

Traducido al castellano por Omar Garcia de la lista Carduelios

## **La influencia de los carotenoides, adquisición y utilización en el mantenimiento de la pigmentación del plumaje típico de la especie en machos de goldfinches americanos (*carduelis tristis*) y Northern cardinals (*cardinalis cardinalis*)**

**Kevin J. McGraw**

**Geoffrey E. Hill**

**Riccardo Stradi**

**Robert S. Parker**

Department of Biological Sciences, 331 Funchess Hall, Auburn University, Auburn, Alabama 36849; Department of Neurobiology and Behavior, Cornell University, Ithaca, New York 14853; Facolta di Farmacia, Istituto di Chimica Organica, Universita di Milano, Via Venezian, 21 Milano 20133, Italy; Division of Nutritional Sciences, Cornell University, Ithaca, New York 14853

### **EXTRACTO**

Los pájaros exhiben una enorme variedad de colores en su plumaje basados en carotenoides, pero el mecanismo subyacente de la variabilidad interespecífica de la pigmentación por carotenoides sigue siendo mal entendida. Porque los vertebrados no pueden sintetizar los carotenoides, acceder a los pigmentos mediante la alimentación es un factor que puede establecer diferencias entre las especie en la coloración del plumaje basadas en carotenoides. Sin embargo, algunos pájaros metabolizan los carotenoides ingeridos y adquieren pigmentos diferentes del color de los precursores dietéticos, indicando que las capacidades metabólicas pueden también contribuir a la diversidad de colores de plumajes que vemos en la naturaleza. En este estudio, investigamos cómo la adquisición y la utilización de carotenoides influencia al mantenimiento de la pigmentación del plumaje típico de la especie en los *american goldfinches* machos (*Carduelis tristis*) y los *cardenales norteos* (*Cardinalis Cardinalis*). Suplimos la dieta de los goldfinches cautivos con carotenoides rojos para determinar si los machos, que son típicamente amarillos, eran capaces de adquirir el plumaje rojo. También privamos a cardenales de pigmentos dietéticos rojos para determinar si podrían fabricar los carotenoides rojos de precursores amarillos para adquirir su plumaje rojo típico. Encontramos que los goldfinches americanos podían depositar los nuevos pigmentos en su plumaje y desarrollar un aspecto anaranjado llamativo. Así, el acceso alimenticio a los pigmentos desempeña un papel en el grado de determinación con el cual los goldfinches expresan la coloración basada en carotenoides del plumaje. También encontramos que a los cardenales norteos le crecieron plumas rojas pálidas en ausencia de pigmentos dietéticos rojos, indicando que son capaces de metabolizar los carotenoides amarillos de su dieta para darle brillo al plumaje rojo que exhiben.

### **Introducción**

La evolución del plumaje colorido en los pájaros ha sido de interés para los biólogos por más de un siglo (Darwin 1871; Wallace 1889). Muchas especies utilizan los pigmentos de los carotenoides para colorear a sus plumas de rojo, anaranjado, y amarillo (Fox 1976), y la pigmentación basada en carotenoides ha sido el tema de muchos estudios recientes que investigan las bases próximas y últimas para la variabilidad en las exhibiciones de plumajes de color (Olson y Owens 1998; Hill 1999)

Más énfasis se ha puesto en los rasgos de la función de selección sexual de los carotenoides ornamentales dentro de las especies, como ser que las hembras prefieren los colores opacos y los machos los más brillantes como la mejor condición (andersson 1994).

Comparativamente menos atención se ha prestado a los factores que son la base de la enorme diversidad de colores de plumajes basados en carotenoides que vemos entre especies aviar en la naturaleza. Es esencial dilucidar los mecanismos por los cuales los pájaros se diferencian del color de las muestras de carotenoides y comprender los pasos implicados en producir plumas basadas en carotenoides. Los vertebrados no pueden sintetizar los pigmentos de los carotenoides de nuevo, así que deben adquirirlos de la dieta cuando esta creciendo su plumaje para poderlos depositar en las plumas (Volker 1938; Brush 1981). Consecuentemente, el acceso a los pigmentos en la alimentación puede ser diferente entre especie y contribuir a la variación en los colores de plumajes aviar que existen. Sin embargo, ciertas especies metabolizan los carotenoides ingeridos y depositan pigmentos de diferente color de sus precursores dietéticos (Brush 1990a). Así, la adquisición de carotenoides y la utilización pueden establecer diferencias interespecíficas en la pigmentación basada en carotenoides.

Los primeros trabajos sobre los determinantes de la pigmentación por carotenoides se centraron en las bases fisiológicas para las diferencias de color entre especies. Usando cautivos en cuya alimentación el contenido dietético de carotenoides fue manipulado, y comparando los pigmentos de plumaje presentes en especie de cercana relación, muchos concluyeron que las diferencias en color del plumaje basado en carotenoides entre especie eran atribuibles a los mecanismos bioquímicos y fisiológicos bajo control genético (Brush y Johnson 1976; Hudon et al. 1989; Hudon 1991). Por ejemplo, Test (1969) alimentó por separado los shafted flickers (*Colaptes auratus*) amarillos y rojos cautivos con la misma dieta y encontró que todavía le crecían plumas diferentemente coloreadas. También, reduciendo la cantidad de pigmentos rojos en las dietas de los flamencos americanos cautivos (*Phoenicopterus ruber*, Fox y McBeth 1970) y black rosis finches (*Carpodacus roseus*; French 1959) indujo a que a los pájaros le crezcan plumas pálidas pero no evitó que desarrollaran la coloración roja típica de la especie. Colectivamente, estos resultados sugieren que la pigmentación basada en carotenoides específicos de las especies en pájaros sea poco afectada por la alimentación y en su lugar esté sostenida sobre todo como resultado de caminos metabólicos específicos.

La idea que el acceso alimenticio a los pigmentos influencia la variación de la coloración por carotenoides ha ganado recientemente la ayuda de estudios en los cuales nuevos carotenoides se han agregado a la dietas de los pájaros. La introducción de la madreSelva (*Lonicera morrowii*) en los Estados Unidos del este, que se convirtió en parte de la dieta de los waxwings del cedro (*Bombycilla cedrorum*) durante los últimos 40 años ha sido responsable del aspecto de la banda anaranjada del final de la cola del waxwings, más bien que de la pigmentación amarilla típica de la especie (Hudon y Brush 1989; Brush 1990b; Mulvihill et al. 1992; Witmer 1996). Las Yellow-brested chat (*Icteria virens*) y las currucas de Kentucky (*Oporornis formosu*) también desarrollan el color anaranjado en sus plumas de las colas por las bayas de madreSelva que consumen (Mulvihill et al. 1992). Una variante anaranjada del bananaquit (*Coereba flaveola*), una especie que exhibe típicamente un plumaje amarillo por pigmentación basada en carotenoides, se ha identificado en las Indias del oeste francesas y también se atribuye a una nueva fuente de pigmento dietético (Hudon et al. 1996).

De todo este trabajo, está claro que son necesarios más estudios experimentales en los cuales se manipule el acceso a los carotenoides para entender mejor la especificación de los sistemas de pigmentación entre las especies y así el grado en los cuales el acceso y la utilización de los carotenoides determinan patrones específicos de las especies en el color del plumaje. En este estudio, realizamos las pruebas de alimentación en dos passerines que exhibían la pigmentación basada en carotenoides para hacer dos preguntas acerca de las capacidades fisiológicas de la pigmentación entre especie: ¿(1) puede en especies amarillo-pigmentada crecer plumaje rojo cuando abundan los pigmentos rojos en la comida? ¿(2) puede la especie rojo-pigmentada mantener el plumaje rojo aun cuando este privada de pigmentos dietéticos rojos y solamente consumir alimentos con carotenoides amarillos?. Específicamente, investigamos si a los goldfinches americanos machos (*Carduelis tristis*), que exhiben coloración de plumaje amarilla basada en carotenoides (Middleton 1993), podría crecerle plumaje rojo cuando se adiciona el pigmento rojo canthaxantina en su dieta durante muda. También probamos si los cardenales nortños machos (*Cardinalis Cardinalis*), que son de color rojo (Halkin y Linville 1999), podrían mantener la pigmentación roja del plumaje en presencia solamente de pigmentos dietéticos amarillos. Después de que los pájaros hubieran terminado la muda en cautiverio, cuantificamos el color del plumaje en ambas especies con un espectrofotómetro reflectante e identificamos los carotenoides en el alimento y las plumas usando la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para determinar el sino metabólico de pigmentos dietéticos.

## **Métodos.**

### *Goldfinches americanos*

Entre el 15 y el 24 de enero de 1999, capturamos 58 goldfinches machos con cestas trampas en los cardales del condado de Lee, Alabama. Dividimos aleatoriamente a los machos en cuatro grupos de 13 o 15 y mantuvimos a los mismos en jaulas separadas al aire libre (3,7 m x 1,5 m x 2,4m de alto). Se alimentaron a todos los grupos con una dieta básica amplia y libre de girasoles y agua a través del curso del estudio. Dos platos de alimento y de agua fueron colocados en el piso de cada jaula. El agua fue tratada con 6.6 gotas/L de multivitaminas de alto-potencia Premium multidrops (ocho en productos de animal doméstico, Hauppauge, N.Y.) y 0.001 g/ml de sulfadimethoxine, una droga que suprime infecciones coccidial en estos pájaros (McGraw, Hill 2000). Ninguno de los carduelis dieron muestras de ectoparasitismo (ej., pox aviar, conjuntivitis mycoplasma) o murieron durante su tiempo pasado en cautiverio.

Comenzamos nuestro experimento de suplementación de carotenoides el 15 de febrero, un mes antes de que los pájaros comenzaran su muda prenupcial a mediados de marzo. Dos grupos de control (n = 30

pájaros) se alimentaron con dieta de semillas y agua normal por el curso del estudio. Para dos grupos experimentales (n=28 machos), suplementamos la dieta básica con carotenoides disolviendo un pigmento rojo, canthaxanthin (0.001 g/ml de Roxanthin red 10 WS canthaxanthin, de las vitaminas de Roche, Parsippany, New Jersey), en el agua. Utilizamos este tratamiento del carotenoides porque el canthaxanthin es absorbido y depositado fácilmente en el plumaje del los carduelis rojos cercanamente relacionados con los *C.tristis* (Stradi 1998; Inouye et al. 2001) y porque esta concentración de pigmento es suficiente para teñir de rojo a los machos cautivos de esta especie (Hill 1992). Todos los grupos de goldfinches terminaron su muda prenupcial antes del 1 de junio.

### ***Cardenales Norteños***

Capturaron a diez cardenales machos usando redes de niebla en el condado de Lee entre el 14 y el 21 de agosto de 1997. Mantuvimos a los machos en una jaula al aire libre idéntica a las descritas arriba. Se alimentaron a los cardenales con una dieta libre de mijo rojo, mijo blanco, de semillas de girasol, y de agua vitaminada y médicamente tratada. No proporcionamos ningún suplemento de carotenoides a estos pájaros. Todos los cardenales terminaron su única muda anual en las jaulas antes del 1 octubre de 1997.

### **Muestreo de plumas**

Después de la muda, anotamos la coloración (tonalidad) del plumaje basado en carotenoides de los goldfinches y de los cardenales machos usando un espectrofotómetro handheld Colortron (sensu Hill 1998). Tomamos tres muestras de pigmentación de ambos lados, vientre y dorso, de los animales e hicimos un promedio de estas seis muestras para computar la baja tonalidad del plumaje para cada uno individualmente. Para la comparación con los pájaros cautivos, capturamos y anotamos el plumaje recientemente mudado de 29 goldfinches machos salvajes en Ithaca, Nueva York, entre el 1ro. Y el 15 de mayo del 2000 y 16 cardenales machos salvajes, en el condado de Lee, Alabama, del 14 al 21 de agosto de 1997. El Colortron asigna las cuentas de la tonalidad basadas en una rueda de 360 colores, así que los valores disminuyen de amarillo a naranja y a rojo

### **Análisis de semillas y de carotenoides en las plumas**

Porque estábamos interesados en determinar en que grado estos pájaros incorporaron fisiológicamente los nuevos o reducidos niveles de pigmentos dietéticos en su plumaje, utilizamos técnicas de HPLC para identificar los carotenoides presentes en la dieta y en las plumas de cardenales y goldfinches. Para analizar los carotenoides de las semillas, pulverizamos en un fino polvo por separado 0.5 g de pipas de girasol, de mijo rojo, y de mijo blanco con un mortero de mano. Los lípidos de la semilla fueron extraídos en tres etapas con 3 ml de tetrahydrofuran. Centrifugamos la suspensión a 3.000 RPM por 3 minutos y evaporamos la suspensión a estado seco bajo una corriente de nitrógeno. Redisolvimos el residuo de ambos tipos de mijo en 100 ml de la fase A (metanol-aceto-methanol-aceto-nitrilo, 50 del HPLC: 50. v/v, 0.05% triethylamine) más 50 ml de la fase B (cloruro del metanol-metileno, 50 del HPLC: 50. v/v, 0.05% triethylamine) y centrifugado de un precipitado blanco antes de análisis del HPLC. Debido al alto contenido de triglicéridos en semillas de girasol, las xantofilas y los carotenos fueron repartidos entre 1 ml de dimethylformamide (DMF) y 4 ml de hexano, respectivamente. Sacudimos y centrifugamos esta suspensión por 2 minutos, quitamos el hexano flotante, y reextrajimos la fase de DMF con otro hexano de 4 ml. Después de sacudir y de centrifugar, las fases del hexano fueron combinadas, y el hexano y los DMF fueron evaporados a estado seco bajo nitrógeno. Suspendimos de nuevo los carotenos y las xantofilas en 1 ml de hexano y de etanol, respectivamente, para la cuantificación de los carotenoides totales por spectrophotometry (Bausch y Lomb 1001 spectronic). Aplicamos el fórmula siguiente:

$$\frac{A \times \text{volumen de extracto (mL)}}{E \times \text{masa de las semillas (g)}}$$

donde A es la absorbencia de la muestra en  $\lambda_{\max}$  (448 para las xantofilas y 453 para los carotenos) y E es el coeficiente de la extinción en 1%/1 centímetro de los carotenoides relevantes en  $\lambda_{\max}$  (2.550 para las xantofilas en etanol y 2.592 para los carotenos en hexano; Bauernfiend 1981).

Inyectamos 20  $\mu$ l de cada muestra en una Hitachi L-6200 HPLC (Hitachi, Tokio) en una columna de HPLC de Develosil RPAqueous RP-30 (250 x 4,6 mm id.). La fase de hexano de las semillas de girasol no fueron analizadas por HPLC porque los triglicéridos particionados con los carotenos durante la extracción procuraban saponificar y quitar estos lípidos darían pruebas insatisfactorias. Un sistema de gradiente fue utilizado para el análisis en un índice constante de piso de 1.2 ml minuto: elución isocratic

con 92: 8 (v/v) A: B por 10 minutos, seguido por un gradiente linear hasta 30: 70 A: B con 26 minutos, y el acabar con la elución isocrática en 30: 70 A: B por 12 minutos. Los carotenoides fueron detectados en 450 nm usando un detector de Hitachi L-4250 UV/VIS, y las áreas máximas fueron integradas con un integrador HP 3390A. Identificamos los pigmentos presentes en las semillas comparando sus tiempos de retención a los de los carotenoides de referencia proporcionada por Roche Vitamins (luteína, 13.9 minutos; zeaxantina, 16.0 minutos;  $\beta$ -cryptoxanthin, 28.8 minutos;  $\beta$ -caroteno, 36.8 minutos). La concentración de cada tipo de carotenoides en el mijo rojo y blanco ha sido determinada por comparación con el estándar interno (echinenone, Roche vitamins, 1mg. Ml, tiempo de retención de 19,8 min.); la concentración específica de xantofilas en semillas de girasol fueron calculadas por comparación con la proporción relativa de un pigmento individual, como reflejado por HPLC en las áreas pico, el total de contenido de carotenoides se determinó por espectrofotometría.

Para identificar los carotenoides de las plumas, arrancamos el plumaje recién mudados de siete cardenales cautivos, cinco goldfinches machos salvajes, tres goldfinches cautivos alimentados con semilla llana, y tres goldfinches cautivos alimentados con canthaxanthin. Hudon (1991) había publicado previamente los pigmentos de carotenoides presentes en el plumaje de cardenales machos salvajes. Seguimos los protocolos de extracción y de identificación de Stradi et al. (1995a) para analizar los pigmentos de la pluma. Los barbulos carotenoides-pigmentados de cada pájaro fueron lavados con hexano, puestos por separado en 3 ml de metanol, tierra en un micronizador, filtrados de las sales y de la queratina inorgánicas, y evaporados en la temperatura ambiente. El residuo fue disuelto en 200 ml de acetona, momento después del cual el precipitado fue filtrado y el líquido filtrado que contenía el pigmento fue evaporado bajo nitrógeno seco. El residuo de pigmento restante fue disuelto en la fase móvil (acetonitrilo/methanol, 70: 30) e inyectado en un instrumento de Gymcotec A 110 para el análisis del HPLC usando dos columnas secuenciales de Lichrocart Purosphere RP-18 (250 x 4 mm. id.) en un índice de piso de 0.5 ml minuto. Los datos fueron adquiridos entre 230 y 600 nm con diodo-array detector (HP 1050 series), y el área máxima fue integrada en 450 nm. Los cromatogramas tridimensionales fueron registrados usando software del HP Chem. La espectrometría total fue realizada con un instrumento HP 5988 A de partículas para la identificación del pigmento.

### ***Análisis estadístico***

Los datos de los matices del plumaje no fueron normalmente distribuidos para cualquier grupo (W-test de Shapiro-Wilks,  $P < 0.05$ ), así que utilizamos el U-test de Mann-Whitney (Z reported) no paramétrico para comparar los conteos de baja tonalidad entre los grupos dentro de cada especie. Los goldfinches en jaulas bajo dietas tratadas no se diferenciaron perceptiblemente en la tonalidad del plumaje (ambas  $P > 0.2$ ), así que los reunimos para los análisis

### ***Resultados***

#### *American Goldfinches*

Desde la básica semilla de girasol en la dieta que alimentó a los goldfinches cautivos, nosotros aislamos dos pigmentos carotenoides primarios, luteínas y zeaxantina amarillos (fig. 1; Tabla 1), con cantidades de menor importancia de carotenos no identificados. Los machos cautivos que fueron alimentados solamente con esta dieta de semilla durante la muda depositaron dos carotenoides primarios en su plumaje amarillo: xantofilas amarillas A y B (fig. 2). Éstos son los mismos pigmentos encontrados en el plumaje basado en carotenoides de los goldfinches machos salvajes (fig. 2).

En los machos cautivos alimentados con girasol durante la muda creció un plumaje amarillo monótono comparado con los machos salvajes ( $Z=6.29$ ,  $P<0.0001$ ;fig. 3). En los machos cuya dieta fue suplementada con cantaxantina mudaron a un aspecto anaranjado llamativo (referirse a la fig. A en la edición online de *Physiological and Biochemical Zoology* para una imagen de color de estos pájaros). La cantaxantina fue identificada como el principal pigmento ( $> 75\%$ ) presente en las plumas de estos pájaros. El plumaje de los machos suplementados con cantaxantina difiere significativamente de la tonalidad de los machos cautivos que no recibieron suplementos ( $Z = 6.62$ ,  $P < 0.0001$ ) y de los machos salvajes ( $Z = 6.58$ ,  $P < 0.0001$ ; Fig. 3)

#### *Cardenal Norteño*

Aislamos cuatro pigmentos importantes en las semillas proporcionadas a los cardenales cautivos: luteína, zeaxantina,  $\beta$ -cryptoxanthin, y  $\beta$ -caroteno (fig. 1; Tabla 1). Los machos cautivos alimentados con esta dieta de semillas durante la muda depositaron cuatro pigmentos primarios en su plumaje ornamental:  $\alpha$ -doradoxanthin, astaxanthin, canthaxanthin, y adonirubin (fig. 5), iguales a éstos se encontró en el plumaje de los machos salvajes (Hudon 1991). En contraste con los carotenos y las hydroxy-xantofilas típicamente amarillas presente en las semillas, los keto-carotenoides que fueron encontrados en el plumaje típico exhibieron tonalidades rojiza. Aunque en los cardenales cautivos alimentados con esta dieta de semillas el plumaje se diferenció perceptiblemente en tonalidad con el plumaje de los machos salvajes (Fig.6), es posible que le crezcan plumas rojas con una dieta conteniendo pigmentos amarillos (referirse a la fig. 8 en la edición online para una imagen a color)

Tabla 1: Los principales pigmentos carotenoides identificados en las semillas que alimentaron a los goldfinches americanos y a los cardenales norteros cautivos.

<i>tipo de semillas y pigmentos</i>		<i>Concentración</i>	<i>Porcentaje del total</i>
<b>Mijo Blanco</b>			
	total	7,26 + - 0,08	...
	luteína	5,01 + - 0,06	69,0 + - 0,76
	zeaxantina	2,10 + - 0,05	28,9 + - 0,60
	b-cryptoxantina	0,06 + - 0,007	0,08 + - 0,14
	b-caroteno	0,09 + - 0,016	1,3 + - 0,21
<b>Mijo Rojo</b>			
	total	0,74 + - 0,27	....
	luteína	0,28 + - 0,12	36,0 + - 6,56
	zeaxantina	0,46 + - 0,21	58,3 + - 6,03
	b-cryptoxantina	0,02 + - 0,004	1,9 + - 0,87
	b-caroteno	0,03 + - 0,01	4,3 + - 1,52
<b>Semilla de girasol</b>			
	total	1,06 + - 0,11	...
	luteína	0,68 + - 0,05	65,2 + - 2,52
	zeaxantina	0,41 + - 0,06	33,7 + - 2,52
	Carotenos	0,02 + - 0,01	1,7 + - 0,43

Nota. Los medios + - 1 SD se divulgan para cada tipo de pigmento basado en las extracciones triples realizadas en porciones de semilla de 0.5-g

## Discusión

### *American goldfinches*

Usando HPLC, identificamos dos pigmentos carotenoides amarillos primarios – canary xantophylls A y B - en el plumaje nupcial amarillo de los carduelis tristis machos salvajes. Estas xantofilas son también los carotenoides principales encontrados en las plumas amarillas de otros carduelis (Stradi et al. 1995b) y están presentes en concentraciones más bajas en el plumaje rojo en varios de los parientes de *Carpodacus* (Stradi et al. 1997; Inouye et al. 2001). Cuando proveemos una dieta de semillas de girasol durante la muda que contiene luteínas y zeaxantina como los carotenoides primarios, a los goldfinches machos cautivos le crecieron plumas amarillas y como en los pájaros salvajes, depositaron las canary xantofilas A y B como pigmentos del plumaje. Esto sugiere que los machos salvajes metabolizan los dos pigmentos dietéticos amarillos y depositan más carotenoides amarillos oxidados en su plumaje ornamental (fig. 7; sensu Stradi 1998).

Cuando proveemos el pigmento carotenoides rojo cantaxantina en la dieta, en los goldfinches machos cautivos crecieron plumas rojizas depositando cantaxantina directamente en las plumas. La cantaxantina

se encuentra comúnmente en el plumaje de muchos pájaros, incluidos varios jilgueros (Stradi et al. 1997) y pájaros carpinteros (Stradi et al. 1998). Así, como en la especie mencionada previamente que exhibe pigmentación amarilla basada en carotenoides en su plumaje ornamental (Mulvihill et al. 1992; Hudon et al. 1996), los machos de american goldfinches tienen la capacidad de que le crezcan plumaje anaranjado cuando se le proveen nuevos pigmentos en su dieta durante la muda. Porque el plumaje anaranjado nunca se ha registrado en los machos silvestres, este resultado sugiere que los goldfinches no consumen suficiente cantidad de pigmentos anaranjados o rojos en la naturaleza como para colorear su plumaje de rojo o anaranjado. De hecho, aunque los ítem específicos de la dieta de los goldfinches salvajes no está completamente descrito, no hay evidencia de que durante la primavera los goldfinches consuman frutas o bayas (Middleton 1993) que contienen grandes cantidades de anaranjados y rojos carotenoides (Brush 1978). En cambio, los goldfinches son principalmente granívoros y consumen pasto, arbustos, y compuestos de semillas, además de brotes de hojas y flores de diente de león (Middleton 1993), todos probablemente contienen principalmente los pigmentos amarillos luteína y zeaxantina y pocos pigmentos rojos o anaranjados (Volker 1934; Goodwin 1980, Klau and Bauernfiend 1981). Así, el tipo de carotenos de la dieta ingerida durante la muda prenupcial es un factor que limita la expresión de la coloración del plumaje basado en pigmentos de los machos de goldfinches.

Una serie de factores biomecánicos permiten al goldfinches y a otras especies con pigmentación amarilla depositar pigmentos rojos en su plumaje. La cantaxantina es depositada inmodificada en las plumas por los goldfinches y esto hace que no requiera un específico sistema de conversión de enzimas para incorporar este pigmento en su plumaje. La cantaxantina también tiene una estructura química similar a las dos "canary xanthofilas" encontradas en el plumaje de los goldfinches (fig. 1). Los tres carotenoides contienen oxo-grupos, y oxo-carotenoides son absorbidos preferencialmente por los pájaros y los peces (schiedt 1989). De hecho, la cantaxantina es un isómero posicional de canary xantofilas B, diferente sólo en el grado de conjugación de las cadenas hidrocarburos y en la localización del grupo carbonil. La rodoxantina, el pigmento que el waxwings del cedro obtiene de las bayas de madre selva y que le hace crecer el plumaje anaranjado (Brush 1990b), es también un isómero posicional de canary xantofilas típicamente encontrada en la banda amarilla de la cola del waxwings (Stradi 1998). Así, los pájaros pueden ser predispuestos a depositar en sus plumas ciertos carotenoides basados en una estructura de pigmentación similar al del plumaje natural e improbablemente depositen nuevos pigmentos que son estructuralmente poco similares a los típicamente usados en sus plumas de color.

El sistema de procesamiento de los pigmentos puede también diferir entre pájaros de canto de color amarillos o rojos. Las especies de plumaje amarillo, como los goldfinches, no pueden utilizar pigmentos dietarios tan efectivamente como las especies que son de color rojo naturalmente. Mientras en los machos goldfinches cautivos creció un plumaje anaranjado por la cantaxantina suplementada en la dieta, los carpodacus mexicanos cautivos, que expresan plumaje rojo en libertad, desarrollaron una pigmentación roja brillante cuando la comida presentaba la misma concentración de cantaxantina (Hill 1992). A causa de que son más pequeños, los goldfinches pueden haber consumido menos agua y menos pigmentos que los carpodacus. Sin embargo, los machos de nuestro estudio presentaron una considerable cantidad de cantaxantina en sus heces (indicado por las deposiciones coloreadas de naranja, observación personal de K. McGraw), lo que sugiere que deben haber diferencias en las vías en que esas dos especies absorben o procesan los pigmentos ingeridos, que le permite a los carpodacus depositar más cantaxantina en su plumaje que a los goldfinches. Además, aunque los goldfinches convierten los pigmentos dietarios en xantofilas, ellos no tienen la capacidad de metabolizar ciertos carotenoides que son oxidados por otras especies para obtener un plumaje rojo o anaranjado. En apoyo de esto, los goldfinches alimentados con una concentración de  $\beta$ -carotenos (un pretendido precursor de cantaxantina en ciertos carduelines, Stradi 1998) fallaron idénticamente que con la cantaxantina de este estudio para conseguir un plumaje naranja en cautividad (K. McGraw, dato no publicado).

### *Cardenal Norteno*

Hudon (1991) identificó cuatro pigmentos principales en los plumajes basados en carotenoides de los machos silvestres de cardenales nortenos: Cantaxantina, astaxantina, adonirubin (formalmente phenocoxantina), y  $\alpha$ -cryptoxantina. En nuestro estudio, cuando fueron alimentados con semillas que contenían los cuatro carotenoides amarillos: luteína, xaxantina,  $\beta$ -caroteno y  $\beta$ -cryptoxantina, los pájaros no adquirieron el plumaje amarillo; en cambio muchos cardenales machos cautivos depositaron los mismos cuatro pigmentos rojos que son encontrados en el plumaje de los pájaros silvestres. Esto es una pequeña evidencia de que los pájaros de color almacenan carotenoides previamente al depósito en la pigmentación de las plumas (Brockmann and Voker 1934; Hill 1992, Inouye 1999), lo que apoya la idea de que los pájaros de nuestro estudio sacaron los carotenoides del plumaje rojo de los pigmentos de la dieta disponibles para ellos durante la muda y no de los acumulados previamente en libertad.

Basados probablemente en las 4 reacciones oxidantes que parecen ser comunes en los pájaros (Stradi et al 2001), proponemos que los cardenales convierten cada uno de los pigmentos dietarios en diferentes carotenoides rojos que son depositados en el plumaje (Fig.7; sensu Stradi 1998).

Nuestro estudio sugiere que los cardenales del norte poseen las capacidades metabólicas de obtener el plumaje rojo por oxidación de los pigmentos precursores amarillos de la dieta. Así, la utilización de los carotenoides facilita el mantenimiento de la coloración típica de la especie. Los pájaros cautivos en nuestro estudio probablemente mudaron a una baja intensidad de coloración roja no a causa del acceso a pigmentos diferentes, sino que tuvieron acceso a bajas concentraciones de pigmentos que los que ellos consiguen en libertad. Los cardenales machos silvestres consumen una dieta compuesta de un 60% de frutas durante la muda (Linville and Breitwisch 1997), probablemente provistas con una mayor concentración de pigmentos que las semillas ofrecidas en cautiverio por este estudio (Brush 1998). En cautividad los american goldfinches comen semillas de girasol, que presumiblemente contienen poco de los dos pigmentos que los machos ingieren en su dieta natural de semillas, también mudaron a un mas pobre plumaje color amarillo que los pájaros silvestres. Aunque algunos especulan que la salud de los pájaros cautivos también afectó la muestra de plumaje (Hudon 1994), los goldfinches y cardenales todavía incorporaron pigmentos rojos en sus plumas con nuestra dieta experimental.

¿Hay aquí un particular sendero de conversión metabólica que permite a los cardenales mantener su color rojo?. Stradi (et al. 2001) investigó los componentes de asimilación de los pigmentos rojos en carduelis proveyendo una dieta rica en luteína (precursor propuesto de la  $\alpha$ -doradexantina) y deficiente en  $\beta$ -cryptoxantina (hipotético precursor del adonirubin). La  $\alpha$ -doradexantina es encontrada en el plumaje silvestre de solo pocos carduelines rojos (ej. *Carpodacus rose*, *Pyrrhula pyrrhula*), y solo en esas especies es posible retener el color rojo en cautividad, presumiblemente a causa de su habilidad para oxidar las luteínas como lo opuesto a depositarla directamente en las plumas cuando crece su plumaje amarillo. Las luteínas se presentan fácilmente en casi todas las materias de las plantas (Goodwin 1980), entonces será importante en un futuro estudio de especies color rojas remover las luteínas de la dieta y determinar el grado en que los individuos pueden mantener la pigmentación típica de la especie.

## Conclusiones

A causa del enlace directo con las fuentes de alimentación, los plumajes de color basados en carotenoides ofrecen una oportunidad única para investigar la importancia de los factores ambientales en la formación de las expresiones variables de los rasgos de dimorfismo sexual entre especies. Parámetros ecológicos como la altitud (Badyaev 1997), luminosidad ambiente (Endler and Thery 1996; Anderson 2000), presión predatora, y carga parasitaria tienen que ser considerados en un cuadro comparativo para evaluar la variabilidad del color entre las taxas aviares. Aquí, examinamos directamente el medio por el cual los pájaros usan los pigmentos disponibles en su alimentación para entender mejor las diferencias en los sistemas de pigmentación de dos passerines que muestran diferentes colores ornamentales basados en carotenoides. Ambos accesos alimenticios a los pigmentos y la habilidad de usar diferentes pigmentos ha contribuido a la expresión de la coloración típica de las especies en los *American Goldfinches* y los *Cardenales nortños*. Aunque esto marca un principio de entendimiento de los factores que controlan la pigmentación en estas dos especies, la adquisición y utilización de carotenoides continúa no estudiada en la mayoría de especies de pájaros silvestres. No sólo es escasamente conocido el tipo y cantidad de pigmentos que las especies consumen para que le crezcan sus plumas de color, pero muchos aspectos de la fisiología de los carotenoides aún no han sido descritos. Por ejemplo, las vías de conversión de los pigmentos son solo hipotéticas y basados en alimentación experimental con pigmentos no etiquetados. Además, no conocemos en algunas especies con coloración de plumaje basada en carotenoides en sitio anatómico donde esa conversión metabólica ocurre (ej. hígado, folículo de la pluma) y en consecuencia, todavía no hemos dado en identificar a las enzimas que catalizan las reacciones de oxidación (Brush 1990<sup>a</sup>). Esos componentes fundamentales del plumaje ornamental deben ser prioridad en futuras investigaciones para que podamos entender los sistemas de señalización de carotenoides en cualquier nivel de análisis.

## Reconocimientos.

Lo procedimientos experimentales realizados durante este estudio fueron aprobados por el *Institutional animal Care and Use Committee at Auburn University* (protocol nos 0011-R-1058 and 015-R-2139). Un especial agradecimiento a S. Otis, M. Ducharme, y a L.A. Phillips por la asistencia con agricultura animal y a C. Thom por traducir del alemán a Brockmann y Volker (1934). La *National Science Foundation* (grant IBN9722171 to G.E.H.) y al *College of Science and Mathematics*, la *Alabama Agricultural Experiment Station*, al *Department of Zoology and Wildlife Sciences*, y al *Graduate School at Auburn*

*University* que proveyeron soporte financiero para esta investigación. Durante la preparación del manuscrito, K.J.M. fue soportado por el *College of Agriculture and life Sciences* acompañado por el *Cornell Universite and Science to Archive Result* y por el *Environmental Protection Agency*.