Ramphastidae). We find that positive selection acted on *MC1R* in the common ancestor of the genus *Ramphastos* and that this coincided with evolution of darker plumage in members of this genus. Using phylogenetically-corrected correlations we show significant and specific relationships between the rate of non-synonymous change in *MC1R* (dN) and plumage darkness across Ramphastidae, and also between the rate of functionally significant amino acid changes in *MC1R* and plumage darkness. Furthermore, three of the five amino acid changes in *MC1R* that occurred in the ancestral *Ramphastos* branch are associated with melanism in other birds. Taken together, our results strongly suggest that the dark colour of *Ramphastos* toucans was related to the cumulative accumulation of positively

selected substitutions in MC1R. The results are of general importance in showing a quantitative relationship between gene and phenotype evolution, and demonstrate a role for *MC1R* in macroevolution of plumage phenotypes.

Key-words: Molecular Evolution, Melanocortin-1 Receptor, Gradualism, Ramphastidae, Positive Selection, Molecular Adaptation

1. Introduction

More than a century has passed since the rediscovery of Mendel's experiments established the foundations of Modern Genetics and a new theoretical framework for understanding the effect of genetic changes on the phenotypes exhibited by natural populations [1,2]. In the last decades, thanks to the development of new molecular techniques, researchers have been able to find the molecular basis of some phenotypes, and to recognize that the same genes or genetic pathways could be associated with convergent traits [3,4]. This is allowing the identification of genes that may be associated with specific phenotypes in several different organisms [5,6]. Another, though related, task is to determine if genetic loci associated to phenotype also show hallmarks of natural selection [7], which is important to determine if specific phenotypes evolved as a result of adaptive pressures [8].

Coloration is a key trait often subjected to natural selection due to its role in mechanisms such as camouflage, thermoregulation, sexual selection, or other signalling functions [1]. Several loci have been implicated in adaptive variation in melanin-related colour traits in vertebrates [1-3,4]. Taken together these studies show that convergent evolution of dark or light coloration within species often involves the same locus, the most prominent example being the *melanocortin-1 receptor* locus (*MC1R*) [1-9]. However, an open question is whether changes in the same loci are also important in changes in coloration among different species over

longer evolutionary timescales, which requires a comparative perspective. Besides, considering that colouration may be viewed as a continuous rather than a binary (light vs. dark) character, it is noteworthy that there has been remarkably little investigation of whether evolution of continuously varying traits can be quantitatively related to genetic changes over a phylogeny [10].

The family Ramphastidae (Aves, Piciformes) includes toucans, araçaris, toucanets and mountain-toucans, which are among the most emblematic and charismatic birds occurring in the Neotropical region [11]. They are widespread across the Neotropics from Central Mexico to Southern Brazil [12, 13] occupying a wide range of habitats, from lowland rain forests to cool mountainous forests including forested patches in more open environments [13].

Ramphastidae species exhibit very distinctive colour patterns, which is the main character used to identify species (electronic supplementary material, Figure S1). Among the major genera included in this family, *Ramphastos* have a largely black plumage with a few white or carotenoid-coloured patches [14, 15]. *Selenidera* includes sexually dichromatic species with large variations in colour across the body. All members have greenish upperparts and reddish undertail-covert. The males have the throat, crown, neck and chest in intense black while the vast majority of females range from gray to brown in these portions. Finally, *Pteroglossus* is the genus with the largest diversity of colour patterns among its members. These species also have plumage ranging from yellow to black, with a wide variation

across the body, which typically varies in shades of green, red or brown [12]. The wide range of habitats and colour patterns make Ramphastidae a good model for study the genetic basis of feather pigmentation as well as its adaptive and evolutionary significance.

In this study, we used colour variation in Ramphastidae as a case study to answer the following questions: Does the *MC1R* locus contribute to the wide range of colour variation in Ramphastidae? Is there a quantitative relationship between colour evolution and *MC1R* evolution in Ramphastidae? Is there evidence for positive natural selection acting on *MC1R*? Is there evidence for a gradual evolution of dark plumage in Ramphastidae?

2. Material and methods

(a) Colour measurements

To have a quantitative measurement of plumage brightness among the studied species, we took digital photographs from one to three males individuals of each species. We took all photos in natural lighting conditions without zoom and about 20 cm from the bird. We used a Canon Power Shot G10 digital camera (14.7 Megapixels) with Canon Lenses (EF-S 6.1-30.5mm f/2.8 to 4.5), which allowed full manual control over metering and exposure. Photographs were taken in specimens from the bird collection of the Zoology Museum from the University of São Paulo (MZUSP) and the Emílio Goeldi Museum (MPEG) (electronic supplementary

material, Table S1). We used a Mini Munsell ColourChecker Charts (manufactured by Munsell Colour) as a colour standard to calibrate the colour measurements in each image [16]. Photos were standardized in RGB (Red, Green, and Blue) values and analyzed in AxioVision Imaging System Release 4.8.9 (Göttingen, Germany). We took colour measures from seven standard body regions: dorsal head, back, dorsal tail, throat, chest, belly and wings (electronic supplementary material, Figure S2). After calibration, a RGB colour score was determined for every body part in each individual, and then averaged over individuals to obtain a single value for each body part for each species (electronic supplementary material, Table S2)[17]. These values are not intended to represent how individual birds perceive colour, but to give a general quantification of the brightness in each body part, which is likely related to melanin content. Finally, we used Principal Component Analysis (PCA) to reduce the dimensionality of this dataset and select the two first principal components (PC1 and PC2) that explain most of the variation in plumage colour.

(b) Taxon sampling and molecular data

We sampled 20 individuals from eleven Ramphastidae species covering the three main genera (supplementary material, Figure S1; Table S1). Tissue samples from these individuals were available from Laboratory of Cytogenetic and Evolution, UFRGS, Porto Alegre, Brazil, or from the Laboratory of Avian Evolution and

Genetics, USP, São Paulo, Brazil. DNA was extracted using a modified CTAB method [18].

We amplified and sequenced 831bp of the *melanocortin-1 receptor gene* (*MC1R*) coding region, as well as 639bp of *recombination activating gene 1* (*RAG-1*) and 631bp of the mitochondrial *cytochrome c oxidase subunit 1 gene* (*COI*). These genes were used to estimate Ramphastidae phylogeny and as negative controls for the effect of genetic variation over colour in phylogenetic correlation methods. PCR primers, conditions and cycling parameters are given in electronic supplementary material and methods. PCR products were purified enzymatically using ExoSAP-it (Affymetrix) and directly sequenced at Macrogen Inc (South Korea) on both strands using the same primers as in the PCR. Sequences were aligned, edited, and translated to protein using MEGA 5 [19]. All sequences were deposited in the GenBank and made available under accession numbers (*MC1R*: KP233045-KP233069; *COI*: KP899714-KP899745; *RAG-1*: KP899714-KP899731).

(c) Sequence analysis and tests of selection

All three genes, *COI*, *RAG-1* and *MC1R* were used for phylogenetic reconstructions. *Coereba flaveola* was used as outgroup (Genbank accession numbers *MC1R*: AF362587; *COI*: EF567607; *RAG-1*: HQ153083). We used the Bayesian Information Criterion scores estimated in MEGA 5 [19] to estimate the best substitution model for each gene. Therefore, we used the HKY+G substitution model

for *COI*, K2+G for *RAG-1* and HKY for *MC1R* in all analyses. Phylogenies were inferred under a Bayesian framework using BEAST v.1.7.3 [20]. A species tree using combined dataset was inferred by unlinking substitution models, clock rates and gene trees across partitions using *BEAST [21]. We assumed a Yule speciation tree-prior and a strict molecular clock with a starting estimate of 0.0135 substitutions per site per million years (s/s/My) for *COI* [22] and a continuous-time Markov chain (CTMC) rate reference prior for the other partitions (*RAG-1* and *MC1R*). In all analyses, we ran BEAST for 50 million generations sampling every 1,000 generations and discarding the first 10% samples as burn-in. We executed five independent runs to check for convergence, and then combined Log and tree files for the final estimate. We checked that the effective sample size (ESS) for all parameters were higher than 200 to ensure sampling sufficiency.

We estimated the impact of natural selection over *MC1R* based on maximum likelihood estimates of the rate of nonsynonymous substitutions per nonsynonymous site to synonymous substitutions per synonymous site ($\omega = dN/dS$) under a codon-based substitution model implemented in PAML v.4 [23]. We used the fully resolved species tree obtained in *BEAST (see session above) as the input tree. To test for positive selection acting on particular sites (codons) we compared results of nested pairs of site models: M1a-M2a, M7-M8 and M8-M8a [23]. The likelihood of the null model (M1a, M7 and M8a), which does not allow positive selection, was compared to positive selection models (M2a and M8), which allow a

proportion of sites to evolve with a dN/dS above one, using a Likelihood Ratio Test (LRT) [23]. We also used the branch-site model to test if dN/dS in the *Ramphastos* lineage was significantly higher than in other Ramphastidae lineages by defining the branch leading to the *Ramphastos* clade as the 'foreground branch'. In all cases, the LRTs between nested models were conducted by comparing the difference in log-likelihood values (LR statistic = $2(\ln L_1 - \ln L_2)$) using a χ^2 distribution, with degrees of freedom equal to the difference in the number of parameters between models [24]. Finally, PROVEAN (Protein Variation Effect Analyzer) v1.1.3 [25] was used to predict the functional effects of protein sequence variations including single or multiple amino acid substitution in the MC1R protein, applying a default threshold of -2.5.

(d) Phylogenetically correlation between Colour and Genetic Variation

We tested for genotype-phenotype correlation in a phylogenetic context to evaluate if genetic changes in specific genes could explain colour variation among species. For each gene, we estimated the root-to-tip nonsynonymous (dN) and synonymous (dS) substitution rates using branch models in PAML v.4. These quantities represent the sum of branch lengths in each category for all species. For the *MC1R* gene, we also estimated the sum of functional effects (SumEffect) estimated in PROVEAN (see above) in each lineage. Root-to-tip estimates result in values more comparable with phenotypic data since the latter also represent the

accumulated evolution rather than being the result of changes solely on the terminal branch [10].

We estimated a phylogenetic corrected correlation between these estimates vs. PC1 or PC2 values extracted from colour measurements (Table S2) in BayesTraits v.2 [26]. For all analyses, we ran BayesTraits for 1 billion steps after a burn-in of 1 million steps sampling every 5,000 steps. All analyses were repeated thrice to test the stability of the harmonic mean estimate of the marginal likelihood. All datasets were run using two alternative models of continuous (random-walk) character evolution. In the first model, correlation between variables could take any value in the interval [-1, 1]. In the second, a null-model of no correlation was assumed. We used Bayes Factors (BF) to compare the marginal likelihood of the alternative hypotheses. BF values higher than 100 ($\log_{10} \text{BF} > 2$) were interpreted as giving positive evidence in favor of a given hypothesis [27]. Overall, we ran BayesTraits for 14 comparisons (dN for the three genes, vs. PC1; dN for the three genes vs. PC2; dS for the three genes, vs. PC1; dS for the three genes vs. PC2; SumEffect for MC1R vs. PC1; SumEffect for MC1R vs. PC2). We expected no correlation between colour variables (PC1 and PC2) and synonymous substitutions for MC1R, as well as between PC1 or PC2 and both nonsynonymous and synonymous substitutions in other genes used as a control, *COI* and *RAG-1*. Concerning nonsynonymous substitutions in the *MC1R* gene, our expectation was that if variation in *MC1R* leads to darker phenotypes by a single point mutation, or if *MC1R*

was not associated with darker phenotypes, there would be no significant correlation between PC1 (or PC2) and either dN or SumEffect. On the other hand, if plumage colour (i.e. PC1 and/or PC2) were due to several substitutions in *MC1R*, these variables would show a significant correlation with either dN or SumEffect.

3. Results

(a) Adaptive evolution of the *MC1R* gene in Ramphastidae

We obtained an 831bp alignment for the *MC1R* gene from 11 Ramphastidae species. We found 31 variable sites within Ramphastidae, 14 of which represented synonymous substitutions, while the remaining 17 sites represented nonsynonymous substitutions. The tree reconstructed using *MC1R*, *COI*, and *RAG-1* (Figure 1) was consistent with previously published species phylogenies for Ramphastidae [22,28].

We did not find evidence for positive selection across the whole phylogeny using site models in PAML irrespective of which models were used (M1a vs. M2a, M7 vs. M8 or M8a vs. M8, $P > 0.01$). However, given the high number of nonsynonymous substitutions reconstructed in the ancestral *Ramphastos* lineage, we decided to test for positive selection in the branch leading to *Ramphastos* (Figure 1) using a branch-site model. The alternative model (M2, positive selection) was significantly better than the null model (M0, neutral evolution) ($P < 0.0001$), and

included a proportion of sites (0.00438) with an estimated ω of 2.19. Out of seventeen nonsynonymous amino acid substitutions found in the Ramphastidae clade (Figure 1), five (R112H, R230C, F247L, H257R, R257C) show evidence of functional effect in protein function (PROVEAN score <-2.5) (Table S3). All of these occur in the *Ramphastos* clade, three in the basal lineage, and two in the clade comprising *R. tucanus*/*P. vitellanus* and *P. dicolorus*.

(b) *MC1R* molecular evolution and plumage colour

Principal component analysis (PCA) of colour measurements among species revealed that the first principal component (PC1) explained ~76% of colour variation in the dataset, with throat, chest and belly having the highest weights. PC2 explained ~17% of colour variation, with throat, chest and head having the highest weights (Table 2). Low PC1 and PC2 values are associated with the darker colour in Ramphastidae plumage (Figure 2).

We found a significant association between the molecular evolution of *MC1R* and plumage colour in Ramphastidae, as shown by significant correlations between PC1 and dN (BF = 2.908, $R^2 = 0.2829$), and between PC1 and SumEffect (BF = 11.530, $R^2 = 0.372$) (Table 1). As expected, we did not find any significant correlation between synonymous substitutions in *MC1R* and either PC1 or PC2, or between PC2 and *MC1R* functional variation (dN or SumEffect). Also, there was no significant

correlation between synonymous or nonsynonymous substitutions from control genes, *COI* and *RAG-1*, and PC1 or PC2 (Table 1).

4. Discussion

Our results demonstrate both the action of positive selection on *MC1R* in the basal *Ramphastos* clade and a significant relationship between the rate of amino acid evolution in *MC1R* and plumage darkness in toucans. Together these provide strong support for an adaptive role of *MC1R* in interspecific variation in plumage coloration, as now discussed.

Whereas it is relatively straightforward to demonstrate a genotype-phenotype relationship within species using such techniques as candidate gene resequencing, QTL analysis and GWAS analysis, it is far harder to directly demonstrate that a gene is functionally related to phenotypic variation across species. Here we use a recently introduced method [10] to demonstrate a phylogenetically-corrected correlation between two measures of the rate of functional amino acid evolution of *MC1R* and plumage darkness across the toucan clade. Since it is well-known that a number of factors (e.g. effective population size, life history variables) can correlate with rates of molecular evolution it is important to rule these out using appropriate control loci. Hence it is crucial that we obtained positive results only for non-synonymous *MC1R* substitutions and not synonymous substitutions, and not for two other control loci (*COI* and *RAG-1*). While an alternative approach using ancestral state

reconstruction was previously applied to the evolution of pigmentation loci and sexual dimorphism in coloration in galliforms [29], this is the first time to our knowledge that this more general methodology has been successfully applied to link evolution of specific loci to coloration.

Several lines of evidence indicate that adaptively important substitutions in *MC1R* occurred in the basal *Ramphastos* lineage. First, the positive branch test shows that *MC1R* evolved adaptively in this lineage. Second, three of the seven amino acid changes along this lineage are estimated by Provean to be functionally significant. Third, three of the substitutions involve sites that have previously been implicated in colour variation in birds and mammals. Variation at site 230 is associated with dark coloration in arctic skuas and rock pocket mice [30-31], and the variant found in *Ramphastos* (R230C) occurs in the relatively dark great skua (*Catharacta skua*) [30]. The E100K and R112H substitutions are fixed in the relatively dark black-necked swan (*Cygnus melanocoryphus*) and brown booby (*Sula leucogaster*) respectively [32-33]. Hence results are consistent in suggesting that several amino acid sites were involved, presumably leading to gradual adaptive darkening along this lineage.

A notable feature of our results is that both the correlation between *MC1R* evolution and plumage colour evolution and the presence of positive selection in the ancestral *Ramphastos* lineage point to multiple incremental changes in plumage coloration as a result of separate *MC1R* substitutions, i.e. gradual evolution of

adaptive plumage coloration. This contrasts with numerous cases where single mutations (point mutations or deletions) in *MC1R* have a dramatic effect on coloration in a range of birds and other vertebrates [30, 34-37]. There are several potential causes for this difference. If the darkest coloration in *Ramphastos* was already the fittest when the lineage began to evolve, the multiple *MC1R* substitutions can be seen as part of an adaptive walk to the fittest genotype. In that case, the absence of mutations of large effect could be because they did not occur, or because the genotype-phenotype relationship is different between toucans and other lineages. Alternatively, the intermediate phenotypes may have been optimal in the populations in which they arose, and then the fittest phenotype evolved over time, with *MC1R* mutations of smaller effect tracking this change. In fact, there are other cases where multiple *MC1R* mutations are associated with dark phenotypes, including arctic skua (*Stercorarius parasiticus*), red-footed booby (*Sula sula*) and rock pocket mouse (*Chaetodipus intermedius*) [38-40]. It is interesting to note that in all of these examples, these are parallel *MC1R* genetic changes shared with toucans, suggesting some commonality in genotype-phenotype relationships among these groups. It would be interesting to investigate this further by studying functional effects of these *MC1R* mutations directly *in vitro* [1, 4, 41].

Our finding of positive selection on *MC1R* in the ancestral *Ramphastos* lineage is in contrast to several studies that only identified purifying selection on *MC1R*, including gannets and boobies [32], cetartiodactyls [42], mustelids [43],

swans [32] and primates [44]. Since dN/dS methods are insensitive to small numbers of substitutions, this difference can be explained by the same point above about single MC1R mutations having a large phenotypic effect.

What evolutionary scenario could explain the darker colour evolution in *Ramphastos*? Sexual selection is unlikely, given that MC1R evolution is not related to colour in *Selenidera*, the only genus with sexual dichromatism. On the other hand, there is evidence that in Neotropical birds plumage may evolve in response to the brightness of their habitats [45]. For instance, plumage colour diversity in tanagers is best explained by species occurrence in open vs. closed habitats [46]. However, a closed environment may select for increased crypsis, in which case plumage will match colour and brightness patterns in the environment [46], or for conspicuousness, in which case a contrasting colour pattern will be selected [45]. The genus *Ramphastos* diverged in the Miocene (8.58–13.02 Ma), coincident with the increased drying of a huge lake complex in Amazonia [22, 47] and a gradual increase in open vegetation areas. While *Pteroglossus* and *Selenidera* include species found mostly in forest interior, *Ramphastos* species may occupy open habitats, and will occupy preferentially forest edges or taller forest canopy [11]. Thus, it is possible that the overall difference in habitat use for different Ramphastidae genera shapes different selective pressures for coloration in these groups. We stress that plumage brightness that we focus on here is just one dimension of colour differences among toucans, which also vary greatly, for

example, in the extent of yellow/red coloration in their plumage and bills, allowing other colour dimensions upon which natural selection may act.

5. Conclusion

In this study, we show that variation in the *MC1R* gene is associated to dark plumage colour in Ramphastidae and show that positive selection is acting on *MC1R* in *Ramphastos*. Strikingly, several substitutions previously associated with dark colour are shared among members of genus *Ramphastos*, suggesting that the stretches of black plumage found in these species may have arisen in a stepwise manner, by accumulating substitutions of additive effect. This novel finding extends our understanding of the complex interplay between *MC1R* variation and pigmentation in vertebrates. Even though the exact selective pressures leading to the dark plumage in *Ramphastos* remain elusive, its occurrence in forest canopy and, in some cases, open areas, may have provided the link between ecological requirements and adaptation at the molecular level.

Authors' contributions

JC conceived of the study, carried out the molecular lab work, participated in data analysis, and wrote the manuscript; TROF support the study and helped to write the manuscript; NIM helped to write the manuscript and helped statistical analysis; NJRF participated in the design of the study, carried out the statistical analyses and wrote the manuscript. All authors gave final approval for publication.

Funding

This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). JC received a scholarship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil.

Acknowledgments

We thank Cristina Y. Miyaki for DNA samples of *Ramphastos* (LGEMA, USP); Luís Fernando Silveira for allowing access to the Ornithology Collection of Zoology Museum of São Paulo University (MZUSP); Maria de Fátima C. Lima for allowing access to the Ornithology Collection of Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG), and Thanh-Lan Gluckman for assistance in some analyses.

References

1. Hubbard JK, Uy JAC, Hauber ME, Hoekstra HE, Safran RJ. 2010 Vertebrate pigmentation: from underlying genes to adaptive function. *Trends Genet.* **26**, 231–239. (doi:10.1016/j.tig.2010.02.002)
2. Ridley M. 2003 *Evolution*. Boston, MA: Blackwell Scientific.
3. Hoekstra HE. 2006 Genetics, development and evolution of adaptive pigmentation in vertebrates. *Heredity* **97**, 222–234. (doi:10.1038/sj.hdy.6800861)
4. Mundy NI. 2005 A window on the genetics of evolution: *MC1R* and plumage colouration in birds. *Proc. R. Soc. B* **272**, 1633–1640. (doi:10.1098/rspb.2005.3107)
5. Rosemlum EB, Parent CE, Brandt EE. 2014 The molecular basis of phenotypic convergence. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **45**, 203–226. (doi:10.1146/annurev-ecolsys-120213-091851)
6. Stapley J, Reger J, Feulner PGD *et al.* 2010 Adaptation genomics: the next generation. *Trends Ecol. Evol.* **25**, 705–712. (doi:10.1016/j.tree.2010.09.002)
7. Golding GB, Dean AM. 1998 The structural basis of molecular adaptation. *Mol. Biol. Evol.* **15**, 355–369. (doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a025932)
8. Ghalambor C K, McKay JK, Carroll SP, Reznick DN. 2007 Adaptive versus non-adaptive phenotypic plasticity and the potential for contemporary adaptation in new environments. *Funct. Ecol.* **21**, 394–407. (DOI: 10.1111/j.1365-2435.2007.01283.x)
9. Roulin A, Ducrest AL. 2013 Genetics of colouration in birds. *Sem. Cell Dev. Biol.* **24**(6-7), 594–608. (doi:10.1016/j.semcdb.2013.05.005)
10. Montgomery SH, Capellini I, Venditti C, Barton RA, Mundy NI. 2011 Adaptive evolution of four microcephaly genes and the evolution of brain size in anthropoid primates. *Mol. Biol. Evol.* **28**, 625–638. (doi:10.1093/molbev/msq237)
11. Sick H. 1997 *Ornitologia Brasileira*. Rio de Janeiro, RJ: Ed. Nova Fronteira.
12. Sigrist T. 2009 *Avifauna Brasileira: The avis brasilis Field guide to the birds of Brazil*. São Paulo, SP: Editora Avis Brasilis.
13. Short LL, Horne JFM. 2012 *Family Ramphastidae (Toucans) Handbook of the Birds of the World*. Vol 7. Barcelona: Lynx Edicions; 2012.

14. Weckstein JD. 2005 Molecular phylogenetics of the *Ramphastos* toucans: implications for the evolution of morphology, vocalizations, and coloration. *Auk* **122**, 1191–1209.(doi:10.1642/0004-8038(2005)122[1191:MPOTRT]2.0.CO;2)
15. Prum RO, Torres RH. 2003 Structural colouration of avian skin: convergent evolution of coherently scattering dermal collagen arrays. *J. Exp. Biol.* **206**, 2409–2429. (doi: 10.1242/jeb.00431)
16. Bergman TJ, Beehner JC. 2008 A simple method for measuring color variation in wild animals: Validation and use in geladas (*Theropithecus gelada*). *Biol. J. Linn. Soc.* **94**, 231-240. (doi:10.1111/j.1095-8312.2008.00981.x)
17. Clarke JM, Schluter D. 2011 Colour plasticity and background matching in a threespine stickleback species pair. *Biol. J. Linn. Soc.* **102**, 902–914. (doi:10.1111/j.1095-8312.2011.01623.x)
18. Boyce MT, Zwick MT, Aquadro CF. 1989 Mitochondrial DNA in the bark weevils: size, structure and heteroplasmy. *Genetics* **123**, 825–836.
19. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011 MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* **28**, 2731-2739.(doi:10.1093/molbev/msr121)
20. Drummond AJ, Rambaut A. 2007 Beast: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol. Biol.* **7**, 214.(doi:10.1186/1471-2148-7-214)
21. Heled J, Drummond A. 2010 Bayesian inference of species trees from multilocus data. *Mol. Biol. Evol.* **27**, (3):570-80. (doi:10.1093/molbev/msp274)
22. Patané JSL, Weckstein JD, Aleixo A, Bates JM. 2009 Evolutionary history of *Ramphastos* toucans: molecular phylogenetics, temporal diversification, and biogeography. *Mol. Phylogenet. Evol.* **53**, 923–934. (doi:10.1016/j.ympev.2009.08.017)
23. Yang Z. 2007 PAML 4: Phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Mol. Biol. Evol.* **24**, 1586–1591. (doi:10.1093/molbev/msm088)
24. Yang Z, Nielsen R, Goldman N, Pederson AM. 2000 Codon-substitution models for heterogeneous selection pressures at amino acid sites. *Genetics* **155**, 431–49.

25. Choi Y, Sims GE, Murphy S, Miller JR, Chan AP. 2012 Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels. *PLoS ONE* **7**, e46688. (doi:10.1371/journal.pone.0046688)
26. Pagel M. 1999 Inferring the historical patterns of biological evolution. *Nature* **401**, 877-884.(doi:10.1038/44766)
27. Kass RE, Raftery AE. 1995 Bayes factors. *J. Am. Statist. Assoc.* **90**, 773-795
28. Patel S, Weckstein JD, Patané JSL, Bates JM, Aleixo A. 2011 Temporal and spatial diversification of *Pteroglossus aracaris* (Aves: Ramphastidae) in the neotropics: constant rate of diversification does not support an increase in radiation during the Pleistocene. *Mol. Phylogenet. Evol.* **58**, 105–115. (doi:10.1016/j.ympev.2010.10.016)
29. Nadeau NJ, Burke TA, Mundy NI. 2007 Evolution of an avian pigmentation gene correlates with a measure of sexual selection. *Proc. R. Soc. B* **274**, 1807-1813. (doi: 10.1098/rspb.2007.0174)
30. Mundy NI, Badcock NS, Hart T, Scribner K, Jansen K, Nadeau NJ. 2004 Conserved genetic basis of a quantitative trait involved in mate choice. *Science* **303**, 1870-1873. (doi:10.1126/science.1093834)
31. Nachman MW, Hoekstra HE, D'Agostino SL. 2003 The genetic basis of adaptive melanism in pocket mice. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **100**, 5268–5273. (doi: 10.1073/pnas.0431157100)
32. Pointer MA, Mundy NI. 2008 Testing whether macroevolution follows microevolution: are colour differences among swans (*Cygnus*) attributable to variation at the MC1R locus. *BMC Evol. Biol.* **12**, 249 (doi:10.1186/1471-2148-8-249)
33. Baiao P, Parker PG. 2012 Evolution of the Melanocortin-1 Receptor (MC1R) in Boobies and Gannets (Aves, Suliformes). *J. Hered* **103**, 322–329. (doi:10.1093/jhered/esr151)
34. Theron E, Hawkins K, Bermingham E, Ricklefs RE, Mundy NI. 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*. *Curr. Biol.* **11**, 550–7. (doi:10.1016/S0960-9822(01)00158-0)

35. Cibois A, Thibault JC, Pasquet E. 2012 The molecular basis of the plumage colour polymorphism in the Tahiti reed-warbler *Acrocephalus caffer*. *J. Avian Biol.* **43**, 3–8. (doi: 10.1111/j.1600-048X.2011.05546.x)
36. Vidal O, Araguas RM, Fernández R, Heras S, Sanz N, Pla C. 2010 Melanism in guinea fowl (*Numida meleagris*) is associated with a deletion of Phenylalanine-256 in the MC1R gene. *Anim. Genet.* **41**, 656-658. (doi:10.1111/j.1365-2052.2010.02056.x)
37. Uy JA, Moyle RG, Filardi CE, Cheviron ZA. 2009 Difference in plumage color used in species recognition between incipient species is linked to a single amino acid substitution in the melanocortin 1 receptor. *Am. Nat.* **174**, 244–54.(doi: 10.1086/600084)
38. Baião PC, Schreiber EA, Parker PG. 2007 The genetic basis of the plumage polymorphism in Red-Footed Boobies (*Sula sula*): A Melanocortin-1 Receptor (MC1R) analysis. *J. Hered.* **98**, 287-292. (doi:10.1093/jhered/esm030)
39. Janssen K, Mundy NI. 2013 Molecular population genetics of the melanic plumage polymorphism in arctic skuas (*Stercorarius parasiticus*): Evidence for divergent selection on plumage colour. *Mol. Ecol.* **22**, 4634–4643 (doi: 10.1111/mec.12428)
40. Nachman MW, Hoekstra HE, D'Agostino SL. 2003 The genetic basis of adaptive melanism in pocket mice. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **100**, 5268–5273. (doi: 10.1073/pnas.0431157100)
41. Hoekstra HE, Hirschmann RJ, Bunday RA, Insel PA, Crossland JP. 2006 A single amino acid mutation contributes to adaptive beach mouse color pattern. *Science* **313**, 101–104. (doi: 10.1126/science.1126121)
42. Ayoub NA, McGowen MR, Clark C, Springer MS, Gatesy J. 2009 Evolution and phylogenetic utility of the melanocortin-1 receptor gene (MC1R) in Cetartiodactyla. *J. Mol. Phylogene. Evol.* **52**,550-7. (doi:10.1016/j.ympev.2009.03.008)
43. Shimada T, Sato JJ, Aplin KP, Suzuki H. 2009 Comparative analysis of evolutionary modes in Mc1r coat colour gene in wild mice and mustelids. *Genes Genet. Syst.* **84**, 225-231.(doi:10.1266/ggs.84.225)

44. Mundy NI, Kelly J. 2003 Evolution of a pigmentation gene, the melanocortin-1 receptor, in primates. *Am. J Phys. Anthropol.* **121**, 67-80. (doi:10.1002/ajpa.10169)
45. Gomez D, Théry M. 2007 Simultaneous crypsis and conspicuousness in colour patterns: comparative analysis of a Neotropical rainforest bird community. *Am. Nat.* **169**, S42-S61. (doi:10.1086/510138?uid=3737664)
46. Shultz AJ, Burns KJ. 2013 Plumage evolution in relation to light environment in a novel clade of Neotropical tanagers. *Mol. Phylogenet. Evol.* **6**, 112-125. (doi:10.1016/j.ympev.2012.09.011)
47. Hovikoski J, *et al.* 2007 The nature of Miocene Amazonian epicontinental embayment: high-frequency shifts of the low gradient coastline. *Geol. Soc. Am. Bull.* **119**, 1506–1520. (doi: 10.1130/0016-7606(2007)119[1506:TNOMAE]2.0.CO;2)

Table 1. Correlation test between Root-to-Tip dN, dS, Sum Functional Effect (SumEffect) and plumage color measures from PCA analysis (PC1 and PC2) in Ramphastidae. Significant values are in bold.

Locus		PC1			PC2		
		PC1 vs dN	PC1 vs dS	PC1 vs SumEffect	PC2 vs dN	PC2 vs dS	PC2 vs SumEffect
<i>MC1R</i>	Bayes Factor	2.908	-0.094	10.530	0.592	-1.884	-1.314
	R	-0.532	-0.374	0.610	0.282	0.196	-0.018
	R ²	0.283	0.140	0.372	0.079	0.038	0.0003
<i>RAG-1</i>	Bayes Factor	0.229	0.400	-	0.147	-2.086	-
	R	0.139	-0.364	-	0.337	0.153	-
	R ²	0.019	0.133	-	0.114	0.023	-
<i>COI</i>	Bayes Factor	-1.058	1.122	-	-0.878	0.284	-
	R	0.329	-0.459	-	0.195	0.435	-
	R ²	0.108	0.210	-	0.038	0.189	-

R - correlation coefficient between traits 1 and 2. R² - determination coefficient between traits 1 and 2.

Table 2. Variance loading of first three principal components to color traits measured of seven body regions samples from male's individuals. Variances that have the high contribution are highlighted in bold.

Patch	PC 1	PC 2	PC 3
Head	0.059	0.308	0.415
Back	0.162	-0.162	0.057
Tail	0.187	-0.018	0.363
Throat	-0.766	0.423	0.338
Chest	0.268	0.800	-0.494
Belly	0.498	0.243	0.579
Wing	0.171	0.001	0.007
Eigenvalue	0.368	0.080	0.021
Variance (%)	76.14	16.59	4.41

Figure Legends

Figure 1. Bayesian phylogenetic tree of Ramphastidae constructed with combined data set for the partitioned of DNA sequences (MC1R + RAG-1 + COI). Values below branches indicate posterior probabilities from Bayesian analysis. Amino acid substitutions indicated evidence of effect on MC1R function from Provean analysis are shown in filled circles, all other substitutions are shown in unfilled circles. Abbreviations: *R.*= *Ramphastos*; *S.*=*Selenidera*; *P.*= *Pteroglossus*. *Coereba flaveola* was used as the outgroup taxon.

Figure 2. Factor loadings for the two first principal components derived from measurements of the colour traits of seven body regions from male Ramphastidae, PC1 in white column and PC2 in black column. Lower values in PC1 represent darker plumage. Abbreviations: *R.* = *Ramphastos*; *S.*=*Selenidera*; *P.*= *Pteroglossus*.

Figure 1

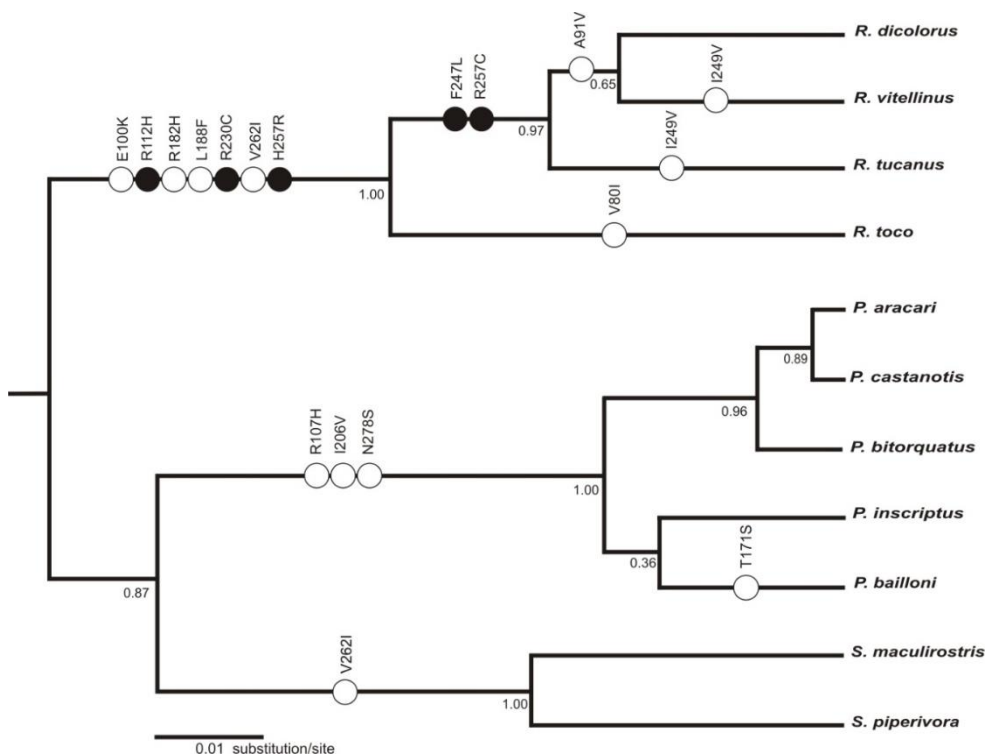
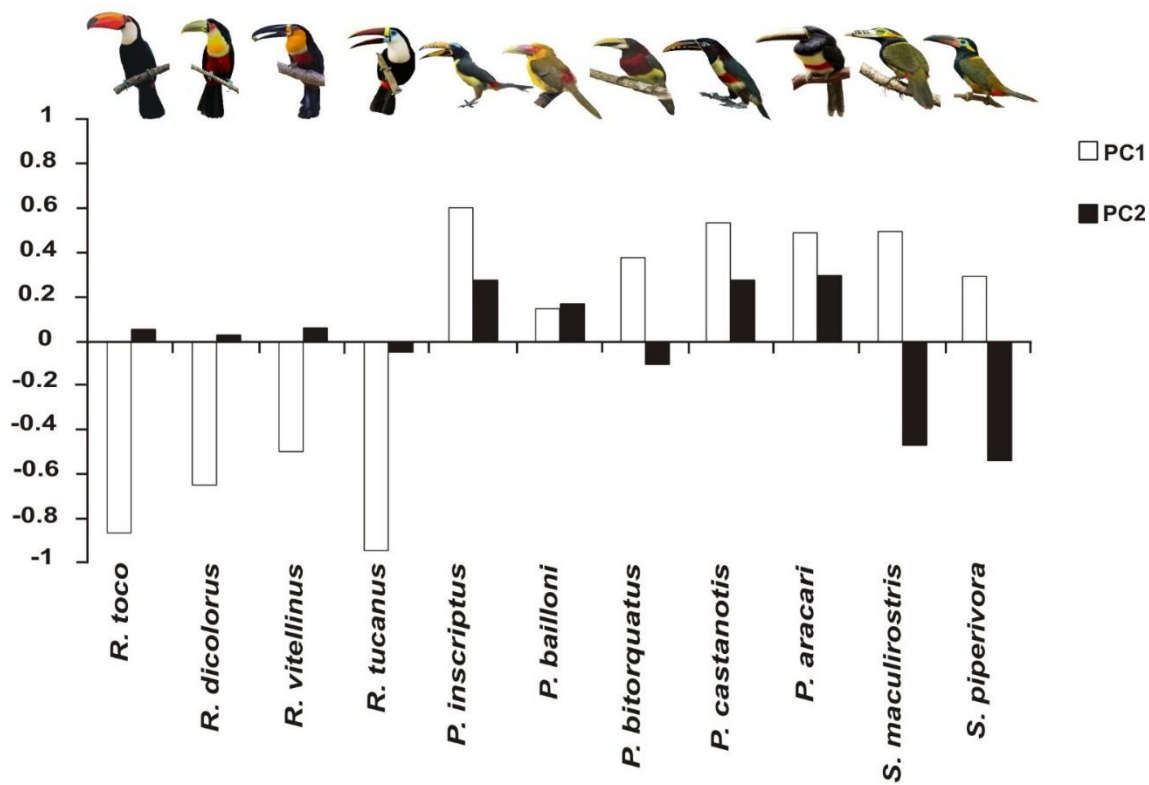


Figure 2



ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

Table S1. Taxon sampling for this study.

Common name	Family Ramphastidae Species	Abbr.	DNA samples code ¹	Voucher ID used to color measures ²
Toco toucan	<i>Ramphastos toco a</i> <i>Ramphastos toco b</i> <i>Ramphastos toco c</i>	Rto	DA40240 DA39885 DA39886	53300A, 80100A, 31001A
Red-billed toucan	<i>Ramphastos tucanus a</i> <i>Ramphastos tucanus b</i> <i>Ramphastos tucanus c</i>	Rtu	DA38043 DA37169 DA38044	17648F, 64058 F, 64059M
Channel-billed toucan	<i>Ramphastos vitellinus</i>	Rvi	DA34256	29484M, 29485F, 31001M
Red-breasted Toucan	<i>Ramphastos dicolorus a</i> <i>Ramphastos dicolorus b</i>	Rdi	DA40302 DA40186	12480F, 87342A, 93083M
Spot-billed toucanet	<i>Selenidera maculirostris a</i> <i>Selenidera maculirostris b</i>	Sma	DA31775 LGEMA3336	315M, 7988M, 47720M, 24363F, 33176F, 33178F
Guianan toucanet	<i>Selenidera piperivora</i>	Spi	LGEMA3439	58239M, 66857F
Saffron toucanet	<i>Pteroglossus bailloni a</i> <i>Pteroglossus bailloni b</i>	Pba	DA3176 DA31777	24368F, 43202F, 34769F
Lettered aracari	<i>Pteroglossus inscriptus a</i> <i>Pteroglossus inscriptus b</i>	Pin	DA39171 DA39173	3424M, 52615M, 52616M, 52614F, 68976F, 68977F
Black-necked aracari	<i>Pteroglossus aracari a</i>	Par	DA39496	28072A, 33173F, 4485M
Red-necked aracari	<i>Pteroglossus bitorquatus</i>	Pbi	LGEMA13877	2211M, 10659F, 13032M
Chestnut-eared aracari	<i>Pteroglossus castanotis a</i> <i>Pteroglossus castanotis b</i>	Pca	DA39494 DA34803	30903M, 30905M, 30906F

¹Numbered samples that start with: DA = were deposited in Laboratório de Citogenética e Evolução (Universidade Federal do Rio Grande do Sul- RS, Brazil); LGEMA = were loaned from Laboratório de Genética e Evolução Molecular de Aves (Universidade de São Paulo- SP, Brazil). ²Samples used for color analysis were from Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP) and Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG). Numbered samples that end with: F =female, M= male, A=sex were not identified.

Table S2. Standard measurements of color from seven body regions sampled each species. Mean values± standard error (SE).

Specie abbr. ¹	Head	Back	Tail	Throat	Chest	Belly	Wing
Rto	-0.087± 0.00	-0.141± 0.02	-0.181± 0.03	0.984± 0.01	-0.113± 0.04	-0.161± 0.00	-0.121± 0.03
Rtu	-0.201± 0.03	-0.193± 0.03	-0.229± 0.02	0.986± 0.00	-0.201± 0.01	-0.170± 0.04	-0.274± 0.06
Rvi	-0.178± 0.05	-0.226± 0.00	-0.237± 0.04	0.559± 0.03	0.137± 0.03	-0.161± 0.01	-0.056± 0.01
Rdi	-0.279± 0.04	-0.168± 0.04	-0.316± 0.02	0.679± 0.03	0.109± 0.05	-0.238± 0.05	-0.107± 0.02
Sma	-0.263± 0.04	0.049± 0.07	0.094± 0.01	-0.320± 0.0	-0.111± 0.05	0.331± 0.04	0.152± 0.03
Spi	-0.294± 0.00	0.160± 0.04	-0.117± 0.03	-0.271± 0.00	-0.136± 0.05	0.122± 0.02	-0.035± 0.00
Pba	0.125± 0.05	-0.011± 0.01	-0.001± 0.03	0.196± 0.05	0.279± 0.01	0.237± 0.06	0.103± 0.03
Pin	-0.048± 0.02	0.014± 0.02	-0.019± 0.01	-0.092± 0.01	0.517± 0.06	0.623± 0.13	0.015± 0.03
Par	-0.049± 0.00	-0.027± 0.02	-0.008± 0.02	-0.044± 0.02	0.568± 0.05	0.441± 0.05	0.056± 0.02
Pbi	-0.060± 0.01	0.002± 0.01	0.010± 0.01	-0.024± 0.01	0.040± 0.01	0.521± 0.04	0.040± 0.01
Pca	-0.077± 0.00	0.012± 0.01	-0.010± 0.01	-0.055± 0.01	0.535± 0.04	0.525± 0.07	0.070± 0.01

¹Abbreviations was conform Table S1.

Table S3. Predicted functional effects of amino acid variants in the Ramphastidae.

Codon	Domain^a	BEB^b M2 (M8)	Provean^c
V80I	TM II	-	-0.66
A91V	TM II	-	1.24
E100K	EC	0.80	-1.56
R107H	EC	-	0.39
R112H	EC	0.79	-2.73
T171S	TM IV	-	-1.51
R182H	TM IV	0.81	0.29
L188F	EC	0.76	-2.2
I206V	TM V	-	0.08
R230C	EC	0.78	-3.34
F247L	TM VI	0.78	-5.80
I249V	TM VI	-(0.65)	-0.16
H257R	TM VI	0.53(0.78)	-7.66
R257C	TM VI	0.53 (0.78)	-2.87
N278S	TM VII	-	3.93

^aEC = Extracellular, TM = Transmembrane.

^bBEB, Bayes Empirical Bayes, with significant ω tested with Branch and Site Model in PAML given M2 model. BEB values for the M8 model are indicated in parenthesis.

^cCutoff = -2.5, variants with a score equal to or below -2.5 are considered "deleterious", in bold.

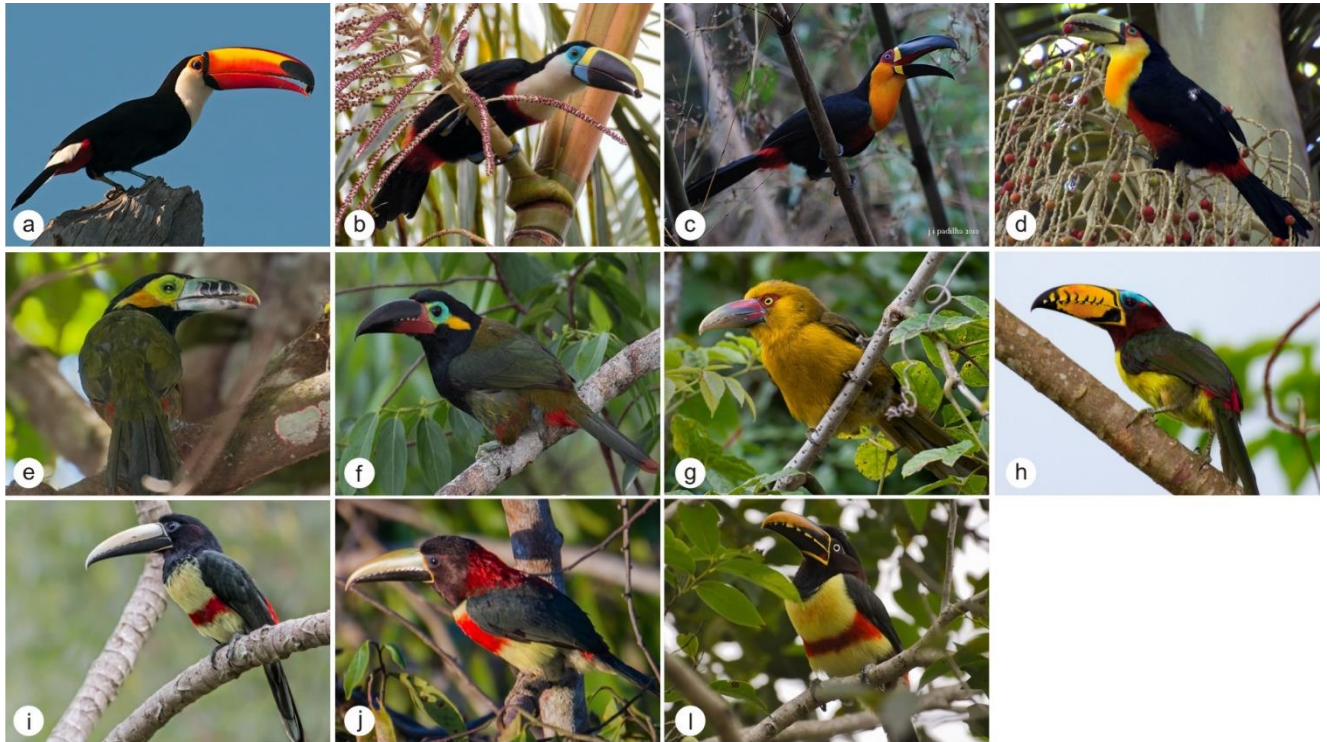


Figure S1. Ramphastidae. a) *Ramphastos toco* (Toco toucan); b) *Ramphastos tucanus* (Red-billed toucan); c) *Ramphastos vitellinus* (Channel-billed toucan); d) *Ramphastos dicolorus* (Red-breasted Toucan); e) *Selenidera maculirostris* (Spot-billed toucanet); f) *Selenidera piperivora* (Guianan toucanet); g) *Pteroglossus bailloni* (Saffron toucanet); h) *Pteroglossus inscriptus* (Lettered aracari); i) *Pteroglossus aracari* (Black-necked aracari); j) *Pteroglossus bitorquatus* (Red-necked aracari); l) *Pteroglossus castanotis* (Chestnut-eared aracari). Image: a, d) Dario Sanches; b) Fernando Flores; c) J.I.Padilha; e, g, j, l) Cláudio Dias Timm f) Anselmo d’Affonseca h) André Luiz Briso i) Darlan Sattler.

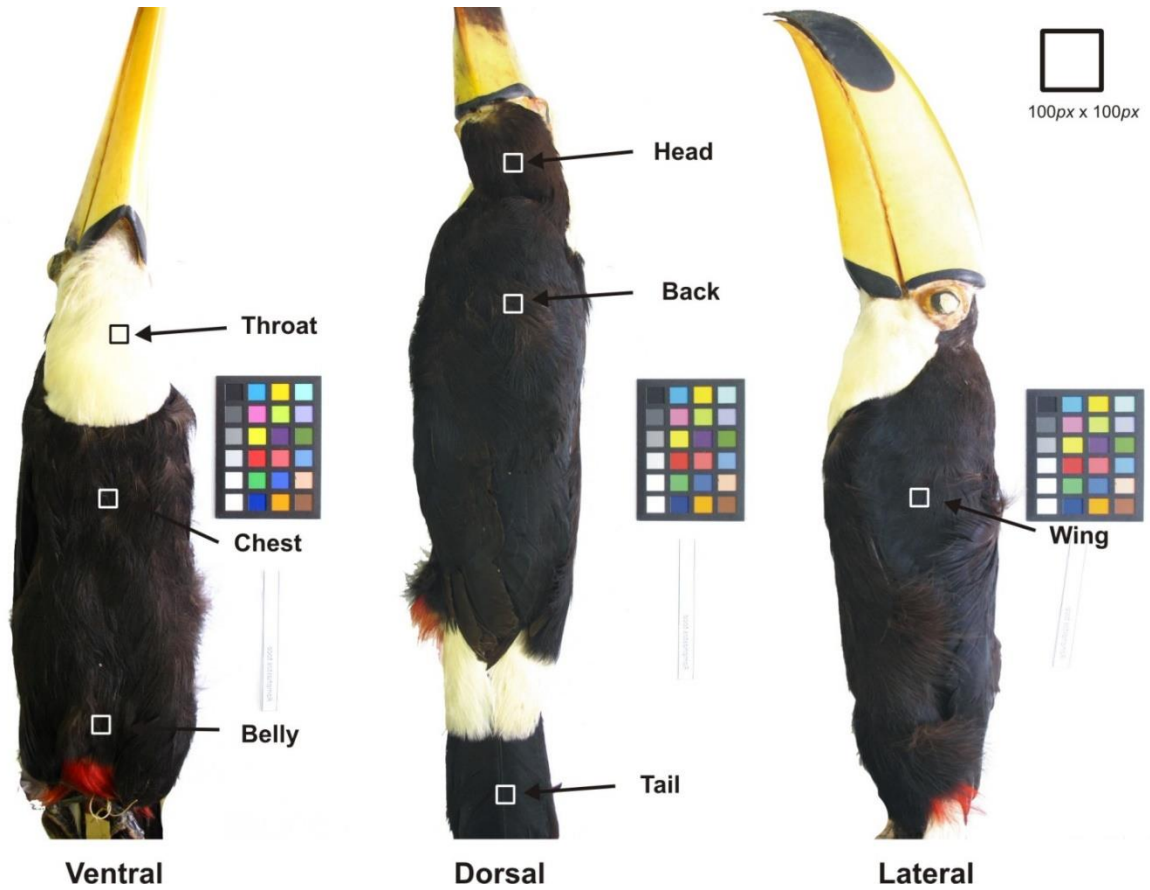


Figure S2. Color measurements were taken from seven body region: head, back, tail, throat, chest, belly and wings. Square box indicate the 'sample area' from each patch measured (approximately 100 pixels x 100 pixels). All pictures were taken from voucher specimens next to Mini Munsell ColorChecker Charts (Munsell Color).

CAPÍTULO IV

ARTIGO CIENTÍFICO



Genetic variation in the bronze locus (*MC1R*) in turkeys from Southern Brazil

Josmael Corso¹, Diego Hepp^{1,2}, Nelson J. R. Fagundes^{1*}, Thales R. O. de Freitas¹

¹Departament of Genetics, Institute of Biosciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

² Federal Institute of Education, Science and Technology of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

*Corresponding Author:

Nelson J.R. Fagundes

Departamento de Genética – UFRGS

Caixa Postal 15053, 91501-970 Porto Alegre, RS Brazil

nelson.fagundes@ufrgs.br

Manuscrito em preparação para o periódico 'Genetics and Molecular Biology'

ABSTRACT

Domestic turkeys present several color phenotypes controlled by at least five genetic loci, but only one of these have been identified precisely: the bronze locus, which turned out to be the *melanocortin-1 receptor* gene (*MC1R*). *MC1R* variation is important for breeders interested in maintaining or developing different color varieties. In this study, we sequenced most of the *MC1R* gene from 16 White Holland (the main commercial turkey variety) and 19 pigmented birds from Southern Brazil with two purposes: describing *MC1R* diversity in White Holland turkeys, which may serve as reservoirs of genetic diversity at this locus, and testing if the traditional color classification used by Brazilians breeders is related to *MC1R* alleles previously known. White Holland birds had four different haplotypes corresponding to 31 bronze (b^+) alleles and a single black-winged bronze (b^1) allele. Pigmented birds also had four haplotypes, corresponding to 13 b^+ and 25 b^1 alleles. The black allele, B , was absent from our sample. Overall, our results suggest that White Holland individuals have been kept mostly isolated from pigmented birds, and that the traditional color classification used by Brazilians breeders cannot accurately predict the genotypes at the bronze locus.

Key words: *Meleagris gallopavo*, white phenotype, melanocortin-1 receptor, bronze locus

The turkey (*Meleagris gallopavo*) is a bird with high commercial value, playing a preponderant role in the Brazilian poultry industry, once Brazil is the third largest producer and exporter of turkey meat (Antunes, 2005). Domestic turkeys have been bred into many varieties with different plumage patterns, and have been used in classical genetic studies to determine the genetic basis of color phenotypes (Robertson *et al.*, 1943). At least five loci were characterized as responsible for the great color variation in this species (Robertson *et al.*, 1943). One of these locus, the bronze locus, shows three alleles in dominance order B (black) $>$ b^+ (wild bronze) $>$ b^l (black-winged bronze) (Asmundson, 1945). Recently, Vidal *et al.* (2010) showed that the bronze locus is actually the melanocortin-1 receptor gene (*MC1R*), with the Black and black-winged bronze phenotypes being considered as a case of dominant or recessive melanism, respectively. *MC1R* is known as a key regulator of melanin synthesis and have been associated to melanism in several vertebrate species (Mundy, 2005; Skoglund and Höglund, 2010).

Molecular characterization of the *MC1R* genes can be useful in breeding programs aiming at maintaining or developing different color varieties in species such as turkeys, in which the different and exquisite plumages have ornamental value. Turkeys bred in backyards for ornamental or family consumption purposes usually have predominantly dark plumage, while turkeys raised for the poultry industry have white plumage, White Holland being one of the major commercial variety used in Brazil (Costa, 2006). White turkeys have the recessive allele c in homozygosity in an epistatic locus for color, and therefore may have any allele

combination in the bronze locus (Robertson *et al.*, 1943; Asmundson, 1945). Thus, white turkeys may serve as a reservoir of *MC1R* variation to be used in turkey breeding programs, but this locus have never been studied in such breeds. Another concern is that most colored birds raised in backyards are classified informally by the breeders based on a general plumage pattern, and, therefore, it is unknown whether this classification is useful for predicting genotypes or alleles present in the bronze locus. In this study, we performed the first characterization of the *MC1R* locus in White Holland turkeys from Southern Brazil. In addition, we characterized the *MC1R* variation found in colored birds raised in backyards in Southern Brazil to test the predictive potential of the informal phenotypic classification made by breeders concerning the bronze locus.

We analyzed 35 domestic turkeys, being 16 White Holland and 19 colored birds (Table 1). We used two alternative phenotypic classifications. First, we used the informal classification attributed by breeders in Southern Brazil. Second, we asked Mr. Kevin Porter (Porter's Rare Heritage Turkeys breeding facility, IN, USA) to classify these birds in traditionally recognized varieties based on pictures taken during sampling collection. DNA was extracted from blood placed at paper filter with the extraction method modified from Boyle *et al.* (1989). The sampling procedure involved a small puncture in birds' wing, and was carried out after informed consent given by the birds' owners. Genomic DNA was amplified with primers MC1R 5UTRF1MG 5'-CTG GCT GAG GCC GGG GCC-3' and MC1R 3UTRR1MG 5'-GAG GTC GGG CAG CCC AAC-3' (Vidal *et al.*, 2010). PCR reactions contained 2-4 μ L

of DNA template, 0.25 mM of each dNTP, 1 x PCR Buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.1 units of Taq DNA polymerase, 0.25 μM each primer and ddH₂O to a final volume of 25 μL. After an initial denaturation at 94 °C for 5 minutes, we performed 35 cycles at 94 °C for 30s, 61.5°C for 40 s and 72°C for 30s, followed by a final extension at 72°C for 5 min. PCR products were checked in agarose gel 1%, purified with Exonuclease I and Shrimp Alkaline Phosphatase (GE Healthcare), and sequenced in Macrogen (Seoul, South Korea) using the primers used during PCR amplification. Sequences with 831 to 1036 bp of the *MC1R* coding region were deposited in GenBank under accession numbers KP867098-KP867115. Nucleotide sequences were aligned and translated using MEGA 5 (Tamura et al., 2011). Putative heterozygous sites were identified by visual inspection of the chromatograms and confirmed by sequencing the complementary strand. Individuals exhibiting heterozygous bases were resolved into haplotypes with PHASE algorithm implemented in DnaSP (Librado and Rozas, 2009) We using the recombination model (-MR0), with 100000 iterations sampling every 100 iterations. The first 10000 iterations were discarded as burn-in (Stephens *et al.*, 2001).

Five variable sites were detected, representing four synonymous and one nonsynonymous substitution (Table 1). When compared to *MC1R* haplotypes previously characterized in this species (Vidal *et al.*, 2010), our study found three haplotypes previously identified (H1, H4, and H5), and three new haplotypes (H6-H8) based on synonymous substitutions. Thus, all new haplotypes represent new variants of the wild-type bronze allele *b^t*. Table 2 shows haplotype frequency for

white and colored birds. Among white individuals, we found a single b^1 allele, with all other alleles being b^+ variants. On the other hand, in colored individuals, b^1 had a frequency of $\sim 0.66\%$, with the remaining alleles being b^+ variants. We did not find any B allele in our sample. Curiously, the most frequent haplotype for a b^+ allele in white birds have not been found in colored birds and vice-versa (Table 2).

Color phenotypes based on a traditional color classification included *Carijó* (which corresponds to a Mottled/Flecked color pattern), *Carijó-Marrom* (Mottled/Flecked Brown), *Preto com Vermelho* (Black with Red) and *Preto* (Black) (Supplementary material Figure S1). This classification had a poor performance for predicting genotypes at the bronze locus. For example, *Carijó* and *Carijó Marrom* included birds having either b^+b^1 or b^1b^1 genotypes. Birds classified as *Preto com Vermelho* or *Preto*, for which a B allele would be expected, were all b^+b^+ . On the other hand, a phenotypic classification performed by Mr. Kevin Porter matched perfectly the expected and observed *MC1R* genotypes. Only phenotypes expected to be b^+b^+ or b^+b^1 (Bronze and Red Bronze), or b^1b^1 (Royal Palm, Tricolor, and Tiger Bronze) were identified among the birds included in this study (Table 1).

Additional analyses showed high heterozygosity in white turkeys ($F_{IS}=-0.173$) compared to colored ($F_{IS}=0.291$), suggesting higher endogamy among birds raised in backyards. This result could be explained either because commercial birds have been bred using different “stocks” to avoid inbreeding (Costa, 2006), because birds within each backyard tend to breed among themselves, or because there is some breeding selection in the backyards driven by color that increases homozygosity in

MC1R. However, we think that this last hypothesis is unlikely because we found no relationship between *MC1R* variation and the color phenotypes ascertained by breeders.

In conclusion, our study found new variants of the b^+ allele in turkeys from Southern Brazil coming from both commercial and non-commercial establishments, and showed that almost all white turkeys were homozygous for the b^+ allele. Taken together, these results suggests that White Holland turkeys are unlikely to provide an input of new bronze alleles in breeding programs aimed at producing new colored varieties. In addition, we showed that the traditional classification used by backyard turkey breeders from Southern Brazil is unrelated to the genotypes at the bronze locus, *MC1R*, which may be relevant for ornamental turkey breeding programs in this region.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Paulo A. Esteves, Monica C. Ledur, Alexandre L. Tessmann, and Jane Peixoto for DNA samples of colored turkeys (EMBRAPA, Suínos e Aves, SC, Brazil). We are also indebted to Kevin Porter (Porter's Rare Heritage Turkeys, IN, USA) for help in classifying these birds into traditional turkey color varieties. JC received a scholarship from Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil.

References

Antunes ML (2005) Criação de perus: a situação brasileira. Conferência Apinco 2005 de Ciência e Tecnologia Avícolas 1: 7-16.

Asmundson VS (1945) A triple-allele series and plumage color in turkeys. *Genetics* 30:305–322.

Boyce TM, Zwick ME and Aquadro CF (1989) Mitochondrial DNA in the Bark Weevils: size, structure and heteroplasm. *Genetics* 123: 825-836.

Costa F (2006) Caracterização do processo de *rigor mortis* e da maciez dos músculos *Gastrocnemius* e *Pectoralis* e efeito da radiação gama na vida comercial da carne de peru (*Meleagris gallopavo*). PhD Thesis, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 145 pp.

Librado P and Rozas J (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451-1452.

Mundy NI (2005) A window on the genetics of evolution: *MC1R* and plumage coloration in birds. *Proc R Soc B* 272:1633-1640.

Robertson WRB, Bohren BB and Warren DC (1943) The inheritance of plumage color in the turkey. *J Hered* 34:246–256.

Skoglund P and Höglund J (2010) Sequence polymorphism in candidate genes for differences in winter plumage between Scottish and Scandinavian Willow Grouse (*Lagopus lagopus*). *PLoS One* 5:e10334.

Stephens M, Smith NJ and Donnelly P (2001) A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 68: 978–989.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M and Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28:2731–9.

Vidal O, Araguas RM, Fernández R, Heras S, Sanz H and Pla C (2010) Melanism in guinea fowl (*Numida meleagris*) is associated with a deletion of Phenylalanine-256 in the *MC1R* gene. *Anim Genet* 41:656–658.

Table 1. Molecular features of the turkey *melanocortin-1 receptor* gene (*MC1R*). Haplotypes H1-H5 according to Vidal *et al.* (2010), H6-H8 are new haplotypes found in this study. Phenotype using a traditional color classification and Porter's Rare Heritage.

Sample ID	Acid Nucleic Site ^A							<i>MC1R</i> haplotype	Bronze locus allele	Color Phenotype ^B	
	90	96	186	364	411	450	887			Tradicional Color Classification	Porter Classification
	G30	W32X	L62	I122F	A137	Y150	A296V				
	C	G	C	A	C	C	C	H1 (MC1R*1)	<i>b</i> ⁺		
	*	*	*	T	*	T	*	H2 (MC1R*2)	<i>B</i>		
	*	A	*	T	*	T	*	H3 (MC1R*3)	<i>b</i> ¹		
	*	*	*	*	*	T	T	H4 (MC1R*4)	<i>b</i> ¹		
	*	*	*	*	*	T	*	H5 (MC1R*5)	<i>b</i> ⁺		
	*	*	G	*	*	*	*	H6	<i>b</i> ⁺		
	*	*	G	*	T	*	*	H7	<i>b</i> ⁺		
	A	*	*	*	*	*	*	H8	<i>b</i> ⁺		
Per01	*	*	C/G	*	*	*	*	H1/H6	<i>b</i> ⁺ <i>b</i> ⁺	White	-
Per02	-	-	G	*	T	*	*	H7/H7	<i>b</i> ⁺ <i>b</i> ⁺	White	-
Per03	*	*	C/G	*	*	*	*	H1/H6	<i>b</i> ⁺ <i>b</i> ⁺	White	-
Per04	*	*	C/G	*	C/T	*	*	H1/H7	<i>b</i> ⁺ <i>b</i> ⁺	White	-
Per06	*	*	C/G	*	C/T	*	*	H1/H7	<i>b</i> ⁺ <i>b</i> ⁺	White	-
Per07	-	-	C/G	*	*	*	*	H1/H6	<i>b</i> ⁺ <i>b</i> ⁺	White	-

Per10	*	*	*	*	*	*	*	H1/H1	b^+b^+	White	-
Per11	*	*	C/G	*	*	*	*	H1/H6	b^+b^+	White	-
Per12	C/A	*	*	*	*	*	*	H1/H8	b^+b^+	White	-
Per13	*	*	C/G	*	C/T	*	*	H1/H7	b^+b^+	White	-
Per14	*	*	*	*	*	*	*	H1/H1	b^+b^+	White	-
Per17	*	*	*	*	*	*	*	H1/H1	b^+b^+	White	-
Per21	*	*	C/G	*	C/T	*	*	H1/H7	b^+b^+	White	-
Per22	*	*	*	*	*	*	*	H1/H1	b^+b^+	White	-
Per24	-	*	*	*	*	C/T	C/T	H1/H4	b^+b^1	White	-
Per25	-	-	C/G	*	*	*	*	H1/H6	b^+b^+	White	-
Pp02	-	-	*	*	*	T	T	H4/H4	b^1b^1	<i>Carijó</i>	Tricolor
Pp03	-	-	*	*	*	T	C/T	H4/H5	b^+b^1	<i>Preto</i>	Bronze
Pp04	-	-	*	*	*	T	T	H4/H4	b^1b^1	<i>Carijó</i>	Tricolor
Pp06	-	-	G	*	*	*	*	H6/H6	b^+b^+	<i>Preto</i>	Bronze
Pp09	-	-	*	*	*	T	T	H4/H4	b^1b^1	<i>Carijó Marrom</i>	Tricolor
Pp10	-	-	C/G	*	C/T	C/T	C/T	H4/H7	b^+b^1	<i>Carijó Marrom</i>	Bronze
Pp11	*	*	*	*	*	T	T	H4/H4	b^1b^1	<i>Carijó</i>	Tricolor
Pp13	*	*	C/G	*	*	C/T	C/T	H4/H6	b^+b^1	<i>Carijó</i>	Bronze
Pp14	-	-	*	*	*	T	T	H4/H4	b^1b^1	<i>Carijó Marrom</i>	Tricolor
Pp15	-	-	*	*	*	T	C/T	H4/H5	b^+b^1	<i>Carijó</i>	Red Bronze
Pp16	-	-	C/G	*	*	C/T	C/T	H4/H6	b^+b^1	<i>Carijó</i>	Red Bronze

Pp17	-	-	*	*	*	T	C/T	H4/H5	<i>b⁺b¹</i>	<i>Carijó</i>	Bronze
Pp18	-	-	*	*	*	T	*	H5/H5	<i>b⁺b⁺</i>	<i>Preto com Vermelho</i>	Bronze
Pp22	*	*	*	*	*	T	T	H4/H4	<i>b¹b¹</i>	<i>Carijó</i>	Tricolor
Pp24	*	*	*	*	*	T	T	H4/H4	<i>b¹b¹</i>	<i>Carijó</i>	Tiger Bronze
Pp28	-	-	*	*	*	T	T	H4/H4	<i>b¹b¹</i>	<i>Carijó</i>	Royal Palm
Pp30	-	-	*	*	*	T	*	H5/H5	<i>b⁺b⁺</i>	<i>Preto</i>	Bronze
Pp31	-	-	*	*	*	T	T	H4/H4	<i>b¹b¹</i>	<i>Carijó Marrom</i>	Tricolor
Pp34	-	-	C/G	*	C/T	C/T	C/T	H4/H7	<i>b⁺b¹</i>	<i>Carijó</i>	Red Bronze

^A*MC1R* nucleotide position is shown above, while the protein position and the corresponding amino acid substitution is shown below. Nonsynonymous and Nonsense mutations are shown in bold. ^BWhite Holland: these birds have not been subjected to further phenotypic classification based on photographs.

Table 2. MC1R haplotype frequencies in sampled individuals. Absolute numbers are given in parenthesis.

Haplotype	Bronze locus allele	White turkeys	Colored turkeys
H1	b^+	0.594 (19)	0.000 (0)
H4	b^1	0.031 (1)	0.658 (25)
H5	b^+	0.000 (0)	0.184 (7)
H6	b^+	0.156 (5)	0.105 (4)
H7	b^+	0.188 (6)	0.053 (2)
H8	b^+	0.031 (1)	0.000 (0)



Figure S1. Turkey photograph from individuals used in this study. Sample ID follow by phenotype using a traditional color classification and Porter's Rare Heritage: a) Pp17, Carijó/Bronze; b) Pp24, Carijó/Tiger Bronze; c) Pp15, Carijó/Red Bronze; d) Pp11, Carijó/ Tricolor; e) Pp28, Carijó/Royal Palm; f) Pp18, Preto-Vermelho/Bronze; g) Pp06, Preto/Bronze; h) Per07, Pure White/White Holland.

CAPÍTULO V

ARTIGO CIENTÍFICO



Highly polymorphic colour vision in a New World monkey with red facial skin, the bald uakari (*Cacajao calvus*)

Josmael Corso¹, Mark Bowler^{2,3}, Eckhard W. Heymann³, Christian Roos⁴,
Nicholas I. Mundy⁵

¹Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves 9500, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

²Behavioral Ecology Division, San Diego Zoo Institute for Conservation Research, 15600 San Pasqual Valley Road, Escondido, California 92027-7000

³Behavioral Ecology and Sociobiology Unit, German Primate Center, Leibniz Institute for Primate Research, Kellnerweg 4, 37077 Göttingen, Germany

⁴Gene Bank of Primates and Primate Genetics Laboratory, German Primate Center, Leibniz Institute for Primate Research, Kellnerweg 4, 37077 Göttingen, Germany

⁵Department of Zoology, University of Cambridge, Downing Street, Cambridge CB2 3EJ, UK

Correspondence: Dr. N. Mundy, nim21@cam.ac.uk

Manuscrito submetido ao periódico 'Proceedings of the Royal Society B'

Abstract

Colour vision is highly variable in New World monkeys. Evidence for the adaptive basis of colour vision in this group has largely centred on foraging benefits for differently coloured foods, whereas selection on colour vision for sociosexual communication is an alternative hypothesis that has received little attention. The colour vision of uakaris (*Cacajao*) is of particular interest because these monkeys have the most dramatic red facial skin of any primate as well as a unique fission/fusion social system and a specialist diet of seeds. Here we investigate colour vision in a wild population of the bald uakari, *C. calvus*, by genotyping the X-linked opsin locus. We document the presence of a polymorphic colour vision system with an unprecedented number of functional alleles (six), including a novel allele with a predicted maximum spectral sensitivity of 555nm. . This supports the presence of strong balancing selection on different alleles at this locus. We consider different hypotheses to explain this selection. One possibility is that trichromacy functions in sexual selection, enabling females to choose high quality males on the basis of red facial coloration. In support of this, there is some evidence that health affects facial coloration in uakaris, and presence of a high prevalence of blood-borne parasitism in wild uakari populations. Alternatively, the low proportion of heterozygous female trichromats in the population may indicate selection on different dichromatic phenotypes, which might be related to cryptic food coloration. We have uncovered unexpected diversity in the last major lineage of NWM to be

assayed for colour vision, and which will provide an interesting system to dissect adaptation of polymorphic trichromacy.

1. Introduction

Colour vision is a key trait that has been fertile ground for demonstrating adaptations in animal sensory systems (ref). Most work has focused on adaptations of colour vision to environmental conditions, such as ambient light or food. However, signalling theory suggests that colour vision should also be optimised for detecting intraspecific signals. Several recent studies in invertebrates and vertebrates have demonstrated such a link, but there has been relatively little work on mammals. [e.g. 1-4]. In New World monkeys (NWMs), colour vision is highly variable and a substantial body of research has investigated the ecological and evolutionary basis of this variation [4], which has implications for the acquisition of trichromacy in humans, apes and Old World monkeys (Catarrhines) [5]. The most frequent colour vision system in NWMs is polymorphic trichromacy, in which individuals of the same species may be either dichromats or trichromats. In these species, there are multiple alleles at the single X-linked opsin locus encoding middle- to longwave-sensitive (MWS/LWS) visual pigments. This leads to heterozygous females being trichromats, whereas homozygous females and hemizygous males are dichromats [4,6]. Almost all NWM genera studied to date have a polymorphic system, including callitrichids such as marmosets (*Callithrix*), cebids such as capuchin monkeys (*Cebus*, *Sapajus*), atelids such as spider (*Ateles*) and woolly (*Lagothrix*) monkeys, and pitheciids such as titi (*Callicebus*), saki (*Pithecia*) and bearded saki (*Chiropotes*) monkeys [7-8]. The two exceptions are the nocturnal owl monkeys (*Aotus*), which

are monochromatic, and the howler monkeys (*Alouatta*) in which all males and females are trichromatic (routine trichromacy) [9-11].

The selective advantages of trichromacy for primates and the evolutionary forces maintaining colour vision polymorphism have been the subject of considerable discussion. There is substantial support for a foraging advantage for trichromats for yellow/red fruit and/or young leaves compared to dichromats [12-16]. The high degree of folivory of howler monkeys has been suggested to account for the evolution of routine trichromacy in this lineage [16]. An alternative hypothesis is that trichromacy functions in intraspecific signalling, enabling individuals to discriminate levels of oxygen saturation in red, blood-engorged areas of bare skin. To date, this hypothesis has primarily been applied to catarrhines, with examples including the facial skin in mandrills and macaques, and sexual swellings of chimpanzees and macaques [17]. In contrast, the possibility that trichromacy functions in intraspecific signalling in NWMs has rarely been considered.

A consistent advantage for trichromatic females such as foraging would be sufficient to maintain colour vision polymorphism in polymorphic species via overdominance. However, there is evidence for visual tasks in which dichromats outperform trichromats in both captivity and the wild, such as detection of camouflaged food [18-20], and an absence of fitness differences between female dichromats and trichromats in a long-term field study of capuchin monkeys [21]. Together, these suggest that frequency-dependent selection may be a more likely

explanation for the persistence of colour vision polymorphism in so many NWM species.

The uakaris, *Cacajao*, are a genus of pitheciid NWMs endemic to Amazonia that is unusual in several respects. Uakaris have a specialized diet with a high proportion of seeds from fruits with relatively cryptic coloration [22,23]. They have a unique social system for NWMs, forming very large groups of up to 200 individuals, with a high degree of fission-fusion behaviour [24,25]. Most notably, the bald uakari, *C. calvus*, has bright red facial skin, in common with several catarrhine primates [26], and two other NWMs; the red-faced black spider monkey, *Ateles paniscus*, and the red-nosed bearded saki, *Chiropotes albinasus* [27,28]. The bald uakari provides the most extreme example of red facial skin of all primates. In this species the red coloration extends over the entire head, which is sparsely-haired, unmelanized, and an intense scarlet, due to the underlying blood supply [29]. The red coloration is subjectively more intense in adult males in comparison to females [30,31], and the enlarged temporal muscles of the adult males further exaggerate the trait in this sex [32]. In addition, the overall pelage colour is reddish orange or reddish golden [27]. Together, these unique features mean that the colour vision of uakaris is of great interest, since they lead to divergent predictions. On one hand, foraging on relatively cryptic food might diminish the importance of trichromatic colour vision. On the other hand, if sexual selection on male red coloration is operating then selection on trichromacy may be enhanced. However, there is currently no information on colour

vision in uakaris, and indeed they are now the only major lineage of NWMs in which colour vision remains unexplored.

There is an excellent understanding of the structure-function relationship of primate MW/LW opsin photopigments [10,33,34], showing that the majority of variation in the maximal spectral sensitivity (λ_{\max}) of opsins can be attributed to three amino acid sites encoded in exons 3 and 5. In this study we investigate colour vision in a wild population of the bald uakari in Peru by genotyping the X-linked opsin locus at these key sites affecting spectral sensitivity. We find that a polymorphic system of colour vision is present in this species, and uncover an unprecedented number of functional alleles for a single NWM population.

2. MATERIAL AND METHODS

(a) Sampling

We followed a single group of Peruvian red uakaris (*Cacajao calvus ucayalii*) in November and December 2010 within an area of 600 ha in the Lago Preto Conservation Concession, on the Yavari River, Peru (4°28'S, 71°46'W). Group size was unconfirmed, due to wide group spread and a high degree of fission-fusion behaviour, but a minimum of 80 animals used the study area during the period. Sixty faecal samples were collected from leaf litter as soon as possible after defecation, but individual animals were not identified. To ensure rapid desiccation, we preserved one small piece of each sample (0.2 to 0.5 g) on filter paper in 30 ml container 80%

full of dry silica gel. A further sample was available from the Yanayacu-Pucate River population (4°56'S, 74°08'W), which is separated from the Yavari population by a wide river barrier [35].

(b) DNA extraction, sex determination and mtDNA genotyping

For DNA extraction from faecal samples we used the QIAGEN QIAamp Stool Mini Kit (Qiagen) following the standard protocol as recommended by the supplier with only minor changes [36]. Afterwards DNA concentration was measured on a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer and samples were stored at -20°C until further processing. To determine the sex of individuals we used a PCR-based gonosomal sexing system (Roos, unpubl.). The complete mitochondrial cytochrome *b* gene (1140bp) was sequenced in all individuals, resulting in 7 haplotypes that were used here to aid identification of individuals from faecal samples. Full details of mitochondrial DNA (mtDNA) sequencing will be published elsewhere (Roos et al., in prep.).

(c) Genotyping of the X-linked opsin locus

We designed oligonucleotide primers to amplify exons 3 and 5 of the LWS/MWS opsin gene from an alignment of existing NWM data from Genbank: Exon 3, Primer3CCF2 5'- CTCTGGTCCCTGGCCATCATT-3' and Primer3CCR2 5'- CCCCTTACCTGCTCCAACCAA-3'; Exon 5, Primer5CCF2 5'-

AGAGTCCGAATCCACCCAGA-3' and Primer5CCR3 5'-TGCCGGTTCATGAAGACAT-3'. PCR reactions contained ~50ng DNA template, 2.5mM each dNTP, 1 x PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.1U Taq DNA polymerase (Bioline), 0.25µM each primer and ddH₂O to a final volume of 20µl. After an initial denaturation at 94°C for 5 minutes, the thermocycling profile consisted of 43 cycles at 94°C for 30s, 57°C for 20s (exon 3 and 5) and 72°C for 30s, and a final extension at 72°C for 5 min. Each PCR was performed with a negative control consisting of ddH₂O instead of template DNA. Each exon was amplified and sequenced 1 to 5 times on sense and antisense strands per individual (supplementary material, Table S1) to avoid genotyping errors, i.e. to ensure correct scoring of heterozygous sites.

PCR products were purified by adding 0.05 U Exonuclease I, 0.25 U Shrimp Alkaline Phosphatase (Affymetrix) and 0.7µl of ddH₂O add to each 6µl PCR product and then heated at 37°C for 30 min followed by 15 min at 80°C. Sequencing on both strands was performed at the DNA Sequencing Facility (Department of Biochemistry, University of Cambridge, UK) with an Applied Biosystems 3730 DNA Analyser. Sequences were edited using SeqMan in Lasergene 10 (DNASTAR, Inc., Madison, WI, USA) and aligned/translated in MEGA 5 [37]. Nucleotide sequences have been deposited in Genbank (Accession nos. KP867064-KP867097).

(d) Data analysis

Colour vision phenotypes for each individual were inferred by combining data from exons 3 and 5 of the LWS/MWS opsin gene, with predicted maximum spectral sensitivity (λ_{\max}) from critical positions at exon 3 (position 180) and exon 5 (277 and 285) [38]; we also checked site 294 [39]. Chi-square tests were used to test for heterogeneity in allele frequencies.

3. RESULTS

We determined the sex, mtDNA haplotype and X-linked opsin genotypes for 34 faecal samples (Supplementary Table S1). Three pairs of faecal samples (from two males, one female) yielded identical mtDNA and opsin sequences, and we conservatively consider that these are samples from the same individuals in the following analyses. All other samples yielded unique genotypes. We therefore analysed genotypes from 31 total individuals, comprising 11 males and 20 females.

We identified multiple functional alleles at the X-linked opsin locus defined by variation at the three key amino sites determining spectral sensitivity (180, 277, 285, Table 1). Two further variable sites occurred (276, 309), which have not been implicated in functional effects. All alleles were verified by the two exons being independently amplified and sequenced in multiple samples (five alleles), or, where only present in a single individual, from amplification and sequencing both exons independently at least twice (one allele, Supplementary Table S1). In addition, all

exons with heterozygous sites were sequenced at least twice. No individual presented more than one heterozygous site across the three sites in the two exons, so haplotype inference was straightforward.

The results demonstrate a polymorphic system of colour vision in the bald uakari. First, females were heterozygous for one or more key amino acid sites (35%, 7/20) whereas no heterozygotes were found among males (0/11), following the pattern expected for an X-linked polymorphic system. Second, in total we found six alleles defined by variation across the three key sites, an unprecedented number in a single primate species. Five of these alleles have been described previously in other species. The sixth allele, with the three-site pattern Serine-Phenylalanine-Threonine (SFT), is novel and was found in two heterozygous females. Following the additive rule for the phenotypic effects of substitutions at these sites [33], the Alanine (A) to Serine (S) transition at site 180 should add ~5nm to the λ_{\max} of the Alanine-Phenylalanine-Threonine (AFT) allele (550nm), giving a predicted λ_{\max} of the novel allele of ~555nm; we hereafter refer to this as the 555nm allele. This is slightly less than the λ_{\max} of the previously described allele Alanine-Tyrosine-Threonine (AYT) (556nm), and functional studies will be needed to determine if these two opsins have sufficient λ_{\max} separation to provide useful red-green colour vision in a trichromat. Across all alleles there was no variation at site 294, [all alleles with Asparagine (N)], a site which can affect tuning in other primates.

The frequencies of the six alleles among the 51 X chromosomes sampled are shown in Figure 1. Allele frequencies varied from 0.039 – 0.392, and showed significant heterogeneity ($\chi^2 = 27.23$, $P < 0.05$). The three most common alleles had λ_{\max} of 535nm, 550nm and 562nm (Figure 1), whereas the 543nm allele was the rarest allele, sampled in a single individual. Four types of heterozygote were found: 535nm/550nm, 550nm/556nm, 550nm/555nm, 556nm/562nm (Table 1).

4. DISCUSSION

The system of X-linked colour vision polymorphism we have uncovered in the uakari is similar to that of a large majority of other NWMs, occurring in all families and at least 14 genera. With all major lineages now sampled, there are just two NWM genera with other types of colour vision – routine trichromacy in *Alouatta* and monochromacy in *Aotus*. However, the presence of six functional allelic types in a wild primate population is unprecedented. Most species of NWM, including all callitrichids, cebids, and polymorphic atelids, have two to three, or occasionally four, alleles. Among wild populations of the three other pitheciid genera (a saki, *Pithecia irrorata*, [8, 40]; a bearded saki *Chiropotes utahicki*, [7]; a titi monkey, *Callicebus brunneus*, [38]), the three alleles found (535nm, 550nm, 562nm) were the same as the three most common alleles in the uakari. Another species of titi monkey (*C. moloch*) is the only other species of NWM in which more than four alleles have been reported [41]. However, the five alleles (530nm, 535nm, 542nm, 550nm, and 562nm)

were found in a captive population and it is unknown whether all of these alleles co-occur in the same wild population. In addition to the novel 555nm allele found in the uakari, the 556nm allele has not been previously described in pitheciids.

Discussions of the adaptive advantage of colour vision in NWMs have largely centred on foraging ability. Studies modelling the chromatic signal of food items eaten in the wild and experimental studies in captivity have confirmed that trichromacy is well-suited to many foraging tasks involving yellow/red food against a green foliage background [13-15,42,43]. However, trichromacy works less efficiently for cryptic food [18,19], which likely includes the sclerocarpic fruits whose unripe and mature seeds represent a major proportion of the uakaris' diet [23, 44]. Thus, foraging for yellow/red food is unlikely to account for the high allelic diversity in uakaris. Trichromatic NWMs may also be better at detecting carnivore predators than dichromats [45], but this is unlikely to play a role for uakaris, as they occupy a high canopy niche where raptors are probably more important predators [46].

Alternatively, the large number of photopigment alleles in the bald uakari could be related to intraspecific signalling involving red coloration, and in particular the uniformly red facial skin of males. The red facial skin of uakaris bears the hallmarks of a sexually selected trait, being more prominent in males than females (with males also having more prominent heads because of enlarged temporal muscles) [47,48]. Although the mating system of uakaris is poorly understood there is strong circumstantial evidence for a polygynous system related to male coloration.

Uakaris have large group sizes and fission-fusion behaviour [25] that are associated with greater male ornamentation in primates [32], sexual dimorphism in visual traits is stronger in polygynous primates [49], and there is some evidence that subgroups of uakaris are composed of affiliative male units that are outnumbered by females [50]. In addition, large group sizes in NWMs are associated with simple facial patterns, as found in uakaris [51].

In routinely trichromatic Old World monkeys, the intensity of red coloration of male facial skin has been shown to be a sexually-selected signal, e.g. in mandrills and rhesus macaques [52,53]. These results accord with the finding that primate trichromacy is well-suited for discriminating the degree of oxygen saturation in the blood in bare skin [17]. There has been good progress in recent years in identifying the proximate factors that lead to variation in sexually selected skin coloration in non-human primates [54,55]. In uakaris, this could be related to testosterone or to specific genotypes as it is in mandrills [56,57] and/or to parasitism and immune status following some of the main theoretical explanations for the evolution of sexually selected ornaments [47,58-60]. There is anecdotal evidence that the red face of the bald uakari varies with health, becoming pale in sick uakaris [30,31,60], and the structure of the uakari facial skin allows a direct external assessment of haematological status [29], suggesting that the colour of the face would be an honest indicator of health. Intriguingly, uakaris appear particularly susceptible to infection by two blood-borne parasites: they showed the highest rates of infection

by the malaria parasite *Plasmodium brasilensis* of any NWM [61] and had an infection rate of 100% for trypanosomatids (*Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli*) compared to 64% for other primates on the Yavari River in Peru [62]. Hence the physiological effects of plasmodial and trypanosomal infections might be two aspects of male quality that are signalled by facial coloration in uakaris.

These considerations support the possibility high levels of colour vision polymorphism in the bald uakari might be an adaptation for sexual selection on male (facial) coloration. Trichromacy in female uakaris could serve an important function in discriminating male quality via facial coloration, and give trichromatic females an advantage over dichromats. One prediction is that selection for trichromacy in female uakaris would lead to novel allele advantage and an increased number of functional alleles. and our finding of high allelic diversity is consistent with this. A second prediction is that, all else being equal, the proportion of female heterozygotes would increase with increasing numbers of alleles. Here the prediction is not met in our data, since only 35% of females are heterozygous, although we cannot rule out the presence of some other factor such as inbreeding affecting heterozygosity in the single population sampled. Alternatively, these results may suggest that there is a component of balancing selection involving dichromatic uakaris. This likely occurs in other NWMs [21] and in the case of uakaris might involve detection of cryptically-coloured food.

In conclusion, uakaris have surprisingly diverse colour vision, and it seems likely that sexual selection is a contributory factor although other adaptive advantages may well be involved. Further clarification of the selective forces acting on uakari colour vision will require behavioural studies. It will be of great interest to elucidate these mechanisms further, since uakaris may be a model for the evolution of colour vision in catarrhines, in which ancestrally evolved trichromatic colour vision for foraging then became co-opted for use in sociosexual signalling [63, but see 64].

Competing Interests

None

Authors' Contributions

MB and NM conceived the study, MB collected field samples, JC, CR and MB generated the data, JC and NM analysed the data, JC, MB, CR, EWH and NM wrote the manuscript. All authors gave final approval for publication.

Acknowledgements

We thank the Los Angeles Zoo for funding the sample collections, and Murray Edwards College, Cambridge for funding opsin genotyping. Part of the genetic analyses were made possible due to a DAAD grant to MB for a research stay at the Deutsches Primatenzentrum. Data were collected with a permit from INRENA

(Instituto Nacional de Recursos Naturales) of the Peruvian government, and the methodology complied with their regulations. We thank the Natural History Museum of the National University of San Marcos, Lima and WCS Peru, for assistance in logistics. Maribel Recharte and Liseth Lavajos assisted in the field, Christiane Schwarz assisted in the laboratory, and we thank Pedro Mayor for comments on a draft of the manuscript.

References

1. Seehausen O, Terai Y, Magalhaes IS, Carleton KL, Mrosso HD, Miyagi R, Sluijs I, Schneider MV, Maan ME. *et al.* 2008 Speciation through sensory drive in cichlid fish. *Nature* **455**, 620-626. (doi:10.1038/nature07825)
2. Briscoe AD, Bybee SM, Bernard GD, Yuan F, Sison-Mangus MP, Reed RD, Warren AD, Llorente-Bousquets J, Chiao CC. 2010 Positive selection of a duplicated UV-sensitive visual pigment coincides with wing pigment evolution in *Heliconius* butterflies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 3628-3633. (doi: 10.1073/pnas.0910085107)
3. Ödeen A, Pruett-Jones S, Driskell AC, Armenta JK, Håstad O. 2012 Multiple shifts between violet and ultraviolet vision in a family of passerine birds with associated changes in plumage coloration. *Proc. R. Soc. B* **279**, 1269-1276. (doi:10.1098/rspb.2011.1777)
4. Bloch NI. 2014 Evolution of opsin expression in birds driven by sexual selection and habitat. *Proc. R. Soc. B* **282**, 20142321.
5. SurrIDGE AK, Osorio D, Mundy NI. 2003 Evolution and selection of trichromatic vision in primates. *Trends Ecol. Evol.* **18**, 198-205. (doi:10.1016/S0169-5347(03)00012-0)
6. Jacobs GH. 2008 Primate color vision: A comparative perspective. *Visual Neurosci.* **25**, 619-633. (doi:10.1017/S0952523808080760)
7. Mollon JD, Bowmaker JK, Jacobs GH. 1984 Variations of colour vision in a New World primate can be explained by polymorphism of retinal photopigments. *Proc. R. Soc. B* **222**, 373-399.
8. Lima EM, Pessoa DMA, Sena L, de Melo AGC, de Castro PHG, Oliveira-Mendes AC, Schneider MPC, Pessoa VF. 2015 Polymorphic color vision in captive Uta Hick's *cuxiús*, or bearded sakis (*Chiropotes utahickae*). *Am. J. Primatol.* **77**, 66-75. (doi:10.1002/ajp.22311)
9. Bonci DMO, Neitz M, Neitz J, Silveira LCL, Ventura DF. 2013 The genetics of New World monkey visual pigments. *Psychol. Neurosci.* **6**, 133-144. (doi:10.3922/j.psns.2013.2.02)

10. Levenson DH, Fernandez-Duque E, Evans S, Jacobs GH. 2007 Mutational changes in S-cone opsin genes common to both nocturnal and cathemeral *Aotus* monkeys. *Am. J. Primatol.* **69**, 757-765. (doi:10.1002/ajp.20402)
11. Hiramatsu C, Radlwimmer FB, Yokoyama S, Kawamura S. 2004 Mutagenesis and reconstitution of middle-to-longwave-sensitive visual pigments of New World monkeys for testing the tuning effect of residues at sites 229 and 233. *Vision Res.* **44**, 2225-2231. (doi:10.1016/j.visres.2004.04.008)
12. Saito CA, da Silva-Filho M, Lee BB, Bowmaker JK, Kremers J, Silveira LCL. 2004 *Alouatta* trichromatic color vision-single-unit recording from retinal ganglion cells and microspectrophotometry. *ARVO Abstracts Invest Ophthalmol Visual Sci.* **45**, 4276.
13. Smith AC, Buchanan-Smith HM, SurrIDGE AK, Osorio D, Mundy NI. 2003 The effect of colour vision status on the detection and selection of fruits by tamarins (*Saguinus spp.*). *J. Exp. Biol.* **206**, 3159-3165. (doi: 10.1242/jeb.00536)
14. Dominy NJ, Lucas PW. 2001 Ecological importance of trichromatic vision to primates. *Nature* **410**, 363-366. (doi:10.1038/35066567)
15. Caine NG, Mundy NI. 2000 Demonstration of a foraging advantage for trichromatic marmosets (*Callithrix geoffroyi*) dependent on food colour. *Proc. Biol. Sci.* **267**, 439-444. (doi:10.1098/rspb.2000.1019)
16. Sumner P, Mollon JD. 2000 Catarrhine photopigments are optimized for detecting targets against a foliage background. *J. Exp. Biol.* **203**, 1963-1986.
17. Melin AD, Hiramatsu C, Parr NA, Matsushita Y, Kawamura S, Fedigan LM. 2014 The behavioral ecology of color vision: considering fruit conspicuity, detection distance and dietary importance. *Int. J. Primatol.* **35**, 258-287.
18. Jacobs GH. 2007 New world monkeys and color. *Int. J. Primatol.* **28**, 729-759. (doi:10.1007/s10764-007-9168-y)
19. Changizi MA, Zhang Q, Shimojo S. 2006 Bare skin, blood and the evolution of primate colour vision. *Biol. Lett.* **2**, 217-221. (doi:10.1098/rsbl.2006.0440)
20. Caine NG, Osorio D, Mundy NI. 2010 A foraging advantage for dichromatic marmosets (*Callithrix geoffroyi*) at low light intensity. *Biol. Lett.* **6**, 36-38. (doi:10.1098/rsbl.2009.0591)

21. Melin AD, Fedigan LM, Hiramatsu C, Sendall C, Kawamura S. 2007 Effects of colour vision phenotype on insect capture by a free-ranging population of white faced capuchins (*Cebus capucinus*). *Anim. Behav.* **73**, 205-214. (doi:10.1016/j.anbehav.2006.07.003)
22. Saito A, Mikami A, Kawamura S, Ueno Y, Hiramatsu C, Widayati KA, Suryobroto B, Teramoto M, Mori Y, Nagano K *et al.* 2005 Advantage of dichromats over trichromats in discrimination of color camouflaged stimuli in nonhuman primates. *Am. J. Primatol.* **67**, 425-436. (doi:10.1002/ajp.20197)
23. Fedigan LM, Melin AD, Addicott JF, Kawamura S. 2014 The heterozygote superiority hypothesis for polymorphic color vision is not supported by long-term fitness data from wild Neotropical monkeys. *PLoS ONE* **9**, e84872. (doi:10.1371/journal.pone.0084872)
24. Barnett AA, Bowler M, Bezerra BM, Defler TR. 2013 Ecology and behavior of uacaris (genus *Cacajao*). Pp. 151–172 in Veiga LM, Barnett AA, Ferrari SF, Norconk MA (eds.) *Evolutionary biology and conservation of titis, sakis and uacaris*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
25. Bowler M, Bodmer RE. 2011 Diet and food choice in Peruvian red uacaris (*Cacajao calvus ucayalii*): selective or opportunistic seed predation? *Int. J. Primatol.* **32**, 109-122. (doi:10.1007/s10764-011-9527-6)
26. Bowler M, Knogge C, Heymann EW, Zinner D. 2012 Multilevel societies in New World primates? Flexibility may characterize the organization of Peruvian red uacaris (*Cacajao calvus ucayalii*). *Int. J. Primatol.* **33**, 1110-1124. (doi: 10.1007/s10764-012-9603-6)
27. Bowler M, Bodmer R. 2009 Social behavior in fission–fusion groups of red uakari monkeys (*Cacajao calvus ucayalii*). *Am. J. Primatol.* **71**, 976-987. (doi: 10.1002/ajp.20740)
28. Setchell JM, Wickings EJ, Knapp LA. 2006. Signal content of red facial coloration in female mandrills (*Mandrillus sphinx*). *Proc. R. Soc. B* **273**, 2395-2400.
29. Hershkovitz P. 1987 Uacaries, new world monkeys of the genus *Cacajao* (Cebidae, Platyrrhini): A preliminary taxonomic review with the description of a new subspecies. *Am. J. Primatol.* **12**, 1-53. (doi:10.1002/ajp.1350120102)

30. Kellogg R, Goldman EA. 1944 *Review of the spider monkeys*. Smithsonian Inst., United States National Museum.
31. Hill OW. 1960 *Primates: comparative anatomy and taxonomy*. Volume 4, part A. Edinburgh University Press, Scotland.
32. Bowler M. 2007 *The ecology and conservation of the red uakari monkey on the Yavari River, Peru* (Doctoral dissertation, University of Kent, UK).
33. Hill CA. 1965 Maintenance of facial coloration in the red Uakari *Cacajao rubicundus*. *Int. Zoo. Yearb.* **5**, 140-141. (DOI: 10.1111/j.1748-1090.1965.tb01611.x)
34. Grueter CC, Isler K, Dixson BJ. 2015 Are badges of status adaptive in large complex primate groups? *Evol. Hum. Behav.* (doi:10.1016/j.evolhumbehav.2015.03.003)
35. Shyue SK et al. 1998 Molecular genetics of spectral tuning in New World monkey color vision. *J. Mol. Evol.* **46**, 697-702. (doi:10.1007/PL00006350)
36. Hunt DM, Dulai KS, Cowing JA, Julliot C, Mollon JD, Bowmaker JK, Li W-H, Hewett-Emmett D. 1998 Molecular evolution of trichromacy in primates. *Vision Res.* **38**, 3299-3306. (doi:10.1016/S0042-6989(97)00443-4)
37. Bowler M, Noriega Murrieta J, Recharte M, Puertas P, Bodmer R. 2009 Peruvian red uakari monkeys (*Cacajao calvus ucayalii*) in the Pacaya-Samiria national reserve - a range extension across a major river barrier. *Neotrop. Primates* **16**, 34-37. (doi:10.1896/044.016.0108)
38. Haus T, Akom E, Agwanda B, Hofreiter M, Roos C, Zinner D. 2013 Mitochondrial diversity and distribution of African green monkeys (*Chlorocebus* Gray, 1870). *Am. J. Primatol.* **75**, 350-360. (10.1002/ajp.22113)
39. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011 MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* **28**, 2731-2739. (doi:10.1093/molbev/msr121)
40. Bunce JA, Isbell LA, Neitz M, Bonci D, SurrIDGE AK, Jacobs GH, Smith DG. 2011 Characterization of opsin gene alleles affecting color vision in a wild population of titi monkeys (*Callicebus brunneus*). *Am. J. Primatol.* **73**, 189-196. (doi:10.1002/ajp.20890)

41. Matsumoto Y, Hiramatsu C, Matsushita Y, Ozawa N, Ashino R, Nakata M, Kasagi S, Di Fiore A, Schaffner CM, Aureli F, et al. 2014 Evolutionary renovation of L/M opsin polymorphism confers a fruit discrimination advantage to ateline New World monkeys. *Mol. Ecol.* **23**,1799-1812. (doi:10.1111/mec.12703)
42. Boissinot S, Tan Y, Shyue SK, Schneider H, Sampaio I, Neiswanger K, Hewett-Emmett D, Li WH. 1998 Origins and antiquity of X-linked triallelic color vision systems in New World monkeys. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 13749-13754. (doi:10.1073/pnas.95.23.13749)
43. Jacobs GH, Deegan II JF. 2005 Polymorphic New World monkeys with more than three M/L cone types. *J. Opt. Soc. Am. A Opt. Image Sci. Vis.* **22**, 2072-2080. (doi:10.1364/JOSAA.22.002072)
44. Osorio D, Smith AC, Vorobyev M, Buchanan-Smith HM. 2004 Detection of fruit and the selection of primate visual pigments for color vision. *Am. Nat.* **164**, 696-708. (doi:10.1086/425332)
45. Smith AC, Surridge AK, Prescott MJ, Osorio D, Mundy NI, Buchanan-Smith HM. 2012 Effect of colour vision status on insect prey capture efficiency of captive and wild tamarins (*Saguinus spp.*). *Anim. Behav.* **83**,479-486. (doi:10.1016/j.anbehav.2011.11.023)
46. Aquino R, Encarnación F. 1999 Observaciones preliminares sobre la dieta de *Cacajao calvus ucayalii* en el nor-oriente peruano. *Neotropical Primates* **7**: 1-5.
47. Pessoa DMA, Maia R, de Albuquerque Ajuz RC, de Moraes PZPMR, Spyrides, MHC, Pessoa VF. 2014 The adaptive value of primate color vision for predator detection. *Am. J. Primatol.* **76**, 721-729. (doi:10.1002/ajp.22264)
48. Barnett AA, Schiel V, Deveny A, Valsko J, Spironello WR, Ross C. 2011 Predation on *Cacajao ouakary* and *Cebus albifrons* (Primates: Platyrrhini) by harpy eagles. *Mammalia* **75**, 169-172. (doi:10.1515/mamm.2011.004)
49. Dixson AF. 2012 *Primate sexuality: comparative studies of the prosimians, monkeys, apes and humans*. 2nd Ed. OUP. New York.
50. Ayres JM. 1986. The white uakaris and the Amazonian flooded forests. Ph.D. thesis, Cambridge University. 338pp. Dixson AF, Dixson BJ, Anderson M. 2005 Sexual selection and the evolution of visually conspicuous sexually

dimorphic traits in male monkeys, apes, and human beings. *Annu. Rev. Sex Res.* **16**, 1-19.

51. Dixson AF, Dixson BJ, Anderson M. 2005 Sexual selection and the evolution of visually conspicuous sexually dimorphic traits in male monkeys, apes, and human beings. *Annu. Rev. Sex Res.* **16**, 1-19.

52. Gregory T, Bowler M. 2015 Male-male affiliation and cooperation characterize the social behavior of the large-bodied pitheciids, *Chiropotes* and *Cacajao*: A review. *Am. J. Primatol.*: (In Press) (doi: 10.1002/ajp.22404)

53. Santana SE, Alfaro JL, Alfaro ME. 2014 Adaptive evolution of facial colour patterns in Neotropical primates. *Proc. Roy. Soc. B.* **297**, 2204-2211.

54. Dubuc C, Allen W, Maestriperi D, Higham JP. 2014 Is male rhesus macaque red color ornamentation attractive to females? *Behav. Ecol.Sociobiol.* **68**, 1215-1224. (doi:10.1007/s00265-014-1732-9)

55. Setchell JM. 2005 Do female mandrills prefer brightly colored males? *Int. J.Primatol.* **26**, 715-735. (doi:10.1007/s10764-005-5305-7)

56. Bergman TJ, Ho L, Beehner JC. 2009 Chest color and social status in male geladas (*Theropithecus gelada*). *Int. J. Primatol.* **30**, 791-806. (doi: 10.1007/s10764-009-9374-x)

57. Setchell JM, Wickings, JE. 2005 Dominance, status signals and coloration in male mandrills (*Mandrillus sphinx*). *Ethology* **111**, 25-50. (doi:10.1111/j.1439-0310.2004.01054.x)

58. Setchell JM, Dixson AF. 2001 Changes in the secondary sexual adornments of male mandrills (*Mandrillus sphinx*) are associated with gain and loss of alpha status. *Horm. Behav.* **39**, 177-184.

59. Setchell JM, Smith T, Wickings EJ, Knapp LA. 2008 Social correlates of testosterone and ornamentation in male mandrills. *Horm Behav* **54**, 365-372.

60. Setchell JM, Charpentier M, Abbott KA, Wickings EJ, Knapp LA. 2009 Is brightest best? Testing the Hamilton-Zuk hypothesis in mandrills. *Int. J. Primatol.* **30**, 825-844.

61. Hamilton WD, Zuk M. 1982 Heritable true fitness and bright birds: a role for parasites. *Science* **218**, 384-387.

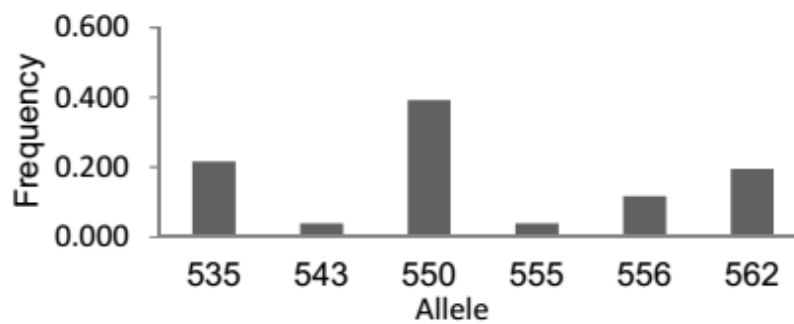
62. Bradley BJ, Mundy NI. 2008 The primate palette: the evolution of primate coloration. *Evol. Anthropol.* **17**, 97-111. (doi: 10.1002/evan.20164)
63. Lasry JE, Sheridan BW. 1965 Chagas' myocarditis and heart failure in the red uakari *Cacajao rubicundus*. *Int. Zoo Yearbook.* **5**, 182-184.
64. Davies CR, Ayres JM, Dye C, Deane JM. 1991 Malaria infection rate of Amazonian primates increases with body weight and group size. *Funct. Ecol.* **5**, 655-662.
65. Aysanoa E, Mayor P, Mendoza AP, Morales A, Zariquiey CM, Perez JG, Bowler M, Ventocilla JA, Baldeviano GC, Lescano AG. 2014 Prevalence of trypanosomatids and *Trypanosoma cruzi* in wild and captive non-human primates from Perú. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene. 63rd Annual Meeting, New Orleans, 2-6 November 2014.
66. Fernandez AA, Morris MR. 2007 Sexual selection and trichromatic color vision in primates: statistical support for the preexisting-bias hypothesis. *Am. Nat.* **170**, 10-20. (doi:10.1086/518566)
67. Kamilar JM, Heesy CP, Bradley BJ. 2012 Did trichromatic color vision and red hair color coevolve in primates? *Am. J. Primatol.* **75**, 740-751. (doi:10.1002/ajp.22099)

Table 1. X-linked opsin amino acid variants at key functional sites, inferred functional alleles and inferred colour vision in wild uakaris

Sample size	Exon 3	Exon 5		Inferred alleles (λ_{\max} nm)	Inferred vision
	1 8 0	2 7 7	2 8 5		
2M, 3 F	A	F	A	535	Dichromatic
1 F	A	Y	A	543	Dichromatic
4 M, 5 F	A	F	T	550	Dichromatic
2 M, 1 F	A	Y	T	556	Dichromatic
3 M, 3 F	S	Y	T	562	Dichromatic
3 F	A	F	T/A	535/550	Trichromatic
1 F	A	F/Y	T	550/556	Trichromatic
2 F	A/S	F	T	550/555	Trichromatic
1 F	A/S	Y	T	556/562	Trichromatic

Figure legend

Figure 1. Allele frequencies of inferred LWS/MWS visual pigments in the bald uakari monkey (*Cacajao calvus*). N = 51 X chromosomes.



CAPÍTULO VI

DISCUSSÃO GERAL



A nossa espécie é investigadora. Esse não é um privilégio apenas da nossa espécie, é verdade. Diversas outras também o são. No entanto, investigamos nosso ambiente não apenas em busca de recursos para nos manter vivos tempo suficiente para passarmos nosso material genético para a próxima geração. Investigamos como a vida se organiza - a nossa e a de outras espécies. As ferramentas que dispomos hoje eram inimagináveis no tempo em que Darwin e Wallace propuseram a teoria da evolução baseada em seleção natural. Naquele tempo, a pouco mais de 150 anos atrás, emergiram os primeiros *insights* de que evolução é mudança¹. Desde então, o desejo de compreender essa mudança e como ela operava levou a um massivo investimento em técnicas que pudessem revelá-la. Este trabalho, é mais um dos que, 150 anos depois, ainda busca contribuir com um melhor entendimento dos fatores responsáveis pela mudança e seu papel na extraordinária variabilidade de cores e formas moldadas pela evolução. Neste estudo exploramos os mecanismos moleculares envolvidos na produção de pigmentos que conferem cor e também exploramos mecanismos através dos quais a coloração é percebida. Os resultados obtidos geraram importantes e, algumas inéditas, informações sobre

¹ Aplico o conceito de mudança no sentido de modificação de uma característica ao longo do tempo.

os mecanismos genéticos e sobre os processos evolutivos envolvidos em características fenotípicas em diferentes grupos de vertebrados.

O trabalho apresentado no capítulo II reúne informações sobre a coloração dos animais com base no papel do gene *receptor de melanocortina-1 (MC1R)*. O artigo visou ampliar a divulgação científica sobre o tema em revista destinada a fomentar a prática docente no ensino de genética. Sendo recorrente o interesse dos alunos sobre a coloração dos animais, buscamos apresentar a contribuição de um gene para essa característica. Destacamos nele, a influência das substituições não-sinônimas no *MC1R* na composição do fenótipo ruivo na espécie humana. Somando-se a outros exemplos em que pequenas mudanças geram grandes efeitos. Acreditamos ser didático a apresentação de exemplos, como este do gene *MC1R*, presentes no cotidiano das pessoas para a compreensão do funcionamento dos mecanismos moleculares.

No capítulo III, o estudo com membros da família Rhamphastidae relata a contribuição do gene *MC1R* na diversidade de coloração encontrada nos tucanos. Sustentando essa afirmação encontramos evidências de substituições adaptativas presentes no ramo do ancestral comum do gênero *Ramphastos*. Análises sugerem que as substituições encontradas são funcionalmente significativas, além disso as substituições haviam sido associadas ao melanismo em outras espécies de aves e de mamíferos. Permanece em aberto a discussão de qual cenário evolutivo favorecia a evolução da plumagem escura em *Ramphastos*.

Gomez e Théry (2013) sugerem que plumagem em aves neotropicais podem evoluir em função da luminosidade dos seus habitats, sejam eles de áreas mais abertas ou fechadas. A diferença de habitats ocupados pelos gêneros de Ramphastidae estudados podem ter fornecido pressões seletivas específicas que atuaram sobre a evolução da coloração. Os dados sugerem que o acumulo de substituições (dN) no gene *MC1R* possuem efeito aditivo na evolução gradual da coloração da plumagem escura nos membros da linhagem de *Ramphastos*.

No capítulo IV buscamos compreender a base molecular do gene *MC1R* em ave que faz parte do cotidiano das pessoas, ou pelo menos lembrada em épocas natalinas. O peru (*Meleagris gallopavo*) é uma ave domesticada para servir de fonte de alimento à nossa espécie, e possui, portanto, grande interesse comercial. Além do mais a domesticação resultou em diferentes fenótipos de coloração, embora o processo de industrialização da criação tenha optado apenas por aves de fenótipo branco. Clássicos estudos apontaram que a coloração da plumagem em perus está sob controle de pelo menos cinco locos genéticos, apenas o loco bronze (três alelos sob dominância, $B > b^+ > b^1$) foi caracterizado a nível molecular e esse foi relacionado ao gene *MC1R*. O estudo buscou caracterizar o gene *MC1R* em indivíduos com fenótipos branco e pigmentados. Em indivíduos de fenótipo branco foram encontrados três novos haplótipos, além dos cinco previamente descritos. A maioria dos indivíduos brancos amostrados (93%) eram homocigotos para o alelo b^+ , apenas um indivíduo era heterocigoto para o loco e apresentou alelo b^1 e b^+ .

Esse grupo apresentou maior heterozigosidade em relação ao grupo de indivíduos pigmentados. Sugerindo-se que em perus de criação comercial ocorre cruzamentos usando estoques genéticos diversos a fim de evitar efeitos negativos do endocruzamento. Enquanto aves pigmentadas criadas em pequenas propriedades tendem a ser cruzadas entre si, seja pela baixa disponibilidade de aves para acasalamento, seja com o intuito de manter a homogeneidade do padrão de coloração da plumagem. Entre os indivíduos pigmentados analisados, encontramos 13 alelos b^+ e 25 alelos b^1 . Os indivíduos pigmentados utilizados neste estudo foram classificados de acordo com o seu fenótipo por criadores do sul do Brasil com nomenclaturas tradicionalmente utilizadas. No entanto, a classificação não possui poder preditivo em relação ao genótipo esperado para o loco bronze. O que pode ser significativo em programas de melhoramento que busquem selecionar indivíduos portadores de determinados alelos com influência na coloração da plumagem.

No capítulo V, investigamos visão colorida em população selvagem do uacari-branco (*Cacajao calvus*) a partir da genotipagem do loco da opsina ligado ao cromossomo X. A caracterização do loco revelou a presença de sistema visual polimórfico com elevado número de alelos funcionais (seis), considerado maior registro para primatas. Provavelmente devido à forte seleção para visão tricromática. As discussões sobre a vantagem adaptativa da visão colorida em primatas do novo mundo (NWM) centraram-se na capacidade de forrageamento e

na detecção de predadores carnívoros. No entanto parece ser pouco significativa a influência desses fatores em uacari-branco, uma vez que eles se alimentam de alimentos de coloração críptica e seus predadores são aéreos, como aves de rapina. A visão colorida em uacari-branco parece ser associado a sinalização intraespecífica envolvendo a coloração facial vermelha do macho. Estudos com outras espécies de primatas apontam que sistema social do tipo fissão-fusão e de acasalamento do tipo poliginia contribuem para ornamentação sexual de machos e na presença de dimorfismo sexual. Tais sistemas podem ter efeito significativo no dimorfismo sexual presente na espécie de uacari-branco. Sustenta-se que a visão tricromática nas fêmeas teria função importante na discriminação do estado de saúde do macho através da coloração facial. O macho da espécie possui coloração facial mais intensa em relação as fêmeas. Indivíduos da espécie são sensíveis a infecção de parasitas transmitidos pelo sangue interferindo na coloração facial, quando doentes apresentam coloração facial pálida. Desse modo, fêmeas com visão tricromática teriam vantagem sobre as dicromáticas pela possibilidade de discriminar o aspecto sanitário de machos via coloração facial.

Como mencionado previamente, esta tese faz sua pequena contribuição ao entendimento das mudanças que geram efeitos significativos em como os organismos percebem e são percebidos por membros de seu grupo. Os resultados obtidos demonstram o potencial das investigação genéticas na compreensão da diversidade de fenótipos encontrados na natureza. Interessante notar que entre as

milhares de proteínas sintetizadas no corpo de vertebrados as duas proteínas receptoras aqui analisadas, *MC1R* e opsina, estão na base das principais características e funções em um organismo, a produção da coloração e a percepção visual. A exploração do papel do gene controlador da rota de produção de melanina apesar de amplamente empregado em estudos de coloração dos animais continua a fornecer dados interessantes. Abordagens futuras envolvendo ensaios funcionais *in vitro* para verificar experimentalmente o impacto das substituições identificadas nos trabalhos dessa tese seriam um passo importante na compreensão dos mecanismos envolvidos na produção da coloração. Essas abordagens também podem ser aplicadas no estudo dos polimorfismos do loco da opsina LWS/MWS verificando se de fato as substituições apresentam efeito significativo na espécie analisada. Essa abordagem se beneficiaria pela combinação com estudos ecológicos e comportamentais de indivíduos caracterizados com diferentes genótipos na compreensão do significado adaptativo das mudanças genéticas para este grupo de organismos.

CAPÍTULO VII

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amaral AJ, Ferretti L, Megens H-J, Crooijmans RPMA, Nie H, *et al.* (2011) Genome-wide footprints of pig domestication and selection revealed through massive parallel sequencing of pooled DNA. PLoS ONE 6: e14782.

Aslam ML, Bastiaansen JW, Elferink MG, Megens H-J, Crooijmans RP, *et al.* (2012) Whole genome SNP discovery and analysis of genetic diversity in Turkey (*Meleagris gallopavo*). BMC Genomics 13: 391.

Barnett AA, Schiel V, Deveny A, Valsko J, Spironello WR, Ross C (2011) Predation on *Cacajao ouakary* and *Cebus albifrons* (Primates: Platyrrhini) by harpy eagles. Mammalia 75:169-172.

Berg M and Bennett ATD (2010) The evolution of plumage coloration in parrots: a review. Emu 110: 10–20.

Bowler M, Bodmer RE (2011) Diet and Food Choice in Peruvian Red Uakaris (*Cacajao calvus ucayalii*): Selective or Opportunistic Seed Predation? Int J Primatol 32:1109–1120.

Bowler M, Noriega Murrieta J, Recharte M, Puertas P, Bodmer R (2009) Peruvian red uakari monkeys (*Cacajao calvus ucayalii*) in the Pacaya Samiria National reserve - a range extension across a major river barrier. Neotrop Primates 16:34-37.

- BirdLife International (2014). "*Selenidera maculirostris*". IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.2. International Union for Conservation of Nature. Retrieved 26 November 2014.
- Bonci DMO, Neitz M, Neitz J, Silveira LCL, Ventura DF (2013) The genetics of New World monkey visual pigments. *Psychol Neurosci* 6: 133-144.
- Bunce JA, Isbell LA, Neitz M, Bonci D, Surridge AK, Jacobs GH, Smith DG (2011) Characterization of opsin gene alleles affecting color vision in a wild population of titi monkeys (*Callicebus brunneus*). *Am J Primatol* 73:189-196.
- Canul SM, Sierra A, Mena O, Ortiz J, Zamora R, Duran L (2011) Distribución a la caracterización fenotípica del Meleagris gallopavo en la zona sur de Yucatán, México. *AICA* :284-287.
- Carney RM, Vinther J, Shawkey MD, D'Alba L e Ackermann J (2012) New evidence on the colour and nature of the isolated Archaeopteryx feather. *Nat Commun* 3: 637.
- Corso J, Hepp D (2013) O gene MC1R e a pigmentação dos animais. *Genética na Escola* 8: 194-201.
- D'Alba LB, Shawkey MD (2012) Relative contributions of pigments and biophotonic nanostructures to natural color production: a case study in Budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *J Exp Biol* 215:1272-1277.
- De La Hera I, Hedenström A, Pérez-Tris J and Tellería JL (2010) Variation in the mechanical properties of flight feathers of the blackcap *Sylvia atricapilla* in relation to migration. *J Avian Biol* 41: 342–347.

- Eizirik E, Yuhki N, Johnson WE, Menotti-Raymond M, Hannah SS and O'Brien SJ (2003) Molecular genetics and evolution of melanism in the cat family. *Curr Biol* 13: 448–453.
- Futuyma D (2008) *Biologia evolutiva*. 2 ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética.
- Gill F, Donsker D (Eds) (2012) *IOC World Bird Names (v 3.1)*. Disponível em <http://www.worldbirdnames.org/> [Accessado "04/05/2014"].
- Goldstein G, Flory K, Browne B, Majid S, Ichida JM, Burt JE (2004) Bacterial degradation of black and white feathers. *Auk*. 121: 656–659.
- Gomez D, Théry M (2007) Simultaneous crypsis and conspicuousness in colour patterns: comparative analysis of a Neotropical rainforest bird community. *Am Nat* 169: 42-61.
- Goodwin TW (1984) *The biochemistry of the carotenoids*. Animals, vol. 2 Chapman & Hall, New York.
- Haitina T, Klovins J, Takahashi A, Löwgren M, Ringholm A, Enberg J, Kawauchi H, Larson E T, Fredriksson R, Schiöth HB (2007) Functional characterization of two melanocortin (MC) receptors in lamprey showing orthology to the MC1 and MC4 receptor subtypes. *BMC Evol Biol* 7: 101–114.
- Hershkovitz P (1987) Uacaries, new world monkeys of the genus *Cacajao* (Cebidae, Platyrrhini): A preliminary taxonomic review with the description of a new subspecies. *Am J Primatol* 12:1-53.

- Hill GE (2006) Female mate choice for ornamental coloration. *In* Bird Coloration: Function and Evolution (Hill, G.E. and McGraw, K.J., eds), pp. 137–200, Harvard University Press.
- Hoekstra HE (2006) Genetics, development and evolution of adaptive pigmentation in vertebrates. *Heredity* 97:222–34.
- Hofreiter M, Schöneberg T (2010) The genetic and evolutionary basis of colour variation in vertebrates. *Cell Mol Life Sci* 67: 2591-2603.
- Hubbard JK, Uy JAC, Hauber ME, Hoekstra HE, SafranRJ (2010) Vertebrate pigmentation: from underlying genes to adaptive function. *Trends Genet* 26: 231–239.
- Hunt DM, Dulai KS, Cowing JA, Julliot C, Mollon JD, Bowmaker JK, Li WH, Hewett-Emmett D (1998) Molecular evolution of trichromacy in primates. *Vision Res* 38: 3299-3306.
- Jacobs GH (2007) New world monkeys and color. *Int J Primatol* 28: 729-759.
- Jacobs GH (2009) Evolution of colour vision in mammals. *Phil Trans R Soc B* 364:2957–2967.
- Jacobs GH (2013) Losses of functional opsin genes, short-wavelength cone photopigments, and color vision--a significant trend in the evolution of mammalian vision. *Vis Neurosci* 30(1-2):39-53.
- Lehtonen PK (2010) The molecular mechanisms and evolutionary significance of plumage colour variation in pied flycatchers (*Ficedula hypoleuca*). PhD thesis, University of Turku, Turku.

- Lin J, Fisher D (2007) Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature*. 45:843–850.
- McGraw K J, Nogare MC (2004) Carotenoid pigments and the selectivity of psittacofulvin-based coloration systems in parrots. *Comp Biochem Physiol B* 138:229-233.
- McGraw KJ (2006) Mechanics of melanin-based coloration. *In* Bird Coloration, Vol.1, Mechanisms and Measurements (ed. G. E. Hill and K. J. McGraw), pp. 243-394. Cambridge, MA: Harvard University Press.
- Melin AD, Hiramatsu C, Fedigan LM, Schaffner C, Aureli F, Kawamura S (2012) Polymorphism and adaptation of primate colour vision. *In* Evolutionary biology: mechanisms and trends (pp. 225–241). Berlin and Heidelberg: Springer Science, Business Media.
- Mundy NI (2005) A window on the genetics of evolution: MC1R and plumage colouration in birds. *Proc R Soc B* 272: 1633–1640.
- Nachman MW, Hoekstra HE, D'Agostino SL (2003) The genetic basis of adaptive melanism in pocket mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:5268–5273.
- Olsson M, Stuart-Fox D, Ballen C (2013) Genetics and evolution of colour patterns in reptiles. *Sem Cell Dev Biol* 24: 529–541.
- Orr HA (2005) The genetic theory of adaptation: a brief history. *Nat Rev Gen* 6:119–27.
- Patané JSL, Weckstein JD, Aleixo A, Bates JM (2009) Evolutionary history of Ramphastos toucans: molecular phylogenetics, temporal diversification, and biogeography. *Mol Phylogenet Evol* 53: 923–934.

- Papaj DR, Newsom GM (2005) A within-species warning function for an aposematic signal. *Proc R Soc Lond B* 272: 2519–2523.
- Protas ME, Patel NH (2008) Evolution of coloration patterns. *Annu Rev Cell Dev Biol* 24:425–446.
- Prum RO, Brush AH (2002) The evolutionary origin and diversification of feathers. *Q Rev Biol* 77:261–95.
- Prum RO (2006) Anatomy, physics, and evolution of avian structural colors. *In* *Bird Coloration, Vol. 1, Mechanisms and Measurements* (ed. G. E. Hill and K. J. McGraw), pp. 295-353. Cambridge, MA: Harvard University Press.
- Reed DH, Frankham R (2003) Correlation between fitness and genetic diversity. *Conserv Biol* 17:230–237.
- Robertson WRB, Bohren BB, Warren DC (1943) The inheritance of plumage color in the turkey. *J Hered* 34, 246–256.
- Roulin A (2004) The evolution, maintenance and adaptive function of genetic colour polymorphism in birds. *Biol Rev Camb Philos Soc* 79(4):815-848.
- Roulin A, Ducrest AL (2013) Genetics of colouration in birds. *Semin Cell Dev Biol* 24(6-7):594-608.
- Roulin A, Wink M (2004) Predator-prey relationships and the evolution of genetic colour polymorphism: a phylogenetic analysis in diurnal raptors. *Biol J Linnean Soc* 81: 565-578.
- Sick H. 1997 *Ornitologia Brasileira*. Rio de Janeiro, RJ: Ed. Nova Fronteira.

- Sigrist T (2009) Avifauna Brasileira: The avifauna of Brazil Field guide to the birds of Brazil. São Paulo, SP: Editora Avis Brasilis.
- Shapley R, Hawken MJ (2011) Color in the cortex: single- and double-opponent cells. *Vision Research* 51:701–717.
- Shichida Y, Matsuyama T (2009) Evolution of opsins and phototransduction. *Phil Trans R Soc B* 364: 2881–2895.
- Skoglund P and Höglund J (2010) Sequence Polymorphism in Candidate Genes for Differences in Winter Plumage between Scottish and Scandinavian Willow Grouse (*Lagopus lagopus*). *PLoS ONE* 5(4): e10334.
- Speller CF, Brian MK, Scott DW, Monroe C, Lipe WD, Arndt UM, Yang DY (2010) Ancient mitochondrial DNA analysis reveals complexity of indigenous North American turkey domestication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(7): 2807-2812.
- Steffen J, McGraw KJ (2009) How dewlap color reflects its carotenoid and pterin content in brown anoles. *Comp Biochem Physiol B* 154:334-340.
- Steiner CC, Römpler H, Boettger LM, Schöneberg T, Hoekstra HE (2009) The genetic basis of phenotypic convergence in beach mice: similar pigment patterns but different genes. *Mol Biol Evol* 26:35-45.
- Stevens M, Cuthill IC, Windsor AMM, Walker HJ (2006) Disruptive contrast in animal camouflage. *Proc R Soc B* 273:2433–2438.
- SurrIDGE AK, Osorio D, Mundy NI (2003) Evolution and selection of trichromatic vision in primates. *Trends Ecol Evol* 18: 198-205.

- Takeuchi S, Suzuki H, Yabuuchi M and Takahashi S (1996) A possible involvement of the melanocortin-1 receptor in regulating feather pigmentation in the chicken. *Biochim Biophys Acta* 1308: 164–168.
- Theron E, Hawkins K, Bermingham E, Ricklefs RE and Mundy NI (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*. *Curr Biol* 11: 550–557.
- Toral GM, Figuerola J, Negro JJ (2008) Multiple ways to become red: pigment identification in red feathers using spectrometry. *Comp Biochem Physiol, Part B: Biochem Mol Biol* 150:147–52.
- Trezise AE, Collin SP (2005) Opsins: evolution in waiting. *Curr Biol* 15(19):794-6.
- Tso IM, Tai P-L, Kuo C-H, Yang EC (2002) Colour associated foraging success and population genetic structure in a sit-and-wait predator *Nephila maculata* (Araneae: Tetragnathidae). *Anim Behav* 6:175-182.
- Vidal O, Araguas RM, Fernández R, Heras S, Sanz N, Pla C (2010) Melanism in guinea fowl (*Numida meleagris*) is associated with a deletion of Phenylalanine-256 in the MC1R gene. *Animal Genetics* 41: 656–658.
- Weckstein JD (2005) Molecular phylogenetics of the Ramphastos toucans: implications for the evolution of morphology, vocalizations, and coloration. *Auk* 122: 1191–1209.
- Zhang F, Kearns SL, Orr PJ, Benton MJ, Zhou Z, et al. (2010) Fossilized melanosomes and the colour of Cretaceous dinosaurs and birds. *Nature* 463: 1075–1078.