

**CHAMADOS DE DISTRESSE EM MORCEGOS: MARCADORES
BIOACÚSTICOS DE DIFERENÇAS INDIVIDUAIS,
POPULACIONAIS E ESPECÍFICAS**

RICARDO BRIOSCHI LYRA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE

DARCY RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

MARÇO 2022

**CHAMADOS DE DISTRESSE EM MORCEGOS: MARCADORES
BIOACÚSTICOS DE DIFERENÇAS INDIVIDUAIS,
POPULACIONAIS E ESPECÍFICAS**

RICARDO BRIOSCHI LYRA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE

DARCY RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

MARÇO 2022

**CHAMADOS DE DISTRESSE EM MORCEGOS:
MARCADORES BIOACÚSTICOS DE DIFERENÇAS
INDIVIDUAIS, POPULACIONAIS E ESPECÍFICAS**

RICARDO BRIOSCHI LYRA

Tese apresentada ao Centro de
Biotecnologias da Universidade Estadual do
Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como
parte das exigências para a obtenção do
título de doutor em Ecologia e Recursos
Naturais

Orientador: Dr. Leandro Rabello Monteiro

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

MARÇO 2022

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pelo autor.

L992

Lyra, Ricardo Brioschi.

Chamados de Distresse em morcegos : marcadores bioacústicos de diferenças individuais, populacionais e específicas / Ricardo Brioschi Lyra. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2022.

109 f.

Inclui bibliografia.

Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2022.

Orientador: Leandro Rabello Monteiro.

1. Filostomídeos. 2. Comunicação. 3. Evolução. 4. Comportamento animal. 5. Ecologia. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 577

CHAMADOS DE DISTRESSE EM MORCEGOS:
MARCADORES BIOACÚSTICOS DE DIFERENÇAS
INDIVIDUAIS, POPULACIONAIS E ESPECÍFICAS

RICARDO BRIOSCHI LYRA

Tese apresentada ao Centro de
Biotecnologias da Universidade Estadual do
Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como
parte das exigências para a obtenção do
título de doutor em Ecologia e Recursos
Naturais

Aprovada em:

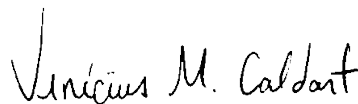
Comissão examinadora:



Profa. Maria João Ramos Pereira (UFRGS)



Prof. Carlos Ramón Ruiz-Miranda (UENF)



Prof. Vinícius Matheus Caldart (UEPG)



Prof. Leandro Rabello Monteiro (UENF)
(Orientador)



Governo do Estado do Rio de Janeiro
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

DECLARAÇÃO

Eu, Marina Satika Suzuki, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais (PPG-ERN) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), seguindo a Resolução CPPG nº2 de 2021, declaro validadas as assinaturas constantes da Folha de Assinaturas da Tese intitulada “**Chamados de Distresse em Morcegos: Marcadores Bioacústicos de Diferenças Individuais, Populacionais e Específicas**” de autoria de Ricardo Brioschi Lyra, defendida no dia 25 de março de 2022.

Campos dos Goytacazes, 20 de junho de 2022

Marina Satika Suzuki
Coordenadora PPG-ERN / UENF
ID. Funcional 641333-1



Documento assinado eletronicamente por **Marina Satika Suzuki, Coordenadora**, em 20/06/2022, às 16:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento nos art. 21º e 22º do [Decreto nº 46.730, de 9 de agosto de 2019](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.fazenda.rj.gov.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=6, informando o código verificador **34697256** e o código CRC **553881A1**.

Referência: Processo nº SEI-260009/002124/2021

SEI nº 34697256

Avenida Alberto Lamego, 2000, - Bairro Pq. Califórnia, Campos dos Goytacazes/RJ, CEP 28013-602
Telefone: - www.uenf.br

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a todos os professores que tive ao longo da vida. Reconheço nessa profissão um dos atos mais nobres da humanidade: a transformação das pessoas por meio da educação. Deixo aqui, de forma escrita, minha estima e admiração por estes profissionais.

Agradeço às agências de fomento, CAPES, CNPq e FAPERJ pelo financiamento deste trabalho. Agradeço à CAPES também a possibilidade (e financiamento) de participar no Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE). Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, e principalmente ao meu orientador, o Professor Leandro Rabello Monteiro, pela oportunidade e confiança na minha capacidade de desenvolver este trabalho. Ao último agradeço tanto como aluno, quanto como amigo, pelos muitos conselhos e direcionamentos acadêmicos e de vida ao longo desse processo.

Agradeço a todos os companheiros de trabalho e colaboradores que tive durante minha participação no laboratório do Professor Leandro, especialmente aos Dr. Marcelo Rodrigues Nogueira, Dr. Isaac Passos de Lima, Professor Adriano Lucio Peracchii, Dr. Breno Mellado da Rocha, Msc. Lucas Carneiro de Oliveira, Msc. Luana Burg Mayer e Dr^a. Jamile de Moura Bubadué.

Agradeço aos membros da banca de defesa, os Profs. Carlos Ramón Ruiz-Miranda, Maria João Ramos Pereira e Vinícius Matheus Caldart, por suas excelentes contribuições que em muito enriqueceram o trabalho. Ao primeiro, agradeço também pelas discussões ao longo de meus estudos, sempre com sugestões valiosas.

Agradeço aos membros do *K. Lisa Yang Center for Conservation Bioacoustics* (KLY-CCB) da Universidade de Cornell por me receberem durante minha participação no programa CAPES/PDSE, a qual foi de suma importância para consolidar meu trabalho. Agradeço especialmente aos Dr. Holger Klinck, Dr. Russell Charif e Dr^a Laurel Braden Symes pelo grande aprendizado através de treinamentos, discussões e ideias.

Agradeço à minha família pelo suporte durante todos esses anos, mas principalmente aos meus pais pelo amor e apoio incondicional em todos meus objetivos. Devo à minha mãe grande parte do meu desenvolvimento intelectual, tendo em vista sua atuação ativa no meu ensino durante os anos pré-universitários,

especialmente durante a infância e a pré-adolescência. Considero-a uma de minhas maiores e mais importantes professoras. Ao meu pai devo minha paixão pela música, que me levou a ter fascínio pela Acústica como ciência e a escolher essa como uma de minhas principais ferramentas de trabalho. Atribuo a eles a herança daquelas que julgo minhas maiores qualidades: de meu pai a solicitude para com o próximo e de minha mãe a admiração e o carinho para com todos os seres vivos e o mundo. Nunca serei capaz de expressar em palavras o quanto os amo e admiro.

Agradeço àqueles a quem considero família, apesar de não possuir relações sanguíneas. Agradeço a Brenda Luana Schereiner pelo companheirismo e apoio constantes e por me trazer calma, especialmente nos estágios finais da produção do presente documento. Agradeço a Breno Mellado da Rocha pelas muitas conversas e pela camaradagem ao longo dos anos. Agradeço a todos integrantes da incrível família Law, especialmente Jane-Marie e Adam, por terem me acolhido como parte da sua família desde meu primeiro dia em sua residência. Vocês terão minha eterna gratidão e carinho, além de uma família no Brasil.

Sumário

Resumo.....	XIV
Abstract.....	XV
Introdução Geral.....	1
Contexto teórico.....	1
Metodologia geral.....	8
<i>Permissões.....</i>	8
<i>Áreas de estudo.....</i>	8
<i>Amostras obtidas.....</i>	9
<i>Considerações sobre amostragem nos diferentes níveis hierárquicos.....</i>	10
<i>Gravações e análises espectrográficas.....</i>	11
<i>Variáveis morfométricas.....</i>	13
Referências Bibliográficas.....	14
Capítulo 1 - Acoustic structure of the distress calls of Neotropical bats.....	18
Introduction.....	18
Materials and Methods.....	20
<i>Study areas.....</i>	20
<i>Capture, recording and acoustic analysis.....</i>	20
<i>Call categories distribution.....</i>	22
Results.....	22
<i>Description of general patterns.....</i>	22
1) <i>Continuous pulses (CPs – Fig. 1, Supplementary Table 2).....</i>	22
2) <i>Pulses containing sinusoidal frequency modulations (sFMs – Fig. 2, Supplementary Table 3).....</i>	23
3) <i>Well-defined harmonics (Harms – Fig. 3, Supplementary Table 4).....</i>	23
4) <i>Thrill-like structures (Thrs – Fig. 4, Supplementary Table 5).....</i>	24
5) <i>Complex pulses (Comp).....</i>	24
<i>Chi-squared tests.....</i>	29
Discussion.....	30
<i>Nonlinearities might be related to distinct functionalities.....</i>	30
<i>Varied call categories might indicate distinct strategies.....</i>	31
<i>Other bats as listeners.....</i>	33
<i>Species ecologies and Distress Calls.....</i>	35
<i>Final considerations.....</i>	35
Literature cited.....	36

Capítulo 2 - Variação individual e populacional em chamados de distresse e sua relação com a morfologia.....	45
Resumo.....	45
Introdução.....	46
Metodologia específica.....	48
Áreas de estudo.....	48
<i>Captura, gravação e mensuração.....</i>	<i>48</i>
Análises estatísticas.....	51
Resultados.....	53
<i>Variação individual.....</i>	<i>53</i>
<i>Variação populacional em Artibeus lituratus.....</i>	<i>55</i>
<i>Variáveis morfométricas e acústicas.....</i>	<i>56</i>
Discussão.....	57
<i>Variação individual.....</i>	<i>57</i>
<i>Variação populacional em Artibeus lituratus.....</i>	<i>59</i>
<i>Relação entre morfologia e variabilidade acústica.....</i>	<i>60</i>
Referências Bibliográficas.....	60
Capítulo 3 – Padrões evolutivos de variação acústica em chamados de distresse de morcegos.....	66
Resumo.....	66
Introdução.....	66
Metodologia específica.....	69
Áreas de trabalho e obtenção de dados.....	69
Análises estatísticas.....	69
Resultados.....	73
<i>Sinal filogenético.....</i>	<i>73</i>
<i>Variação acústica e morfológica.....</i>	<i>75</i>
<i>Relações entre variáveis acústicas, morfométricas e ecológicas.....</i>	<i>81</i>
Discussão.....	83
<i>Sinal Filogenético.....</i>	<i>83</i>
<i>Tamanho corporal e variação acústica dos CDs.....</i>	<i>84</i>
Emissão oral vs nasal.....	85
Possíveis relações ecológicas e funcionais dos CDs.....	86
Referências Bibliográficas.....	88
Conclusão geral.....	92

Lista de Figuras

Introdução geral

Figura 1 – Espectrograma (esquerda) e espectro de força (direita) mostrando o procedimento de obtenção das variáveis acústicas de um pulso de Chamado de Distresse da espécie *Desmodus rotundus*. A caixa vermelha representa a seleção visual feita pelo pesquisador. No caso dos chamados da categoria Trinados (Capítulo 1), as seleções se deram do início do primeiro pulso ao final do último pulso de cada grupo de pulsos. As linhas representam as variáveis acústicas. Verde - Frequência 95%, Amarelo – Frequência Central, Vermelho – Frequência Pico, Preto – Frequência 5%.....12

Figura 2. Morcego filostomídeo (*Uroderma magnirostrum*) mostrando medidas morfométricas referentes à cabeça, orelha e folha nasal. AO – altura da orelha; LO – largura da orelha; AF – altura da folha nasal; LF – largura da folha nasal; AC – altura da cabeça; LC – largura da cabeça na região pós-orbital; CC – comprimento da cabeça. Foto de M. R. Nogueira.....13

Capítulo 1

Fig. 1 – Examples of Distress Calls of the category Continuous Pulse (CP). A) *Platyrrhinus lineatus* Stacked pattern; B) *Artibeus lituratus* Stacked pattern; C) *A. lituratus* Noise Burst; and D) *Desmodus rotundus* Noise Burst.....25

Fig. 2 – Examples of Distress Calls of the category Sinusoidal Frequency Modulations (sFM). A) *Chrotopterus auritus* sFM at the end; B) *Artibeus lituratus* sFM at the end; C) *Diphylla eucaudata* sFM on the entire pulse with varying nonlinear phenomena; D) *Glossophaga soricina* clean sFM on the entire pulse.....26

Fig. 3 – Examples of Distress Calls of the category Harmonics (Harm). A) *Artibeus lituratus* harmonics; B) *Glossophaga soricina* two types of steep frequency modulated harmonics; C) *Sturnira tildae* harmonics and harmonics shifting to noise; D) *Peropteryx kappleri* horizontal harmonics.....27

Fig. 4 – Examples of Distress Calls of the category Thrills (Thr). A) *Trachops cirrhosus* tonal thrills; B) *Carollia perspicillata* tonal thrills with varying pulse structures; C) *Anoura caudifer* noisy thrills; D) *Artibeus lituratus* thrills.....28

Capítulo 3

Figura 1. Árvore filogenética das espécies do presente estudo. A escala abaixo da árvore mostra o tempo em milhões de anos. A distribuição das variáveis ecológicas Guilda e Disponibilidade de recursos (Disp.) é mostrada com cores de acordo com os níveis dos fatores, cuja legenda se encontra abaixo de cada fator. As categorias de guilda são frugívoro de sub-bosque (Frug.Sub), frugívoro de dossel (Frug. Doc), animalívoro (Anim), nectarívoro (Nec) e hematófago (Sang). Os níveis de disponibilidade são esparsos (Esp.) e explosivos (Exp.), sendo estes últimos geralmente associados à frutificação de figueiras.....71

Figura 2. Histograma com a distribuição de 1000 valores da estatística K para simulações da evolução de caracteres quantitativos na filogenia das espécies estudadas. As linhas tracejadas verticais indicam a posição dos valores observados para variáveis acústicas (azul) e variáveis morfométricas (preto). As abreviações são: CA - comprimento do antebraço, MC – massa corporal, CC - comprimento da cabeça, LA - largura da cabeça, AC - altura da cabeça, AF - altura da folha nasal, LF - largura da folha nasal, AO - altura da orelha, LO - largura da orelha, FrC - frequência central, Fr5 - frequência 5%, Fr95 - frequência 95%, FrP - frequência pico, IIF - Intervalo Interquartil de Frequência, Dur90 - duração 90%, Ent - entropia espectral.....75

Figura 3. Diagramas de dispersão com ordenação dos dois primeiros componentes principais filogenéticos das variáveis acústicas e árvores filogenéticas com mapeamento dos escores dos componentes principais. As linhas conectando espécies na ordenação correspondem ao mapeamento da filogenia no espaço dos PCs acústicos. As abreviações das espécies no diagrama de ordenação seguem o padrão com a primeira letra do gênero e

as três primeiras do epíteto específico. A escala de cores representa a proximidade acústica entre as espécies.....77

Figura 4. Diagramas de dispersão com ordenação dos dois primeiros componentes principais filogenéticos das variáveis morfométricas e árvores filogenéticas com mapeamento dos escores dos componentes principais. As linhas conectando espécies na ordenação correspondem ao mapeamento da filogenia no espaço dos PCs (filomorfoespaço). As abreviações das espécies no diagrama de ordenação seguem o padrão com a primeira letra do gênero e as três primeiras do epíteto específico. A escala de cores representa a proximidade morfológica entre as espécies.....79

Lista de Tabelas

Introdução geral

Tabela 1 – Hipóteses funcionais atribuídas aos Chamados de Distresse e predições quanto a suas características acústicas e comportamentos associados. Vale lembrar que nenhuma das hipóteses é mutuamente excludente apesar de determinadas características fazerem mais sentido em certos contextos. As predições que mais auxiliarão para a compreensão das potenciais funcionalidades encontram-se destacadas em negrito.....6

Tabela 2 – Número de gravações de Chamados de Distresse obtidas por espécie. Cada gravação representa um indivíduo distinto.....9

Tabela 3 – Variáveis acústicas selecionadas, suas descrições e justificativas de escolha para o presente trabalho.....12

Capítulo 1

Table 1 – Accoustic parameters for Distress Calls of Neotropical bats from Phyllostomidae (Ph), Molossidae (Mo), Vespertilionidae (Ve), and Emballonuridae (Em), and information on sample size for recorded individuals (Indiv) and total number of selected Distress Calls (Calls). Parameters are as follows: percentage of each of the call categories in relationship to the total – Continuous Pulses (CP), Sinusoidal Frequency Modulation (sFM), Harmonics (Harm), Thrills (Thr), Complex (Comp) and Transitioning (Tran); Emission rate (Erate); Occupation Rate (Orate); and Frequency of Emission rate (Ferate).....41

Table 2 – Contingency tables relating call type and timing of emission in four species of phyllostomid bats. Observed frequencies and standardized residuals (within parentheses) from the Chi-squared test are shown. Timing sections presented in rows and call type in columns: Continuous Pulses (CP); Sinusoidal Frequency Modulations (sFM); Harmonics (Harm); Thrills (Thr).....43

Capítulo 2

Tabela 1 – Número de indivíduos gravados por espécie.....49

Tabela 2 – Número de indivíduos de *Artibeus lituratus* gravados para cada localidade onde o trabalho foi desenvolvido.....49

Tabela 3 – Resultados das Análises Discriminantes com Misturas Gaussianas e dos cálculos do índice H_s para todas as espécies avaliadas em nível individual. As espécies se encontram dispostas em ordem decrescente quanto ao valor de H_s . . Abreviações: Sp - Espécie; n_{ind} – Número de indivíduos; Acc – acurácia; Nir – porcentagem de classificações corretas esperadas aleatoriamente (*No information rate*); mE – mediana da especificidade; mS – mediana da sensibilidade; mAb – mediana da acurácia balanceada; H_s – somatório de H_i para os PCs das variáveis acústicas; H_i – Estatística de informação de Beecher para cada

variável acústica. Índices baseados em ANOVAs com $P < 0,001$ se encontram destacados em negrito; N – número de indivíduos identificáveis estimado a partir do H_s ; D90 – duração 90%; F5 – frequência 5%; F95 – frequência 95%; Fpico – frequência pico; IIF – intervalo interquartis de frequências; Ent – entropia espectral; A.lit – *Artibeus lituratus*; A.cin – *A. cinereus*; A.obs – *A. obscurus*; C.per – *Carollia perspicillata*; D.rot – *Desmodus rotundus*; G.sor – *Glossophaga soricina*; L.aur – *Lonchorhina aurita*; P.lin – *Platyrrhinus lineatus*; P.rec – *Platyrrhinus recifinus*; S.lil – *Sturnira lilium*.....55

Tabela 4 – Porcentagens encontradas pela ADMG avaliando a variação acústica entre populações para as sensibilidade, especificidade e acurácia balanceada de cada população.....56

Tabela 5 – Resultados das dbRDAs e subsequentes permutações para cada uma das espécies avaliadas.....56

Capítulo 3

Tabela 1 – Resultados encontrados para o índice K de Blomberg e para o teste de permutação das variáveis acústicas e morfométricas. IIF – Intervalo Interquartis de Frequências.....73

Tabela 2 – Coeficientes das variáveis acústicas nos dois primeiros componentes principais (pPCs) da Análise dos Componentes Principais Filogenética avaliando a variabilidade acústica em chamados de distresse de morcegos filostomídeos. No primeiro eixo (pPC1), todas as variáveis atuaram no mesmo sentido, com exceção à Duração 90%76

Tabela 3 – Coeficientes das variáveis morfométricas nos dois primeiros componentes principais (pPCs) da Análise dos Componentes Principais Filogenética.....78

Tabela 4 – Coeficientes das variáveis morfométricas e acústicas no primeiro eixo (dbRDA1) da Análise de Redundância Filogenética avaliando a relação entre variáveis acústicas e morfométricas em morcegos filostomídeos. Os coeficientes das variáveis acústicas foram obtidos por correlações com os escores do eixo.....80

Tabela 5 – Contribuição das variáveis no primeiro eixo (dbRDA1) da Análise de Redundância Baseada em Distância Filogenética avaliando a relação entre variáveis acústicas, tamanho do antebraço e tipo principal de recurso em morcegos filostomídeos.....82

Resumo

Chamados de Distresse (CDs) são vocalizações emitidas em contextos aflitivos, como a captura por predadores. São amplamente distribuídos em vertebrados, ocorrendo também em morcegos. Não se sabe ao certo qual sua funcionalidade primária, mas sua emissão está provavelmente relacionada à sobrevivência do emissor. Pode-se agrupar hipóteses funcionais em duas categorias: 1) CDs são direcionados a outros indivíduos; e 2) CDs são direcionados aos predadores. O presente trabalho tem por objetivo avaliar a estrutura acústica dos CDs em morcegos, numa tentativa de aumentar a compreensão sobre sua funcionalidade e evolução. Foram avaliados três pontos quanto aos CDs, representando capítulos distintos: 1) A descrição dos CDs e caracterização de padrões gerais entre espécies; 2) A variação acústica individual e populacional, e sua relação com variáveis morfométricas; e 3) a variação acústica entre espécies no contexto filogenético, focando em sua relação com características morfológicas e ecológicas. Foram encontrados padrões qualitativos na estrutura dos CDs (Capítulo 1). É possível que haja uma relação funcional entre a estrutura dessas vocalizações e sua funcionalidade primária, refletida na emoção/intenção do emissor e no efeito causado sobre os receptores. Em dez espécies, a capacidade de classificação de indivíduos com base em características de seus CDs, e o conteúdo de informação de identidade (Hs) foram baixos, dando suporte à hipótese de que não há individualidade (Capítulo 2). Não foram encontradas assinaturas vocais populacionais nos CDs de *A. lituratus*, sugerindo que a variação acústica entre indivíduos é maior que entre populações (Capítulo 2). Métodos filogenéticos comparativos indicaram forte sinal filogenético em variáveis acústicas e morfométricas (Capítulo 3). O tamanho corporal foi o principal fator associado à variabilidade acústica dos CDs. Guildas alimentares apresentaram relação com a estrutura dos CDs, mas a disponibilidade de recursos não (Capítulo 3). Nossos resultados quanto aos CDs corroboram a hipótese de que a resposta heteroespecífica se relaciona à similaridade acústica e indicam que diferenças estruturais podem estar relacionadas ao tamanho corporal e à intencionalidade do emissor.

Abstract

Distress Calls (DCs) are vocalizations emitted in affiliative contexts, such as the capture by predators. They are widely distributed in vertebrates, being also found in bats. Its primary function is still unknown, but its emission is probably related to the emitter's survival. Functional hypothesis can be grouped into two categories: 1) DCs are addressed to other individuals; 2) DCs are addressed to predators. This work aims to evaluate the acoustic structure in DCs of bats, as an attempt to increase the understanding about its functionality and evolution. Three points were evaluated, representing distinct chapters: 1) The description of DCs and the characterization of general patterns between species; 2) The individual and populational acoustic variation and its relationship to morphometric variables; 3) The acoustic variation among species in the context of phylogeny, focusing in its relationship with morphological and ecological characteristics. Qualitative patterns were found in the structure of DCs (Chapter 1). It is possible that there is a functional relationship between the structure of these vocalizations and its primary function, reflected in the emitter's emotion/intention and in the effect caused on the receivers. In ten species, the ability to classify individuals based on their DCs characteristics and the identity information (H_s) content were low, supporting the hypotheses that there is no individuality (Chapter 2). Populational vocal signatures weren't found for the DCs of *Artibeus lituratus*, suggesting that the acoustic variation among individuals is bigger than among populations (Chapter 2). Phylogenetic comparative methods indicate a strong phylogenetic signal in acoustic and morphometric variables (Chapter 3). Body size was the main factor associated to the acoustic variability of DCs. Food guilds presented a relationship to the structure of DCs, but resource availability did not (Chapter 3). Our results for DCs support the hypotheses that the heterospecific response relates to the acoustic similarity and indicate that structural differences might be related to body size and the emitter's intentions.

Introdução Geral

Contexto teórico

Chamados sociais são importantes para a comunicação entre indivíduos e a dinâmica social cotidiana dos morcegos, como os chamados de contato usados para manter a coesão em grupo ou os chamados de isolamento utilizados pelos filhotes para sinalizar sua localização (Russo e Jones, 1999; Knörnschild *et al.*, 2010; Carter *et al.*, 2012; Engler *et al.*, 2017). Dentre estes, os Chamados de Distresse (CDs) merecem destaque, pois, apesar de pouco compreendidos, apresentam grande potencial de influenciar a sobrevivência de indivíduos em interações presa-predador (Perrone Jr., 1980; Conover, 1994a; Wise *et al.*, 1999). Chamados de Distresse são emissões sonoras produzidas em situações de aflição, como a captura por predadores. São amplamente distribuídos entre diversos grupos taxonômicos e são bem estudadas especialmente em Aves (Hill, 1986; Conover, 1994b; Mathevon *et al.*, 1997). Para morcegos, algumas das características estruturais dos CDs, como a ocupação de grandes bandas de frequência, uso de frequências relativamente baixas quando comparadas aos pulsos de ecolocalização e investimento energético relativamente alto em um contexto associado à sobrevivência tem levado às seguintes indagações: Qual a função primária dos CDs? Que benefícios diretos e indiretos são obtidos pelos indivíduos emissores? Tais sinais são dirigidos a outros morcegos, aos predadores ou a ambos? As hipóteses que procuram esclarecer esta função não são mutuamente excludentes, podendo atuar em contextos variados (Perrone Jr., 1980; Conover, 1994b; Hechavarría *et al.*, 2016).

Acredita-se que os CDs possuam capacidade de se dispersar por distâncias relativamente longas por conterem frequências graves, especialmente quando comparados aos pulsos de ecolocalização. Tal fato permite que a informação enviada pelo emissor chegue a uma maior quantidade de receptores (Römer e Lewald, 1992; Mathevon *et al.*, 1997). Em um trabalho com *Carollia perspicilata*, Hechavarría *et al.* (2016) sugerem que a distância de detecção pode atingir cerca de 116 metros. Os cálculos se baseiam no investimento energético em frequências relativamente graves produzidas pelos indivíduos desta espécie, tornando tais sinais mais resistentes à atenuação do ar; e no fato de que

frequências entre 20 e 25 Khz apresentarem quantidade considerável de energia para a espécie, se sobrepondo a uma faixa de frequência de sensibilidade auditiva elevada (~23 Khz). Essas informações corroboram a hipótese de que os CDs são direcionados aos próprios morcegos, possuindo funcionalidades como a de atrair outros indivíduos (*Attract-an-audience hypothesis* – Conover, 1987), podendo levar a comportamentos antipredatórios como o de mobilização grupal (*mobbing* - Hartley, 1950). Os indivíduos que se aproximam podem ser *mobbers* ativos, que atacam o predador, podendo levar a uma chance de fuga da presa que tenha sido capturada. Tal comportamento é bem documentado para aves (e.g., Johnson *et al.*, 2003; Sandoval e Wilson, 2012), mas foi reportado apenas duas vezes em morcegos (Knörnschild e Tchapka, 2012; Lučan e Šálek, 2013). Os indivíduos atraídos também podem ser *mobbers* passivos – aqueles que se aproximam sem chegar a ter contato físico, o que pode lhes trazer benefícios devido ao aprendizado proveniente da interação presa-predador (Conover, 1987). Carter *et al.* (2015) sugerem que talvez a aproximação dos indivíduos não seja necessariamente um ataque ao potencial predador, mas apenas vôos de inspeção para avaliar o risco informado pelo emissor, o que enquadraria a resposta na categoria de mobilização grupal passiva.

Quando os CDs abrangem o universo sonoro dos predadores, novas hipóteses surgem quanto à sua funcionalidade, envolvendo aumento na chance de evasão em eventos de captura/predação. Uma delas é que o indivíduo vocaliza com a intenção de surpreender predadores inexperientes, levando a uma redução na força de constrição exercida pelo predador, possibilitando uma chance de fuga (*Startle-the-predator hypothesis* – Conover, 1994a). Outra possível explicação é que os indivíduos vocalizam para atrair outros predadores que possam estar próximos, assustando o predador inicial (*Attract-another-predator hypothesis* – Perrone Jr., 1980). A atração de predadores com o uso de CDs é uma prática comum a caçadores, porém estudos que defendam sua eficácia são sujeitos a controvérsias (Morse e Balser, 1961; Wise *et al.*, 1999). Constatou-se que *playbacks* de chamados variados de mamíferos e aves, incluindo CDs, atraíram arminhos dentro de 5 minutos, porém os resultados não foram conclusivos quanto aos fatores responsáveis pela atração, pois podem ter sido influenciados pelo tipo de gravação – analógica vs. digital, com resposta apenas ao segundo (Spurr e O'Connor, 1999). Por fim, há também a possibilidade de que

os sinais sejam emitidos com a finalidade de agredir os predadores através de um incômodo gerado, por serem sinais que podem apresentar grande quantidade de energia e por serem normalmente acompanhados por comportamentos de defesa, como tentativas de fuga e mordidas. Essas hipóteses são reforçadas pelo fato de os CDs apresentarem frequências dentro do limite audível de espécies de alguns potenciais predadores (*Carollia perspicilata* – 12 a 74 KHz, Hechavarría *et al.*, 2016; *Pipistrellus nathusii*, *P. pipistrellus* e *P. pygmaeus* - 17 a 33 KHz, Russ *et al.*, 2004).

Além de aspectos sociais, como os destacados acima, a variação nos CDs também pode estar associada a características do emissor, incluindo a estrutura corporal, idade e sexo (Blumstein e Munos, 2005; Blumstein e Fernández-Juricic, 2010; Briefer e McElligot, 2011). Isto acontece pelo efeito da anatomia sobre os processos de produção e emissão dos sons. Em geral, indivíduos com maior tamanho corporal tendem a gerar sons predominantemente mais graves, devido à atenuação das frequências (principalmente as mais altas) que ocorre dentro do próprio corpo do emissor (Pye, 1979; Fletcher, 2004; García *et al.*, 2014). A Teoria de Fonte-Filtro (Brittan-Powell *et al.*, 1997; Vannoni e McElligott, 2007; Taylor e Reby, 2010) prediz que estruturas diferentes, com funcionalidades variadas, associadas à produção sonora e à modulação intencional dos sons, como as cordas vocais e a boca, respectivamente, atuam de forma conjunta no processo de sonorização (Herrel *et al.*, 2009; Riede e Goller, 2010). Tais pontos refletem na relação entre a intencionalidade e as limitações corporais na produção de sons (Morton, 1977).

Outra forma de compreender melhor a funcionalidade dos CDs é averiguar a variação acústica e sua relação com variáveis fenotípicas e ecológicas. Observa-se um crescente número de estudos, principalmente nos últimos dez anos, mas abordando o problema em grande parte no nível intraespecífico (August, 1985; Ryan *et al.*, 1985; Russ *et al.*, 1998; Russ *et al.*, 2004; Carter *et al.*, 2015; Hechavarría *et al.*, 2016; Prat *et al.*, 2016; Jiang *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2018; Hechavarría *et al.*, 2020; Hörmann *et al.*, 2020) Elucidar qual o nível de especificidade do sinal e quais tipos de variáveis possuem relação com a resposta ajudará a entender sua funcionalidade. Para tal, três níveis hierárquicos podem ser estabelecidos: Indivíduos, Populações e Espécies.

Para o primeiro nível hierárquico, informações sobre individualidade permitem um melhor entendimento sobre como o sinal é utilizado. Se a variação interindividual é maior do que a intraindividual, é possível que haja uma ferramenta sonora de diferenciação entre os indivíduos (Mathevon *et al.*, 2003; Nelson e Poesel, 2007; Blumstein e Fernández-Juricic, 2010; Pollard *et al.*, 2010). À quais fatores esta variação pode estar associada, no âmbito dos CDs, é uma dúvida sobre a qual se é possível apenas especular no momento. Uma possibilidade é a de que indivíduos com relações genéticas fortes (ou alguma outra fonte de variação que gere afinidade) se reconhecem e respondem mais intensamente aos chamados de seus próximos. Há também a possibilidade de que exista um comportamento altruísta recíproco. Caso este tipo de comportamento se aplique aos CDs, reforça-se seu direcionamento a outros morcegos e não aos predadores. Comportamentos similares ao altruísmo recíproco são conhecidos em morcegos, como *Desmodus rotundus*, hematófago, em que indivíduos compartilham sangue entre si após o forrageio, dentro das colônias que ocupam (Wilkinson, 1984; Wilkinson, 1988). Neste caso, os indivíduos partilham o alimento com outros com os quais tenham laços sociais dentro dos abrigos, formados por interações anteriores como a partilha de alimentos e a limpeza social (Carter e Wilkinson, 2013; Ripperger e Carter, 2021). Portanto, é essencial que haja uma ferramenta de reconhecimento individual. Ainda quanto aos trabalhos de Wilkinson, constatou-se que os ganhos ao receber alimento de um outro indivíduo são consideravelmente maiores do que as perdas da partilha, o que explica a manutenção de tais relações interindividuais. Também é possível que não haja individualidade nos CDs e que o sinal emitido não seja dirigido a um grupo específico de indivíduos, mas a todos presentes no ambiente no momento. Assim, a manutenção de um comportamento de resposta geral conservaria um aumento no valor adaptativo para cada indivíduo da população e não apenas aos intimamente relacionados (Russ *et al.*, 1998).

Quanto ao nível de populações, para diversas espécies de Aves foi constatado que o meio em que se encontram tem grande influência sobre a estrutura das emissões sonoras, podendo gerar diferenças entre populações (Slabbekoorn e Smith, 2002; Tubaro e Lijtmaer, 2006; Mathevon *et al.*, 2008; Ríos-Chelén *et al.*, 2012). A identificação de perfis populacionais pode ser um indício de que há um certo nível de diferença comunicativa entre as populações, ainda que

sutil, devido ao fato de que a estrutura sonora pode ser influenciada por características do meio, como a estrutura da vegetação (Slabbekoorn e Smith, 2002). Ao longo do tempo evolutivo é possível que tal diferenciação atinja um nível que gere incompatibilidade na comunicação entre indivíduos de populações diferentes, consequentemente alterando, ou até mesmo nulificando, sua funcionalidade. Tais relações devem ser melhor exploradas antes de qualquer afirmação. Estudos com os tentilhões de Galápagos sugerem que características morfométricas possam ter tido grande peso sobre a incompatibilidade na comunicação, influenciando o processo de radiação adaptativa ocorrido no arquipélago por gerar isolamento social e consequentemente reprodutivo (Podos, 2001; Podos e Nowicki, 2004). Por fim, a identificação de perfis populacionais iniciaria a discussão de que os CDs possam ser aprendidos e não comportamentos inatos, seguindo um modelo de aprendizado vocal de multidão (Prat *et al.*, 2017).

No nível de variação interespecífico, acredita-se que os CDs possuam baixa especificidade devido à sobreposição de parâmetros acústicos e aos benefícios que a resposta pode fornecer aos emissores (Willey e Richards, 1982; Russ *et al.*, 1998; Russ *et al.*, 2004; Knörnschild *et al.*, 2010). Avaliar a variação nas variáveis acústicas permite compreender se, mesmo com funcionalidade direcionada a toda assembleia presente, há diferenças que permitam discriminar espécies. Caso não haja diferença, este é mais um indício de que a especificidade do sinal é, de fato, baixa e que tal aspecto da comunicação possui forte potencial de resposta por parte das comunidades de morcegos como um todo; ou de predadores. Além disso, proximidades gerais das variáveis acústicas entre as espécies podem sugerir que hajam grupos que interajam mais entre si, por ocuparem de forma mais parecida o nicho acústico (Krause, 1987). Foi sugerido anteriormente que espécies que possuem características próximas associadas à percepção de afinação tendem a responder mais intensamente entre si (ex: Frequência pico - Huang *et al.*, 2018). Por fim, deve-se avaliar a variabilidade acústica dos CDs em um contexto filogenético, verificando sua associação evolutiva com variáveis morfológicas, como por exemplo o tamanho corporal e a morfologia cefálica e da folha nasal, remetendo a questões ligadas ao histórico evolutivo dessas vocalizações.

Assim sendo, o principal objetivo deste trabalho é elucidar a funcionalidade e a evolução dos Chamados de Distresse, avaliando a especificidade do sinal, a sua variabilidade em diferentes níveis hierárquicos e as relações entre variáveis morfométricas e acústicas, levando em consideração que as similaridades entre as espécies não são independentes da filogenia. Para tal, foram definidos objetivos específicos, os quais serão organizados em três capítulos: 1) Abordar e descrever a estrutura acústica dos CDs em espécies de morcegos variadas, buscando padrões gerais; 2) Avaliar a ocorrência de assinaturas vocais individuais e populacionais nos CDs e a relação da estrutura acústica com a morfologia intraespecífica; e 3) Abordar a variação interespecífica nos CDs, com a finalidade de entender a especificidade deste tipo de Chamado Social, bem como sua evolução conjunta com características morfológicas e ecológicas. A Tabela 1 traz hipóteses e predições que serão úteis para a interpretação dos resultados encontrados no presente trabalho.

Tabela 1 – Hipóteses funcionais atribuídas aos Chamados de Distresse e predições quanto a suas características acústicas e comportamentos associados. Vale lembrar que nenhuma das hipóteses é mutuamente excludente apesar de determinadas características fazerem mais sentido em certos contextos. As predições que mais auxiliarão para a compreensão das potenciais funcionalidades encontram-se destacadas em negrito.

Hipóteses funcionais	Predições
1) Atrair outros morcegos (Hartley, 1950; Conover, 1987; Conover, 1987; Carter et al., 2015)	Energia investida em porções mais graves da vocalização para se propagar por distâncias maiores.
	Investimento energético dentro de uma faixa de maior sensibilidade auditiva para morcegos, caso seja espécie-específico (difere da hipótese 2) – não avaliado no presente trabalho.
	Independente dos limites audíveis dos predadores (difere da hipótese 2) - não avaliado no presente trabalho.
	Se a resposta é por relações de altruísmo recíproco ou por afinidade, a variação intraindividual deve ser menor que a interindividual.

Se a especificidade do sinal é baixa, a variação intrapopulacional é maior que a interpopulacional.

Se a variabilidade acústica entre grupos é mais baixa que a dentro dos grupos (para os níveis de indivíduos, populações e espécies), a resposta pode estar associada à não distinção intergrupos

Se há um possível uso diferenciado do nicho acústico entre as espécies, a variação intraespecífica é menor que a interespecífica.

Predomínio de vocalizações menos ruidosas do que no caso de sinalização de agressividade (difere das hipóteses 3 e 4)

Altas taxas de emissão, que potencialmente se estendem por todo o tempo em que o indivíduo está preso (difere da hipótese 3)

2) Atrair outros predadores (Perrone Jr., 1980) Energia investida em porções mais graves da vocalização para se propagar por distâncias maiores.

Energia investida em frequências que se sobreponham aos limites audíveis de potenciais predadores (difere da hipótese 1) - não avaliado no presente trabalho.

Independente da ocorrência de individualidade

Não é necessário que a entropia do chamado seja elevada por não configurar um chamado agressivo (difere das hipóteses 3 e 4).

3) Assustar predadores inexperientes (Conover, 1994a) Energia investida em frequências que se sobreponham aos limites audíveis de potenciais predadores.

Alto investimento energético para assustar predadores inexperientes, principalmente nos primeiros chamados, levando a um predomínio de vocalizações ruidosas nos momentos iniciais da emissão (difere das hipóteses 1 e 2).

Eficácia diminuída conforme o *display* comportamental

aumenta, assim, não se espera que a emissão seja muito longa (difere das hipóteses 1, 2 e 4)

O comprimento de banda e a entropia possuem tendência a ser altos, seguindo o padrão de vocalizações agressivas
(difere das hipóteses 1 e 2)

4) Agredir o predador

Energia investida em frequências que se sobreponham aos limites audíveis de potenciais predadores.

Alto investimento energético para gerar incômodo aos predadores, ao longo de toda vocalização, refletindo em características como altas taxas de emissão e aumentos na amplitude e nos níveis de ruído (difere das hipóteses 1 e 2).

Metodologia geral

Permissões

Todos os procedimentos conduzidos foram aprovados pelo Comitê de Ética e Uso Animal da UENF (projeto 569030, protocolos 354 e 498). Os trabalhos de campo nas Reservas Biológicas União e de Sooretama possuem autorização para atividades com finalidade científica (SISBIO número 62649-3). A captura e coleta de exemplares testemunho fora de unidades de conservação federais foi autorizada pelos proprietários das áreas e pela licença de coleta permanente do Prof. Leandro R. Monteiro (SISBIO 28730-2).

Áreas de estudo

O trabalho foi desenvolvido principalmente em duas florestas distantes 420 km entre si. A Reserva Biológica União se encontra no estado do Rio de Janeiro, nas coordenadas 22° 36' e 22° 12' S e 42° 12' e 42° 60' O; já o complexo florestal composto pelas Reserva Natural Vale e Reserva Biológica de Sooretama se localiza na região norte do estado do Espírito Santo, nas coordenadas 19° 03' 24.51" S e 40° 08' 51.83" O. A primeira possui duas vegetações predominantes, sendo estas a de Floresta Ombrófila Densa e a de Floresta Ombrófila Submontana (ICMBio, 2008); já a segunda é representada predominantemente

pela Mata Atlântica de Tabuleiro, compondo juntamente às Reservas Particulares de Patrimônio Natural Recanto das Antas e Mutum Preto, o maior remanescente deste tipo de Floresta do Sudeste brasileiro (Germano Filho *et al.*, 2000). A Reserva Ecológica de Guapiaçu (REGUA) também foi utilizada como área complementar, sendo localizada na porção central estado do Rio de Janeiro, nas coordenadas 22° 27' 10.309" S e 42° 46' 13.011" O. A REGUA também se localiza na Mata Atlântica, possuindo vegetação de baixada, sub-montana e montana (Oliveira-Filho e Fontes, 2000). Por fim, o *campus* da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro foi utilizado para contemplar as partes do trabalho referentes à variação individual e populacional nos Chamados de Distresse. Na UENF, os animais foram capturados durante períodos de frutificação de uma figueira.

Amostras obtidas

Foram obtidas 371 gravações para indivíduos adultos de 28 espécies de morcegos (Tabela 2). As espécies mais representadas foram *Artibeus lituratus*, *Carollia perspicillata* e *Desmodus rotundus*, tanto pelo número de capturas, quanto por comumente emitirem CDs quando foram capturadas. O uso de redes de neblina para a captura de morcegos tende a ser mais efetivo para certas espécies do que para outras (Flaquer *et al.*, 2007; Robbins *et al.*, 2008). Filostomídeos são comumente capturados em redes de neblina (Kalko e Handley Jr., 2001; Sampaio *et al.*, 2003), possivelmente gerando predomínio dessa família nas gravações obtidas.

Tabela 2 – Número de gravações de Chamados de Distresse obtidas por espécie. Cada gravação representa um indivíduo distinto.

Espécie	Gravações
<i>Anoura caudifer</i>	5
<i>Anoura geoffroyi</i>	4
<i>Artibeus fimbriatus</i>	2
<i>Artibeus lituratus</i>	78
<i>Artibeus obscurus</i>	16
<i>Carollia perspicillata</i>	52
<i>Chrotopterus auritus</i>	4
<i>Desmodus rotundus</i>	43

<i>Artibeus cinereus</i>	6
<i>Diphylla ecaudata</i>	1
<i>Glossophaga soricina</i>	9
<i>Lonchorhina aurita</i>	10
<i>Lonchophylla peracchii</i>	1
<i>Micronycteris microtis</i>	5
<i>Molossus molossus</i>	2
<i>Molossus rufus</i>	1
<i>Myotis nigricans</i>	5
<i>Platyrrhinus lineatus</i>	8
<i>Platyrrhinus recifinus</i>	12
<i>Peropteryx kappleri</i>	1
<i>Phyllostomus discolor</i>	4
<i>Rhinophylla pumilio</i>	4
<i>Saccopteryx bilineata</i>	1
<i>Saccopteryx leptura</i>	1
<i>Sturnira lilium</i>	6
<i>Sturnira tildae</i>	1
<i>Trachops cirrhosus</i>	4
<i>Vampyressa pusila</i>	1
Total	371

Considerações sobre amostragem nos diferentes níveis hierárquicos

Para abordar as variações Individuais, foram utilizadas todas espécies com 6 ou mais indivíduos adultos gravados, de modo a ter no mínimo o mesmo número de variáveis e indivíduos para o cálculo das estatísticas de individualidade (ver Linhart *et al.*, 2019). As espécies que se adequaram a esse critério foram *Artibeus cinereus*, *A. lituratus*, *A. obscurus*, *Carollia perspicillata*, *Desmodus rotundus*, *Glossophaga soricina*, *Lonchorhina aurita*, *Platyrrhinus lineatus*, *P. recifinus* e *Sturnira lilium*. Também por restrições de tamanho amostral, somente as espécies *A. lituratus*, *Carollia perspicillata* e *Desmodus rotundus* foram utilizadas para avaliar a relação entre as variáveis acústicas e morfométricas no nível dos indivíduos no Capítulo 2 (Legendre e Anderson, 1999). Para o nível de populações, apenas *A. lituratus* foi utilizada. Para o nível de Espécie foram utilizadas gravações de CDs de 20 espécies pertencentes à família Phyllostomidae capturadas durante os trabalhos de campo nos diferentes locais.

Gravações e análises espectrográficas

As gravações foram realizadas imediatamente após a captura dos animais em redes de neblina entre Abril de 2018 e Março de 2021. Indivíduos capturados eram transferidos em sacos de pano até uma estação de gravação fixa. Não foram observadas alterações comportamentais que sejam dignas de nota na emissão de CDs associada ao manuseio dos indivíduos. Foi utilizado um microfone ultrassônico M500 (Pettersson Elektroniks, www.batsound.com) conectado a um laptop. As gravações (Amostragem: 500KHz/s; 16 bits) foram realizadas a uma distância aproximada de 2 metros do indivíduo manipulado no momento, com exceção aos indivíduos de *Artibeus lituratus*, os quais foram gravados a distâncias entre 4 e 6 metros, devido a amplitudes maiores em suas vocalizações, que por vezes ultrapassavam os limites de sensibilidade do microfone. As análises acústicas foram feitas utilizando o software Raven Pro 1.6 (Center for Conservation Bioacoustics, 2011). A extração dos parâmetros acústicos se deu de forma automatizada pelo referido *software*. Os pontos de referência (início, fim, limite superior e limite inferior) utilizados durante a seleção de chamados foram obtidos uma única pessoa com base em inspeção visual de espectrogramas (Figura 1). As variáveis acústicas obtidas e a razão de suas escolhas encontram-se listadas na Tabela 3. Deve-se destacar que as variáveis utilizadas no presente trabalho e a indisponibilidade de informações na literatura sobre as capacidades auditivas em morcegos de espécies variadas impossibilitam concluir se os chamados de distresse seriam direcionados apenas a morcegos da própria espécie ou a toda a comunidade. Assim, no presente trabalho, ambos os casos foram unificados em uma única categoria: atrair outros morcegos.

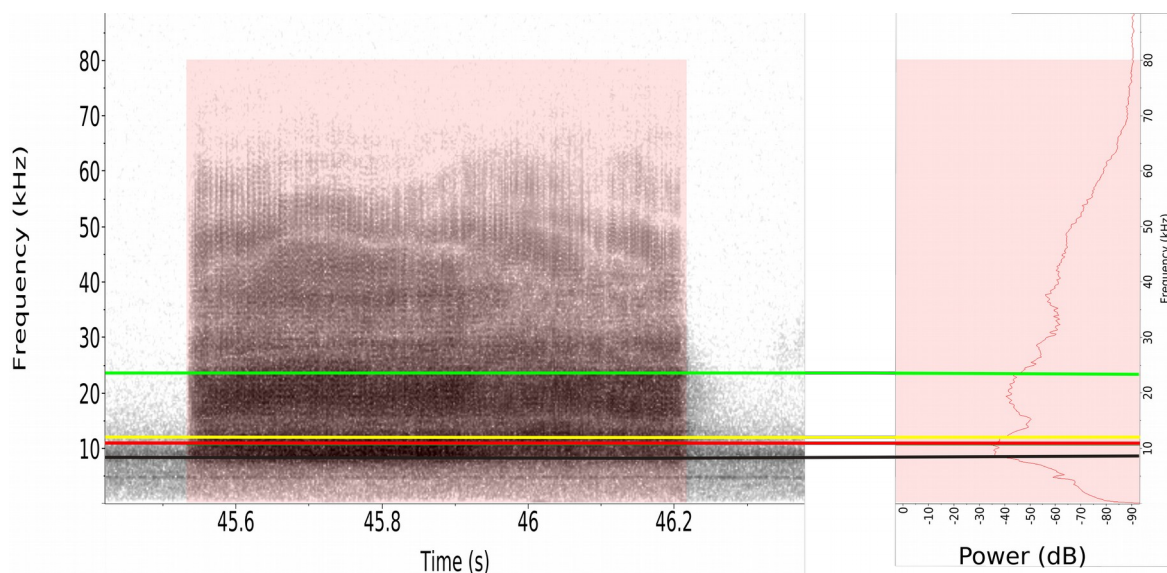


Figura 1 – Espectrograma (esquerda) e espectro de força (direita) mostrando o procedimento de obtenção das variáveis acústicas de um pulso de Chamado de Distresse da espécie *Desmodus rotundus*. A caixa vermelha representa a seleção visual feita pelo pesquisador. No caso dos chamados da categoria Trinados (Capítulo 1), as seleções se deram do início do primeiro pulso ao final do último pulso de cada grupo de pulsos. As linhas representam as variáveis acústicas. Verde - Frequência 95%, Amarelo – Frequência Central, Vermelho – Frequência Pico, Preto – Frequência 5%.

Tabela 3 – Variáveis acústicas selecionadas, suas descrições e justificativas de escolha para o presente trabalho.

Variável acústica	Descrição	Justificativas de escolha
Frequência 95%	Referente à porção mais aguda. Representa a frequência que divide a seleção em dois intervalos de frequência, contendo 95% e 5% da energia total.	Quanto maior o investimento em frequências mais agudas, espera-se que as vocalizações sejam dirigidas principalmente a outros morcegos que estejam próximos. Frequências agudas são mais facilmente atenuadas, atingindo menores distâncias.
Frequência 5%	Referente à porção mais grave. Representa a frequência que divide a seleção em dois intervalos de frequência, contendo 5% e 95% da energia total.	Quanto maior o investimento em frequências mais graves, duas possibilidades se tornam reais: o direcionamento aos predadores e a propagação do som por distâncias maiores devido a menor atenuação.
Intervalo inter-quartil de frequência (IIF)	Referente à banda de frequência usada, é obtida pela diferença dos quartis de 75 e 25% dos valores absolutos de frequência em KiloHertz contendo 75% e 25% da energia total.	Será útil para avaliar o nível de similaridade entre as espécies. Valores altos podem estar associados à ocorrência de fenômenos não-lineares relacionados ao contexto agonístico de emissão. Quanto maior o comprimento de banda, maior o potencial de sobreposição do nicho acústico entre espécies, o que sugere baixa especificidade do sinal. Espécies com IIF amplo potencialmente apresentam maior

		sobreposição intra e interespecífica.
Frequência Central	Frequência em KHz que representa o Quartil de 50% do total, dividindo a seleção em dois intervalos de frequência contendo energia similar.	Será útil para avaliar o nível de similaridade entre as espécies
Frequência Pico	Frequência que dispõe maior valor de energia dentre todas	Sua sobreposição ou não entre as espécies pode estar relacionada ao nível de especificidade da resposta ou à morfologia corporal, bem como indicar sobreposição do nicho acústico.
Entropia espectral	Nível de organização da energia distribuída nas frequências do pulso. Varia entre 0 e 1 para sinais mais tonais ou ruidosos, respectivamente.	Valores mais altos sugerem uma relação mais íntima com chamados agressivos, possivelmente dirigidos aos predadores, seja para assustá-los ou agredi-los.
Duração 90%	Tempo em segundos entre os percentis de 5 e 95% da duração total.	Será útil para avaliar o nível de similaridade entre as espécies, podendo estar relacionada a diferenças no uso temporal durante a emissão dos chamados de distresse.

Variáveis morfométricas

Todas as medições corporais foram obtidas após as gravações, de forma que apenas indivíduos que vocalizaram foram submetidos a tal etapa. As medidas obtidas foram: comprimento do antebraço, massa corporal, comprimento – distância entre a narina e a crista ossificada na porção dorsal do crânio, largura na região pós-orbital e altura da cabeça, altura da base à ponta e largura no ponto de maior distância da orelha, altura - da base à ponta da lança e largura – no ponto de maior distância da folha nasal (Figura 2).

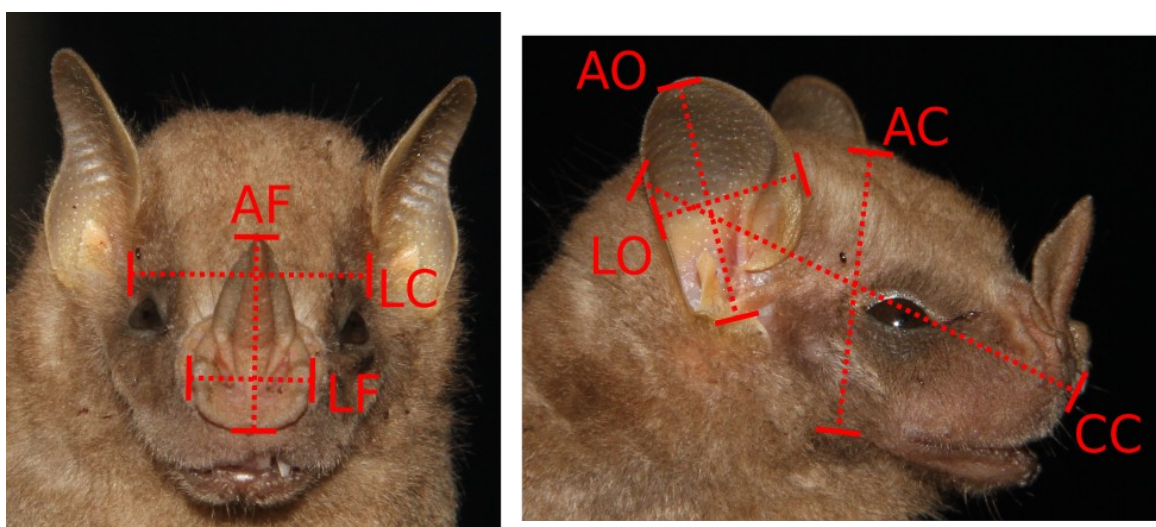


Figura 2. Morcego filostomídeo (*Uroderma magnirostrum*) mostrando medidas morfométricas referentes à cabeça, orelha e folha nasal. AO – altura da orelha; LO – largura da orelha; AF – altura da folha nasal; LF – largura da folha nasal; AC – altura da cabeça; LC – largura da cabeça na região pós-orbital; CC – comprimento da cabeça. Foto de M. R. Nogueira.

Referências Bibliográficas

- August, P.V. (1985). Acoustical properties of the distress calls of *Artibeus jamaicensis* and *Phyllostomus hastatus* (Chiroptera: Phyllostomidae). *The Southwestern Naturalist* 30:371-375.
- Blumstein, D., Fernández-Juricic, E. (2010). *A primer of conservation behavior*. Sunderland, Massachusetts : Sinauer Associates, Inc. Publishers.
- Blumstein, D.T., Munos, O. (2005). Individual, age and sex-specific information is contained in yellow-bellied marmot alarm calls. *Animal Behaviour* 69:353-361.
- Briefer, E., McElligot, A.G. (2011). Indicators of age, body size and sex in goat kid calls revealed using the source-filter theory. *Applied Animal Behaviour Science* 133:175-185.
- Brittan-Powell, E.F., Dooling, R.J., Larsen, O.N., Heaton, J.T. (1997). Mechanisms of vocal production in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *The Journal of the Acoustical Society of America* 101:578-589.
- Carter, G., Schoeppler, D., Manthey, M., Knörnschild, M., Denzinger, A. (2015). Playback response data for distress calls of a fast-flying bat (*Molossus molossus*) provoke inspection flights but not cooperative mobbing. *PLOS ONE* 10:1-15.
- Carter, G.G., Logsdon, R., Arnold, B.D., Menchaca, A., Medellín, R.A. (2012). Adult Vampire Bats Produce Contact Calls When Isolated: Acoustic Variation by Species, Population, Colony, and Individual. *PLoS ONE* 7:e38791.
- Carter, G. G., Wilkinson, G. S. (2013). Food sharing in vampire bats: reciprocal help predicts donations more than relatedness or harassment. *Proceedings of the Royal Society B* 280:20122573.
- Conover, M.R. (1987). Acquisition of predator information by active and passive mobbers in ring-billed gull colonies. *Behaviour*:41-57.
- Conover, M.R. (1994b). How birds interpret distress calls: implications for applied uses of distress call playbacks. *Proceedings of the Sixteenth Vertebrate Pest Conference*:233-234.
- Conover, M.R. (1994a). Stimuli eliciting distress calls in adult passerines and response of predators and birds to their broadcast. *Behaviour* 131:19-37.
- Center for Conservation Bioacoustics (2011). Raven Pro: Interactive sound analysis software (Version 1.4) [Computer Software]. Ithaca, NY: The Cornell Lab of Ornithology.
- Engler, S., Knörnschild, M., Rose, A. (2017). Isolation call ontogeny in bat pups (*Glossophaga soricina*). *Behaviour* 154:267-286.
- Flaquer, C., Torre, I., Arrizabalga, A. (2007). Comparison of sampling methods for inventory of bat communities. *Journal of mammalogy* 88(2):526-533.
- Fletcher, N.H. (2004). A simple frequency-scaling rule for animal communication. *The Journal of the Acoustical Society of America* 115:2334-2338.
- García, N.C., Barreira, A.S., Kopuchian, C., Tubaro, P.L. (2014). Intraspecific and interspecific vocal variation in three Neotropical cardinalids (Passeriformes: Fringillidae) and its relationship with body mass. *Emu* 114:129-136.
- Germano Filho, P., Peixoto, A.L., Jesus, R.M. (2000). Espécies vegetais descritas a partir de espécimes coletados na Reserva Florestal de Linhares, Espírito Santo, Brasil. *Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão* 11:35-48.

- Hartley, P.H.T. (1950). An experimental analysis of interspecific recognition. *Symp. Soc. Exp. Biol.*313-336.
- Hechavarría, J.C., Beetz, M.J., García-Rosales, F., Kössl, M. (2020). Bats distress vocalizations carry fast amplitude modulations that could represent an acoustic correlate of roughness. *Scientific Reports* 10:7332.
- Hechavarría, J.C., Beetz, M.J., Macias, S., Kössl, M. (2016). Distress vocalization sequences broadcasted by bats carry redundant information. *Journal of Comparative Physiology A* 202:503-515.
- Herrel, A., Podos, J., Vanhooydonck, B., Hendry, A.P. (2009). Force-velocity trade-off in Darwin's finch jaw function: A biomechanical basis for ecological speciation?. *Functional Ecology* 23:119-125.
- Hill, G.E. (1986). The function of distress calls given by tufted titmice (*Parus bicolor*): an experimental approach. *Animal Behavior* 34:590-598.
- Hörmann, D., Tschapka, M., Rose, A., Knörnschild, M. (2020). Distress calls of nectarivorous bats (*Glossophaga soricina*) encode individual and species identity. *Bioacoustics* 30:253-271.
- Huang, X. et al. (2018). Acoustic similarity elicits responses to heterospecific distress calls in bats (Mammalia: Chiroptera). *Animal Behaviour* 146:143-154.
- ICMBio (2008). Plano de Manejo da Reserva Biológica União Encarte 3: Análise da Unidade de Conservação. *Ministério do Meio Ambiente - Brasília, DF*:189 p.
- Jiang, T., Huang, X., Wu, H., Feng, J. (2017). Size and quality information in acoustic signals of *Rhinolophus ferrumequinum* in distress situations. *Physiology & Behavior* 173:252-257.
- Johnson, F.R., McNaughton, E.J., Blumstein D, T (2003). Mechanisms of heterospecific recognition in avian mobbing calls. *Australian Journal of Zoology*:577-585.
- Kalko, E.K.V., Handley Jr., C.O. (2001). Neotropical bats in the canopy: diversity, community structure, and implications for conservation. *Plant Ecology* 153:319-333.
- Knörnschild, M., Glöckner, V., Helversen, V. (2010). The vocal repertoire of two sympatric species of nectar-feeding bats (*Glossophaga soricina* and *G. commissarisi*). *Acta Chiropterologica* 12:205-215.
- Knörnschild, M., Tschapka, M. (2012). Predator mobbing behaviour in the Greater Spear-Nosed Bat, *Phyllostomus hastatus*. *Chiroptera Neotropical* 18:1132-1135.
- Krause, B. (1987). Bioacoustics, habitat ambience in ecological balance. *Whole Earth Review*:14-18.
- Legendre, P., Anderson, M.J. (1999). Distance-based redundancy analysis: testing multispecies responses in multifactorial ecological experiments. *Ecological Monographs* 69:1-24.
- Linhart, P. et al. (2019). Measuring individual identity information in animal signals: Overview and performance of available identity metrics. *Methods in Ecology and Evolution* 10:1558-1570.
- Lučan, R.K., Šálek, M. (2013). Observation of successful mobbing of an insectivorous bat, *Taphozous nudiventris* (Emballonuridae), on an avian predator, *Tyto alba* (Tytonidae). *Mammalia* 77:235-236.
- Mathevon, N., Aubin, T., Brémond, J. (1997). Propagation of bird acoustic signals: comparative study of starling and blackbird distress calls. *Académie des sciences de la vie* :869-876.

- Mathevon, N., Aubin, T., Vielliard, J., da Silva, M., Sebe, F., Boscolo, D. (2008). Singing in the rain forest: How a tropical bird song transfers information. *PLoS ONE* 3:2-7.
- Mathevon, N., Charrier, I., Jouventin, P. (2003). Potential for individual recognition in acoustic signals: A comparative study of two gulls with different nesting patterns. *Comptes Rendus - Biologies* 326:329-337.
- Morse, M.A., Balser, D.S. (1961). Fox calling as a hunting technique. *The Journal of Wildlife Management* 25:148-154.
- Morton, E.S. (1977). On the occurrence and significance of motivation-structural rules in some birds and mammals sounds. *The American Naturalist* 111:855-869.
- Nelson, D.A., Poesel, A. (2007). Segregation of information in a complex acoustic signal: individual and dialect identity in white-crowned sparrow song. *Animal Behaviour* 74:1073-1084.
- Oliveira-Filho, A.T., Fontes, M.A.L. (2000). Patterns of floristic differentiation among Atlantic Forests in Southeastern Brazil and the influence of climate. *Biotropica* 32:793-810.
- Perrone Jr., M. (1980). Factors affecting the incidence of distress calls in passerines. *The Wilson Bulletin* 92:404-408.
- Podos, J. (2001). Correlated evolution of morphology and vocal signal structure in Darwin's finches. *Nature* 409:185-188.
- Podos, J., Nowicki, S. (2004). Beaks, adaptation and vocal evolution in Darwin's Finches. *BioScience* 54:501-510.
- Pollard, K.A., Blumstein, D.T., Griffin, S.C. (2010). Pre-screening acoustic and other natural signatures for use in noninvasive individual identification. *Journal of Applied Ecology* 47:1103-1109.
- Prat, Y., Azoulay, L., Dor, R., Yovel, Y. (2017). Crowd vocal learning induces vocal dialects in bats: playback of conspecifics shapes fundamental frequency usage by pups. *PLOS Biology* 15:e2002556.
- Prat, Y., Taub, M., Yovel, Y. (2016). Everyday bat vocalizations contain information about emitter, addressee, context, and behavior. *Scientific Reports* 6:.
- Pye, J.D. (1979). Why ultrasound? *Endeavour* 3:57-62.
- Riede, T., Goller, F. (2010). Peripheral mechanisms for vocal production in birds – differences and similarities to human speech and singing. *Brain and Language* 115:69-80.
- Ríos-Chelén, A., Salaberria, C., Barbosa, I., Macías Garcia, C., Gil, D. (2012). The learning advantage: Bird species that learn their song show a tighter adjustment of song to noisy environments than those that do not learn. *Journal of Evolutionary Biology* 25:2171-2180.
- Ripperger, S.P., Carter, G.G. (2021). Social foraging in vampire bats is predicted by long-term cooperative relationships. *PloS Biology* 19(9):e3001366.
- Robbins, L.W., Murray, K.L., McKenzie, P.M. (2008). Evaluating the effectiveness of the standard mist-netting protocol for the endangered Indiana bat (*Myotis sodalis*). *Northeastern Naturalist* 15(2):275-282.
- Römer, H., Lewald, J. (1992). High-frequency sound transmission in natural habitats: implications for the evolution of insect acoustic communication. *Behavioral Ecology*:437-444.
- Russ, J., Jones, G., Mackie, I., Racey, P. (2004). Interspecific responses to distress calls in bats (Chiroptera: Vespertilionidae): a function for convergence in call design?. *Animal Behaviour* 67:1005-1014.

- Russ, J., Racey, P., Jones, G. (1998). Intraspecific responses to distress calls of the pipistrelle bat, *Pipistrellus pipistrellus*. *Animal behaviour* 55:705-713.
- Russo, D., Jones, G. (1999). The social calls of Kuhl's pipistrelles *Pipistrellus kuhlii* (Kuhl, 1819): structure and variation (Chiroptera: Vespertilionidae). *Journal of Zoology* 249:476-481.
- Ryan, J.M., Clark, D.B., Lackey, J.A. (1985). Response of *Artibeus lituratus* (Chiroptera: Phyllostomidae) to distress calls of conspecifics. *Journal of Mammalogy* 66:179-181.
- Sampaio, E.M., Kalko, E.K.V., Bernard, E., Rodríguez-Herrera, B.R., Handley Jr., C.O. A biodiversity assessment of bats (Chiroptera) in a tropical lowland rainforest of central Amazonia, including methodological and conservation considerations. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 38(1):17-31.
- Sandoval, L., Wilson, D.R. (2012). Local predation pressure predicts the strength of mobbing responses in tropical birds. *Current Zoology* 58:781-790.
- Slabbekoorn, H., Smith, T.B. (2002). Bird song, ecology and speciation. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 357:493-503.
- Spurr, E.B., O'Connor, C.E. (1999). Sound lures for stoats. *Science for Conservation* 127B:25-38.
- Taylor, A.M., Reby, D. (2010). The contribution of source-filter theory to mammal vocal communication research. *Journal of Zoology* 280:221-236.
- Tubaro, P.L., Lijtmaer, D.A. (2006). Environmental Correlates of Song Structure in Forest Grosbeaks and Saltators. *The Condor* 108:120-129.
- Vannoni, E., McElligott, A.G. (2007). Individual Acoustic Variation in Fallow Deer (*Dama dama*) Common and Harsh Groans: A Source-Filter Theory Perspective. *Ethology* 113:223-234.
- Wilkinson, G.S. (1984). Reciprocal food sharing in the vampire bat. *Nature* 308:181-184.
- Wilkinson, G.S. (1988). Reciprocal altruism in bats and other mammals. *Ethology and Sociobiology* 9:85-100.
- Willey, R.H., Richards, D.G. (1982). *Adaptations for acoustic communication in birds: sound propagation and signal detection*. In: Acoustic communication in birds. 1 ed:131-181.
- Wise, K.K., Conover, M.R., Knowlton, F.F. (1999). Response of coyotes to avian distress calls: testing the startle-predator and predator-attraction hypotheses. *Wildland Resources Faculty Publications* 136:935-949.

Capítulo 1 - Acoustic structure of the distress calls of Neotropical bats

Submetido à revista Acta Chiropterologica em 08 de Dezembro de 2021

Abstract: Distress Calls (DCs) are emitted by many animal groups but their evolution and functionalities are still not well understood. We address the acoustic variation present in the DCs of 28 species of Neotropical bats. There was high acoustic variability within and between species. We created call categories based on shared acoustic similarities, through a visual inspection of the structure of the spectrograms. We used Chi-squared tests to evaluate if the call categories are randomly distributed throughout the initial, middle and ending sections of our recordings. For *Artibeus lituratus*, *A. obscurus* and *Platyrrhinus lineatus* the results suggest a non-random distribution. The standardized residuals of the models point towards distinct calling strategies. For *Carollia perspicillata* the distribution seems random, contrasting previous literature reports. Characteristics such as sinusoidal frequency modulations might be intentionally produced; or at least influence the response to DCs. Some ecological aspects such as the foraging context and listeners density could also influence functionality. We calculated distinct vocalization rates that might suggest a relationship between DCs, unpredictability and habituation avoidance. Finally, we provide measurements for multiple acoustic variables as supplemental materials.

Key words: Animal Behavior, Bioacoustics, Scream Calls, Motivation-Structural Rules, Chiroptera

Bat Distress Calls

Introduction

Distress Calls (DCs) are acoustic signals commonly emitted in afflictive situations, such as when an individual is captured by a predator (Högstedt, 1983). Although observed among various animal groups (Hill, 1986; Hödl and Gollmann, 1986; Ruiz-Monachesi and Labra, 2020), its evolution and primary function are still unclear. Due to the perilous contexts of its emission, DCs potentially have an

important role over survival. Therefore, understanding the causes and effects of this behavior might bring important knowledge on the nature of interactions within and between species. There are different hypothetical functions of DCs and they are not mutually excludent: 1) to inform other individuals about the danger of a predator (Conover, 1994); 2) to attract other individuals which may perform behaviors such as mobbing or inspection flights, potentially distracting the predator (Conover, 1994; Carter *et al.*, 2015); 3) to attract other predators who might compete with and/or scare the one restraining the individual (Perrone Jr., 1980); 4) to startle unexperienced predators with loud screams that they're not expecting (Conover, 1994); 5) to harass the predator, alongside biting and trying to escape, which might be related to the emitter's ability to defend itself.

Morton's Motivation-Structural Rules (MS Rules – Morton, 1977) suggest a relationship between the acoustic characteristics of a signal and the emitter's emotional state and/or intention. According to these rules, certain properties of a sound might play an important role in transmitting the emitter's valence and arousal levels, referring, respectively, to an emotion's pleasantness (ranging from positive to negative) and to its intensity (from low to high). This way, the acoustic variation might provide information that will help understand the primary functions of DCs.

Bats are known to frequently emit DCs when captured by researchers, but there is a limited understanding of the behaviors associated with these vocalizations (Carter *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2018). Only a few species have been studied or even have their DCs described. Efforts on increasing the knowledge about DCs in different species might help to understand them and generate new ideas and hypotheses. Therefore, the objective of the present work is to present the general acoustic structure found on DC recordings of 28 species of Neotropical bats, as an attempt to better understand it in the context of MS rules. We describe the general acoustic patterns within and among species, discussing possible implications related to these rules.

Materials and Methods

Study areas

Bats were captured between April 2018 and March 2021 on sites located in Southeast Brazil, in areas originally covered by Atlantic Forest. The two main areas visited were the União Biological Reserve, located at Rio de Janeiro state (coordinates: 22° 36' S; 42° 12' W); and the forest complex composed by the Sooretama Biological Reserve and the Vale Natural Reserve (19° 03' 24.51" S; 40° 08' 51.83" W) in Espírito Santo state. Other sites were the Guapiaçu Ecological Reserve (22° 27' 10.309" S; 42° 46' 13.011" W) and the *campus* of the Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF, coordinates: 21° 45' 41.9" S; 41° 17' 08.8" W), both in Rio de Janeiro state.

Capture, recording and acoustic analysis

Animals were captured using mist nets set across roads and trails, during night time, and taken to a recording station set up at the trapping site. We used a M500 ultrasound microphone connected to a laptop running the software Batsound Touch Lite (Pettersson Elektronik, www.batsound.com). The recordings (Sample rate: 500 KHz/s; depth: 16 bits) were made at a distance of 2 meters from the recorded individual, except for *Artibeus lituratus*, for which we used distances of up to 6 meters due to higher amplitudes in their calls. One researcher held the bat facing the microphone and gently stimulated it with subtle touches on the head and body. Another researcher controlled the recording process. Recordings were always made by the same person. The bat was recorded for one minute after the emission of the first call. Individuals that hit the one minute mark without emitting Distress Calls were considered non-emitters, released and removed from the sample. Some bats also emitted DCs while biting the researcher's gloves. For the sake of standardizing the sample, we didn't include these calls in further analysis, using only calls that were emitted when the bat's mouth was not obstructed. All procedures were approved by the UENF Animal Use Ethics Committee (project 569030, protocols 354 and 498).

We manually selected calls in each recording using the software Raven Pro 1.6 (Center for Conservation Bioacoustics, 2011). To standardize this process

a single person was responsible for call selection. Only good quality calls were used (at least 15 dB over background noise, no clipping and no overlap with echolocation pulses from passing bats). While qualitatively categorizing the DCs, we observed many distinct structural types (STs), varying both within and between species. We created categories based on similarities observed among STs. We decided not to use the term “syllable” to describe the smallest unit present in a distress call because as we are dealing with multiple species we cannot assume that these units are related to each other instead of randomly emitted in each case. We use “pulse” as the word defining the smallest unit present in a single call. Therefore, a call may contain one or multiple pulses. Calls, in turn, are part of the whole calling event (corresponding to the whole recording). Also, we are not considering the effects of emission bouts (Hechavarría *et al.*, 2016). Every call present in our recordings showed Non-Linear Phenomena (NLP), ranging from harmonics to deterministic chaos (Fitch *et al.*, 2002; Tokuda, 2018). We focused on describing and discussing the overall patterns of acoustic variation among species instead of treating each of them separately. This approach makes it easier to observe how similar categories might be related to distinct species, taking in consideration their ecologies and the MS rules.

We extracted 28 acoustic variables (Hanning window; Window length: 1024 points; Overlap: 50%) from the bat calls using Raven Pro 1.6 (Center for Conservation Bioacoustics 2011) and warbleR (Araya-Salas and Smith-Viadurre, 2017) this latter from R version 3.5.1 (R Core Team, 2021). A description of the variables can be found in the Supplementary Table 1. We calculated two vocalization rates. The Emission Rate (Erate) is the number of calls divided by the duration of the recording from the start of the first call to the end of the last. The Occupation Rate (Orate) was obtained through the product of the number of calls in a recording and the median interval values containing 90% of the duration of the calls in that recording, divided by the duration of the recording from the start of the first call to the end of the last. Erate acts purely as an evaluation of the intensity of an individual’s vocal behavior; while Orate focuses on the proportional usage of time when distress calling. The calculation of these rates do not take in consideration distinct call categories, acting as a representation of the overall vocal activity of the captured individuals.

Call categories distribution

To evaluate the distribution of the call categories throughout the recordings – which could be related to distinct categories having different meanings and/or functionalities if they are not random, we transformed the time of a call into a discrete variable determining if it was emitted in the first (initial), second (middle) or third (end) portions of the total duration of each recording. This approach allows us to evaluate differences between species in the emission patterns of DCs, which could represent distinct calling strategies. We obtained these transformations using the package *arules* (Hahsler *et al.*, 2021) in the R environment (R Core Team, 2021). We created contingency tables containing the frequency of each call category in each time bin. We conducted a Chi-squared test for each species that had sufficient sample size and different call categories.

Results

Description of general patterns

Although there are many distinct call types present both within and between species, it is possible to group them based on shared qualitative characteristics. We created five major call categories that will be described below. One of them presents calls that are highly variable, showing mixed characteristics from the remaining groups. We decided not to further address it as it may cause confusion when discussing the general patterns spread across the recorded bat species. The total number of calls, individuals and the percentage of calls from each category, alongside the values of the distinct rates for each species are provided in Table 1. The Supplementary Tables 2 to 5 contain the median values of the measured acoustic variables for the main call categories.

1) Continuous pulses (CPs – Fig. 1, Supplementary Table 2)

This call type is characterized by a single continuous and relatively long pulse. Changes in NLP through the duration of the pulse can occur. These nonlinearities might vary, forming patterns that range from a stacked structure with well-defined sub-harmonics to noisier patterns like noise bursts. The most

common patterns in this category are the Stacks (St) and Noise Bursts (NB). The same species—e.g. *Artibeus lituratus*—might present all of this variability among its calls. Species presenting CPs as their most common structural type are: *Artibeus lituratus*, *A. obscurus*, *Desmodus rotundus*, *Artibeus cinereus*, *Lonchophylla peracchii*, *Molossus molossus*, *M. fluminensis*, *Platyrrhinus lineatus*, *Phyllostomus discolor*, *Saccopteryx leptura*, *Sturnira lilium*, *Sturnira tildae*, and *Vampyressa pusilla* (Table 1).

2) Pulses containing sinusoidal frequency modulations (sFMs – Fig. 2, Supplementary Table 3)

This category consists of calls that contain sinusoid-like frequency modulations. There are two types: single pulses with sFMs through its whole duration (sFMw); and calls with an sFM component at the end (sFMend). It is worth noting that the sFMend calls typically contain an introductory component that resembles CPs or Thrills (see below). There is variability on the NLP of sFMs within and between species. Some species have noisier patterns where the sFMs are hardly observable, while others present a tendency to be more tonal, presenting harmonics, but not other nonlinearities. The introductory component of sFMend can show varied nonlinearities, presenting patterns that range from stacked to noisy structures. They resemble the structure of social calls from some bat species (Knörnschild *et al.*, 2010, Knörnschild *et al.*, 2016). Species presenting sFMs as their most common structural type are: *Anoura caudifer*, *Anoura geoffroyi*, *Chrotopterus auritus*, *Diphylla eucaudata*, *Micronycteris microtis*, *Platyrrhinus recifinus* and *Rhinophylla pumilio* (Table 1).

3) Well-defined harmonics (Harms – Fig. 3, Supplementary Table 4)

This call type presents single pulses with clear harmonic structure without the stacked or noisy patterns found in CPs, therefore being relatively more tonal. There are two types of harmonics. The steep frequency modulated harmonics (sH) present strong and fast frequency modulations, where the start and end frequencies are far from each other. These can be both upward or downward frequency modulations. The other type is composed by horizontal frequency harmonics (hH), where the start and end frequencies present values that are

closer to each other than in sHs. The hHs might present frequency modulations throughout the signal, but never as steep as the sHs. Species presenting Harms as their most common structural type are: *Glossophaga soricina* and *Myotis nigricans* (Table 1).

4) Thrill-like structures (Thrs – Fig. 4, Supplementary Table 5)

This category is characterized by short pulses emitted close to each other, in a single call emission event. The individual pulse shapes composing the thrills might vary, but the most commonly found patterns are steep frequency modulated pulses with short duration, resembling the aforementioned sHs. Such as in CPs, there seems to be varying NLP, which generates tonal thrills (tThr) and noisy thrills (nThr). Species presenting Thrs as their most common type are: *Artibeus fimbriatus*, *Carollia perspicillata*, *Lonchorhina aurita*, *Peropteryx kappleri*, and *Trachops cirrhosus* (Table 1).

5) Complex pulses (Comp)

The Complex pulses are highly variable for different reasons. A single pulse may contain frequency jumps and/or complex frequency modulations that don't seem to follow an obvious and repetitive pattern. Calls from this category commonly show parts with well-defined harmonics, quickly changing to Stacks or Noise Bursts, and returning to the initial harmonic pattern. This category serves more as an exhibit of complex vocal behaviors that are found in the DCs of bats. Their high structural variability makes it hard to make inferences about them. Because of that, we decided not to further discuss them as they could obscure our primary goal: understanding the general patterns found among species.

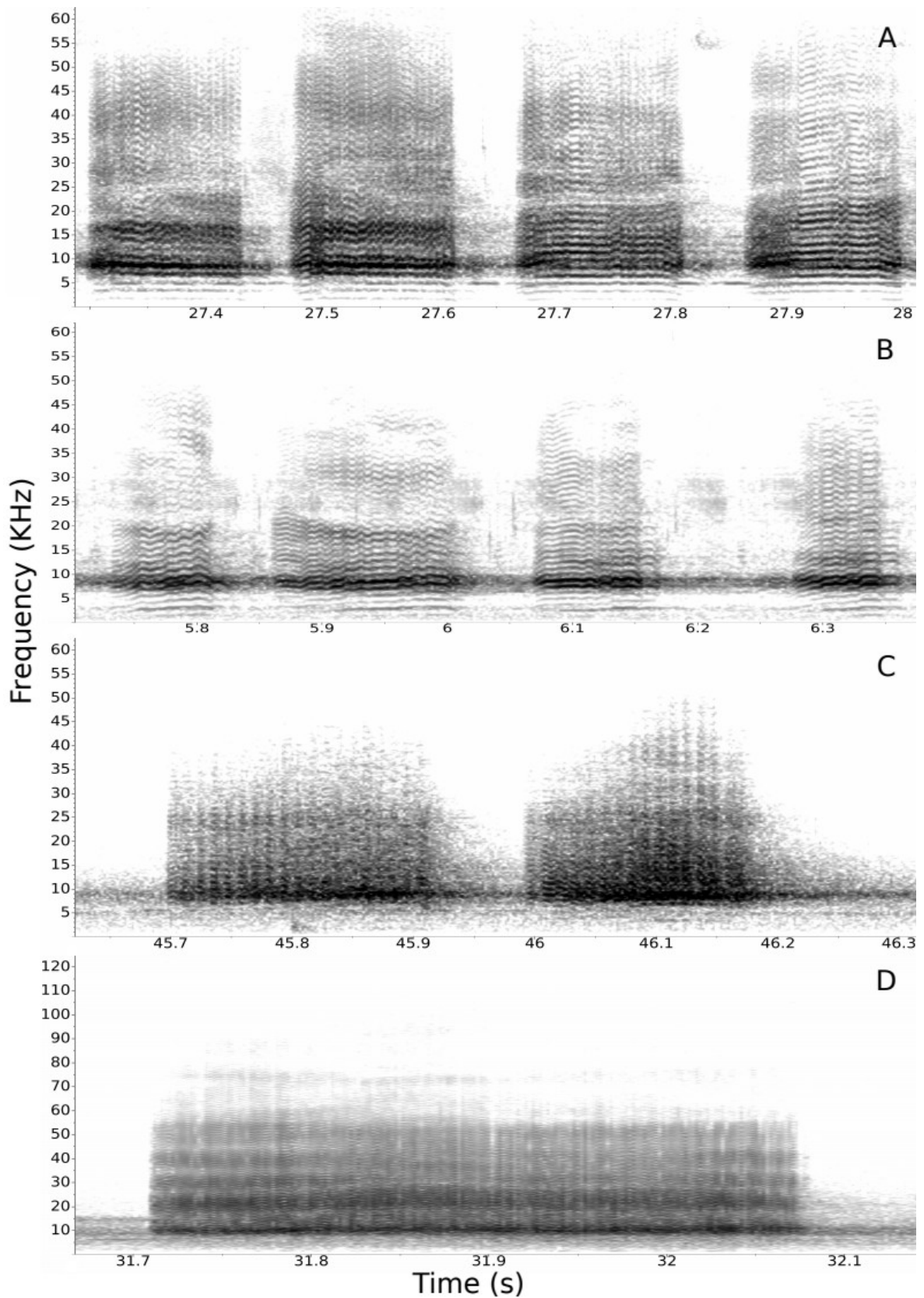


Fig. 1 – Examples of Distress Calls of the category Continuous Pulse (CP). A) *Platyrrhinus lineatus* Stacked pattern; B) *Artibeus lituratus* Stacked pattern; C) *A. lituratus* Noise Burst; and D) *Desmodus rotundus* Noise Burst.

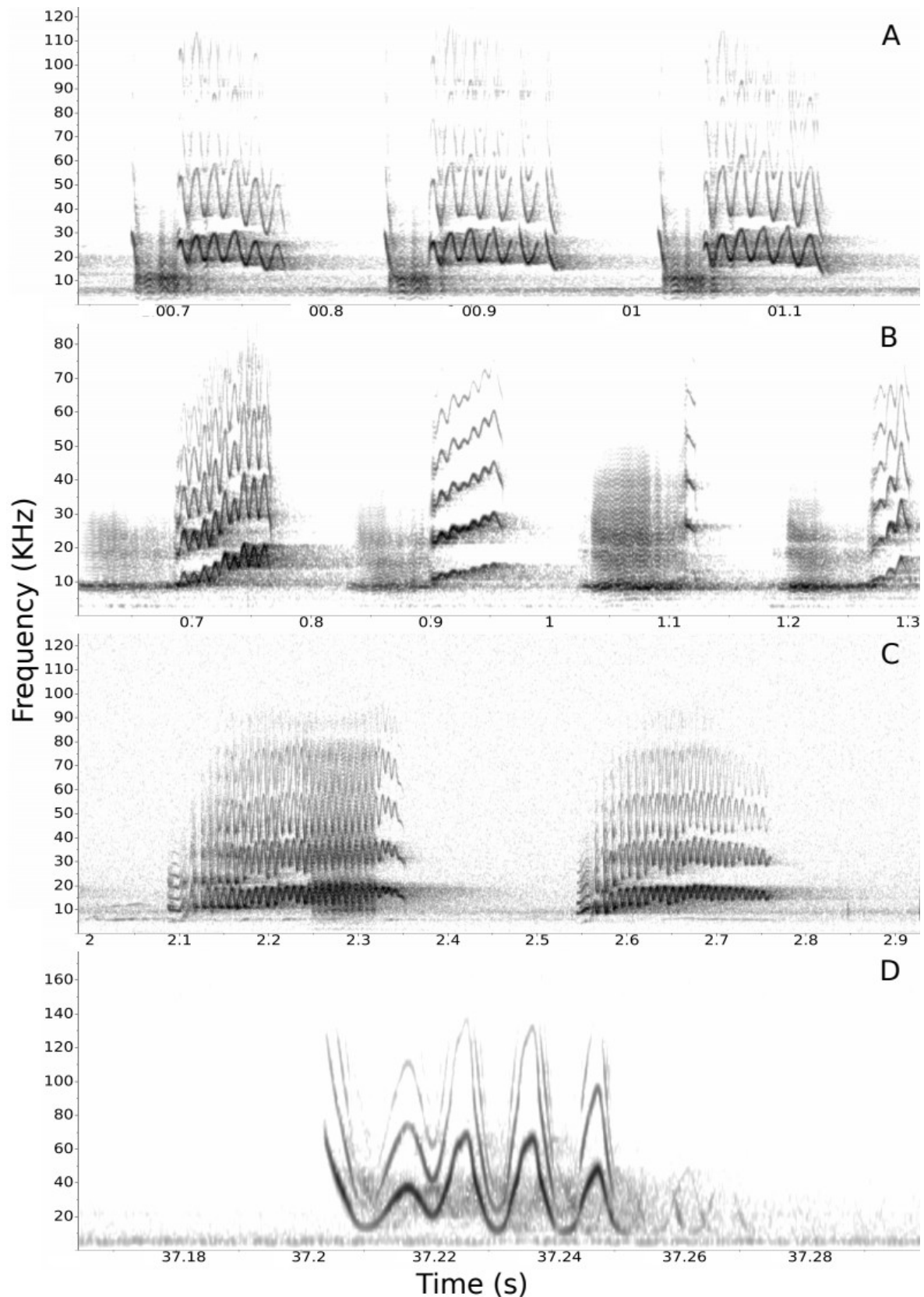


Fig. 2 – Examples of Distress Calls of the category Sinusoidal Frequency Modulations (sFM). A) *Chrotopterus auritus* sFM at the end; B) *Artibeus lituratus* sFM at the end; C) *Diphylla eucaudata* sFM on the entire pulse with varying nonlinear phenomena; D) *Glossophaga soricina* clean sFM on the entire pulse.

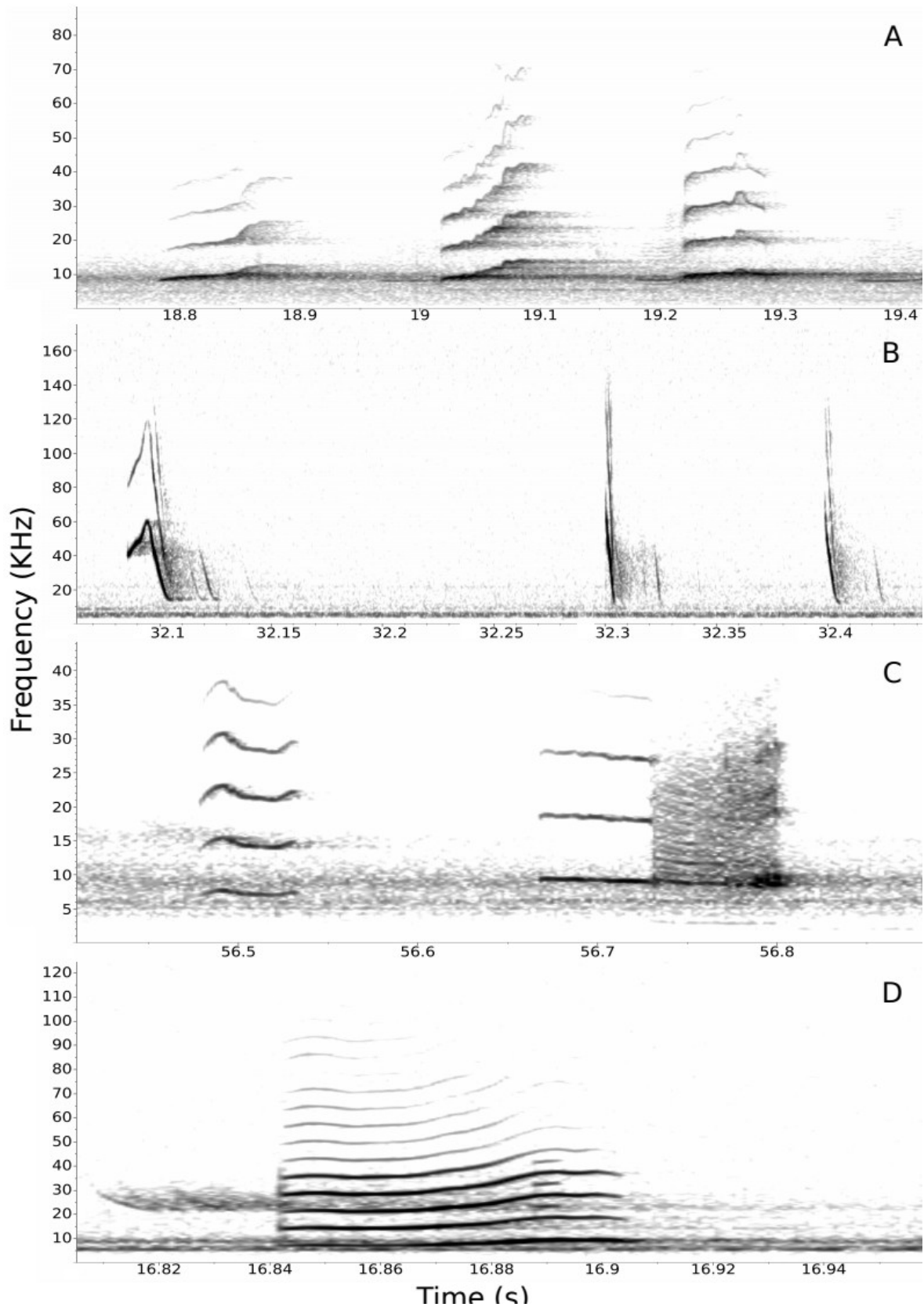


Fig. 3 – Examples of Distress Calls of the category Harmonics (Harm). A) *Artibeus lituratus* harmonics; B) *Glossophaga soricina* two types of steep frequency modulated harmonics; C) *Sturnira tildae* harmonics and harmonics shifting to noise; D) *Peropteryx kappleri* horizontal harmonics.

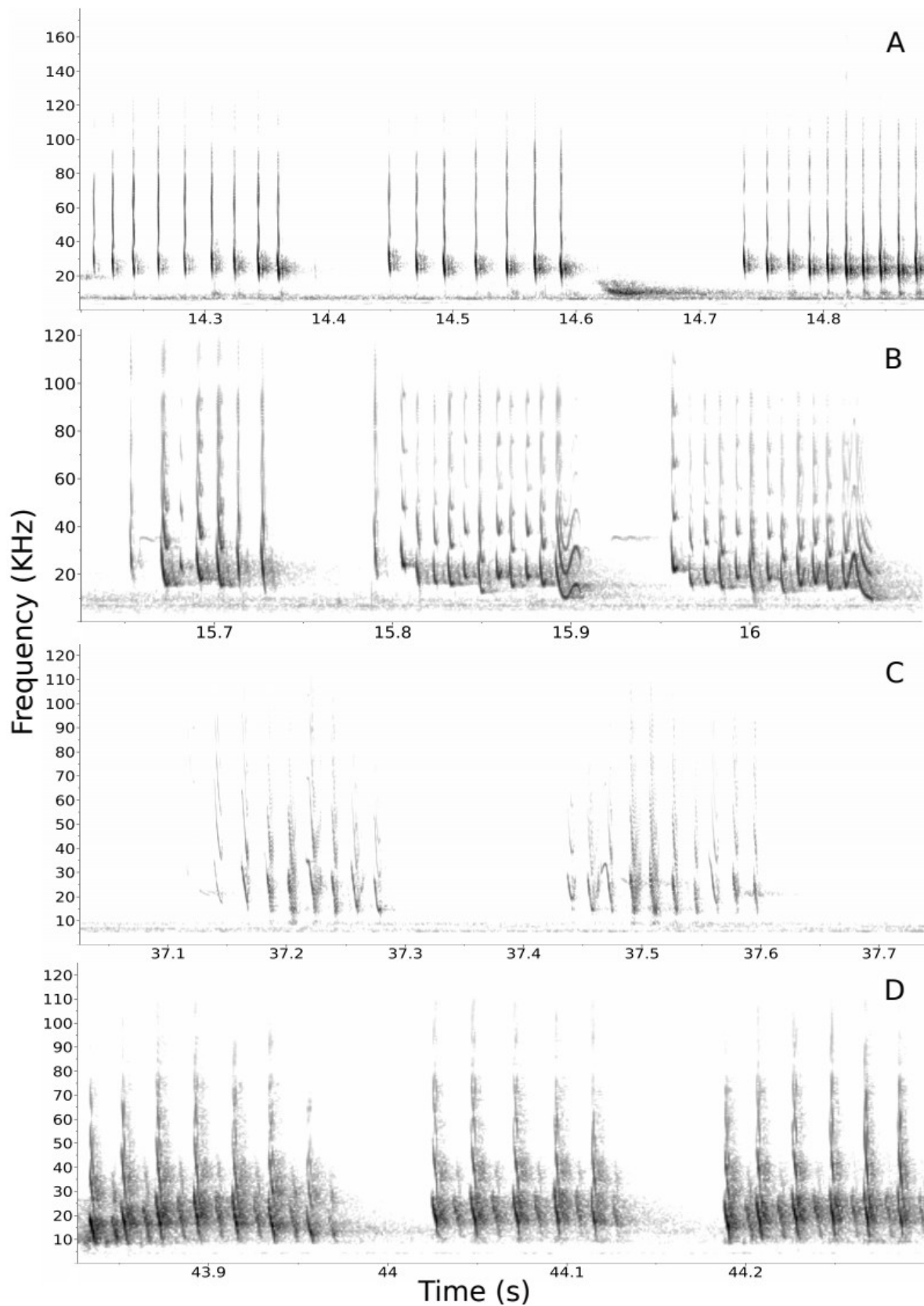


Fig. 4 – Examples of Distress Calls of the category Thrills (Thr). A) *Trachops cirrhosus* tonal thrills; B) *Carollia perspicillata* tonal thrills with varying pulse structures; C) *Anoura caudifer* noisy thrills; D) *Artibeus lituratus* thrills.

Chi-squared tests

Four species presented sample sizes and diversity of calls that were large enough to allow for Chi-squared tests to be performed in order to test for independence between call type and timing of emission. *Artibeus lituratus* is the best represented species in our sample (9366 calls, 78 individuals). We also used data from *A. obscurus* (1012 calls; 16 individuals), *Platyrrhinus lineatus* (1071 calls; 8 individuals), and *Carollia perspicillata* (2248 calls, 52 individuals).

The Chi-squared tests for three species reject the null hypothesis of independence, suggesting a non-random distribution of call types (*Artibeus lituratus*: $X^2 = 44.855$, $df = 6$, $p = 5.001e-08$; *Artibeus obscurus*: $X^2 = 14.236$, $df = 6$, $p\text{-value} = 0.02711$; and *Platyrrhinus lineatus*: $X^2 = 73.364$, $df = 6$, $p\text{-value} = 8.331e-14$). As for *Carollia perspicillata*, the non-significant results suggest that the categories are randomly distributed throughout the recordings ($X^2 = 7.6561$, $df = 6$, $p\text{-value} = 0.2644$).

The standardized residuals from the models (Table 2) show that for *A. lituratus* CPs tend to be common at the middle and end sections, while uncommon at the beginning. The sFMs present a tendency to be more commonly found at the initial than at the middle section, and random at the end. The Thrs, are common at the beginning, while rare at the middle and end. These results suggest differential predominances of call structural types throughout the duration of the recordings, specially when comparing the initial and middle sections. *A. obscurus* shows a random distribution for every category at the initial and middle sections of the recordings. The end section contains few CPs, with Harms and Thrs being the predominant types, while sFMs are random throughout all sections. *P. lineatus* shows the opposite pattern of *A. lituratus*, as the initial section has a strong predominance of CPs and Thrs, which both decreases at the middle and end sections; while sFMs are rare at the initial and predominant at the middle and end sections. Harms are less common than expected by chance at the beginning, random at the middle and emitted mostly at the end.

Discussion

This is a first description of general acoustic variation patterns of distress calls in Neotropical bats. Through qualitative visual inspection we found that there is high variability both within and among species. Besides that, shared characteristics in the call structure allowed for the creation of call categories. Based on our results we were able to create new *a posteriori* hypotheses that could point out to DCs having multiple functionalities. We did not strictly test any of these hypotheses, but they might prove to be important for understanding the functionality of DCs. The main observations are: 1) nonlinearities are ubiquitous and could be related to distinct functionalities and to the emitter's emotional states; 2) The non-random distribution of the distinct call categories for three out of four Chi-squared tests might indicate distinct calling strategies among species; 3) Emotional contagion might play an important role in bat species that present intense response to DCs, which could lead to repeatability and unpredictability having important roles in such cases; 4) Ecological aspects of distinct species – such as the density of listeners - might be important for shaping the functionality of DCs.

Nonlinearities might be related to distinct functionalities

All pulses presented nonlinearities, ranging from relatively tonal to noisier patterns, such as harmonics and noise bursts, respectively (Fitch *et al.*, 2002; Tokuda, 2018). This could be related to high arousal levels due to the capture event, which would indicate that these variations in NLP are not intentional. Alternatively, these changes might be intentional and present a specific receiver and function.

According to Morton's MS Rules (Morton, 1977), variation in the acoustic structure might be related to the emotional context of the emitter, where positively valenced emotional states tend to produce calls that are tonal with a tendency to higher pitches, whereas negatively valenced calls are noisy and broadband. Lower frequencies can act as honest signals of larger body sizes, being important in agonistic contexts (Vannoni and McElligott, 2008). Some individuals might try to cheat about their body sizes (Dawkins and Guilford, 1991; Charlton and Reby,

2016), but there is a limit to the lowest frequencies that can be produced without losing control over the vibration of the vocal folds, reducing tension and synchronicity, resulting in nonlinearities (Morton, 1977). Therefore, as an individual tries to oversell the information of its own body size when vocalizing, it tends to increase the spectral density of the produced sound.

Examples of sounds that present strong nonlinearities and are emitted by bats during agonistic contexts are the Screech calls emitted by *Phyllostomus hastatus* (Knörnschild and Tchapka, 2012) and vocalizations emitted by *Carollia perspicillata* in varied agonistic interactions such as when males compete for roost position (Fernandez *et al.*, 2014; Knörnschild *et al.*, 2014). In *Eptesicus fuscus*, syllables containing deterministic chaos were common in a context of high aggression, less common in medium and low aggression, and absent during appeasing, which consisted mostly of syllables with subharmonics, therefore relatively more tonal (Gadziola *et al.*, 2012). The number of noisy syllables was greater than the number of tonal syllables for aggressive vocalizations of female *Vespertilio sinensis* competing for roost position (Zhao *et al.*, 2018). Together, these examples could indicate that nonlinearities - specially regarding noise production, might be related to varied intentionalities or emotions. Overall, noisier patterns could be an unintentional consequence of higher arousal levels, making it a candidate for honest signalling; or related to the emitter's intention to oversell information, cheating about its ability to defend itself - e.g., by overestimating its own body size (Morton, 1977; Dawkins and Guilford, 1991 Vannoni and McElligott, 2008; Charlton and Reby, 2016). Although inconclusive when referring to the emitter's intention, this indicates that in both cases the nonlinear dynamics of the vocal tract could lead to distinct functionalities of DCs. Our hypothesis agrees with the findings of Massenet *et al.* (2022), that different NLPs affect the perception by humans of the emotional state, body size and dominance in dog puppy whines, with increases in deterministic chaos being highly associated to the perception of distress.

Varied call categories might indicate distinct strategies

The high variability of pulse types might also be an indicative that differences in the acoustic structure of DCs are related to distinct intentions or emotions. Calls presenting sFMs can be emitted alone or in combination with CPs

or Thrs. When combined, these components can independently show nonlinearities. This could indicate that distinct components of DCs are intentionally produced. It could also point towards DCs being complex vocalizations, with components that could interact functionally (Hebets and Papaj, 2005; Hechavarría *et al.*, 2016). If that is the case, the distribution of call categories should not be random, nor depend only on changes in the arousal levels. The Chi-squared test results for *A. lituratus*, *A. obscurus*, and *P. lineatus*, three species from the Stenodermatinae subfamily, suggest a non-random distribution of call categories throughout the duration of our recordings, but presenting different distributions in the time bins (Table 2). The results for *C. perspicillata* suggest no association between call type and timing. This opposes previous results for this species, where similar syllable types seem to be emitted together, following a non-random pattern that renders DC sequences highly repetitive and redundant (Hechavarría *et al.*, 2016). As we used qualitative classifications of the general acoustic variability, our approach is less sensitive, identifying less structural types. This should be kept in mind when comparing these results.

For *A. lituratus* the sFMs are more commonly found at the initial than at the middle sections of the recordings. The opposite pattern is observed for CPs. If DCs act to startle inexperienced predators, it would make sense that the success rates for the emitter would be higher for the first calls—corresponding to the initial sections of our recordings, when the predator is not expecting that reaction from its prey. This way, sFMs could have an important part in increasing startling success rates. If the startling attempt did not work, the emitter could try to attract other bats by increasing the emission of CPs. For *P. lineatus* we observed the opposite pattern of call type distribution found for *A. lituratus*. They start with CPs and change to sFMs in the middle and end sections. This does not fit well into the startle-the-predator hypothesis as previously suggested. If the intention is to signal aggressiveness or the ability to defend itself, then this change would still make sense. In mammals, sFMs seem to have evolved independently multiple times as a mechanism to increase spectral density by repeatedly striking formants; and they probably encode size and/or identity cues (Charlton *et al.*, 2017). Emphasizing size information, and maybe overselling it, would be a valid strategy for *P. lineatus* as it is a relatively small species that could benefit from cheating. This prediction would fit both the startle-the-predator and the aggressive signaling

contexts. For most of our species' DCs, CPs presented slightly lower values of Spectral Entropy than sFMs (Supplementary Tables 1 and 2, respectively), which could make sFMs sound noisier to the listener, and therefore more aggressive according to Morton's MS Rules (Morton, 1977). In *Phyllostomus discolor* sFMs are used both in mother-infant communication and in antagonistic interactions (Lattenkamp *et al.*, 2019), suggesting that these frequency modulations might be related to varied behavioral contexts. Although the Chi-squared test results for *A. obscurus* were similar to those for *A. lituratus*, the confusing distribution of call types, with some categories being random, could suggest that this species has a mixed strategy when distress calling.

Other bats as listeners

The DCs of some species of bats attract both conspecific and heterospecific individuals (Ryan *et al.*, 1985; Russ *et al.*, 2004; Carter *et al.*, 2015). Although we did not test for this effect, we often captured individuals of *P. lineatus* when captured *A. lituratus* were emitting DCs near the mist nets. These two species seem to present similarities in our qualitative call types classification, and are also similar in some of their measured acoustic parameters, specially peak frequency (Supplementary Tables 1 to 4). Although we did not test for it, body size doesn't seem to generate major acoustic distinctions between them, as *A. lituratus* (average forearm length in our sample: 71.35 +/- 2.59 mm) is larger than *P. lineatus* (average forearm length = 46.52 +/- 1.01 mm). The response to each other may prove to be related to this acoustic resemblance, as previously suggested for the DCs of other bat species (Huang *et al.*, 2018) and also for the mother's heterospecific approach response to infant cries in deers (Teichroeb *et al.*, 2013; Lingle and Riede, 2014). At least in the Atlantic Forest, *A. lituratus* and *P. lineatus* are species with a high overlap in their geographic distribution, with the first being more abundant overall (Velazco and Patterson, 2008; Stevens, 2013; Muylaert *et al.*, 2017). This suggests that the acoustic similarity between them may have evolved due to mimicry by *P. lineatus*, as calling for larger audiences of *A. lituratus* could impose fitness gains because of the higher density of responders. Recently, Ancillotto *et al.* (2022) have suggested that the buzzes emitted by distressed *Myotis myotis* individuals while handled could act as a mimicry of insect

sounds to deter predators. Their recorded distress buzzes resemble the acoustic structure of many of the Thrill-like structures we found here for multiple species, which could point out to this strategy being widely spread among bats. As human listeners, we failed to perceive the acoustic resemblance between our recorded DCs and the buzzes emitted by insects. On the other hand, the DCs of *Glossophaga soricina* might encode individual and species identity cues (Hörmann *et al.*, 2020), suggesting that this “acoustic similarity hypothesis” might not be valid for all species. It is also possible that the response to DCs is not related to the current acoustic similarities between species, occurring due to a perceptual bias associated to the perception and processing of older signals by the receptor (Endler and Basolo, 1998; Ryan and Cummings, 2013).

Mechanistic factors in the brain can be associated to the responses to DCs. In *Cynopterus sphinx*, listeners present a pattern of brain activity similar to the emitters of DCs (Mariappan *et al.*, 2013; Mariappan *et al.*, 2016), while in *Eptesicus fuscus* there are coping dynamics in the auditory cortex, with some neurons having a strong response to sFMs – and only to them (Casseday *et al.*, 1997; Yue *et al.*, 2007). This might indicate that emotional contagion influences the response to DCs. In this context, the easiest way to stop experiencing the stimuli caused by these vocalizations would be leaving the area, which would imply in resource losses, such as access to shelter, food and other individuals, to name a few. Because of this, evaluating the risks and benefits associated to the calls could be an important for the receiver. It is also possible that listeners would approach the source of the signal as an attempt to intervene and end their own discomfort (Preston and de Waal, 2002). It would be beneficial for the emitter to produce sounds that are unpredictable, making them harder to ignore or habituate to (Dong and Clayton, 2009). One characteristic that helps avoid habituation is the presence of Non-Linear Phenomena (Fitch *et al.*, 2002; Blumstein and Récapet, 2009; Blesdoe and Blumstein, 2014; Reby and Charlton, 2012; Karp *et al.*, 2014). Unpredictability alongside high emission rates and time usage might generate intense activation of brain regions associated to the listening of DCs, enhancing the stimulus, and avoiding habituation. If DCs act to attract other individuals, listener’s habituation is not desired. Also, if the goal is to startle unexperienced predators, the chances of success would be higher for the first emitted calls, as the predator is not going to expect that type of reaction from its prey, rendering

repeatability and variability not as useful. Finally, if the emitter is trying to sound aggressive, noisier and harsher patterns with lower frequencies are to be predominant.

Species ecologies and Distress Calls

Most Stenodermatinae bats use *Ficus* as a core dietary item (Fleming, 1986; Muscarella and Fleming, 2007) and are attracted in large numbers (hundreds) to these trees when their ephemeral but intense ("big-bang") frutifications are available (Kalko *et al.*, 1996). In this context, if a bat is captured and calls, there are many individuals receiving the message, leading to intense approximation. Other species, such as the blood-feeding *Desmodus rotundus* tend to forage in small numbers (Hermanson and Carter, 2014), which could lead to a smaller "audience" for DCs, with consequences to their effect and purpose.

The DCs of *A. lituratus* (the stenodermatine with the largest sample in our study) presented more variation of acoustic structural types, and higher emission and occupation rates than DCs of *D. rotundus*, which could act to avoid listeners's habituation and increase approximation. These examples suggest a relationship between the functionality of DCs and the density of listeners. In *Saccopteryx bilineata*, the response to DCs near a roost seems to be more intense than further from it (Eckenweber and Knörnschild, 2016). Accordingly, bird species that form flocks seem to emit DCs more often than solitary ones (Greig-Smith, 1982; Inglis *et al.*, 1982). Therefore, it is not farfetched to hypothesise that acoustic characteristics that intensify the response by other bats could have been selected in the DCs of species with high densities of listeners, while uncommon or absent in solitary ones.

Final considerations

Our work is the first to address the overall acoustic variability found on DCs of multiple species of Neotropical bats. Our results suggest new hypotheses and implications for the study of these vocalizations, specially under the light of ecological aspects and its relationships to the acoustic structure of DCs, while taking in consideration the interplay between Morton's Motivation-Structural Rules and the Source-Filter Theory. There are lines of investigation that might help

understand the evolution and functionality of DCs that we could not address at this moment. Some of them are: 1) The occurrence and implications of sexual differences in the emission patterns and acoustic structure of DCs (González-Palomares *et al.*, 2021); 2) The ontogeny of these vocalizations and their relationships to vocal learning and babbling behaviors (Knörnschild *et al.*, 2006; Prat *et al.*, 2017); and 3) Possible implications of other characteristics of the acoustic structure that we did not verify, e.g. amplitude modulations (Hörpel and Firzlaff, 2019; Hechavarría *et al.*, 2020). By providing supplementary materials containing measurements of several acoustic variables we hope to encourage other researchers to address this subject in the future.

Literature cited

- Ancilloto, L., Pafundi, D., Cappa, F., Chaverri, G., Gamba, M., Cervo, R., Russo, D. (2022). Bats mimic hymenopteran insect sounds to deter predators. *Current Biology* 32:R339-R413.
- Araya-Salas, M., Smith-Viadurre, G. (2017). warbleR: an R package to streamline analysis of animal acoustic signals. *Methods in Ecology and Evolution* 8:184-191.
- Blesdoe, E.K., Blumstein, D.T. (2014). What is the sound of fear? Behavioral responses of white-crowned sparrows *Zonotrichia leucophrys* to synthesized nonlinear acoustic phenomena. *Current Zoology* 60:534-541.
- Blumstein, D.T., Récapet., C. (2009). The sound of arousal: the addition of novel non-linearities increases responsiveness in marmot alarm calls. *Ethology* 115:1074-1081.
- Carter, G., Schoeppler, D., Manthey, M., Knörnschild, M., Denzinger, A. (2015). Playback response data for distress calls of a fast-flying bat (*Molossus molossus*) provoke inspection flights but not cooperative mobbing. *PLOS ONE* 10:1-15.
- Casseday, J.H., Covey, E., Grothe, B. (1997). Neural selectivity and tuning for sinusoidal frequency modulations in the Inferior Colliculus of the Big Brown Bat, *Eptesicus fuscus*. *Journal of Neurophysiology* 77:1595-1605.
- Charlton, B.D., Reby, D. (2016). The evolution of acoustic size exaggeration in terrestrial mammals. *Nature Communications* 7:1-8.

- Charlton, B.D., Taylor, A.M., Reby, D. (2017). Function and evolution of vibrato-like frequency modulation in mammals. *Current Biology* 27:2692-2697.
- Conover, M.R. 1994. Stimuli eliciting distress calls in adult passerines and response of predators and birds to their broadcast. *Behaviour* 131:19-37.
- Center for Conservation Bioacoustics. (2011). Raven Pro: Interactive sound analysis software (Version 1.4) [Computer Software]. Ithaca, NY: The Cornell Lab of Ornithology.
- Dawkins, M.S., Guilford, T. (1991). The corruption of honest signalling. *Animal Behaviour* 41:865-873.
- Dong, S., Clayton, D.F. (2009). Habituation in songbirds. *Neurobiology of learning and memory* 92(2):183-188.
- Eckenweber, M., Knörnschild, M. (2016). Responsiveness to conspecific distress calls is influenced by day-roost proximity in bats (*Saccopteryx bilineata*). *Royal Society Open Science* 3:160151.
- Endler, J.A., Basolo, A.L. (1998). Sensory ecology, receiver biases and sexual selection. *TREE* 13:415-420.
- Fernandez, A.A., Fasel, N., Knörnschild, M., Richner, H. (2014). When bats are boxing: aggressive behaviour and communication in male Seba's short-tailed fruit bat. *Animal Behaviour* 98:149-156.
- Fitch, W., Neubauer, J., Herzog, H. (2002). Calls out of chaos: the adaptive significance of nonlinear phenomena in mammalian vocal production. *Animal Behaviour* 63:407-418.
- Fleming, T.H. (1986). Opportunism versus specialization: the evolution of feeding strategies in frugivorous bats. Pp. 105-108, *In: Frugivores and seed dispersal* (Estrada, A.; Fleming, T.H., eds.). Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht, Netherlands + 392 pp.
- Gadziola, M.A., Grimsley, J.M.S., Faure, P.A., Wenstrup, J.J. (2012). Social vocalizations of Big Brown Bats vary with behavioral context. *PLoS ONE* 7:e44550.
- González-Palomares, E., López-Jury, L., Wetekam, J., Kiai, A., García-Rosales, F., Hechavarria, J.C. (2021). Male *Carollia perspicillata* bats call more than females in a distressful context. *Royal Society Open Science* 8:202336.
- Greig-Smith, P.W. (1982). Distress calling by woodland birds. *Animal Behaviour* 30:299-301.

- Hahsler, M., Buchta, C., Gruen, B., Hornik, K. (2021). arules: mining association rules and frequent itemsets. R package version 1.6-8. <https://CRAN.R-project.org/package=arules>
- Hebets, E., Papaj, D.R. (2005). Complex signal function: Developing a framework of testable hypotheses. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 57:197-214.
- Hechavarría, J.C., Beetz, M.J., García-Rosales, F., Kössl, M. (2020). Bats distress vocalizations carry fast amplitude modulations that could represent an acoustic correlate of roughness. *Scientific Reports* 10:7332.
- Hechavarría, J.C., Beetz, M.J., Macias, S., Kössl, M. (2016). Distress vocalization sequences broadcasted by bats carry redundant information. *Journal of Comparative Physiology A* 202:503-515.
- Hermanson, J.W., Carter, G.G. (2014). Vampire bats. Pp. 257-272, *In: Phyllostomid Bats: A Unique Mammalian Radiation* (Fleming, T.H.; Dávalos, L.M.; Mello, M.A.R., eds.). The University of Chicago Press, Chicago, IL + 470 pp.
- Hill, G.E. (1986). The function of distress calls given by tufted titmice (*Parus bicolor*): an experimental approach. *Animal Behavior* 34:590-598.
- Hödl, W., Gollmann, G. (1986). Distress calls in neotropical frogs. *Amphibia-Reptilia* 7:11-21.
- Högstedt, G. (1983). Adaptation unto death: function of fear screams. *The American Naturalist* 121:562-570.
- Hörmann, D., Tschapka, M., Rose, A., Knörnschild, M. (2020). Distress calls of nectarivorous bats (*Glossophaga soricina*) encode individual and species identity. *Bioacoustics* 30:253-271.
- Hörpel, S.G., Firzlaff, U. (2019). Processing of fast amplitude modulations in bat auditory cortex matches communication call-specific sound features. *Journal of Neurophysiology* 121:1501-1512.
- Huang, X., Metzner, W., Zhang, K., Wang, Y., Luo, B., Sun, C., Jiang, T., Feng, J. (2018). Acoustic similarity elicits responses to heterospecific distress calls in bats (Mammalia: Chiroptera). *Animal Behaviour* 146:143-154.
- Inglis, I.R., Fletcher, M.R., Feare, C.J., Greig-Smith, P.W., Land, S. (1982). The incidence of distress calling among british birds. *Ibis* 124:351-355.

- Kalko, E.K.V., Herre, E.A., Handley, C.O. (1996). Relation of fig fruit characteristics to fruit-eating bats in the New and Old World tropics. *Journal of Biogeography* 23:565-576.
- Karp, D., Manser, M.B., Wiley, E.M., Townsend, S.W. (2014). Nonlinearities in Meerkat Alarm Calls prevent receivers from habituating. *Ethology* 120:189-196.
- Knörnschild, M., Behr, O., von Helversen, O. (2006). Babbling behavior in the sac-winged bat (*Saccopteryx bilineata*). *Naturwissenschaften* 93:451-454.
- Knörnschild, M., Feifel, M., Kalko, E.K. (2014). Male courtship displays and vocal communication in the polygynous bat *Carollia perspicillata*. *Behaviour* 151:781-798.
- Knörnschild, M., Tchapka, M. (2012). Predator mobbing behaviour in the Greater Spear-Nosed Bat, *Phyllostomus hastatus*. *Chiroptera Neotropical* 18:1132-1135.
- Knörnschild, M., Eckenweber, M., Fernandez, A.A., Nagy, M. (2016). Sexually selected vocalizations of Neotropical bats. Pp. 179-195, In: *Sociality in Bats* (Ortega, J. ed.). Springer Cham.
- Knörnschild, M., Glockner, V., Helversen, O.V. (2010). The vocal repertoire of two sympatric species of nectar-feeding bats (*Glossophaga soricina* and *G. commissarisi*). *Acta Chiropterologica* 12(1):205-215.
- Lattenkamp, E.Z., Shields, S.M., Schutte, M., Richter, J., Linnenschmidt, M., Vernes, S.C., Wiegrebe, L. (2019). The vocal repertoire of Pale Spear-Nosed Bats in a social roosting context. *Frontiers in Ecology and Evolution* 7:1-14.
- Lingle, S., Riede, T. (2014). Deer mothers are sensitive to infant distress vocalizations of diverse mammalian species. *The American Naturalist* 184:510-522.
- Mariappan, S., Bogdanowicz, W., Marimuthu, G., Rajan, K.E. (2013). Distress calls of the greater short-nosed fruit bat *Cynopterus sphinx* activate hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis in conspecifics. *Journal of Comparative Physiology A* 199:775-783.
- Mariappan, S., Bogdanowicz, W., Raghuram, H., Marimuthu, G., Rajan, K.E. (2016). Structure of distress call: implication for specificity and activation of dopaminergic system. *Journal of Comparative Physiology A* 202:55-65.

- Massenet, M., Anikin, A., Pisanski, K., Reynaud, K., Mathevon, N., Reby, D. (2022). Nonlinear vocal phenomena affect human perceptions of distress, size and dominance in puppy whines. *Proceedings of the Royal Society B* 289:20220429.
- Morton, E.S. (1977). On the occurrence and significance of motivation-structural rules in some birds and mammals sounds. *The American Naturalist* 111:855-869.
- Muscarella, R., Fleming, T.H. (2007). The role of frugivorous bats in tropical forest succession. *Biological Reviews* 82:573-590.
- Muylaert, R.deL., Stevens, R.D., Esbérard, C.E.L., Mello, M.A.R., Garbino, G.S.T., Varzinczak, L.H., Faria, D., Weber, de M.M., Rogeri, P.K., Regolin, A.L., de Oliveira, H.F.M., Costa, L. de M., Barros, M.A.S., Sabino-Santos, G., de Moraes, M.A.C., Kavagutti, V.S., Passos, F.C., Marjakangas, E.L., Ribeiro, M.C., Galetti, M. (2017). ATLANTIC BATS: a data set of bat communities from the Atlantic Forests of South America. *Ecology* 98:3227-3227.
- Perrone Jr., M. (1980). Factors affecting the incidence of distress calls in passerines. *The Wilson Bulletin* 92:404-408.
- Prat, Y., Azoulay, L., Dor, R., Yovel, Y. (2017). Crowd vocal learning induces vocal dialects in bats: playback of conspecifics shapes fundamental frequency usage by pups. *PLOS Biology* 15:e2002556.
- Preston, S.D., de Waal, F.B.M. (2002). Empathy: Its ultimate and proximate bases. *Behavioral and Brain Sciences* 25:1–20.
- R Core Team. (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>
- Reby, D., Charlton, B.D. (2012). Attention grabbing in red deer sexual calls. *Animal Cognition* 15:265-270.
- Ruiz-Monachesi, M.R., Labra, A. (2020). Complex distress calls sound frightening: the case of the weeping lizard. *Animal Behaviour* 165:71-77.
- Russ, J., Jones, G., Mackie, I., Racey, P. (2004). Interspecific responses to distress calls in bats (Chiroptera: Vespertilionidae): a function for convergence in call design? *Animal Behaviour* 67:1005-1014.

- Ryan, J.M., Clark, D.B., Lackey, J.A. (1985). Response of *Artibeus lituratus* (Chiroptera: Phyllostomidae) to distress calls of conspecifics. *Journal of Mammalogy* 66:179-181.
- Ryan, M.J., Cummings, M.E. (2013). Perceptual biases and mate choice. *The Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 44:21.1-21.23.
- Stevens, R.D. (2013). Gradients of bat diversity in Atlantic Forest of South America: environmental seasonality, sampling effort and spatial autocorrelation. *Biotropica* 45:764-770.
- Teichroeb, L.J., Riede, T., Kotrba, R., Lingle, S. (2013). Fundamental frequency is key to response of female deer to juvenile distress calls. *Behavioural Processes* 92:15-23.
- Tokuda, I.T. (2018). Non-linear dynamics in mammalian voice production. *Anthropological Science* 126:35-41.
- Vannoni, E., McElligott, A.G. (2008). Low frequency groans indicate larger and more dominant Fallow Deer (*Dama dama*) Males. *PLoS ONE* 3:e3113.
- Velazco, P., Patterson, B. (2008). Phylogenetics and biogeography of the broad-nosed bats, genus *Platyrrhinus* (Chiroptera: Phyllostomidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49:749-759.
- Yue, Q., Casseday, J.H., Covey, E. (2007). Response properties and location of neurons selective for sinusoidal frequency modulations in the Inferior Colliculus of the Big Brown Bat. *Journal of Neurophysiology* 98:1364-1373.
- Zhao, X., Jiang, T., Gu, H., Liu, H., Sun, C., Liu, Y., Feng, J. (2018). Are aggressive vocalizations the honest signals of body size and quality in female Asian particoloured bats? *Behavioral Ecology and Sociobiology* 72:96.

Tables

Table 1 – Acoustic parameters for Distress Calls of Neotropical bats from Phyllostomidae (Ph), Molossidae (Mo), Vespertilionidae (Ve), and Emballonuridae (Em), and information on sample size for recorded individuals (Indiv) and total number of selected Distress Calls (Calls). Parameters are as follows: percentage of each of the call categories in relationship to the total – Continuous Pulses (CP), Sinusoidal Frequency Modulation (sFM), Harmonics (Harm), Thrills (Thr), Complex

(Comp) and Transitioning (Tran); Emission rate (Erate); Occupation Rate (Orate); and Frequency of Emission rate (Ferate).

Species	Indiv	Calls	CP	sFM	Harm	Thr	Comp	Tran	Erate	Orate	FErate
<i>Anoura caudifer</i> (Ph)	5	427	0.23	72.13	0	11.71	0	15.92	2.708	0.171	5.55
<i>Anoura geoffroyi</i> (Ph)	4	131	0	87.02	0	0	0	12.98	3.1	0.294	md
<i>Artibeus fimbriatus</i> (Ph)	2	83	25.3	20.48	15.66	30.12	0	8.43	1.285	0.1	md
<i>Artibeus lituratus</i> (Ph)	78	9366	78.39	9.64	0.53	9.23	0.19	2.01	4.913	0.315	55.49
<i>Artibeus obscurus</i> (Ph)	16	1012	94.76	0.69	0.49	3.85	0.1	0.1	5.32	0.333	51.72
<i>Carollia perspicillata</i> (Ph)	52	2248	3.87	11.88	3.87	71.35	1.2	7.83	3.625	0.212	7.83
<i>Chrotopterus auritus</i> (Ph)	4	133	10.53	72.18	0.75	15.04	1.5	0	2.701	0.167	100
<i>Desmodus rotundus</i> (Ph)	43	1086	99.54	0	0	0.46	0	0	0.959	0.261	84.21
<i>Artibeus cinereus</i> (Ph)	6	420	98.57	0	0	1.43	0	0	2.393	0.318	md
<i>Diphylla eucaudata</i> (Ph)	1	77	16.88	83.11	0	0	0	0	2.054	0.318	50
<i>Glossophaga soricina</i> (Ph)	9	691	0	4.34	44.43	31.26	1.45	15.52	5.203	0.079	46.15
<i>Lonchorhina aurita</i> (Ph)	10	510	17.65	4.51	1.18	75.69	0	0.98	4.172	0.228	76.92
<i>Lonchophylla peracchii</i> (Ph)	1	22	45.45	50	0	4.54	0	0	2.189	0.162	100
<i>Micronycteris microtis</i> (Ph)	5	106	0	72.64	0	27.36	0	0	1.291	0.059	100
<i>Molossus molossus</i> (Mo)	2	3	100	0	0	0	0	0	4.41	0.225	md
<i>Molossus rufus</i> (Mo)	1	6	100	0	0	0	0	0	0.94	0.056	md
<i>Myotis nigricans</i> (Ve)	5	113	16.81	0	59.29	0	23.89	0	4.888	0.215	md
<i>Platyrrhinus lineatus</i> (Ph)	8	1071	67.88	26.24	2.8	3.08	0	0	5.33	0.426	70
<i>Platyrrhinus recifinus</i> (Ph)	12	636	45.12	50.79	0	40.9	0	0	3.436	0.348	100
<i>Peropteryx kappleri</i> (Em)	1	42	0	0	38.09	54.76	0	7.14	1.165	0.042	md
<i>Phyllostomus discolor</i> (Ph)	4	97	47.42	11.34	0	41.24	0	0	1.963	0.236	md

<i>Rhinophylla pumilio</i> (Ph)	4	135	16.3	56.3	2.96	24.44	0	0	4.198	0.202	md
<i>Saccopteryx bilineata</i> (Em)	1	5	0	0	40	60	0	0	1	0.045	md
<i>Saccopteryx leptura</i> (Em)	1	19	73.68	5.26	21.05	0	0	0	1.192	0.047	md
<i>Sturnira lilium</i> (Ph)	6	295	98.3	0.34	1.35	0	0	0	4.084	0.377	9.09
<i>Sturnira tildae</i> (Ph)	1	136	97.06	0	2.94	0	0	0	4.702	0.404	100
<i>Trachops cirrhosus</i> (Ph)	4	108	0	0	0	100	0	0	2.02	0.194	37.5
<i>Vampyressa pusila</i> (Ph)	1	96	73.96	0	0	19.79	0	6.95	3.354	0.386	100

Table 2 – Contingency tables relating call type and timing of emission in four species of phyllostomid bats. Observed frequencies and standardized residuals (within parentheses) from the Chi-squared test are shown. Timing sections presented in rows and call type in columns: Continuous Pulses (CP); Sinusoidal Frequency Modulations (sFM); Harmonics (Harm); Thrills (Thr).

Artibeus lituratus

Timing section	CP	sFM	Harm	Thr
Initial	2696 (-5.64)	380 (2.57)	13 (-1.77)	405 (5.52)
Middle	2463 (3.67)	265 (-2.23)	17 (0.20)	246 (-2.78)
End	2183 (2.24)	258 (1.68)	20 (-0.44)	214 (-3.03)

Artibeus obscurus

Timing section	CP	sFM	Harm	Thr
Initial	415 (1.95)	2 (-0.75)	0 (-1.93)	13 (-1.19)
Middle	305 (0.95)	2 (-0.17)	1 (-0.55)	10 (-0.80)
End	239 (-3.20)	3 (1.02)	0 (2.76)	16 (2.19)

Platyrrhinus

lineatus

Timing section	CP	sFM	Harm	Thr
Initial	344 (5.01)	78 (-5.67)	3 (-3.61)	26 (4.33)
Middle	223 (-2.03)	112 (2.99)	9 (-0.32)	6 (-1.80)
End	160 (-3.51)	91 (3.22)	18 (4.45)	1 (-2.98)

Carollia

perspicillata

Timing section	CP	sFM	Harm	Thr
----------------	----	-----	------	-----

Initial	31 (-1.41)	124 (1.24)	34 (0.74)	689 (0.04)
Middle	25 (-0.41)	85 (0.43)	28 (0.30)	490 (-0.30)
End	31 (2.01)	58 (-1.84)	25 (0.51)	425 (0.27)

As demais Tabelas Suplementares podem ser acessadas no link:

<https://drive.google.com/drive/folders/>

[10TA5KI_DxP57_9vUCYGCwgWx5wIXqos8?usp=sharing](https://drive.google.com/drive/folders/10TA5KI_DxP57_9vUCYGCwgWx5wIXqos8?usp=sharing)

Capítulo 2 - Variação individual e populacional em chamados de distresse e sua relação com a morfologia

Resumo

A individualidade representa a existência de características que permitem distinguir os emissores de um sinal. Vocalizações emitidas em contextos de interação social comumente apresentam assinaturas individuais. Uma das causas da individualidade é a variação na morfologia corporal. A variabilidade acústica pode levar também à ocorrência de assinaturas vocais populacionais, especialmente se as pressões ambientais entre as populações forem diferentes. Chamados de Distresse (CDs) são emitidos por indivíduos de diversas espécies quando capturados, porém não se sabe qual sua funcionalidade primária. Uma das respostas aos CDs é a atração de outros indivíduos, podendo estar vinculada a relações de parentesco ou altruísmo recíproco – contextos dependentes do reconhecimento individual, logo da existência de individualidade. O objetivo deste capítulo é o de avaliar a ocorrência de assinaturas vocais individuais e populacionais na estrutura acústica dos CDs em dez espécies de morcegos filostomídeos, além de avaliar sua relação com a morfologia em três espécies. Após a captura em redes de neblina, os CDs dos indivíduos foram gravados. Variáveis acústicas e morfométricas foram obtidas. Para cada espécie foram conduzidas Análises Discriminantes com Misturas Gaussianas (ADMGs) para avaliar a ocorrência de individualidade nos CDs. Todos os modelos apresentaram acurácia acima do esperado por acaso, indicando que é possível distinguir os indivíduos com base nos parâmetros acústicos avaliados. No entanto, a Estatística de Informação de Beecher (Hs) indicou que as variáveis acústicas utilizadas não possuem forte capacidade discriminatória, apesar de ser possível identificar alguns padrões entre as espécies. A ocorrência de assinaturas vocais populacionais em *A. lituratus* foi avaliada por uma ADMG. A acurácia da classificação não foi superior ao esperado por acaso, indicando que a variabilidade interindividual é maior que a interpopulacional. Para avaliar a influência de variáveis morfométricas sobre os CDs em nível de indivíduo, foram conduzidas Análises de Redundância Baseadas em Distância (dbRDAs) para as

espécies *Artibeus lituratus*, *Desmodus rotundus* e *Carollia perspicillata*. Os modelos indicaram ausência de associação entre as variáveis morfométricas e acústicas. Em conjunto, os resultados indicam que a resposta aos CDs aparenta não estar vinculada ao reconhecimento individual.

Introdução

Variações fenotípicas podem estar relacionadas a fatores diversos, como o genótipo e a ontogenia, entre outros (Fisher, 1930; Cox e Rabosky, 2013; Hordijk e Altenberg, 2020). Se uma característica apresenta maior variação interindividual do que intraindividual, pode-se dizer que a mesma apresenta individualidade (Blumstein e Fernández-Juricic, 2010; Pollard *et al.*, 2010; Lyra *et al.*, 2022), o que pode acontecer com sinais sonoros. Em roedores ciurídeos a individualidade em Chamados de Contato aparenta ter evoluído juntamente ao aumento da complexidade social (Pollard e Blumstein, 2011). Em morcegos, o reconhecimento individual decorrente de assinaturas vocais pode ser encontrado em diferentes chamados sociais (Leippert *et al.*, 2000; Knörnschild *et al.*, 2007; Carter *et al.*, 2012).

Chamados de Distresse (CDs) são emitidos em contextos aflitivos (Hörmann *et al.*, 2020). As hipóteses funcionais sobre os CDs envolvem duas possibilidades distintas: a direcionalidade a predadores (Morse e Balser, 1961; Conover, 1994; Wise *et al.*, 1999) ou a outros indivíduos (Conover, 1987; Carter *et al.*, 2015). Avaliar a ocorrência de individualidade em CDs pode ajudar a entender a funcionalidade primária dessas vocalizações. Se CDs são dirigidos a outros indivíduos, é possível que a resposta esteja ligada a relações de parentesco ou altruísmo recíproco (Wilkinson, 1984; Wilkinson, 1988; Carter e Wilkinson, 2013; Engler *et al.*, 2017), contextos que necessariamente estariam relacionados ao reconhecimento individual. A ausência de individualidade, por outro lado, sugeriria que eventuais respostas dos destinatários dos sinais não estejam atreladas ao parentesco ou reconhecimento para reciprocidade.

O isolamento geográfico é um dos fatores que podem influenciar o processo de especiação. Populações distintas estão submetidas a pressões ambientais diferentes, devido às características de habitat às quais estão sujeitas. Nos tentilhões de Galápagos, modificações morfológicas ligadas a diferentes recursos explorados pelas populações do arquipélago levaram a alterações na

estrutura acústica de seus cantos, o que atuou como uma barreira de isolamento e contribuiu para a especiação neste grupo (Podos, 2001; Podos e Nowicki, 2004).

A influência do isolamento geográfico não afeta apenas a evolução de caracteres sexuais. Vocalizações utilizadas em contextos sociais se enquadram também nesse contexto (Mitani *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 2020). Não há estudos abordando a variação populacional em Chamados de Distresse de morcegos. Isso provavelmente se deve à baixa especificidade da resposta que ultrapassa a barreira de espécies e colabora para uma alta variabilidade dos parâmetros acústicos (Russ *et al.*, 2004; Carter *et al.*, 2015). É importante conduzir estudos confirmatórios sobre tal suposição, de forma a trazer mais robustez à discussão. Apesar da variabilidade acústica grande, CDs de populações isoladas podem estar passando por processos seletivos distintos devido a diferenças nas pressões locais (ver *Acoustic Adaptation Hypothesis* - Ey e Fischer, 2009), podendo levar à ocorrência de assinaturas vocais populacionais ou dialetos (Henry *et al.*, 2015). A não ocorrência por sua vez reforça a hipótese de que de fato a especificidade do sinal é baixa, sugerindo que os benefícios associados a uma ampla resposta permitem a manutenção da alta variabilidade - ou seja, uma resposta rápida e universal, que pode trazer benefícios a qualquer emissor, desde o nível de indivíduos ao de espécies (Lingle *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2018).

A estrutura corporal representa um dos fatores que pode influenciar as características acústicas dos sons produzidos por um organismo. Segundo a Teoria da Fonte-Filtro (Brittan-Powell *et al.*, 1997; Vannoni e McElligott, 2007; Taylor e Reby, 2010), o som emitido é fruto da dinâmica entre a fonte – estrutura responsável pela produção; e o filtro – estruturas associadas à fonte, as quais em morcegos são representadas pelas cordas vocais e pelo restante do trato vocal, respectivamente. Variações no trato vocal, como o tamanho, diâmetro, entre outras, podem influenciar as propriedades de ressonância das frequências e moldar o som emitido (Taylor e Reby, 2010). Assim, é possível que diferenças anatômicas entre os indivíduos levem à existência de assinaturas vocais individuais e/ou geográficas.

O presente capítulo tem por objetivo avaliar a ocorrência de indícios acústicos sobre assinaturas vocais individuais e populacionais em Chamados de Distresse de morcegos e sua relação com a morfologia dos indivíduos numa

tentativa de melhor compreender as informações transmitidas por essas vocalizações. Para tal, tentamos responder às seguintes perguntas: 1) Em filostomídeos, existem assinaturas vocais individuais na variação acústica dos CDs?; 2) Qual a relação entre a variação acústica e diferenças na morfologia dos indivíduos?; 3) Existem assinaturas vocais populacionais nos CDs de *Artibeus lituratus*?

Metodologia específica

Áreas de estudo

Morcegos foram capturados com o uso de redes de neblina em localidades do Sudeste brasileiro. Foram realizadas capturas no *campus* da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro (UENF, coordinates: 21° 45' 41.9" S; 41° 17' 08.8" W). e nas seguintes unidades de conservação: Reserva Biológica União (22° 36' S; 42° 12' W) e Reserva Ecológica Guapiaçu (22° 27' 10.309" S; 42° 46' 13.011" W), ambas no Rio de Janeiro; e no complexo florestal formado pelas Reserva Biológica de Sooretama e Reserva Natural Vale (19° 03' 24.51" S; 40° 08' 51.83" W) no estado do Espírito Santo. As capturas na UENF foram realizadas durante o período de frutificação de uma figueira, gerando atração de muitos indivíduos de *Artibeus lituratus* simultaneamente.

Captura, gravação e mensuração

As espécies *Artibeus cinereus*, *A. lituratus*, *A. obscurus*, *Carollia perspicillata*, *Desmodus rotundus*, *Glossophaga soricina*, *Lonchorhina aurita*, *Platyrrhinus lineatus*, *P. recifinus* e *Sturnira lilium* foram escolhidas como modelos por apresentarem um número de indivíduos gravados maior ou igual ao número de variáveis acústicas utilizadas. Para *A. lituratus*, grande parte dos indivíduos apresentou erros de classificação com um indivíduo específico (ver as análises estatísticas conduzidas). Este indivíduo foi o único a apresentar dentre seus chamados apenas pulsos da categoria CP (Capítulo 1). Tal fato pode ter subestimado sua variação intraindividual, gerando aumento nas taxas de erro de

classificação. Este indivíduo foi removido da análise para uma melhor observação dos padrões gerais. Assim, foram usados 38 indivíduos de *A. lituratus*. Nem todos indivíduos vocalizaram repetidas vezes, de forma que o número de gravações por indivíduo variou entre 1 e 3. O número de indivíduos utilizados por espécie pode ser visto na Tabela 1. Para avaliar a ocorrência de assinaturas vocais individuais em *A. lituratus*, apenas indivíduos da população UENF foram utilizados, já para as demais espécies, indivíduos de populações distintas foram incluídos para aumentar o tamanho amostral. Para avaliar a ocorrência de assinaturas vocais populacionais apenas *A. lituratus* foi utilizada, com um total de 71 indivíduos distribuídos entre 4 localidades (Tabela 2). Nós não podemos assumir com certeza que não há fluxo de indivíduos entre as populações, tendo em vista que não foram utilizados dados genéticos. As maiores distâncias de deslocamento já registradas para *A. lituratus* atingem distâncias e gradientes altitudinais de até 120 Km e 1237 m, respectivamente (Arnone *et al.*, 2016; Esbérard *et al.*, 2017).

Tabela 1 – Número de indivíduos gravados por espécie.

Espécie	Indivíduos
<i>Artibeus cinereus</i>	6
<i>Artibeus lituratus</i>	38
<i>Artibeus obscurus</i>	15
<i>Carollia perspicillata</i>	43
<i>Desmodus rotundus</i>	35
<i>Glossophaga soricina</i>	8
<i>Lonchorhina aurita</i>	9
<i>Platyrrhinus lineatus</i>	7
<i>Platyrrhinus recifinus</i>	8
<i>Sturnira lilium</i>	6

Tabela 2 – Número de indivíduos de *Artibeus lituratus* gravados para cada localidade onde o trabalho foi desenvolvido.

Local	União	ES	REGUA	UENF
Indivíduos	7	21	14	29

Após a captura, os indivíduos eram transportados para uma estação de gravação fixa. Os indivíduos da UENF foram gravados repetidas vezes, numa

tentativa de representar melhor a variabilidade de seus CDs, porém o mesmo não foi feito para as demais localidades. Assim, foram originados dois tipos de conjuntos de dados distintos: 1) referente apenas às gravações repetidas para os indivíduos da população UENF, que foram utilizados para avaliar a ocorrência de individualidade nos CDs de *A. lituratus*; e 2) incluindo apenas uma gravação por indivíduo para todas as localidades (incluindo a UENF) para avaliar a ocorrência de individualidade nas demais espécies e para avaliar a existência de assinaturas vocais populacionais em *A. lituratus*.

Após a gravação (500 KHz/s; 16 bits), as seguintes medidas morfométricas foram obtidas: comprimento do antebraço, massa corporal, largura da cabeça na região pós-orbital, altura e comprimento da cabeça, altura e largura da orelha, altura e largura da folha nasal. Em seguida, os indivíduos foram soltos no local de captura. Apesar de as taxas de recaptura em morcegos serem baixas, para evitar que o mesmo indivíduo fosse gravado repetidamente, foram realizados furos no patágio para identificação dos indivíduos gravados. Não houve recapturas durante o experimento. As capturas e gravações em todas localidades se deram entre abril de 2018 e Junho de 2019.

Para as análises acústicas, apenas chamados de boa qualidade foram utilizados (ao menos 15 dB acima do ruído de fundo, sem *clipping*). A seleção dos chamados foi feita com base em classificação visual de espectrogramas, utilizando o *software* Raven Pro 1.6 (Center for Conservation Bioacoustics, 2011). Em seguida foram extraídas variáveis acústicas (janela Hanning; Tamanho da janela: 1024 pontos; sobreposição 50%) usando o pacote warbleR (Araya-Salas e Smith-Viadurre, 2017) do *software* R versão 3.5.1 (R Core Team, 2021). As variáveis selecionadas foram: Frequência 95%, Frequência 5%, Intervalo Interquartilico de Frequências, Frequência Pico, Entropia Espectral e Duração 90% (para definições, ver Tabela 1.2 – Introdução geral). Para avaliar a ocorrência de individualidade em *A. lituratus* foram obtidos de maneira aleatória 43 chamados para cada gravação de cada indivíduo proveniente da população UENF. Tal número de chamados foi utilizado para incluir um indivíduo que possuía apenas 43 pulsos utilizáveis e padronizar a amostra. Para as demais espécies, foram utilizados todos os chamados presentes nas gravações. Para o conjunto de dados referente às análises de variação populacional em *A. lituratus*, a média das variáveis acústicas foi obtida para cada gravação, onde cada gravação representa

um indivíduo distinto. Tal esforço serviu para evitar pseudoreplicação local com base na repetição de indivíduos.

Análises estatísticas

Para avaliar a classificação das vocalizações aos indivíduos, foram conduzidas Análises Discriminantes com Misturas Gaussianas (ADMG – Scrucca, 2014) baseadas nos parâmetros acústicos para cada espécie separadamente. Essa metodologia permite a visualização da classificação de grupos a partir das características geométricas num subespaço reduzido, estimado a partir de um modelo Gaussiano de mistura para Análise de Função Discriminante (AFD - Venables e Ripley, 2002). Usando tal abordagem é possível, além de visualizar as ordenações, identificar as variáveis acústicas mais importantes para a discriminação, assim como as proporções de classificação correta aos grupos, mostrando a quantidade de sobreposição acústica encontrada. Pouca sobreposição acústica entre indivíduos, por exemplo, indicará a existência de informação nos CDs que permite a diferenciação individual e um desdobramento de questões a serem examinadas sobre a função dos chamados. A interpretação dos resultados se dá de forma similar à de uma AFD, com a ressalva de que a ADMG não assume normalidade dos dados dentro dos grupos, pois estima possíveis misturas Gaussianas de subdistribuições a partir do conjunto de dados. A escolha pela ADMG se deu pelo fato de terem sido encontrados diferentes tipos de pulsos de CDs, tanto dentro quanto entre espécies (Capítulo 1). Tais variações nas estruturas dos pulsos poderiam quebrar a premissa de normalidade assumida pela AFD. As classificações foram avaliadas por meio de análise de validação cruzada (*n-fold cross-validation*), gerando uma matriz de confusão comparando classificações conhecidas com as previstas pelo modelo, sempre deixando 10 observações de fora do modelo para classificação posterior, como conjunto de dados teste. A acurácia total foi calculada como a proporção de classificações corretas, com intervalo de confiança derivado da função Binomial. A acurácia foi comparada com a probabilidade de classificação ao acaso (*no information rate*), calculada como a proporção de observações por indivíduo. Além destas estatísticas, para cada indivíduo foi calculada uma acurácia balanceada (Velez *et al.*, 2007) como: $(PV/(PV + FN) + NV/(NV + PV))/2 = (\text{Sensibilidade} + \text{Especificidade})/2$, onde a PV é o número de positivos verdadeiros, FN é o número

de falsos negativos e NV é o número de negativos verdadeiros. A sensibilidade corresponde à proporção de vocalizações do indivíduo (i) classificadas corretamente, ao passo que a especificidade corresponde à proporção de vocalizações de outros indivíduos corretamente classificadas como não sendo do indivíduo (i). A acurácia balanceada dá o mesmo peso para os dois componentes como partes do reconhecimento individual: saber que uma vocalização é do indivíduo (i) e saber que uma vocalização não é do indivíduo (i). As análises estatísticas foram conduzidas no *software* R versão 3.5.1 (R Core Team 2021), usando os pacotes *mclust* (Scrucca *et al.*, 2016) e *caret* (Kuhn, 2008). Para avaliar a ocorrência de assinaturas vocais populacionais, outra ADMG foi conduzida levando em conta as quatro diferentes localidades em que foram capturados indivíduos de *A. lituratus*.

Um problema associado ao uso de análises baseadas em acurácia de classificação (*Discrimination Scores* - DS) para análises de individualidade, como a ADMG, é a dificuldade em comparar resultados entre estudos, pela sua dependência do tamanho amostral, onde aumentos no número de indivíduos podem reduzir drasticamente a capacidade discriminatória (Linhart and Šálek, 2017). A Estatística de Informação de Beecher (H_S – Beecher, 1989) se apresenta como uma métrica adequada para lidar com ambos problemas, por ser menos sensível ao tamanho amostral – onde um tamanho amostral que seja ao menos igual ao número de variáveis apresenta resultados comparáveis entre espécies com diferentes tamanhos amostrais (Linhart and Šálek, 2017; Linhart *et al.*, 2019). O conteúdo de informação individual por variável pode ser calculado como

$$H_i = \log_2 \sqrt{\frac{F+n-1}{n}} ,$$

onde a estatística F é obtida em uma análise de variância e n é o número de observações por indivíduo. O conteúdo de informação total do sinal acústico é estimado como o somatório de todas as variáveis $H_S = \sum H_i$. Para evitar a inflação artificial do H_S devido à correlação entre variáveis acústicas, uma análise de componentes principais foi realizada e o H_S foi calculado a partir dos H_i para todo o conjunto dos componentes principais. Assim, o índice H_S foi calculado para todas as espécies mencionadas acima e também o H_i para as variáveis acústicas separadamente, com a finalidade de permitir a comparação interespecífica da informação de individualidade, além de permitir comparações em estudos futuros.

O número de indivíduos potencialmente discrimináveis pelas variáveis acústicas foi calculado para cada espécie como $NI = P \times 2^{H_s}$, onde P é a probabilidade de que a assinatura vocal de um determinado indivíduo não esteja presente em outro indivíduo do mesmo grupo. Assumimos um valor de $P = 0,9$, que é relativamente alto, mas não corresponde a uma discriminação perfeita (Linhart and Šálek, 2017). Valores mais altos de H_s indicam conteúdo de informação no sinal com potencial de discriminação entre maior número de indivíduos. O pacote IDmeasurer (Linhart *et al.*, 2019) do *software* R versão 3.5.1 (R Core Team 2021) foi utilizado para o cálculo dos valores de H_s .

Para avaliar a relação entre as variáveis acústicas e morfométricas foram conduzidas Análises de Redundância Baseadas em Distância (dbRDA - Legendre e Anderson, 1999) para cada uma das espécies *Artibeus lituratus*, *Carollia perspicillata* e *Desmodus rotundus* – escolhidas devido a um maior número de indivíduos gravados. Tal método avalia a relação entre matrizes distintas, seguindo uma sequência de processos. Primeiramente, uma Análise de Coordenadas Principais (PcoA – Gower, 1966; Borcard *et al.*, 2011) é conduzida e os escores das Coordenadas Principais (eixos da PCoA) são utilizados como matriz de variáveis dependentes ou resposta. Este processo enquadra a variabilidade dentro de um Espaço Euclidiano que é adequado para a próxima etapa. Em seguida, a nova matriz resposta é usada em uma Análise de Redundância simples (RDA – Rao, 1973; Borcard *et al.*, 2011) juntamente à matriz contendo as variáveis explicativas (as variáveis morfométricas). O modelo gerado traz informações sobre as proporções de variação Não-restrita – representando o quanto da variação observada pode ser encontrada apenas na matriz dependente; *versus* Restrita – escores preditos pela regressão. Por fim, os modelos foram submetidos a testes de permutação para avaliar as relações encontradas pelas dbRDAs.

Resultados

Varição individual

As funções discriminantes para todas as espécies (Tabela 3) apresentaram acurácia superior ao esperado por acaso, indicando que é possível

discriminar indivíduos com base nos parâmetros acústicos utilizados. A mediana da Especificidade se apresentou alta em todas as espécies (em todos os casos acima de 90%), porém a Sensitividade apresentou valores relativamente baixos, resultando numa mediana da acurácia balanceada inferior a 76% em todos os casos. Todas as estatísticas baseadas nas funções discriminantes foram correlacionadas negativamente com o número de indivíduos (correlação acurácia e $n_{ind} = -0,92$, IC95% $-0,98$ a $-0,67$). Neste contexto, chama a atenção como valor atípico, a acurácia observada para *A. obscurus* ($n_{ind} = 15$, Acc = 53,08%), por ser alta para o número de indivíduos utilizado.

As espécies de *Artibeus* apresentaram os maiores valores de H_s . Dentro deste grupo observamos as únicas espécies que tiveram valores altos de H_i para todas as variáveis acústicas (Tabela 3). *Sturnira lilium* e *C. perspicillata* chamam a atenção por apresentarem valores de intermediários a altos de H_s , mas poucas variáveis acústicas (duração 90 e entropia espectral, particularmente) com valores altos de H_i . *Glossophaga soricina*, por outro lado, apresentou valor baixo de H_s , mas todas as variáveis (menos IIF) com valores altos de H_i , o que sugere grande correlação na informação de individualidade entre as variáveis acústicas. As variáveis mais relevantes com relação à informação de individualidade foram frequência 95% (8 espécies), frequência pico e entropia espectral (7 espécies) (Tabela 3). O conteúdo de informação presente nos sinais acústicos permitiria discriminar grupos de no máximo 2 indivíduos, no caso das espécies de *Artibeus*, *S. lilium*, e *C. perspicillata*, ao passo que para as demais espécies o conteúdo de informação não permitiria identificar indivíduos.

Tabela 3 – Resultados das Análises Discriminantes com Misturas Gaussianas e dos cálculos do índice H_s para todas as espécies avaliadas em nível individual. As espécies se encontram dispostas em ordem decrescente quanto ao valor de H_s . Abreviações: Sp - Espécie; n_{ind} – Número de indivíduos; Acc – acurácia; Nir – porcentagem de classificações corretas esperadas aleatoriamente (*No information rate*); mE – mediana da especificidade; mS – mediana da sensibilidade; mAb – mediana da acurácia balanceada; H_s – somatório de H_i para os PCs das variáveis acústicas; H_i – Estatística de informação de Beecher para cada variável acústica. Índices baseados em ANOVAs com $P < 0,001$ se encontram destacados em negrito; N – número de indivíduos identificáveis estimado a partir do H_s ; D90 – duração 90%; F5 – frequência 5%; F95 – frequência 95%; Fpico – frequência pico; IIF – intervalo interquartis de frequências; Ent – entropia espectral; A.lit – *Artibeus lituratus*; A.cin – *A. cinereus*; A.obs – *A. obscurus*; C.per – *Carollia perspicillata*; D.rot – *Desmodus rotundus*; G.sor – *Glossophaga soricina*; L.aur – *Lonchorhina aurita*; P.lin – *Platyrrhinus lineatus*; P.rec – *Platyrrhinus recifinus*; S.lil – *Sturnira lilium*.

Sp	n_{ind}	Acc	Nir	mE	mS	mAb	H_s	N	H_i					
									D90	F5	F95	Fpico	IIF	Ent
A.lit	38	22,31	2,7	98,26	16,28	57,66	1,45	2,46	0,01	0,77	1,05	0,77	0,76	0,94
A.cin	6	68,57	30	94,72	59,25	75,63	1,36	2,31	0,42	0,10	0,66	0,19	0,22	0,63
A.obs	15	53,08	11,43	96,82	53,85	74,70	1,20	2,07	0,12	0,21	0,37	0,17	0,15	0,78
S.lil	6	56,61	45,63	90,72	52,19	71,14	0,95	1,74	0,51	0,01	0,02	-0,01	0,06	0,30
C.per	43	21,81	4,94	98,46	12,76	55,76	0,92	1,70	0,32	-0,01	0,16	-0,01	0,03	0,21
P.rec	8	49,69	17,61	92,51	53,56	74,24	0,78	1,54	-0,01	0,00	0,47	0,11	0,62	0,17
G.sor	8	43,12	18,84	92,16	49,51	69,35	0,66	1,42	0,11	0,45	0,28	0,50	0,04	0,12
D.rot	35	25,95	6,68	98,22	25	61,12	0,63	1,39	0,01	0,06	0,24	-0,02	0,13	0,05
P.lin	7	58,22	28,04	96,82	53,85	74,70	0,47	1,25	0,00	0,21	0,00	0,22	0,11	0,04
L.aur	9	47,22	20,44	94,72	59,25	75,63	0,37	1,16	0,14	-0,01	0,13	0,09	0,04	0,01

Varição populacional em *Artibeus lituratus*

O modelo da ADMG apresentou acurácia de 45.07% (Intervalos de confiança de 95%: 33.23 e 57.34%), com chance de classificação ao acaso de 40.85%. As sensibilidade, especificidade e acurácia balanceada para cada população se encontram na Tabela 4. As direções 1 e 2 explicaram respectivamente 78.028 e 18.138% de variação, totalizando 96.166% da variação total do modelo.

Tabela 4 – Porcentagens encontradas pela ADMG avaliando a variação acústica entre populações para as sensibilidade, especificidade e acurácia balanceada de cada população.

População	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Acurácia balanceada (%)
ES	14.28	90.00	52.14
UENF	72.41	52.38	62.40
REGUA	57.14	78.95	68.05
União	0	96.87	48.43

Variáveis morfométricas e acústicas

Os três modelos dbRDA independentes gerados para as espécies *A. lituratus*, *D. rotundus* e *C. perspicillata*, contaram com 53, 27 e 19 indivíduos, respectivamente. Todos os modelos apresentaram valores de variação Não-restrita consideravelmente maiores do que Restrita, indicando pouca associação entre as variabilidades acústica e morfológica. Além disso, os resultados dos testes de permutação para cada modelo foram não-significativos, reforçando uma falta de relação entre esses conjuntos de dados com base nas variáveis utilizadas. A Tabela 5 apresenta os resultados das dbRDAs e dos testes de permutação para cada espécie.

Tabela 5 – Resultados das dbRDAs e subsequentes permutações para cada uma das espécies avaliadas

Espécie	dbRDA (proporção de variação)		Teste de Permutação	
	Restrita (%)	Não-restrita (%)	F	P
<i>Artibeus lituratus</i>	14.57	85.43	0.815	0.614
<i>Desmodus rotundus</i>	14.61	85.39	0.323	0.972
<i>Carollia perspicillata</i>	39.53	60.47	0.653	0.773

Discussão

Variação individual

Não há um critério claro que defina a partir de que ponto a acurácia de um modelo sugere um sinal biológico significativo. Chamados de Alarme de Ariranhas apresentaram 29% de acurácia em uma Análise Linear Discriminante (Leuchtenberger *et al.*, 2016). Uma Análise de Função Discriminante para CDs de 15 indivíduos de *Glossophaga soricina* obteve uma acurácia de 41.1% (Hörmann *et al.*, 2020). Análises de Função Discriminante Permutadas para Chamados de Contato da espécie *Desmodus rotundus* apresentaram classificação correta de 66% em quatro indivíduos de uma mesma colônia em cativeiro e 91% para quatro indivíduos selvagens de colônias diferentes; já para 17 indivíduos em cativeiro da espécie *Diaemus youngii*, foi encontrada uma acurácia de 57% (Carter *et al.*, 2012). A acurácia da classificação dos modelos gerados pelas ADMGs neste estudo foi acima da acurácia esperada ao acaso para todas as espécies. Isso sugere que existe um sinal acústico que permite diferenciar até certo ponto os indivíduos com base nas variáveis utilizadas, mas a relevância desta diferenciação não é nítida apenas baseado no resultado das funções discriminantes.

Apesar das taxas de classificação corretas acima do esperado por acaso, as acurácias dos modelos ADMG com as três espécies que dispunham de mais indivíduos (grupo 1: *Carollia perspicillata*, *Artibeus lituratus* e *Desmodus rotundus*) foram inferiores a 26%, o que representa altas taxas de confusão. Por outro lado, as acurácias balanceadas tendem a ser maiores que 50%. Isto sugere que a sensibilidade dos modelos é baixa, mas a especificidade é alta. A interpretação desses padrões é que, por um lado existe alguma confusão ao determinar se a vocalização pertence ao indivíduo (*i*), mas também existe maior confiabilidade em determinar que a vocalização não é do indivíduo (*i*). Foi observada uma clara relação negativa entre o número de indivíduos e as estatísticas de classificação. Modelos baseados em *Discrimination Scores* tendem a sofrer redução em seu desempenho com o aumento do número de indivíduos, o que pode torná-los inadequados em análises comparativas (Linhart e Šálek, 2017; Linhart *et al.*, 2019). Ao considerar esta relação, no entanto, uma espécie (*A. obscurus*) se

destaca com acurácia maior que o esperado para o número de indivíduos em sua amostra. Apesar disso, a estatística de informação H_s não é notadamente diferente das outras espécies do gênero. Será importante avaliar se algum aspecto do comportamento desta espécie difere o suficiente das demais espécies do gênero para explicar o efeito observado na acurácia.

As espécies de *Artibeus* apresentaram os maiores valores de H_s com as variáveis acústicas (com exceção à duração para *A. lituratus*) apresentando certo potencial discriminatório. Tais resultados podem indicar que neste gênero há algum fator não identificado associado à identificação dos indivíduos, associado principalmente às variáveis Frequência 95% e entropia espectral. Este efeito não se estende às duas outras espécies de Stenodermatinae (*Platyrrhinus*) que valores de H_s mais baixos. A variável com maior capacidade de identificação individual foi a Frequência 95%, com efeito importante sobre a classificação de 8 das 10 espécies avaliadas e o maior valor de H_i encontrado dentre todos os casos (1.05 em *A. lituratus*). As variáveis Frequência Pico e entropia espectral assumem o segundo lugar, com importância para 7 espécies. Uma possibilidade é a de que os estados emocionais dos emissores variaram durante a emissão dos CDs, especialmente tendo em vista a influência da variável entropia espectral (Morton, 1977), porém, nossos resultados não são suficientemente robustos para defender essa hipótese.

Em geral, os valores do índice H_s para o efeito combinado das variáveis acústicas variaram entre 0.37 e 1.45, possibilitando identificar com uma probabilidade de 90% apenas entre 1.16 e 2.46 indivíduos em todas espécies. Tais valores são relativamente baixos para o índice levando em conta o número de variáveis utilizadas (para exemplos, ver Beecher, 1989; Medvin *et al.*, 1993; Smith-Vidaurre *et al.*, 2021). Isso indica que o efeito combinado das variáveis acústicas combinadas possui potencial baixo de discriminar indivíduos a partir de seus CDs. Esses resultados reforçam a hipótese de que não há individualidade nos CDs das espécies de morcegos avaliadas. Indica também que os resultados das ADMGs descritos acima podem estar sujeitos à influência dos diferentes tamanhos amostrais.

Esses resultados sugerem que a sobreposição de parâmetros acústicos dos CDs pode estar relacionada à resposta ampla por parte de outros indivíduos – uma resposta geral, independente da identidade do emissor. Tal relação foi

sugerida anteriormente para o nível de espécies (Huang *et al.*, 2018), porém não há evidências para o nível de indivíduos até então. Devido ao contexto em que são emitidos (a captura por predadores), é possível que a sobrevivência ou não do emissor esteja relacionada ao tempo de resposta, devendo este ser o mais rápido possível para maior eficácia. Aparentemente este é o caso para o choro de filhotes de mamíferos, onde a ausência de reconhecimento individual pode estar relacionada ao tempo de processamento do sinal pelo receptor – e consequentemente ao tempo de resposta (Lingle *et al.*, 2012). Em espécies de veados a resposta heteroespecífica ao choro de infantes aparenta estar relacionada a variáveis de afinação (Lingle e Riede, 2014). Por fim, Lingle *et al.* (2012) sugerem também que vocalizações que possuem a finalidade de atrair outros indivíduos podem ter evoluído a partir do choro dos filhotes. Em contrapartida, é possível também que a resposta aos CDs se deva não à similaridade acústica entre as espécies, mas a um viés de percepção associado a outras vocalizações (*perceptual bias* – ver Endler and Basolo, 1998; Ryan and Cummings, 2013) – incluindo o choro de infantes. Nossos resultados sugerem que para os CDs das espécies avaliadas a baixa acurácia na discriminação individual pode ser um sinal de que a resposta não está relacionada a relações de afinidade, como parentesco, ou altruísmo recíproco. Assim sendo, a presença de uma resposta geral por parte dos indivíduos de uma população se torna viável, pois confere aumento no valor adaptativo de cada indivíduo independentemente, possibilitando a manutenção da baixa especificidade do sinal.

Variação populacional em *Artibeus lituratus*

O modelo da ADMG para as populações de *Artibeus lituratus* apresentou acurácia um pouco superior ao esperado por acaso, havendo sobreposição do intervalo de 95% de confiança. A acurácia balanceada para cada população também foi relativamente baixa. É importante ressaltar que o alto valor de classificação ao acaso pode ser devido a um tamanho amostral pequeno e desigual entre as localidades. Tais resultados sugerem que a variabilidade individual é maior do que a entre populações, portanto não é possível distinguir assinaturas vocais populacionais nos CDs de *A. lituratus* com base nos parâmetros acústicos avaliados. Reforça-se assim a hipótese de que a resposta aos CDs é independente de indícios acústicas associadas à identidade, de forma

que quaisquer indivíduos receptores podem ser os alvos do sinal, similar ao sugerido na literatura para a resposta heteroespecífica aos CDs (Huang *et al.*, 2018) e ao choro de infantes (Lingle *et al.*, 2012; Lingle e Riede, 2014).

Relação entre morfologia e variabilidade acústica

Para as três espécies avaliadas, tanto a proporção de variação Não-restrita/Restrita apresentada pelas dbRDAs, quanto os valores de P altos nos testes de permutação revelam uma ausência de associação entre as variáveis acústicas e morfométricas utilizadas. Isso sugere que nas espécies *Artibeus lituratus*, *Desmodus rotundus* e *Carollia perspicillata* a estrutura acústica dos CDs parece ser independente do tamanho e/ou da forma das estruturas sonoras (folha nasal e orelhas) de cada indivíduo. Dessa forma o “Filtro” - refletido na anatomia do corpo como um todo e de estruturas especializadas para a produção sonora - não apresenta influência suficiente para gerar um sinal honesto quanto à diferenças individuais nos CDs. Nas famílias Rhinolophidae e Phyllostomidae, características da anatomia da folha nasal das espécies estão relacionadas à estrutura acústica de seus pulsos de ecolocalização (Bogdanowicz *et al.*, 1997; Leiser-Miller e Santana, 2020; Leiser-Miller e Santana, 2021). Neste ponto surgem duas hipóteses a serem testadas: 1) A anatomia da folha nasal influencia a estrutura acústica dos pulsos de ecolocalização, mas não a dos CDs; e 2) A anatomia da folha nasal influencia a variação acústica dos CDs em nível de espécies, mas não de indivíduos. Por fim, é possível que para as três espécies avaliadas, caso haja individualidade nos CDs (conforme discutido anteriormente), esta seja independente da variação morfológica, sendo determinada por alguma outra razão. No entanto, é importante olhar para esses resultados com cautela, tendo em vista que utilizamos um conjunto reduzido de variáveis acústicas e morfométricas que podem não incorporar completamente aspectos da morfologia dos indivíduos e da variabilidade acústica dos CDs.

Referências Bibliográficas

- Araya-Salas, M., Smith-Viadurre, G. (2017). warbleR: an R package to streamline analysis of animal acoustic signals. *Methods in Ecology and Evolution* 8:184-191.

- Arnone, I.S., Trajano, E., Pulchério-Leite, A., Passos, F.de C. (2016). Long-distance movement by a great fruit-eating bat, *Artibeus lituratus* (Olfers, 1818), in southeastern Brazil (Chiroptera, Phyllostomidae): evidence for migration in Neotropical bats? *Biota Neotropica* 16(1):e0026.
- Beecher, M.D. (1989). Signalling systems for individual recognition: an information theory approach. *Animal Behaviour* 38:248-261.
- Blumstein, D., Fernández-Juricic, E. (2010). *A primer of conservation behavior*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. Publishers.
- Borcard, D., Gillet, F., Legendre, P. (2011). *Numerical ecology with R*. New York: Springer.
- Brittan-Powell, E.F., Dooling, R.J., Larsen, O.N., Heaton, J.T. (1997). Mechanisms of vocal production in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *The Journal of the Acoustical Society of America* 101:578-589.
- Carter, G., Schoeppler, D., Manthey, M., Knörnschild, M., Denzinger, A. (2015). Playback response data for distress calls of a fast-flying bat (*Molossus molossus*) provoke inspection flights but not cooperative mobbing. *PLOS ONE* 10:1-15.
- Carter, G.G., Logsdon, R., Arnold, B.D., Menchaca, A., Medellín, R.A. (2012). Adult Vampire Bats Produce Contact Calls When Isolated: Acoustic Variation by Species, Population, Colony, and Individual. *PLoS ONE* 7:e38791.
- Carter, G. G., Wilkinson, G. S. (2013). Food sharing in vampire bats: reciprocal help predicts donations more than relatedness or harassment. *Proceedings of the Royal Society B* 280:20122573.
- Conover, M.R. (1987). Acquisition of predator information by active and passive mobbers in ring-billed gull colonies. *Behaviour*:41-57.
- Conover, M.R. (1994). Stimuli eliciting distress calls in adult passerines and response of predators and birds to their broadcast. *Behaviour* 131:19-37.
- Center for Conservation Bioacoustics (2011). Raven Pro: Interactive sound analysis software (Version 1.4) [Computer Software]. Ithaca, NY: The Cornell Lab of Ornithology.
- Cox, C.L., Rabosky, R.D. (2013). Spatial and temporal drivers of phenotypic diversity in polymorphic snakes. *The American Naturalist* 182:E40-E57.
- Endler, J.A., A.L Basolo. (1998). Sensory ecology, receiver biases and sexual selection. *TREE*, 13: 415-420.

- Engler, S., Knörnschild, M., Rose, A. (2017). Isolation call ontogeny in bat pups (*Glossophaga soricina*). *Behaviour* 154:267-286.
- Esbérard, C.E.L., Godoy, M.S.M., Renovato, L., Carvalho, W.D. (2017). Novel long-distance movements by Neotropical bats (Mammalia: Chiroptera: Phyllostomidae) evidenced by recaptures in southeastern Brazil. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, DOI: 10.1080/01650521.2016.1273751
- Ey, E., Fischer, J. (2009). The "Acoustic Adaptation Hypothesis" - a review of the evidence from birds, anurans and mammals. *Bioacoustics* 19:21-48.
- Fisher, R.A. (1930). The evolution of dominance in certain polymorphic species. *The American Naturalist* 64:385-406.
- Gower, J.C. (1966). Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. *Biometrika* 53:325-338.
- Henry, L., Barbu, S., Lemasson, A., Hausberger, M. (2015). Dialects in animals: evidence, development and potential functions. *Animal Behavior and Cognition* 2(2):132-135. DOI: 10.12966/abc.05.03.2015
- Hordijk, W., Altenberg, L. (2020). Developmental structuring of phenotypic variation: A case study with a cellular automata model of ontogeny. *Evolution & Development* 22:1-15.
- Hörmann, D., Tschapka, M., Rose, A., Knörnschild, M. (2020). Distress calls of nectarivorous bats (*Glossophaga soricina*) encode individual and species identity. *Bioacoustics* 30:253-271.
- Huang, X. et al. (2018). Acoustic similarity elicits responses to heterospecific distress calls in bats (Mammalia: Chiroptera). *Animal Behaviour* 146:143-154.
- Knörnschild, M., Helversen, O.V., Mayer, F. (2007). Twin siblings sound alike: isolation call variation in the noctule bat, *Nyctalus noctula*. *Animal Behaviour* 74:1055-1063.
- Kuhn, M. (2008). Building predictive models in R using the caret package. *Journal of Statistical Software* 28:1-26.
- Legendre, P., Anderson, M.J. (1999). Distance-based redundancy analysis: testing multispecies responses in multifactorial ecological experiments. *Ecological Monographs* 69:1-24.
- Leippert, D., Goymann, W., Hofer, H., Marimuthu, G., Balasingh, J. (2000). Roostmate communication in adult Indian false bats (*Megaderma lyra*): and

- indication of individuality in temporal and spectral pattern.. *Animal Cognition* 3:99-106.
- Leuchtenberger, C., Sousa-Lima, R., Ribas, C., Magnusson, W.E., Mourão, G. (2016). Giant otter alarm calls as potential mechanisms for individual discrimination and sexual selection. *Bioacoustics* 25:279-291.
- Lingle, S., Riede, T. (2014). Deer mothers are sensitive to infant distress vocalizations of diverse mammalian species. *The American Naturalist* 184:510-522.
- Lingle, S., Wyman, M.T., Kotrba, R., Teichroeb, L.J., Romanow, C.A. (2012). What makes a cry a cry? A review of infant distress vocalizations. *Current Zoology* 58:698-726.
- Linhart, P. et al. (2019). Measuring individual identity information in animal signals: Overview and performance of available identity metrics. *Methods in Ecology and Evolution* 10:1558-1570.
- Linhart, P., Šálek, M. (2017). The assessment of biases in the acoustic discrimination of individuals. *PLOS ONE* 12:e0177206.
- Lyra, R.B., Monteiro, L.R., Ruiz-Miranda, C.R. (2022). Song as a signal of male identity and quality in the Green-winged Saltator (*Saltator similis*). *The Wilson Journal of Ornithology* 134: In press.
- Medvin, M.B., Stoddard, P.K., Beecher, M.D. (1993). Signals for parent-offspring recognition: a comparative analysis of the begging calls of cliff swallows and barn swallows. *Animal Behaviour* 45:841-850.
- Mitani, J.C., Hunley, K.L., Murdoch, M.E. (1999). Geographic variation in the calls of wild chimpanzees: a reassessment. *American Journal of Primatology* 47:133--151.
- Morse, M.A., Balser, D.S. (1961). Fox calling as a hunting technique. *The Journal of Wildlife Management* 25:148-154.
- Podos, J. (2001). Correlated evolution of morphology and vocal signal structure in Darwin's finches. *Nature* 409:185-188.
- Podos, J., Nowicki, S. (2004). Beaks, adaptation and vocal evolution in Darwin's Finches. *BioScience* 54:501-510.
- Pollard, K.A., Blumstein, D.T. (2011). Social group size predicts the evolution of individuality. *Current Biology* 21:413-417.

- Pollard, K.A., Blumstein, D.T., Griffin, S.C. (2010). Pre-screening acoustic and other natural signatures for use in noninvasive individual identification. *Journal of Applied Ecology* 47:1103-1109.
- Rao, C.R. (1973). *Linear statistical inference and its applications*. New York, New York, USA: John Wiley & Sons.
- Russ, J., Jones, G., Mackie, I., Racey, P. (2004). Interspecific responses to distress calls in bats (Chiroptera: Vespertilionidae): a function for convergence in call design? *Animal Behaviour* 67:1005-1014.
- Scrucca, L. (2014). Graphical tools for model-based mixture discriminant analysis. *Adv Data Anal Classif* 8:147-165.
- Scrucca, L., Fop, M., Murphy, T.B., Raftery, A.E. (2016). mclust5: Clustering, Classification and Density Estimation Using Gaussian Finite Mixture Models. *The R Journal* 8:289-317.
- Smith-Vidaurre, G., Perez-Marrufo, V., Wright, T.F. (2021). Individual vocal signatures show reduced complexity following invasion. *Animal Behaviour* 179:15-39.
- Sun, C. et al. (2020). Geographical variation of social calls and vocal discrimination in male Himalayan leaf-nosed bats. *Animal Behaviour* 170:15-26.
- Taylor, A.M., Reby, D. (2010). The contribution of source-filter theory to mammal vocal communication research. *Journal of Zoology* 280:221-236.
- R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Vannoni, E., McElligott, A.G. (2007). Individual Acoustic Variation in Fallow Deer (*Dama dama*) Common and Harsh Groans: A Source-Filter Theory Perspective. *Ethology* 113:223-234.
- Velez, D.R. et al. (2007). A balanced accuracy function for epistasis modeling in imbalanced datasets using multifactor dimensionality reduction. *Genetic Epidemiology* 31:306-315.
- Venables, W.N., Ripley, B.D. (2002). *Modern applied statistics in S*. New York: Springer. 495 p.
- Wilkinson, G.S. (1984). Reciprocal food sharing in the vampire bat. *Nature* 308:181-184.

- Wilkinson, G.S. (1988). Reciprocal altruism in bats and other mammals. *Ethology and Sociobiology* 9:85-100.
- Wise, K.K., Conover, M.R., Knowlton, F.F. (1999). Response of coyotes to avian distress calls: testing the startle-predator and predator-attraction hypotheses. *Wildland Resources Faculty Publications* 136:935-949.

Capítulo 3 - Padrões evolutivos da variação acústica em chamados de distresse de morcegos filostomídeos

Resumo

Chamados de Distresse (CDs) são vocalizações observadas em contextos de aflição em diversos grupos taxonômicos, cuja funcionalidade primária é debatida. Em morcegos, é comum observar indivíduos de uma espécie responderem aos CDs de outra espécie. É possível que a sobreposição de parâmetros acústicos seja um dos fatores responsáveis por essa resposta heterospecífica. Diferentes causas podem gerar similaridades nos parâmetros acústicos de um som. Entre eles destacam-se a relação do tamanho e formato do trato vocal, representada pela Teoria da Fonte-Filtro; e a convergência devido a proximidades ecológicas entre as espécies filogeneticamente distantes entre si. Métodos filogenéticos comparativos adequam análises estatísticas ao histórico evolutivo das espécies por incorporar a não independência das espécies devido à história filogenética. O presente capítulo tem por objetivo comparar a variação acústica encontrada nos CDs de morcegos filostomídeos, levando em conta suas relações filogenéticas, morfológicas e comportamentais. Para 20 espécies, foram gravados CDs e obtidas medidas acústicas e morfométricas. O índice K de Blomberg mostrou sinal filogenético para variáveis acústicas e morfológicas. Foram conduzidas Análises de Redundância para avaliar a relação entre a variabilidade acústica e variáveis morfológicas e ecológicas. Em conjunto, os resultados indicam que há uma relação forte entre os parâmetros acústicos dos CDs e o tamanho corporal, mas não com a morfologia cefálica (folha nasal e orelhas). O contexto de forrageio não aparenta estar associado às características estruturais dos CDs, porém é possível que tais vocalizações indiquem a intencionalidade/emoção dos emissores.

Introdução

A resposta heteroespecífica aos Chamados de Distresse (CDs) é comum em morcegos (Russ *et al.*, 2004; Carter *et al.*, 2015). Tendo em vista seu uso em contextos relacionados à sobrevivência do emissor, tal resposta ampla

potencialmente beneficia indivíduos de cada uma das espécies que respondem entre si, possibilitando a manutenção do comportamento. Avaliar a estrutura acústica dos CDs pode ajudar a entender qual tipo de informação é transmitida, se tornando uma importante ferramenta para a compreensão de sua funcionalidade. Huang *et al.* (2018) sugerem que variáveis relacionadas à afinação das vocalizações, como as frequências fundamental e pico, podem estar relacionadas a respostas mais intensas entre espécies que apresentam proximidade nos parâmetros acústicos. Isto por sua vez pode ser decorrente de um uso próximo do Nicho Acústico (Krause, 1987).

É possível que aspectos ecológicos e comportamentais possuam alguma influência sobre a resposta e a estrutura acústica (Ey e Fischer, 2009). Uma hipótese ainda não testada é a de que espécies que forrageiam em recursos explosivos, como árvores de frutificação efêmera e explosiva – *Big bang* (Kalko *et al.*, 1996), respondem mais intensamente entre si devido à alta densidade de morcegos no local. Avaliar a relação entre a estrutura acústica e tais aspectos ecológico-comportamentais pode auxiliar o entendimento da funcionalidade dos Chamados de Distresse. Outro ponto importante é a possível relação entre a morfologia corporal e a estrutura acústica. Segundo a Teoria de Fonte-Filtro, a anatomia do trato vocal implicará restrições às características estruturais dos sons produzidos (Brittan-Powell *et al.*, 1997; Vannoni e McElligott, 2007; Taylor e Reby, 2010). Assim, espera-se que espécies que possuam características morfológicas parecidas compartilhem também similaridades nas estruturas acústicas de suas vocalizações. Em vocalizações de 252 espécies de Psittaciformes, Marcolin *et al.* (2022) encontraram um forte sinal entre os parâmetros acústicos e os tamanho corporal e seleção sexual, mas não com o tipo de ambiente e a complexidade social.

Uma característica comum aos filostomídeos é a presença da folha nasal. Tal estrutura possui forte relação com o principal tipo de recurso utilizado pelas espécies e a estrutura acústica de seus pulsos de ecolocalização (Jones e Teeling, 2006; Leiser-Miller e Santana, 2020; Leiser-Miller e Santana, 2021). A forma do feixe acústico, importante para um funcionamento adequado da ecolocalização, é influenciada pelo tamanho corporal e pela folha nasal (Jakobsen *et al.*, 2012). Numa avaliação de 12 famílias de morcegos não foram encontradas associações entre as características acústicas de pulsos de ecolocalização e

medições das orelhas e nariz, mas emissores nasais apresentaram frequências relativamente mais agudas do que os orais (Goudy-Trainor e Freeman, 2002). Ao avaliar as famílias Phyllostomidae e Rhinolophidae separadamente, o formato da folha nasal pode ter maior influência do que o tamanho corporal sobre os parâmetros acústicos (Bogdanowicz *et al.*, 1997; Leiser-Miller e Santana, 2021). Além disso, tal estrutura pode apresentar dois módulos em seu funcionamento, um associado à lança e outro à ferradura (Leiser-Miller e Santana, 2020). Nem todas espécies que apresentam folha nasal são emissoras nasais exclusivas (Gessinger *et al.*, 2021). Tais observações sugerem que a emissão oral e a nasal representam módulos diferentes do filtro e que a folha nasal atua como parte importante durante a produção sonora. Devido a isso, tal estrutura poderia influenciar as características estruturais de outras vocalizações, como os CDs.

Em conjuntos de dados comparativos, o histórico evolutivo compartilhado gera dependência entre as respostas de espécies filogeneticamente próximas. O tempo de divergência pode influenciar a distribuição das características (Paradis, 2012; Monteiro, 2013). Ou seja, a proximidade evolutiva pode influenciar à similaridade e funcionalidade primária dos CDs em certos grupos e também a resposta entre as espécies.

Assim sendo, o presente capítulo avalia a hipótese de que as características acústicas dos CDs variam de acordo com a morfologia corporal e ecologia de espécies de morcegos filostomídeos, se relacionando a aspectos de sua filogenia. Para tal, dois objetivos específicos podem ser estabelecidos: 1) Comparar a variação acústica entre as espécies; e 2) Avaliar o sinal filogenético e a relação entre morfologia, ecologia e estrutura acústica dos CDs. Tentou-se responder às seguintes perguntas sobre os CDs: 1) A variabilidade acústica e a morfologia corporal possuem relação com a filogenia?; 2) Existe relação entre as variáveis acústicas e as variáveis morfológicas; 3) Existe relação entre as variáveis acústicas e as variáveis ecológicas?

Metodologia específica

Áreas de trabalho e obtenção de dados

Diferentes localidades do Sudeste do Brasil foram amostradas. Os animais foram capturados e gravados na Reserva Biológica União (RJ), Reserva Natural Vale (ES), Reserva Biológica de Sooretama (ES), Reserva Ecológica Guapiaçu e no *campus* da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (RJ).

Após a captura em redes de neblina, os indivíduos foram transportados até uma estação de gravação fixa, consistindo de um microfone ultrasônico M500 (Pettersson Elektronik) conectado a um laptop. Após a gravação (500 KHz/s, 16 bits), foram obtidas as seguintes medidas morfométricas: comprimento do antebraço, massa corporal, comprimento, altura e largura da cabeça (na região pós-orbital), comprimento e largura da orelha e comprimento e largura da folha nasal. Tendo em vista que as taxas de recaptura em morcegos são baixas, essa etapa não contou com marcações individuais no patágio, a não ser para indivíduos de *A. lituratus*, pois estes foram incluídos nas análises de variação populacional (capítulo 2). Foram extraídas as médias dos parâmetros acústicos e morfológicos para 20 espécies de morcegos pertencentes à família Phyllostomidae. As variáveis acústicas utilizadas foram as frequências 5%, 95%, central e pico, o intervalo Interquartis de frequências, a entropia espectral e a duração 90%. Para a extração das variáveis acústicas foram usados todos os tipos estruturais de CDs descritos no Capítulo 1, com exceção à categoria de pulsos Complexos.

Análises estatísticas

Ao se comparar diferentes espécies é necessário levar em conta seu histórico evolutivo tendo em vista que, devido à ancestralidade comum, não é possível assumir com certeza a premissa de independência entre as mesmas (Paradis, 2012; Monteiro, 2013). A tendência de espécies apresentarem similaridades fenotípicas e ecológicas proporcionais ao tempo de divergência em relação ao último ancestral comum é chamada sinal filogenético (Blomberg *et al.*, 2003; Paradis, 2012; Monteiro, 2013). A variabilidade acústica associada a diferenças morfológicas e ecológicas foi analisada no contexto da árvore

filogenética para as espécies gravadas, obtida a partir dos tempos de divergência entre espécies, disponível no Time Tree of Life (www.timetree.org) (Kumar *et al.*, 2017) (Figura 1). Essa filogenia cobre 19 das 20 espécies aqui avaliadas. A única espécie não disponível foi *Lonchophylla peracchii*, para a qual foram utilizadas as informações de outra espécie do mesmo gênero: *L. mordax*. Variáveis (guilda e disponibilidade de recursos) foram obtidas na literatura (Giannini e Kalko, 2004; Monteiro e Nogueira, 2011; Stevens, 2021) separando as espécies em grupos de similaridade ecológica. A guilda alimentar foi dividida entre Frugívoros de sub-bosque, Frugívoros de dossel, Nectarívoros, Animalívoros e Sanguívoros. A variável disponibilidade do recurso dividiu os grupos que dependem de recursos esparsos - alimentos que se encontram distribuídos pelo ambiente, sem altas concentrações em um único local, portanto não gerariam uma atração de muitos indivíduos simultaneamente; ou explosivos (*big bang* – Kalko *et al.*, 1996) - em que há grande disponibilidade de recursos em um mesmo local ao mesmo tempo, causando altas densidades de morcegos.

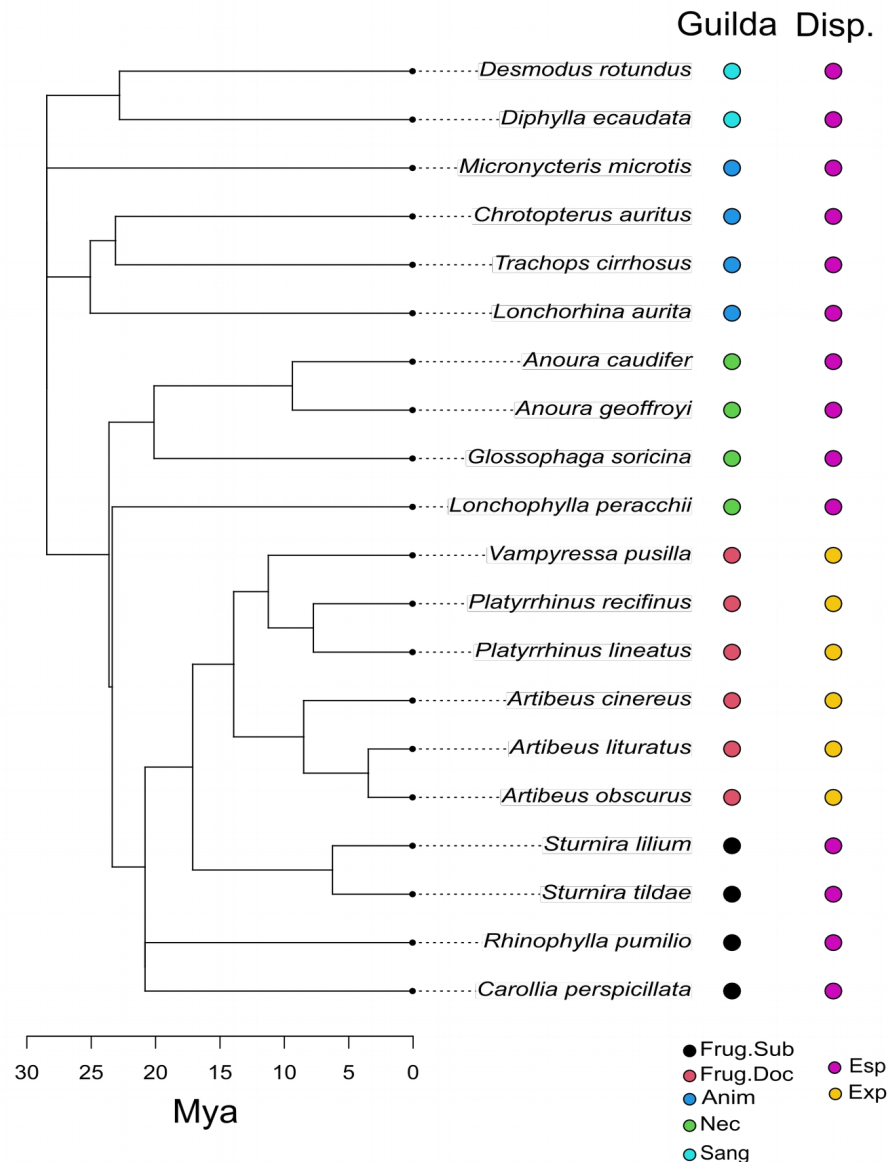


Figura 1. Árvore filogenética das espécies do presente estudo. A escala abaixo da árvore mostra o tempo em milhões de anos. A distribuição das variáveis ecológicas Guilda e Disponibilidade de recursos (Disp.) é mostrada com cores de acordo com os níveis dos fatores, cuja legenda se encontra abaixo de cada fator. As categorias de guilda são frugívoro de sub-bosque (Frug.Sub), frugívoro de dossel (Frug. Doc), animalívoro (Anim), nectarívoro (Nec) e hematófago (Sang). Os níveis de disponibilidade são esparsos (Esp.) e explosivos (Exp.), sendo estes últimos geralmente associados à frutificação de figueiras.

O índice K de Blomberg foi calculado para avaliar o sinal filogenético de todas as variáveis (Blomberg *et al.*, 2003). Valores de K igual a 1 indicam que a distribuição da variável em questão é similar ao esperado em um modelo Browniano, em que a similaridade entre espécies é proporcional ao tempo de divergência. Valores superiores a 1 indicam maior similaridade entre as espécies

do que o esperado em um modelo Browniano, possivelmente relacionado a ocorrência de restrições evolutivas ao longo do tempo; enquanto os valores de K inferiores a 1 indicam que espécies próximas são menos similares do que o esperado pelo modelo Browniano. É importante ressaltar, no entanto, que os valores de K observados não podem ser diretamente interpretados como evidências de processos evolutivos, pois vários processos diferentes podem gerar valores de K similares (Revell *et al.*, 2008). Um teste foi realizado, permutando as observações entre os ramos finais da árvore e recalculando o valor de K. Foi possível então comparar o K observado com uma distribuição de valores de K permutados e sem expectativa de sinal filogenético. Para comparar os valores de K obtidos com uma distribuição esperada de acordo com o modelo de movimento Browniano para a filogenia utilizada neste estudo, foram realizadas 1000 simulações aleatórias de distribuições de caracteres contínuos ao longo da filogenia, utilizando um modelo Browniano (função `rTraitCont`, no pacote `ape`) (Paradis 2012). A distribuição dos K esperados foi utilizada como parâmetro de comparação para os K observados para cada variável.

Eixos de maior variação foram obtidos a partir de Análises de Componentes Principais Filogenéticos (pPCA – Revell, 2009) para avaliar a ordenação das espécies com base em variáveis acústicas e morfológicas. A pPCA corresponde a uma rotação do espaço de variáveis originais, diferente do PCA comum, pois é realizada uma “correção” da dependência filogenética, de modo que a variabilidade dentro das linhagens filogeneticamente mais próximas possui maior peso (Polly *et al.*, 2013). No cálculo do pPCA, o comprimento dos ramos da árvore foi modificado de acordo com o parâmetro Lambda, estimado por máxima verossimilhança, que permite maior flexibilidade com relação ao modelo evolutivo e à intensidade do sinal filogenético assumido na análise (Revell, 2009). A árvore filogenética foi sobreposta à ordenação dos componentes principais para uma visualização da relação entre a ordenação e a similaridade filogenética (*Phylomorphospace*) (Sidlauskas, 2008).

A relação entre as variáveis acústicas, morfométricas e ecológicas foi avaliada através de Análises de Redundância Parcial Baseadas em Distância (dbRDA) (Legendre e Legendre, 2012). A diferença entre a dbRDA simples (Capítulo 2) e a dbRDA parcial consiste no fato de que a última utiliza variáveis condicionantes, de modo que as associações entre a matriz resposta e matriz de

variáveis independentes são parciais em relação às variáveis condicionantes. Para condicionar as análises em relação à filogenia, calculamos coordenadas principais (CorP) da matriz de distâncias filogenéticas (tempos de divergência entre pares de espécies) e utilizamos os vetores da CorP na análise, como condicionantes. Uma análise similar à regressão de vetores filogenéticos proposta por Diniz-Filho *et al.* (1998). Desta maneira, as distâncias entre espécies baseadas nas variáveis acústicas foram associadas às variáveis morfológicas, condicionadas pelas distâncias filogenéticas. Testes de permutação foram realizados para avaliar o suporte estatístico dos eixos da análise de redundância e dos termos (variáveis morfológicas) (Legendre *et al.*, 2011). A proporção da variação acústica explicada pelos diferentes termos do modelo foi estimada pela análise de partição de variâncias (Borcard *et al.*, 1992; Borcard *et al.*, 2011). O mesmo processo foi repetido para outros dois modelos onde a matriz de distâncias acústicas foi novamente a dependente e o comprimento do antebraço (representando o tamanho corporal), com 1) a dieta de cada espécie; e 2) a disponibilidade do recurso como variáveis independentes, e os vetores filogenéticos como condicionantes.

Resultados

Sinal filogenético

A Tabela 1 apresenta os valores encontrados para o índice K e a probabilidade obtida no teste de permutação das variáveis acústicas e morfológicas. As variáveis acústicas Frequência Central, Frequência 95%, Frequência Pico e Duração 90% apresentaram resultados significativos com valores de K inferiores a 1. Já a variável acústica Frequência 5% e as variáveis morfológicas referentes às folha nasal e orelha, assim como o comprimento do antebraço apresentaram resultados também significativos com valores de $K > 1$.

Tabela 1 - Resultados encontrados para o índice K de Blomberg e para o teste de permutação das variáveis acústicas e morfométricas. IIF – Intervalo Interquartil de Frequências.

Variável	K	P
----------	---	---

Frequência Central	0,9227904	0,028
Frequência 5%	1,2854779	0,006
Frequência 95%	0,9187171	0,018
Intervalo Interquartis de Frequência	0,7611638	0,203
Frequência Pico	0,9135023	0,035
Duração 90%	0,9932790	0,045
Entropia Espectral	0,6305196	0,399
Massa corporal	0,7220956	0,339
Comprimento do antebraço	0,9074922	0,054
Comprimento da cabeça	0,6773836	0,362
Largura da cabeça	0,7627046	0,165
Altura da cabeça	0,8384430	0,086
Altura da folha nasal	1,2044355	0,012
Largura da folha nasal	1,1763454	0,005
Altura da orelha	1,3780890	0,002
Largura da orelha	1,5038941	0,002

A simulação de caracteres contínuos por movimento Browniano na filogenia das espécies estudadas, mostrou que a expectativa do valor de K segundo este modelo é relativamente ampla, com um intervalo de confiança de 95% (baseado nos percentis de 2,5 e 97,5 da distribuição de 1000 simulações) entre 0,595 e 1,776, sendo a mediana igual a 0,937, e os quartis inferior e superior 0,805 e 1,119, respectivamente. Desta maneira, todos os valores de K observados na Tabela 1 são estatisticamente compatíveis com o modelo de movimento Browniano, sendo que os valores com P altos são também compatíveis com um modelo de variação aleatória dos caracteres, sem considerar a filogenia, o que sugere falta de poder estatístico para diferenciar entre as hipóteses. A comparação da distribuição de valores de K simulados com os observados para os diferentes grupos de variáveis (Figura 2) sugere, no entanto, que as variáveis acústicas e relacionadas ao tamanho corporal tendem a apresentar valores abaixo da mediana, ao passo que as variáveis relacionadas à folha nasal e orelhas tendem a apresentar valores acima do quartil superior.

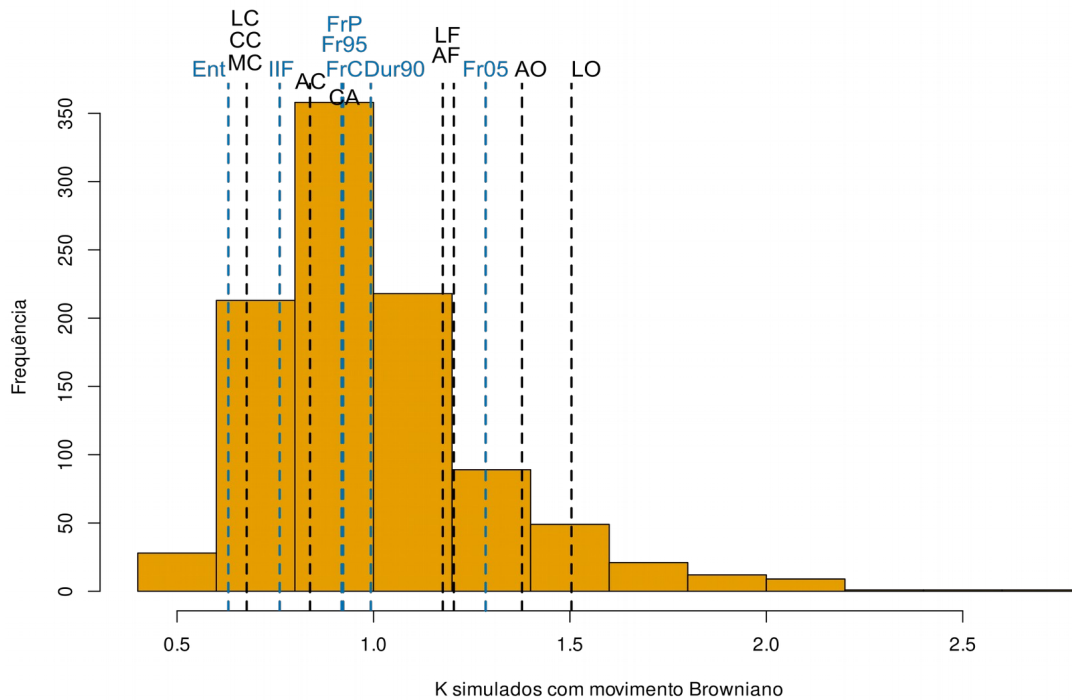


Figura 2. Histograma com a distribuição de 1000 valores da estatística K para simulações da evolução de caracteres quantitativos na filogenia das espécies estudadas. As linhas tracejadas verticais indicam a posição dos valores observados para variáveis acústicas (azul) e variáveis morfológicas (preto). As abreviações são: CA - comprimento do antebraço, MC – massa corporal, CC - comprimento da cabeça, LA - largura da cabeça, AC - altura da cabeça, AF - altura da folha nasal, LF - largura da folha nasal, AO - altura da orelha, LO - largura da orelha, FrC - frequência central, Fr5 - frequência 5%, Fr95 - frequência 95%, FrP - frequência pico, IIF - Intervalo Interquartil de Frequência, Dur90 - duração 90%, Ent - entropia espectral.

Variação acústica e morfológica

Grande parte da variabilidade observada pelo modelo da pPCA para as variáveis acústicas foi encontrada nos dois primeiros componentes principais (pPC1 = 62%; pPC2 = 22%; Total = 84%). A Tabela 2 mostra a contribuição das variáveis acústicas nos dois primeiros pPCs. Todas as variáveis apresentam o mesmo sinal no primeiro componente principal, com exceção da duração, ao passo que o segundo componente representa um contraste entre as variáveis de frequência, com sinal negativo (exceção da Frequência 95%), e as demais variáveis com sinal positivo, com destaque para entropia e duração. A Figura 3 apresenta a distribuição das espécies no filomorfoespaço de acordo com a influência das variáveis acústicas para os dois primeiros pPCs. O primeiro eixo ordena o ramo dos Stenodermatinae + Desmodontinae na direção positiva,

enquanto os demais se agrupam na direção oposta, com destaque para *G. soricina* no extremo negativo. O segundo componente ordena espécies de diferentes ramos em extremos opostos, como as espécies de *Artibeus* + *Chrotopterus* (que têm maior tamanho corporal) no extremo negativo, associados com maiores valores de intervalos interquartis de frequência, enquanto *Desmodus*, *A. cinereus* e *Sturnira* se ordenam no extremo positivo, com maior entropia e duração.

Tabela 2 - Coeficientes das variáveis acústicas nos dois primeiros componentes principais (pPCs) da Análise dos Componentes Principais Filogenética avaliando a variabilidade acústica em chamados de distresse de morcegos filostomídeos. No primeiro eixo (pPC1), todas as variáveis atuaram no mesmo sentido, com exceção à Duração 90%.

Variável	pPC1	pPC2
Frequência Central	-0,9457187	-0,1137614
Frequência 5%	-0,8873381	-0,2382326
Frequência 95%	-0,9645459	0,1504318
Intervalo Interquartis de Frequência.	-0,7432194	0,4284930
Frequência Pico	-0,9000711	-0,2086255
Duração 90%	0,4268886	0,7368918
Entropia Espectral	-0,4254907	0,8408290

interpretado como tamanho geral, pois todas as variáveis morfológicas apresentam coeficientes com o mesmo sinal e magnitudes similares. O segundo componente representa um contraste entre as variáveis associadas ao tamanho do corpo e da cabeça (coeficientes negativos) e variáveis associadas à folha nasal e orelha (coeficientes positivos). A Figura 4 apresenta a ordenação das espécies no filomorfoespaço dos dois primeiros PCs. O primeiro componente apresenta espécies de tamanhos contrastantes nos extremos, com *Chrotopterus* no extremo positivo e a linhagem dos Glossophaginae + *Micronycteris* e *Rhinophylla* no extremo negativo. O segundo eixo ordena espécies com folhas nasais e orelhas maiores no extremo positivo, com destaque para *Lonchorhina* e outros Phyllostominae, enquanto as espécies com menores folhas nasais e orelhas relativas ao tamanho da cabeça se ordenam no extremo negativo, como os Desmodontinae e Glossophaginae. É possível que as espécies extremas como *L. aurita*, *Desmodus rotundus* e *Diphylla ecaudata* sejam responsáveis pela forte influência da altura da folha nasal no segundo eixo, sugerindo cautela na interpretação dos resultados para essa variável.

Tabela 3 - Coeficientes das variáveis morfométricas nos dois primeiros componentes principais (pPCs) da Análise dos Componentes Principais Filogenética.

Variável	pPC1	pPC2
Comprimento do antebraço	0,9460640	-0,2540606
Comprimento da cabeça	0,8813587	-0,3699283
Largura da cabeça	0,9078894	-0,2748780
Altura da cabeça	0,9256934	-0,3280500
Altura da folha nasal	0,5789280	0,7465264
Largura da folha nasal	0,9343388	0,1739141
Altura da orelha	0,8858829	0,3446147
Largura da orelha	0,8909310	0,2465528

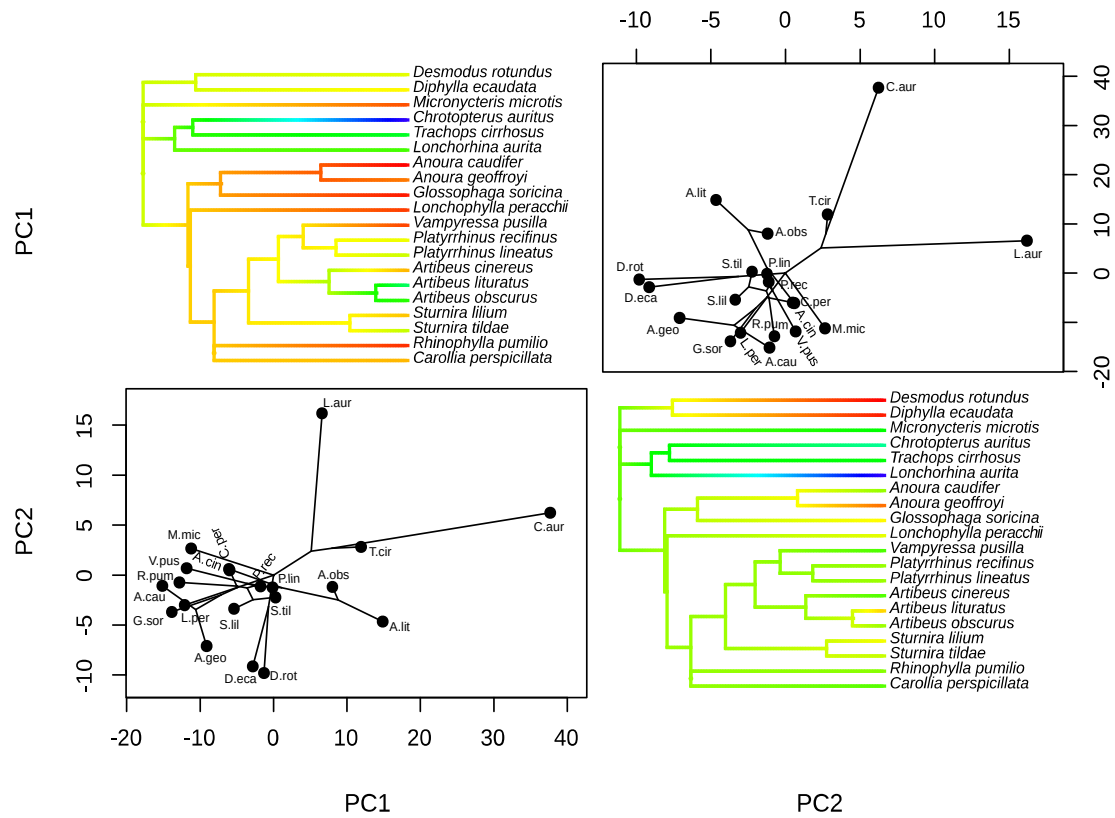


Figura 4. Diagramas de dispersão com ordenação dos dois primeiros componentes principais filogenéticos das variáveis morfométricas e árvores filogenéticas com mapeamento dos escores dos componentes principais. As linhas conectando espécies na ordenação correspondem ao mapeamento da filogenia no espaço dos PCs (filomorfoespaço). As abreviações das espécies no diagrama de ordenação seguem o padrão com a primeira letra do gênero e as três primeiras do epíteto específico. A escala de cores representa a proximidade morfológica entre as espécies.

Relações entre variáveis acústicas, morfométricas e ecológicas

O modelo gerado pela dbRDA avaliando a relação entre as variáveis acústicas e morfométricas, condicionado pelos vetores filogenéticos explicou 21,26% da variação acústica dos CDs. A fração da variância devida apenas aos vetores filogenéticos correspondeu a 24,47% do total, enquanto a combinação de variáveis morfométricas e vetores filogenéticos explicou um total de 69,44% do total. O primeiro eixo sozinho foi responsável por 68% da variação explicada pelo modelo, e foi o único com suporte estatístico nos testes de permutação ($F = 21,93$; $P = 0,06019$). O teste de permutação indicou também que apenas a variável comprimento do antebraço apresentou suporte estatístico ($F = 11,81$; $P = 0,002799$). A variável largura da folha nasal apresentou um suporte moderado ($F = 3,15$; $P = 0,09818$). A associação das variáveis morfométricas e acústicas com o primeiro eixo da dbRDA1 pode ser vista na Tabela 4. Todas as variáveis morfológicas e acústicas apresentam sinais iguais, indicando que diferenças de tamanho corporal organizam a variabilidade acústica restrita pelas variáveis morfológicas.

Tabela 4 - Coeficientes das variáveis morfométricas e acústicas no primeiro eixo (dbRDA1) da Análise de Redundância Filogenética avaliando a relação entre variáveis acústicas e morfométricas em morcegos filostomídeos. Os coeficientes das variáveis acústicas foram obtidos por correlações com os escores do eixo.

Variáveis morfométricas	dbRDA1
Comprimento do antebraço	0.4948
Comprimento da cabeça	0.5870
Largura da cabeça	0.4795
Altura da cabeça	0.4897
Altura da folha nasal	0.2401
Largura da folha nasal	0.3908
Altura da orelha	0.3363
Largura da orelha	0.3026
Variáveis Acústicas	
Frequência Central	-0.5520084
Frequência 5%	-0.3506925
Frequência 95%	-0.633741
Intervalo Interquartil de Frequência	-0.6753470
Frequência Pico	-0.5080197
Duração 90%	-0.1059949
Entropia Espectral	-0.6694337

Foi detectada colinearidade entre as variáveis ecológicas categóricas (guilda alimentar e disponibilidade de recurso). Desta maneira, modelos diferentes foram ajustados associando a variação acústica dos CDs ao comprimento do antebraço mais guilda e disponibilidade de recurso. O modelo gerado pela dbRDA avaliando a relação das variáveis acústicas com o comprimento do antebraço e guilda, condicionado pelos vetores filogenéticos explicou 30,80% da variação acústica dos CDs. A combinação de variáveis morfométricas e vetores filogenéticos explicou um total de 78,72% do total. O primeiro eixo foi responsável por 71,87% da variação explicada pelo modelo, com considerável suporte estatístico ($F = 23,75$; $P = 0,000999$). O segundo eixo foi responsável por 15% da variação explicada, com menos suporte estatístico ($F = 4,95$, $P = 0,09598$). O teste de permutação por termos indicou que o tanto o comprimento do antebraço ($F = 16,97$; $P = 0,0002$) quanto a guilda ($F = 4,0177$, $P = 0,0134$) apresentaram suporte estatístico. A associação das variáveis com os eixos da dbRDA pode ser vista na Tabela 5. Os dois eixos apresentam uma forte relação com o comprimento do antebraço. A relação dos contrastes das guildas com os eixos é menos pronunciada, principalmente contrastando nectarívoros com frugívoros (de sub-bosque no primeiro eixo e de dossel no segundo eixo). Todas as variáveis acústicas apresentam coeficientes com o mesmo sinal no primeiro eixo, mas a duração apresenta um coeficiente de magnitude bem abaixo dos demais, sendo melhor representada no segundo eixo, junto com a entropia, em contraste de sinais com as variáveis de frequência. O modelo dbRDA com comprimento do antebraço e disponibilidade de recursos não apresentou suporte estatístico para o termo de disponibilidade ($F = 0,6634$, $P = 0,5505$) e não foi explorado nos resultados, já que a relação com o comprimento do antebraço já se encontra nos modelos anteriores.

Tabela 5 – Contribuição das variáveis no primeiro eixo (dbRDA1) da Análise de Redundância Baseada em Distância Filogenética avaliando a relação entre variáveis acústicas, tamanho do antebraço e tipo principal de recurso em morcegos filostomídeos.

Variáveis	dbRDA1	dbRDA2
Comprimento do antebraço	0,48214	0,234709
AlimentoSangue	0,00557	-0,007601
AlimentoFrug.topo	-0,03076	-0,020719
AlimentoFrug.sub	0,07070	-0,034458
AlimentoNec	-0,04875	0,076390
Variáveis acústicas		
Frequência Central	-0.57310	0,18842
Frequência 5%	-0.37053	0,21843
Frequência 95%	-0.63889	-0,01679
IIF	-0.66176	-0,21189
Frequência Pico	-0.52406	0,13988
Duração 90%	-0.072318	-0,44412
Entropia Espectral	-0.642813	-0,44561

Discussão

Sinal Filogenético

Todos os valores de K observados para as variáveis acústicas e morfométricas foram compatíveis com a distribuição de K gerada por movimento Browniano para a filogenia deste estudo. As variáveis Entropia, Intervalo Interquartis de Frequência, Largura da Cabeça, Comprimento da Cabeça, Massa Corporal e Altura da Cabeça apresentaram valores de K compatíveis com a hipótese nula de diferenças aleatórias em relação à filogenia, mas ao mesmo tempo também compatíveis com o modelo Browniano. Esta falta de poder estatístico pode estar relacionada ao pequeno número de espécies na filogenia e à sensibilidade das estatísticas de sinal filogenético ao tamanho das amostras (Münkemüller *et al.*, 2012). As variáveis acústicas Duração 90%, Frequência Central, Frequência 95% e Frequência Pico apresentaram valores de K muito próximos da expectativa mediana da distribuição de K simulada e resultados significativos nas permutações. Assim, para tais parâmetros, pode-se dizer que o

sinal filogenético é forte. Este sinal é compatível com a hipótese de que a resposta heteroespecífica a CDs ocorra entre indivíduos de espécies distintas devido a uma sobreposição das características acústicas, ocasionando ausência de indícios acústicos sobre identidade (Huang *et al.*, 2018).

As variáveis associadas com tamanho corporal e as variáveis acústicas de frequência (excluindo a Frequência 5%) apresentaram valores de K similares, o que pode derivar de uma relação linear negativa entre o tamanho corporal e as frequências produzidas pelos animais (Pye, 1979; Fletcher, 2004; García *et al.*, 2014). As medidas da orelha e folha nasal apresentaram valores de K acima do quartil superior da distribuição de K simulados, ainda dentro dos valores esperados pelo modelo Browniano, mas indicando uma tendência diferente das demais variáveis. Isso indica que o tamanho e/ou forma dessas estruturas é mais similar entre as espécies do que o esperado por proximidade filogenética, provavelmente devido à ocorrência de picos adaptativos que restringem a variabilidade ao longo do tempo evolutivo (Blomberg *et al.*, 2003). Existem relações conhecidas entre o tipo de recurso utilizado, a estrutura acústica dos pulsos de ecolocalização e a estrutura da folha nasal e orelhas (Bogdanowicz *et al.*, 1997; Jones e Teeling, 2006; Leiser-Miller e Santana, 2020; Leiser-Miller e Santana, 2021). Tal relação pode ser a responsável por configurar os picos adaptativos sugeridos, diferenciando os padrões evolutivos da morfologia da folha nasal e orelhas, dos padrões de tamanho e acústica dos CDs.

Tamanho corporal e variação acústica dos CDs

O PC1 da pPCA para as variáveis acústicas apresentou forte influência dos parâmetros de Frequência. Com exceção à duração 90%, todas variáveis atuaram na mesma direção. É possível agrupar espécies com base na similaridade dos parâmetros acústicos segundo os PCs da pPCA (Figura 1). No pPC1 podem ser observados três grupos: o grupo 1 é composto por *Desmodus rotundus*, *Artibeus lituratus* e *A. obscurus*; o grupo 2 por *Platyrrhinus recifinus* com *P. lineatus*, *Sturnira Tildae*, *S. liliium*, *Diphylla ecaudata* e *Lonchorina aurita*; por fim, o grupo 3 apresenta *Micronycteris microtis*, *Anoura caudifer*, *A. geoffroyi*, *Rhinophylla pumilio* e *Carollia perspicillata*. Interessantemente, os três grupos aparentam representar proximidades no comprimento do antebraço de seus integrantes. As espécies *Glossophaga soricina*, *Trachops cirrhosus* e

Chrotopterus auritus não foram agrupadas com nenhuma outra. É possível que *G. soricina* tenha sido isolada pois apresenta frequências muito agudas, especialmente quanto às suas frequências mais graves (Frequência 5% - Capítulo 1). As variáveis morfométricas apresentaram sinais iguais nos coeficientes do pPC1 e os grupos formados pelas espécies reforçam similaridades no tamanho corporal, corroborando o descrito acima.

O primeiro eixo da dbRDA mostrou uma relação entre as variáveis acústicas e morfométricas que corrobora essa associação entre estrutura acústica e tamanho corporal. As variáveis de tamanho do corpo e cabeça apresentaram as maiores contribuições ao primeiro eixo dbRDA. As medidas referentes à orelha e à folha nasal apresentaram menor influência. Segundo o teste de permutação, apenas o comprimento do antebraço aparenta possuir influência significativa sobre a variabilidade acústica, provavelmente por ser colinear com as demais variáveis neste nível interespecífico.

Emissão oral vs nasal

No modelo dbRDA contendo variáveis acústicas e morfológicas o tamanho corporal se mostrou como o principal fator explicando a relação entre esses dois conjuntos de dados no dbRDA1. Apesar do segundo componente principal das variáveis morfológicas ter mostrado um contraste entre tamanho do corpo e cabeça versus tamanho das orelhas e folha nasal, não foi observada uma relação destas últimas variáveis com a variação acústica interespecífica dos CDs.

Em Phyllostomidae há uma possível relação entre as características acústicas dos pulsos de ecolocalização e a anatomia da folha nasal (Leiser-Miller e Santana, 2020). Leiser-Miller e Santana (2021) avaliaram a relação entre o comprimento do antebraço e diferentes variáveis acústicas em pulsos de ecolocalização durante a soltura de morcegos filostomídeos. Seus resultados mostram uma relação negativa significativa fraca entre o comprimento do antebraço e as frequências agudas, porém não significativa com a duração, o número de harmônicas, a taxa de varredura (*sweep rate*) e com as frequências grave e pico. Com base nesses resultados foi sugerido que em Phyllostomidae as características acústicas dos pulsos de ecolocalização podem ser melhor preditas por fatores relacionados ao trato vocal e à morfologia da folha nasal do que pelo

tamanho corporal. Resultados similares foram também observados na família Rhinolophidae (Bogdanowicz, 1992).

A ausência de relação entre variação acústica dos CDs e a forma das folha nasal e orelha pode ser devido a uma dissociação evolutiva entre as demandas funcionais para ecolocalização e a produção dos CDs. Durante a emissão sonora, é possível que hajam quatro módulos independentes atuando em conjunto, refletidos na boca (Gessinger *et al.*, 2021), orelhas (Kuc, 2010) e nas lâncas e ferraduras da folha nasal (Leiser-Miller e Santana, 2020). Nossos resultados sugerem que a boca é possivelmente o único módulo atuante durante a emissão de CDs. Nesse contexto, o tamanho corporal é o principal fator a influenciar a variação acústica, e o “filtro” morfológico representado pelas folha nasal e orelha teria pouca ou nenhuma influência sobre a estrutura acústica dos CDs.

Possíveis relações ecológicas e funcionais dos CDs

No modelo dbRDA gerado para o tamanho corporal e guilda, a contribuição das variáveis acústicas para o primeiro eixo reforça a relação negativa entre tamanho corporal e frequências produzidas (Pye, 1979; Fletcher, 2004; García *et al.*, 2014), além de destacar uma possível influência da guilda alimentar. A ANOVA para os eixos da dbRDA apresentou resultado significativo apenas para o primeiro eixo, sobre o qual somente o comprimento do antebraço aparenta ter forte influência, reforçando mais uma vez que o principal fator atuante sobre a variação acústica dos CDs é o tamanho do emissor. Tanto o tamanho corporal quanto a guilda alimentar apresentaram suporte estatístico nos testes de permutação. Há uma possível relação entre os recursos utilizados pelas diferentes espécies, a anatomia da folha nasal e as características acústicas dos pulsos de ecolocalização, especialmente em filostomídeos (Bogdanowicz *et al.*, 1997; Leiser-Miller e Santana, 2020; Leiser-Miller e Santana, 2021). No entanto, apesar do suporte estatístico, a relação entre a estrutura acústica dos CDs e os contrastes entre guildas não é muito clara, e pode ser resultado de um padrão de divergência associado a espécies atípicas, como é o caso de *G. soricina*. Vale a pena destacar que esta é uma espécie generalista quando comparado a outros morcegos nectarívoros, se alimentando de frutos e insetos com frequência (Herrera *et al.*, 2001; Rodríguez-Peña *et al.*, 2007; Clare *et al.*, 2014). É possível

que esse aspecto da ecologia de *G. soricina* esteja relacionado à sua influência sobre o modelo dbRDA, através de uma relação ainda não compreendida.

O segundo componente da pPCA (PCA2) para as variáveis acústicas é influenciado principalmente pela duração 90%, entropia espectral e pelo Intervalo Interquartis de Frequências, com um padrão de ordenação das espécies parcialmente determinado pelo tamanho corporal, com a ressalva da posição extrema de *D. rotundus*, que apresenta chamados longos e ruidosos quase exclusivamente (Capítulo 1). Segundo as Regras de Motivação Estrutural de Morton (Morton, 1977), vocalizações emitidas em contextos agonísticos tendem a apresentar características mais ásperas e com maior ocupação de banda do que as emitidas em contextos não-agonísticos, ou seja, maiores valores do Intervalo Interquartis de Frequência e da entropia espectral. A importância dessas variáveis no pPCA2 corrobora a hipótese de que os CDs podem representar a intencionalidade/motivação do emissor, reforçando a necessidade de avaliar a funcionalidade das diferentes categorias estruturais presentes entre e dentre as espécies (Capítulo 1).

Se a hipótese acima for verdadeira, o comportamento vocal das espécies emissoras pode variar de acordo com o contexto do forrageio. Assim, características como a disponibilidade do recurso e o número potencial de ouvintes, entre outras, podem ter relação com a variabilidade acústica dos CDs e sua funcionalidade em espécies distintas. A disponibilidade de recursos não apresentou relação com a variação acústica dos CDs em nossos dados. Esse resultado é contrário à hipótese de que as diferenças estruturais encontradas nos CDs se relacionam aos contextos comportamentais do forrageio, porém não excluem a hipótese de que a variabilidade encontrada possui funcionalidades diversas. Assim, o fator determinante para a similaridade entre as espécies parece ser a influência da filogenia sobre o tamanho corporal. Nossos resultados estão de acordo com os encontrados em Psittaciformes, onde o tamanho corporal e a seleção sexual, mas não o ambiente e a complexidade social, apresentaram relação com a estrutura acústica das vocalizações (Marcolin *et al.*, 2022). Vale ressaltar que é possível que nossas variáveis ecológicas e acústicas não sejam capazes de sumarizar o sinal biológico associado aos CDs. Assim, mais estudos endereçados à variabilidade acústica dos CDs e, especialmente, suas possíveis

relações ecológicas e funcionais devem ser conduzidos para avaliar tais questões.

Referências Bibliográficas

- Blomberg, S.P., Garland, T., Ives, A.R. (2003). Testing for phylogenetic signal in comparative data: behavioral traits are more labile. *Evolution* 57:717-745.
- Bogdanowicz, W. (1992). Phenetic relationships among bats of the family Rhinolophidae. *Acta Theriologica* 37:213-240.
- Bogdanowicz, W., Csada, R.D., Fenton, M.B. (1997). Structure of noseleaf, echolocation, and foraging behavior in the Phyllostomidae (Chiroptera). *Journal of Mammalogy* 78:942-953.
- Borcard, D., Gillet, F., Legendre, P. (2011). *Numerical ecology with R*. New York : Springer.
- Borcard, D., Legendre, P., Drapeau, P. (1992). Partialling out the Spatial Component of Ecological Variation. *Ecology* 73:1045-1055.
- Brittan-Powell, E.F., Dooling, R.J., Larsen, O.N., Heaton, J.T. (1997). Mechanisms of vocal production in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *The Journal of the Acoustical Society of America* 101:578-589.
- Carter, G., Schoeppler, D., Manthey, M., Knörnschild, M., Denzinger, A. (2015). Playback response data for distress calls of a fast-flying bat (*Molossus molossus*) provoke inspection flights but not cooperative mobbing. *PLOS ONE* 10:1-15.
- Clare, E.L., Goerlitz, H.R., Drapeau, V.A., Holderied, M.W., Adams, A.M., Nagel, J., Dumont, E.R., Hebert, P.D.N., Fenton, M.B. (2014). Trophic niche flexibility in *Glossophaga soricina*: how a nectar seeker sneaks an insect snack. *Functional Ecology* 28:632-641.
- Diniz-Filho, J.A.F., de Sant'Ana, C.E.R., Bini, L.M. (1998). An eigenvector method for estimating phylogenetic inertia. *Evolution* 52:1247-1262.
- Ey, E., Fischer, J. (2009). The "Acoustic Adaptation Hypothesis" - a review of the evidence from birds, anurans and mammals. *Bioacoustics* 19:21-48.
- Fletcher, N.H. (2004). A simple frequency-scaling rule for animal communication. *The Journal of the Acoustical Society of America* 115:2334-2338.

- García, N.C., Barreira, A.S., Kopuchian, C., Tubaro, P.L. (2014). Intraspecific and interspecific vocal variation in three Neotropical cardinalids (Passeriformes: Fringillidae) and its relationship with body mass. *Emu* 114:129-136.
- Gessinger, G., Page, R., Wilfert, L., Surlykke, A., Brinkløv, S., Tschapka, M. (2021). Phylogenetic Patterns in Mouth Posture and Echolocation Emission Behavior of Phyllostomid Bats. *Frontiers in Ecology and Evolution* 9.
- Giannini, N.P., Kalko, E.K.V. (2004). Trophic structure in a large assemblage of phyllostomid bats in Panama. *Oikos* 105:209-220.
- Goudy-Trainor, A., Freeman, P.W. (2002). Call parameters and facial features in bats: a surprising failure of form following function. *Acta Chiropterologica* 4:1-16.
- Herrera, L.G.M., Hobson, K.A., Mirón, L.M., Ramírez, N.P., Méndez, G.C, Sánchez-Cordero, V. (2001). Sources of protein in two species of phytophagous bats in seasonal dry forest: evidence from stable-isotope analysis. *Journal of Mammalogy* 82(2):352-361.
- Huang, X. et al. (2018). Acoustic similarity elicits responses to heterospecific distress calls in bats (Mammalia: Chiroptera). *Animal Behaviour* 146:143-154.
- Jakobsen, L., Ratcliffe, J.M., Surlykke, A. (2012). Convergent acoustic field of view in echolocating bats. *Nature* 493:93-96.
- Jones, G., Teeling, E. (2006). The evolution of echolocation in bats. *Trends in Ecology & Evolution* 21:149-156.
- Kalko, E.K.V., Herre, E.A., Handley, C.O. (1996). Relation of fig fruit characteristics to fruit-eating bats in the New and Old World tropics. *Journal of Biogeography* 23:565-576.
- Krause, B. (1987). Bioacoustics, habitat ambience in ecological balance. *Whole Earth Review*:14-18.
- Kuc, R. (2010). Morphology suggests noseleaf and pinnae cooperate to enhance bat echolocation. *The Journal of the Acoustical Society of America* 128:3190-3199.
- Kumar, S., Stecher, G., Suleski, M., Hedges, S.B. (2017). TimeTree: a resource for timelines, timetrees, and divergence times. *Molecular Biology and Evolution* 34:1812-1819.

- Legendre, P., Legendre, L. (2012). *Numerical Ecology*. Amsterdam : Elsevier.
- Leiser-Miller, L.B., Santana, S.E. (2020). Morphological diversity in the sensory system of phyllostomid bats: Implications for acoustic and dietary ecology. *Functional Ecology* 34:1416-1427.
- Leiser-Miller, L.B., Santana, S.E. (2021). Functional differences in echolocation call design in an adaptive radiation of bats. *Ecology and Evolution* 11:16153-16164.
- Marcolin, F., Cardoso, G.C., Bento, D., Reino, L., Santana, J. (2022). Body size and sexual selection shaped the evolution of parrot calls. *Journal of Evolutionary Biology*.
- Mickaël, H. Stoner, K.E. (2011). Relationship between spatial working memory performance and diet specialization in two sympatric nectar bats. *PLoS One* 6(9):e23773.
- Monteiro, L.R. (2013). Morphometrics and the comparative method: studying the evolution of biological shape. *Hystrix* 24:25-32.
- Monteiro, L.R., Nogueira, M.R. (2011). Evolutionary patterns and processes in the radiation of phyllostomid bats. *BMC Evolutionary Biology* 11.
- Morton, E.S. (1977). On the occurrence and significance of motivation-structural rules in some birds and mammals sounds. *The American Naturalist* 111:855-869.
- Münkemüller, T. et al. (2012). How to measure and test phylogenetic signal. *Methods in Ecology and Evolution* 3:743-756.
- Paradis, E. (2012). *Analysis of phylogenetic and evolution with R*. New York : Springer-Verlag. 386.
- Polly, P.D., Lawing, A.M., Fabre, A.-C., Goswami, A. (2013). Phylogenetic Principal Components Analysis and Geometric Morphometrics. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy* 24.
- Pye, J.D. (1979). Why ultrasound?. *Endeavour* 3:57-62.
- Revell, L.J. (2009). Size-correction and principal components for interspecific comparative studies. *Evolution* 63:3258-3268.
- Revell, L.J., Harmon, L.J., Collar, D.C. (2008). Phylogenetic Signal, Evolutionary Process, and Rate. *Systematic Biology* 57:591-601.
- Rodríguez-Peña, N., Stoner, K.E., Schondube, J.E., Ayala-Berdón, J., Flores-Ortiz, C.M., del Río, C.M. (2007). Effects of sugar composition and

- concentration on food selection by Saussure's long-nosed bat (*Leptonycteris curasoae*) and the long-tongued bat (*Glossophaga soricina*). *Journal of Mammalogy*, 88(6):1466-1474.
- Russ, J., Jones, G., Mackie, I., Racey, P. (2004). Interspecific responses to distress calls in bats (Chiroptera: Vespertilionidae): a function for convergence in call design?. *Animal Behaviour* 67:1005-1014.
- Sidlauskas, B. (2008). Continuous and arrested morphological diversification in sister clades of characiform fishes: a phylomorphospace approach. *Evolution* 62:3135-3156.
- Stevens, R.D. (2021). Dietary affinities, resource overlap and core structure in Atlantic Forest phyllostomid bat communities. *Mammal Review*.
- Taylor, A.M., Reby, D. (2010). The contribution of source-filter theory to mammal vocal communication research. *Journal of Zoology* 280:221-236.
- Vannoni, E., McElligott, A.G. (2007). Individual Acoustic Variation in Fallow Deer (*Dama dama*) Common and Harsh Groans: A Source-Filter Theory Perspective. *Ethology* 113:223-234.

Conclusão geral

Em uma análise visual qualitativa, foram encontrados diferentes tipos estruturais de Chamados de Distresse de 28 espécies de morcegos, os quais foram agrupados em categorias de acordo com similaridades na estrutura acústica (Capítulo 1). Características como diferentes fenômenos não-lineares e a presença de modulações sinusoidais de frequência podem indicar que a funcionalidade primária das categorias de CDs varia de acordo com a intencionalidade/emoção do emissor, conforme sugerido pelas Regras de Motivação Estrutural de Morton (Regras MS); e dos efeitos causados no receptor. Numa pPCA avaliando as características acústicas de CDs, a importância de variáveis como o Intervalo Interquartis de Frequências e a entropia espectral reforça essa hipótese (Capítulo 3).

A variabilidade acústica nos CDs se mostrou alta, sugerindo que tais vocalizações não contêm informações sobre identidade individual - para 10 espécies, ou populacional - em *Artibeus lituratus* (Capítulo 2). Assim, a resposta parece estar relacionada à sobreposição nos parâmetros acústicos e uma consequente não-discriminação individual. Tais resultados indicam que a aproximação de outros morcegos não está associada a contextos dependentes da existência de individualidade, como relações de afinidade e/ou altruísmo recíproco. Além disso, ao comparar os resultados obtidos por Análises Discriminantes com Misturas Gaussianas (ADMGs) com os gerados pelo cálculo do Índice H_s de Beecher, foi detectado um possível artefato estatístico devido a variações no tamanho amostral sobre os modelos ADMGs. A relação entre as duas abordagens estatísticas sugere cautela ao se comparar modelos que dependem de *Discriminant Scores*. São reforçadas também sugestões anteriores de que, atualmente, o índice H_s de Beecher é uma métrica mais adequada a estudos comparativos avaliando assinaturas vocais associadas à identidade (Capítulo 2).

Para o nível de indivíduo, variações morfológicas não apresentaram relação com a variabilidade acústica nas espécies *A. lituratus*, *Carollia perspicillata* e *Desmodus rotundus* (Capítulo 2). Ao analisar os CDs de 20 espécies de morcegos filostomídeos frente à filogenia (Capítulo 3), um sinal forte

entre o tamanho corporal (representado pelo comprimento do antebraço) e as características acústicas foi encontrado. Segundo a Teoria de Fonte-Filtro, a folha nasal poderia influenciar o som produzido por compor o filtro. A estrutura acústica não apresentou relação com a morfologia da orelha e da folha nasal (Capítulo 3), indicando que a emissão dos CDs é exclusivamente oral; e que provavelmente a boca e a folha nasal atuam como módulos distintos do trato vocal.

Há sobreposição dos parâmetros acústicos entre as espécies (Capítulos 1 e 3). e entre indivíduos e populações (Capítulo 2). Esses resultados corroboram a hipótese de que a especificidade do sinal é baixa em CDs, ultrapassando a barreira de espécies; e que a resposta dos receptores (a aproximação) não envolve o reconhecimento da identidade do emissor. Dessa forma, quaisquer indivíduos poderiam potencialmente se beneficiar de uma resposta ampla, gerando aumento no valor adaptativo individual, e possibilitando a manutenção desse comportamento. Além disso, a ausência de indícios acústicas sobre identidade pode estar associada ao contexto de emissão dos CDs - a captura. Para ser eficaz, a resposta aos CDs deve ser o mais rápida possível. Indícios sobre identidade poderiam aumentar o tempo de resposta, o que seria maléfico para o emissor.

As guildas alimentares propostas apresentaram relação com a estrutura acústica dos CDs, mas a disponibilidade dos recursos não (Capítulo 3). Tais resultados podem indicar que o tipo de recurso, mas não outros aspectos ecológicos associados ao forrageio, como a densidade de ouvintes, tenha influência sobre essas vocalizações.

No geral, os resultados encontrados se sobrepõem a hipóteses sugeridas anteriormente, além de trazer um desdobramento de novas questões a serem avaliadas no futuro. Assim, a discussão do presente estudo se relaciona às perguntas iniciais da seguinte forma: 1) *Qual a função primária dos CDs?* Não foi possível definir com clareza qual a função primária dos CDs devido à sua alta variabilidade acústica entre e dentro espécies. Essas diferenças, refletidas nas categorias de pulsos e diferentes fenômenos não-lineares, sugerem que é possível que haja mais de uma funcionalidade primária, associada à intencionalidade ou estado emocional do emissor. 2) *Que benefícios diretos e indiretos são obtidos pelos indivíduos emissores?* Os benefícios diretos obtidos pelo emissor irão depender da resposta dos receptores, sejam esses outros

morcegos (aproximação para inspeção e/ou *mobbing*) ou predadores (assustar, atrair e/ou agredir). Novamente as diferenças acústicas mencionadas podem influenciar essa resposta, onde características como a entropia espectral e a presença de modulações sinusoidais de frequência, entre outras, podem ter efeitos distintos sobre o ouvinte. A ausência de indícios acústicos sobre identidade exclui a possibilidade de que a resposta esteja associada ao reconhecimento individual, contrariando a hipótese de que há ganhos indiretos, associados por exemplo a relações sociais ou de parentesco (ex.: alertar sobre o perigo). 3) *Tais sinais são dirigidos a outros morcegos, aos predadores ou a ambos?* Nossos resultados sugerem que tanto predadores, quanto outros morcegos podem ser os destinatários do sinal, sendo necessários estudos futuros que avaliem a resposta dos receptores após a percepção dos CDs.