



Diana João Cravo Rodrigues

Teste do efeito da velocidade do canto como sinal agonístico na comunicação acústica da milheirinha

Dissertação de mestrado em Ecologia, orientada pelo Professor Doutor Paulo Gama Mota e apresentada ao Departamento de Ciências da Vida
da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Agosto 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Teste do efeito da velocidade do canto como sinal agonístico na comunicação acústica da milheirinha

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra
para cumprimento dos requisitos necessários à
obtenção do grau de Mestre em Ecologia, realizada
sob a orientação científica do Professor Doutor Paulo
Gama Mota (Universidade de Coimbra)

Diana João Cravo Rodrigues

2017

Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer ao Professor Doutor Paulo Gama Mota, pela oportunidade e apoio que me deu para realizar este projeto e por toda a sua dedicação.

Obrigada também ao pessoal do laboratório de Etologia e aos voluntários que me ajudaram e apoiaram neste trabalho. Um agradecimento muito especial à Eliana por toda a disponibilidade, conselhos, ensinamentos e ajuda preciosa.

Aos meus amigos e familiares, nomeadamente à Adri que até as milheirinhas adoram, ao Tiago que teve que me aturar, à Nani por sempre me encorajar e, o mais importante para o fim, à minha mãe por tudo.

Um agradecimento também a todas as pessoas com quem contactei durante o trabalho de campo, que ao me verem com o equipamento de gravação perguntavam se era uma entrevista, que me deixaram entrar nos seus terrenos para que pudesse aproximar-me das aves e que me desejaram sorte neste projeto.

Índice Geral

| | |
|--|-----------|
| Agradecimentos..... | 3 |
| Índice Geral..... | 5 |
| Índice de Figuras..... | 7 |
| Índice de Tabelas..... | 9 |
| Índice de Anexos..... | 11 |
| Resumo..... | 13 |
| Abstract..... | 15 |
| Capítulo 1 – Introdução..... | 17 |
| Comunicação Animal..... | 19 |
| Vocalizações nas Aves..... | 20 |
| Sinais de Agressividade..... | 22 |
| Espécie em Estudo..... | 23 |
| O Canto na Milheirinha..... | 24 |
| Objetivos..... | 26 |
| Capítulo 2 – Materiais e Métodos..... | 29 |
| Produção dos Estímulos..... | 31 |
| Trabalho de Campo..... | 31 |
| Análise comportamental..... | 34 |
| Análise das Canções..... | 34 |
| Análise Estatística..... | 36 |
| Capítulo 3 – Resultados..... | 37 |
| Variáveis Comportamentais..... | 39 |
| Variáveis do Canto..... | 40 |
| Capítulo 4 – Discussão..... | 45 |
| Resposta aos Desafios..... | 47 |
| Considerações Metodológicas..... | 48 |
| Conclusão..... | 49 |
| Referências..... | 51 |
| Anexos..... | 55 |

Índice de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Representação do triangulo de Podos (adaptado de Podos et al 2004)..... | 22 |
| Figura 2 – Fêmea (à esquerda, foto cedida por Eliana Soukiazes) e macho (à direita) de milheirinha (<i>Serinus serinus</i>). | 24 |
| Figura 3 – Espectrograma de uma canção de milheirinha, com representação do modo repetitivo constituído por um trilo (A), seguindo-se o modo sequencial (B)..... | 25 |
| Figura 4 – Locais de gravação. (A) Taveiro, (B) Venda da Luísa, (C) e (D) Adémia. | 32 |
| Figura 5 – Esquema de um “playback” interativo de sobreposição (adaptado de Naguib 1999)..... | 33 |
| Figura 6 – Representação da gravação em campo..... | 33 |
| Figura 7 – Espectrograma de duas canções do mesmo macho com a secção que se repete assinalada a vermelho (adaptado de Funghi et al 2015). | 35 |
| Figura 8 – Latência média de aproximação à coluna (em segundos) desde o início do “playback”, com erros padrão, para o estímulo rápido e para o estímulo lento..... | 39 |
| Figura 9 – Representação dos valores médios e respetivos erros padrão para a duração de secção, por tipo de estímulo, para cada fase do desafio. | 42 |
| Figura 10 – Valores de médias e erros padrão para a frequência de intensidade máxima (em Hertz), por tipo de estímulo, para cada fase do desafio. | 42 |
| Figura 11 – “Box plot” para o número total de sílabas em trilos na canção, para cada fase do desafio, para o estímulo rápido e lento. As linhas horizontais dentro das caixas representam as medianas, os limites das caixas são os percentis de 25% e 75%, as linhas referem-se aos percentis de 5% e 95% e os pontos mostram os “outliers”. | 44 |

Índice de Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Valores de médias, erros padrão e número de indivíduos sujeitos a cada tipo de estímulo (rápido/lento) incluídos na análise e valor da significância para cada comportamento..... | 40 |
| Tabela 2 – Teste de efeitos dentro das amostras relativamente à duração de secção..... | 41 |
| Tabela 3 - Teste de efeitos dentro das amostras relativamente à duração de secção para o estímulo lento..... | 41 |
| Tabela 4 – Teste de contrastes dentro das amostras relativamente à duração de secções para o estímulo lento..... | 41 |
| Tabela 5 – Valores de médias, erro padrão e significância para os parâmetros do canto relacionados com os trilos..... | 43 |

Índice de Anexos

| | |
|--|----|
| Anexo 1 – Informação sobre local e data de cada gravação e respetivos comportamentos registados para cada indivíduo..... | 57 |
| Anexo 2 – Valores de duração de secção e frequência de intensidade máxima para as fases antes, durante e depois do desafio. | 60 |
| Anexo 3 – Médias e erros padrão por tipo de estímulo e fase do desafio para a duração de secção. | 63 |
| Anexo 4 – Médias e erros padrão por tipo de estímulo e fase do desafio para a frequência de intensidade máxima. | 63 |

Resumo

O canto é uma importante forma de comunicação entre as aves, usado tanto na escolha de par como em interações agonísticas entre machos. A competição agressiva de canto entre machos pode envolver a sobreposição de canções, mudanças de tipo de canção ou mudanças no ritmo. Estudos anteriores realizados com machos de milheirinha (*Serinus serinus*) mostraram que canções mais rápidas são um sinal de agressividade. Em estudos recentes mostrou-se que os machos aumentam a velocidade do canto quando desafiados, revelando comportamentos agressivos. Tanto em milheirinhas, como em estudos com outras espécies, foi proposto que as canções mais rápidas são percebidas como um sinal de ameaça, afastando os machos, uma vez que, segundo os resultados desses estudos, os machos se aproximaram menos de estímulos mais rápidos.

O objetivo do presente estudo é determinar se, de facto, canções mais rápidas são percebidas como agressivas e canções mais lentas como menos ou não agressivas de todo, reproduzindo “playbacks” interativos a machos com os dois tipos de estímulo. A velocidade das canções foi aumentada ou diminuída através da remoção ou adição de silêncios entre as sílabas, dentro da variação normal da espécie. Quarenta e seis machos foram testados, metade sob cada condição, as suas canções foram gravadas antes, durante e depois do “playback”, e foi ainda registado quando eles se aproximaram ou voaram em redor da coluna. Os machos responderam de forma diferente perante os dois estímulos, aumentando a velocidade das suas canções em resposta a estímulos lentos, mas não face a estímulos rápidos. Foi também possível verificar que em presença de estímulos lentos, os machos aproximaram-se mais rapidamente da coluna. Estes resultados sugerem que canções mais rápidas são um sinal de agressividade que os machos de milheirinha tentam evitar.

Palavras-chave: Canto, “playback” interativo, *Serinus serinus*, taxa silábica, agressividade

Abstract

Birdsong is a very important way of communication in birds, used both in mate choice and agonistic interactions between males. The aggressive singing competition between males may involve song overlapping, changing of song types or alterations in the rhythm. Previous studies performed with male Serins (*Serinus serinus*) showed that faster songs are a sign of aggressiveness. Previous studies showed that males increase the speed of the songs when challenged, revealing an aggressive behavior. Both in Serins, as in studies with another species, it is suggested that faster songs are perceived as a threat signal, repelling the males, since according to the results of these studies, males approached less to faster stimulus.

The aim of this study is to determine if, indeed, faster songs are perceived as aggressive and slower songs as less or not aggressive, by performing interactive playbacks to males with the two types of stimuli. The speed of the song stimuli was increased or decreased by removing or adding silences between syllables, within the normal range of variation. Forty-six males were tested, half under each condition, and their songs were recorded before, during and after the playbacks. We also recorded whether they approached or flew around the speaker. Males did respond differently in face of the two stimuli, increasing their song speed against slow stimuli, but not against fast stimuli. It was also possible to check that in face of slow stimuli the males approach faster to the speaker. These results suggest that faster songs are an aggressive signal that male Serins try to avoid.

Keywords: Birdsong, interactive playback, *Serinus serinus*, syllable rate, aggressiveness

Capítulo 1 – Introdução



Comunicação Animal

A comunicação é fundamental na compreensão dos comportamentos sociais entre os animais, como a escolha de par, o comportamento de acasalamento, a defesa do território, a competição por recursos (Todt & Naguib 2000), a defesa contra predadores e o reconhecimento individual (Catchpole & Slater 2008).

Comunicação consiste no envio de informação através de sinais. Existe um emissor que envia um sinal que modifica o comportamento de um recetor. Quando o envio do sinal não é em benefício do emissor dá-se o nome de pista (Catchpole & Slater 2008). Teorias anteriores sugeriam que a evolução da comunicação ocorre, pois é benéfica para ambos os intervenientes (Smith 1977). Atualmente os etólogos veem a comunicação, não só como um resultado da cooperação, mas também como um resultado do conflito (Catchpole & Slater 2008). Segundo a teoria de Zahavi (1975, 1980, 1987), conhecida como o princípio do “handicap”, apenas sinais honestos, ou seja, que indiquem a real condição do emissor, conseguem evoluir, uma vez que estes são custosos de produzir (Grafen 1990). Estes custos podem estar associados a um maior dispêndio de tempo e energia, tal como a possibilidade de correrem maiores riscos, ao serem mais desafiados, por apresentarem determinado sinal. Assim, estes sinais podem sinalizar a qualidade do seu portador em termos físicos, nutricionais, condição imunitária, condição motivacional ou capacidade de defesa (Zahavi & Zahavi 1997). No entanto, sabe-se agora que um sinal não tem necessariamente que ser custoso para ser honesto, o que é necessário é uma boa correlação entre o sinal e a característica que é sinalizada. Por exemplo, para um sinal de alarme ser honesto é necessário que os conspécíficos reajam a ele e que a presença do predador seja real (Grose 2011).

A comunicação animal pode ser realizada através de sinais visuais, químicos, acústicos e tácteis, sendo muitas vezes concretizada através de uma combinação destes. Para as aves os sinais mais importantes são, sem dúvida, os visuais (como provam as suas plumagens coloridas) e os acústicos. O som viaja em todas as direções, atravessa objetos e alcança largas distâncias, sendo um método de comunicação entre aves extremamente eficaz (Catchpole & Slater 2008).

Vocalizações nas Aves

O canto das aves é uma das formas mais interessantes da comunicação animal, pelo que tem vindo a ser bastante estudado, sobretudo desde que os avanços tecnológicos ao nível de equipamentos de gravação e de análise permitem o seu estudo mais aprofundado (Catchpole & Slater 2008). As aves têm vindo, inclusive, a ser utilizadas como modelo de estudo na comunicação vocal em humanos, nomeadamente na questão da aprendizagem relacionada com a estrutura cerebral. Para desenvolver a capacidade de canto, as aves necessitam de ouvir adultos a cantar durante o seu período sensitivo, e de se ouvirem a elas próprias, tal como em humanos os bebés necessitam de ouvir adultos e a si próprios para desenvolver a sua linguagem (Brainard & Doupe 2002).

O canto pode ser inato ou aprendido. O canto inato é típico de não-passeriformes e suboscíneos, caracterizado pela sua simplicidade e estrutura estereotipada (Slater 1997). Por outro lado a aprendizagem tem um papel fundamental no desenvolvimento das canções complexas em oscíneos, que devido ao número e complexidade dos seus músculos da siringe (órgão das aves que permite a produção e emissão do som), bem como a sua estrutura cerebral, são capazes de produzir sons bastante mais complexos, tendo ficado conhecidos como os verdadeiros “pássaros cantores” (Catchpole & Slater 2008, Kroodsma & Byers 1991).

Vocalizações podem ser divididas em chamamentos e canções. Os chamamentos são vocalizações normalmente curtas, monossilábicas, produzidas por ambos os sexos durante todo o ano, estando associadas a contextos particulares como alarme, alimentação ou outras situações específicas. As canções são normalmente produzidas por machos durante a época reprodutiva (Catchpole & Slater 2008), no entanto, existem espécies tropicais onde as fêmeas também cantam, geralmente espécies em que há duetos (Grafe & Bitz 2004, Langmore 1998, Sethi et al 2012). São vocalizações mais longas e acusticamente mais complexas, envolvendo uma maior variedade de sílabas e elementos, e não estando associadas a situações específicas (Catchpole & Slater 2008, Marler 2004). Na maioria das espécies o canto contém informação sobre a espécie ou a população a que o indivíduo pertence assim como a sua própria identidade. Existem espécies onde há apenas um tipo de canção, outras onde o repertório de cada indivíduo é constituído por uma grande variedade de canções e sílabas diferentes (Todt & Naguib 2000). As canções são compostas por frases

ou secções que, por sua vez, são constituídas por sílabas, que ocorrem num padrão específico. As sílabas mais complexas podem ainda ser constituídas por vários elementos. Canções, sílabas e elementos podem também ser definidas pelos intervalos entre elas (Mota & Cardoso 2001).

Muita informação pode estar contida no canto, como a condição do indivíduo, a dominância, a idade e a habilidade de luta, uma vez que certos sinais são custosos do ponto de vista da performance, pois requerem uma boa capacidade de controlo motor fino (Catchpole & Slater 2008). É aceite que a evolução das características do canto se devem a duas formas de pressão seletiva: seleção intersexual e intrasexual (Searcy & Andersson 1986). Assim, o canto assume três funções principais, sendo elas, a atração de fêmeas, estimulação reprodutiva da fêmea e afastamento de machos rivais (Kroodsma & Byers 1991).

O canto deverá ser um sinal honesto da qualidade dos machos, uma vez que o desenvolvimento do núcleo cerebral responsável pela aprendizagem do canto ocorre num período em que os juvenis passam por stress nutricional, sendo, deste modo, um indicador do histórico de desenvolvimento e genética do indivíduo (Nowicki et al 1998). Além disso o canto requer uma boa coordenação respiratória, do órgão vocal e dos músculos craniomandibulares (Suthers et al 1999). O ritmo respiratório determina o padrão temporal das canções pois o som é produzido durante as expirações, sendo que, normalmente, cada sílaba é seguida de uma pequena inspiração, exceto durante os trilos (parte repetitiva da canção) (Suthers et al 1999). Podos (1996) mostrou que existem constrangimentos na produção do som aquando de uma taxa mais elevada de repetição silábica em “swamp sparrow” (*Melospiza georgiana*). Identificou também um “tradeoff” entre a taxa de trilos e a banda de frequências em diversas espécies de Passeriformes (*Emberizidea*), ou seja, quando uma aumenta a outra diminui. Representando graficamente estes valores, eles irão formar um triângulo, conhecido como Triângulo de Podos (Podos 1997) (figura 1). O lado desse triângulo representa performances que se encontram no limite das capacidades físicas, sendo que a seleção natural favorece essas canções (Vallet et al 1998). Para além destes aspetos de controlo motor, existem constrangimentos físicos, pois certos sons podem depender do tamanho corporal, uma vez que este limita o tamanho da caixa de ressonância (Ryan & Brenowitz 1985).

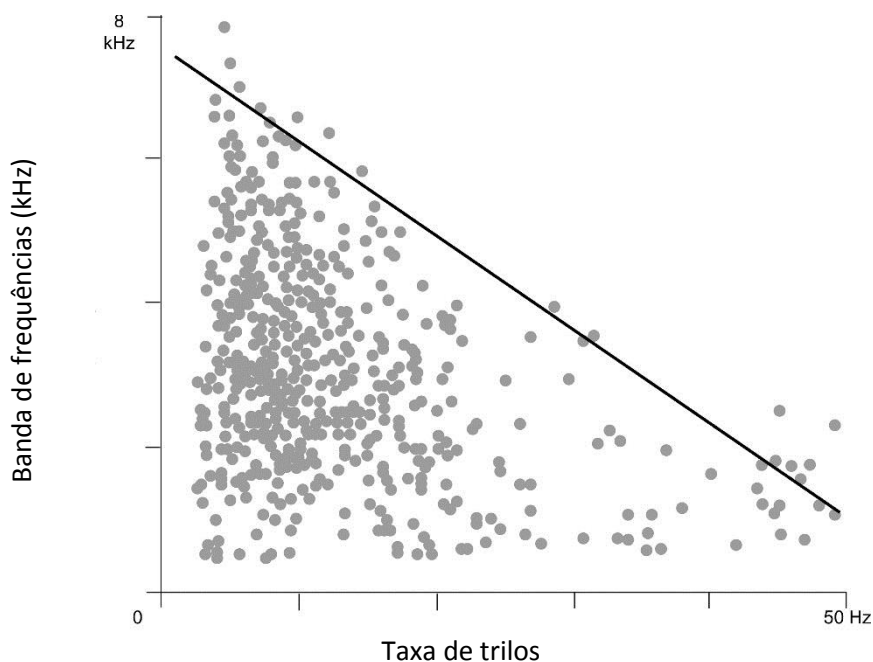


Figura 1 – Representação do triangulo de Podos (adaptado de Podos et al 2004).

Sinais de Agressividade

Para além da variação nas sílabas e elementos que as constituem, as canções podem variar em parâmetros como a sequência em que estes são apresentados, a duração, o número de trilos (sílabas repetitivas), a consistência silábica, a taxa silábica (rapidez da canção), a frequência e a amplitude. A complexidade da sua estrutura permite que haja uma grande variedade de canções, assim como uma grande variedade de funções, tendo vindo a ser estudado se um tipo particular de canção corresponde a uma mensagem em particular (Todt & Naguib 2000). Os sinais de agressividade são bastante importantes na comunicação animal pois permitem confrontos sem necessidade de luta, uma vez que podem transmitir informação como a habilidade de luta do seu emissor. Desta feita, haveria vantagem para o emissor em defraudar estes sinais. Foi, no entanto, proposto que a sua honestidade é garantida pois os indivíduos que os possuem são mais desafiados, assim, apenas machos com maiores capacidades de luta os podem suportar (Rohwer & Ewald 1981). As canções das aves também podem conter sinais de estatuto, como a presença de sílabas específicas (Rehsteiner et al 1998), e apresentar outras características que podem ser sinais de agressividade, como a taxa silábica, o tamanho do repertório, a correspondência de canções,

a correspondência de frequências, a sobreposição de canções, a mudança de tipo de canção, e canções de baixa frequência (Gil & Gahr 2002, Searcy & Andersson 1986). Também a elevada quantidade de trilos na canção será um sinal de agressividade (Illes et al 2006, Neves 2013). Segundo Searcy and Beecher (2009), para um sinal ser considerado agressivo, deve ter-se em conta três requisitos: se o sinal aumenta em contextos agressivos, se o sinal prevê um aumento da agressividade por parte do emissor e se os recetores respondem ao sinal. Verificando-se estes três requisitos, o sinal pode ser considerado agressivo.

“Playback” é uma técnica para retransmitir sinais naturais ou sintéticos a animais e observar a sua resposta. O “playback” de sinais sonoros é o mais utilizado no estudo do comportamento animal, mas também podem ser usados “playbacks” de sinais elétricos e visuais através de vídeo (McGregor et al 1992). Os “playbacks” sonoros têm vindo a ser bastante usados em estudos com aves para simular a presença de outro indivíduo, de modo a testar, por exemplo, comportamentos territoriais (Dabelsteen & Pedersen 1990), o efeito determinados parâmetros do canto (Cardoso et al 2007) ou a capacidade de reconhecimento individual (Botero et al 2007). Uma vantagem do uso de “playbacks” é que o estímulo que é transmitido pode ser manipulado, permitindo estudar a relação entre parâmetros do canto e determinados comportamentos (Slater 1997). Um “playback” interativo, consiste na emissão de um estímulo que começa, neste caso, antes do final da canção do indivíduo em estudo. Naguib and Mennill (2010), através da revisão e discussão de outros estudos, sugeriram que a sobreposição de canções é um sinal de agressividade, já que as aves respondem de forma diferenciada e bastante mais acentuada a canções sobrepostas às suas.

Espécie em Estudo

A espécie considerada neste estudo foi o *Serinus serinus* (Linnaeus, 1766), conhecida vulgarmente como milheirinha. Trata-se de um pequeno passeriforme da família Fringillidae, subfamília Carduelinae, que apresenta uma plumagem malhada de amarelo e castanho, sendo uma das suas características distintivas as bandas amarelas nas asas. Nesta espécie existe dimorfismo sexual, os machos apresentam coloração amarela também no peito, abdómen, babete e coroa, enquanto as fêmeas são mais acastanhadas (figura 2). Esta coloração dos machos é resultante da incorporação de carotenoides através da dieta e é

uma característica sexualmente selecionada pelas fêmeas, sendo que estas preferem machos mais amarelos (Leitão et al 2014).



Figura 2 – Fêmea (à esquerda, foto cedida por Eliana Soukiazes) e macho (à direita) de milheirinha (*Serinus serinus*).

É muito comum em toda a Europa, mas apenas é residente durante todo o ano na zona Mediterrânica, nas zonas mais a norte apenas é nidificante. Os machos cantam intensivamente durante a época reprodutiva que ocorre entre finais de Fevereiro e inícios de Julho, o que tem um importante impacto na estimulação das fêmeas, na guarda do par (Mota 1999) e na própria escolha de par (Cardoso et al 2007). Pode ser encontrada em plantações, terrenos cultivados, mas também em zonas urbanas. Alimenta-se principalmente de sementes, rebentos de gramíneas e outras pequenas plantas hortícolas, embora também se possam alimentar de pequenos invertebrados (Cramp & Perrins 1994). É uma espécie monogâmica, não territorial e gregária (Mota 1995).

O Canto na Milheirinha

Esta espécie apresenta dois modos de canto: o modo repetitivo e o modo sequencial (figura 3). O modo repetitivo consiste na repetição rápida de uma mesma sílaba - partes chamadas trilos (A, figura 3). O modo sequencial é formado por um conjunto de diferentes sílabas que se sucedem numa ordem determinada e normalmente corresponde à maior

parte da canção (B, figura 3). Algumas sílabas neste modo incluem a repetição de elementos muito simples, (ex. figura 3, após 1,8s) (Mota & Cardoso 2001).

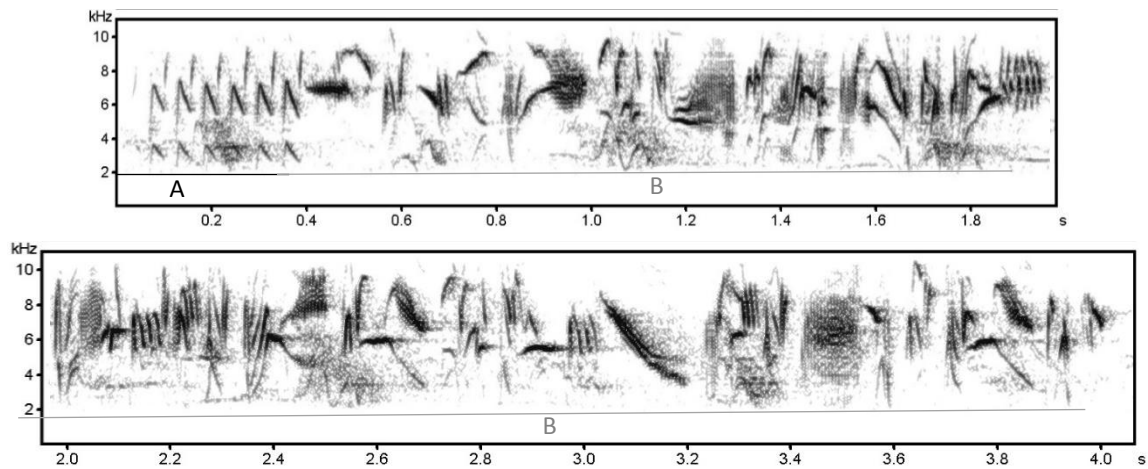


Figura 3 – Espectrograma de uma canção de milheirinha, com representação do modo repetitivo constituído por um trilo (A), seguindo-se o modo sequencial (B).

Em geral as canções dos oscíneos apresentam uma grande variedade na organização sintática, desde espécies com canções simples e curtas até outras com repertórios silábicos organizados em longas sequências numa canção (Catchpole & Slater 2008). A milheirinha não apresenta diferentes tipos de canção, sendo que a organização das mesmas é realizada de forma circular, isto é, existe um número limitado de frases iniciais e as restantes repetem-se numa sequência determinada, podendo acabar o ciclo em qualquer ponto (Mota & Cardoso 2001). Assim as suas canções têm uma duração muito variável, entre 1 e 18 segundos (sendo a média de 3s) e o seu repertório silábico varia entre 40 e 87 sílabas medidas (Mamede & Mota 2012). Num estudo realizado por Mamede & Mota (2012), foi demonstrado que a complexidade das canções e o tamanho do repertório não aumentam com a idade.

O canto desta espécie é percebido pelo ouvido humano como uma sucessão rápida de diferentes elementos de alta frequência, o que contrasta com o canto mais suave e repetitivo dos canários (*Serinus canaria*) e outros carduelinos. Abrange uma ampla gama de frequências, entre os 2,02 e os 10,74 kHz. A frequência de intensidade máxima é, em média, 6,30 kHz (aproximadamente a meio da sua gama de frequências) (Mota & Cardoso 2001). Tratam-se de frequências muito elevadas para o que seria de esperar tendo em conta o seu

tamanho corporal, sendo a espécie com a frequência mais alta dentro do seu gênero (Cardoso & Mota 2007).

Ao cantar grupos de elementos relativamente longos a uma taxa muito rápida é necessário coordenar o canto com a respiração e em muitas espécies os intervalos são usados para inspirar (Suthers & Goller 1997). Esta espécie apresenta uma taxa silábica muito rápida, sendo mesmo a espécie do seu gênero com intervalos intersilábicos de menor duração (cerca de 20 ms) (Cardoso & Mota 2007). O coeficiente de variação da mesma sequência de sílabas é muito baixo, uma média de 1,63% e um máximo medido de 2,33% (Mota & Cardoso 2001). Num trabalho de Cardoso et al (2007) com *Serinus serinus* a taxa silábica foi aumentada e verificou-se que isto inibia a resposta em ambos os sexos, sugerindo ser um sinal de agressividade. No mesmo trabalho, verificou-se que havia uma preferência das fêmeas por sons de elevada frequência. Assim, concluíram que a alta frequência e a rápida taxa silábica características do canto desta espécie não são resultado do mesmo processo evolutivo. Enquanto a elevada frequência poderá resultar de seleção intersexual, a elevada taxa silábica poderá resultar de um processo de seleção intrasexual. Verificou-se que em diferentes espécies os indivíduos aumentam a taxa silábica quando se comportam de forma agressiva (DuBois et al 2009, Geberzahn & Aubin 2014, Linhart et al 2013, Vehrencamp et al 2013) ou respondem a uma elevada taxa silábica com um comportamento agressivo (Illes et al 2006). Num trabalho de 2015, de Funghi et al, utilizou-se um “playback” interativo para sobrepor o canto dos machos de milheirinha, de forma a incitar uma resposta agressiva, com o objetivo de avaliar que características do canto se alteram. Verificou-se que nos machos que responderam de forma mais agressiva, aproximando-se da coluna, a taxa silábica aumentou, enquanto que nos machos que responderam de forma menos agressiva, não se aproximando da coluna, a taxa silábica não se alterou.

Objetivos

Uma vez que a taxa silábica aumenta em contextos agressivos leva a crer que seja um sinal de agressividade, abrindo caminho para outros estudos, nomeadamente de forma a observar a resposta dos machos a canções com a taxa silábica já de si acelerada. Assim sendo, o principal objetivo deste trabalho foi determinar se variações na taxa silábica

representam expressões de comportamento agressivo entre os machos de milheirinha (*Serinus serinus*). Esta investigação foi feita através da realização de desafios em campo, da observação da resposta comportamental e das alterações nos parâmetros do canto no indivíduo desafiado.

As hipóteses colocadas foram:

- Os machos de milheirinha reagem de forma mais agressiva em resposta a um aumento na taxa silábica das canções do que a uma redução?
- As alterações comportamentais mantêm-se após o desafio?

Capítulo 2 – Materiais e Métodos



Produção dos Estímulos

Para produzir os estímulos as canções foram aceleradas ou desaceleradas procedendo ao corte ou acrescento de porções de 10ms nos mesmos intervalos intersilábicos. Apenas foram manipulados os intervalos superiores a 20ms, de modo a manter as canções dentro da variação natural desta espécie (Mota & Cardoso 2001). Foram produzidos 25 pares de estímulos, sendo cada par produzido a partir de uma mesma canção original, a qual foi acelerada num caso e retardada no outro.

De modo a evitar pseudo-replicação, cada macho foi sujeito a um “playback” diferente, gerado a partir de uma gravação de um ano anterior. Cada “playback” constituiu um estímulo diferente que consistiu em apenas uma canção com duração entre 3 a 5 segundos, volume normalizado a 90% e filtro para frequências até 2kHz para remover ruído. Para tal foi utilizado o software Avisoft-SAS Lab Pro (versão 5.2.04), com recurso a uma janela FlatTop, FFT = 512Hz, “Frame size” = 100% e “Overlap” de 93,75%, o que resulta numa largura de banda de 162 Hz, resolução de frequência de 43 Hz e um tempo de resolução de 1,4512 ms.

Trabalho de Campo

As gravações foram realizadas de março a junho de 2017, entre as 8h e as 15h, em dias com boas condições meteorológicas, em zonas dos arredores de Coimbra como Taveiro, Arzila, Pereira, zonas agrícolas do Baixo Mondego, na Escola Superior Agrária e no Choupal (figura 4). De modo a evitar a inclusão de machos repetidos, as gravações foram realizadas em locais diferentes e mantendo uma distância não inferior a 500m entre elas. Para além disso, foi feita a análise comparada dos espectrogramas das canções, que permitem uma identificação individual, uma vez que a estrutura das canções e repertório são únicos (Mota & Cardoso 2001).



Figura 4 – Locais de gravação. (A) Taveiro, (B) Venda da Luísa, (C) e (D) Adémia.

Para a realização dos “playbacks” foram usadas uma coluna JBL Flip 3 e uma coluna Sony SRS-A57 conectadas por Bluetooth ou através de um cabo, respetivamente, a um iPod (Apple) nano 6G ou 7G. Os volumes dos “playbacks” foram ajustados para produzir um nível de som de 70 dB a 1 m de distância, utilizando um sonómetro RS-232 72-860A Tenma Test Equipment. Sempre que se encontrou um macho em atividade de canto, a coluna foi colocada a não mais de cerca de 30m do mesmo e começou-se a gravar posicionando-se de forma a obter um triângulo entre o microfone, a coluna e a ave (figura 6). A gravação foi feita com recurso a um microfone direcional Sennheiser MKH 70 ligado a um gravador Marantz Pro PMD660, com uma frequência de amostragem de 48KHz. A gravação consistiu em 3 minutos, divididos em 3 partes: um minuto de canto não condicionado do macho (minuto controlo), seguindo-se um minuto de desafio em que todas as canções do macho foram sobrepostas com o “playback” (figura 5) e, por fim, mais um minuto apenas do canto do macho para medir a persistência do efeito do “playback”. A estas três fases denominámos de fase antes, durante e depois, respetivamente. Foram utilizadas 46 gravações, das quais 6 sem o minuto final, por a ave se ter afastado ou parado de cantar.

Simultaneamente à gravação foi realizado um registo de comportamentos, bem como outras informações relevantes (como local, data, hora, tipo de vegetação, condições meteorológicas), através do segundo canal do gravador, com recurso a um microfone de lapela.

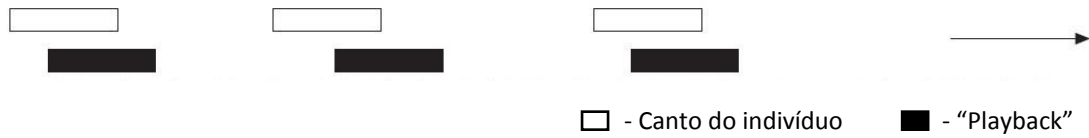


Figura 5 – Esquema de um “playback” interativo de sobreposição (adaptado de Naguib 1999).



Figura 6 – Representação da gravação em campo.

Análise comportamental

Para efeitos de análise comportamental, foram tidos em conta os seguintes aspetos:

- Voo durante o “playback” – voo em direção à coluna durante o minuto de desafio;
- Latência – tempo que a ave demorou a realizar o primeiro voo em direção à coluna desde o início do “playback”, medido em segundos; caso não tenha voado assumiu-se a latência máxima de 60s;
- Distância – distância mínima a que a ave pousou da coluna; medido em intervalos de valores de 5 m (1-5, 6-10,... 26-30); caso não tenha havido aproximação assumiu-se a distância máxima de 30m;
- “Flyovers” – voo em redor da coluna;
- Voo depois do “playback” – qualquer tipo de voo no minuto após o desafio.

É necessário utilizar um dado comportamental que garanta que os machos analisados efetivamente identificaram o desafio do “playback”, já que existe a possibilidade de estes o ignorarem, visto as milheirinhas não serem territoriais, estando habituadas a cantar em proximidade com outros machos sem desencadear necessariamente interações agressivas entre eles. No entanto é de esperar que, estando na época reprodutiva, reajam de forma agressiva perante a presença de outro macho, uma vez que nesta espécie são comuns as tentativas de cópulas extra-par, e existe guarda do par (Mota 1995). Assim, para este estudo só foram considerados os testes em que os machos se aproximaram da coluna durante o “playback”, reduzindo a amostra a 22 indivíduos, havendo, no entanto, parâmetros que não foi possível medir para todos.

Análise das Canções

As canções foram analisadas através do software Avisoft-SAS Lab Pro (versão 5.2.04), com as mesmas configurações referidas para a criação dos estímulos. Em cada gravação foram analisadas todas as canções perceptíveis do indivíduo em questão, sendo utilizado um valor médio dos seguintes parâmetros para cada fase (antes/durante/depois), medidos

manualmente através de inspeção dos espectrogramas ou no caso da frequência de intensidade máxima através do “power spectrum”:

- Duração de secção da canção – dado que a duração das sílabas em milheirinhas é muito variável, em vez de se considerar a taxa silábica como número de sílabas/tempo, para cada indivíduo foi selecionada uma secção da canção que se repetia nas várias canções (figura 7, secção assinalada a vermelho) e foi comparada a duração média dessa mesma secção nas três fases do desafio (antes, durante e depois), seguindo o mesmo procedimento utilizado em Funghi et al (2015). Uma menor duração dessa secção significa que existiu uma aceleração da canção, uma maior duração significa que ocorreu uma desaceleração;

- Frequência de intensidade máxima – frequência correspondente ao maior pico de energia na canção;

- Trilos – foi contabilizado o número de sílabas no(s) trilo(s) inicial(ais), o número de trilos na canção e o número total de sílabas no conjunto de trilos da canção.

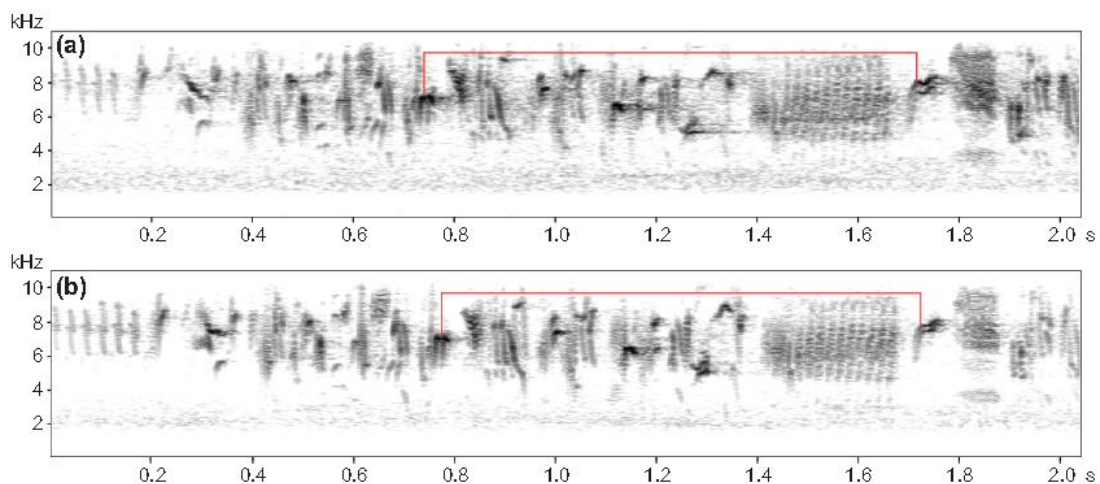


Figura 7 – Espectrograma de duas canções do mesmo macho com a secção que se repete assinalada a vermelho (adaptado de Funghi et al 2015).

Análise Estatística

A análise estatística iniciou-se com uma inspeção às variáveis para determinar a sua distribuição e “outliers”, tendo-se procedido a transformação ou adotando a distribuição mais adequada para cada uma, como indicado mais à frente no texto.

Todos os parâmetros comportamentais foram analisados através de um Modelo Generalizado Linear (GzLM). Para a latência de aproximação à coluna foi utilizada uma transformação logarítmica, considerando uma distribuição normal e “link function” identidade. Para a distância mínima à coluna, tal como o comportamento de “flyover” e a ocorrência de voo depois do “playback” foi considerada uma distribuição Poisson e uma “link function” logarítmica. Em todos os casos foi considerando o tipo de estímulo (rápido/lento) como fator.

Foram utilizadas análises de medidas repetidas para a duração de secção, a frequência de intensidade máxima e todos os parâmetros relacionados com os trilos.

Tanto a duração de secção como a frequência de intensidade máxima foram analisadas através de uma ANOVA, com a fase do desafio e o tipo de estímulo como fatores, sendo fase o fator repetido. Relativamente à duração de secção, as comparações entre categorias para fase e para a interação significativa por contrastes foram feitas usando o método de diferença e o teste à-posteriori usado para testar as diferenças foi o Tukey-B.

Os parâmetros relacionados com os trilos não apresentam uma distribuição normal, pelo que foi feita uma análise através de um Modelo Generalizado de Equações Estimadas (GEE) para uma distribuição binomial negativa com “link function” logarítmica.

A análise dos dados foi feita com recurso ao programa SPSS (versão 22.00, IBM SPSS Statistics®, Armonk, New York, USA).

Capítulo 3 – Resultados



Variáveis Comportamentais

Verificou-se uma diferença significativa na latência de aproximação à coluna para aves sujeitas ao tipo de estímulo rápido ou lento ($P=0,033$), sendo que os machos se aproximaram mais rapidamente do estímulo lento (figura 8). Não existem diferenças significativas nas respostas aos estímulos, quanto à distância mínima a que pousaram da coluna, ao comportamento de “flyover”, ou ao voo depois do “playback” (tabela 1). O dia de gravação não tem influência em nenhuma das variáveis.

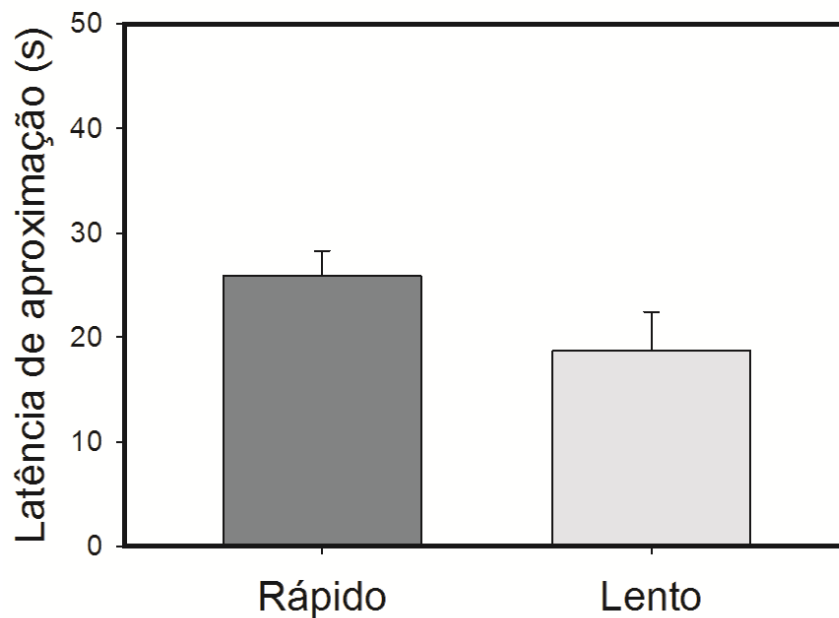


Figura 8 – Latência média de aproximação à coluna (em segundos) desde o início do “playback”, com erros padrão, para o estímulo rápido e para o estímulo lento.

Tabela 1 – Valores de médias, erros padrão e número de indivíduos sujeitos a cada tipo de estímulo (rápido/lento) incluídos na análise e valor da significância para cada comportamento.

| Comportamento | Estímulo | Média | Erro padrão | N | P |
|---------------------------|----------|-------|-------------|----|--------------|
| Latência de voo (log) | rápido | 1,40 | 0,068 | 10 | 0,033 |
| | lento | 1,20 | 0,065 | 11 | |
| Distância mínima à coluna | rápido | 3,30 | 0,575 | 10 | 0,271 |
| | lento | 2,50 | 0,456 | 12 | |
| “Flyover” | rápido | 0,50 | 0,224 | 10 | 0,792 |
| | lento | 0,58 | 0,220 | 12 | |
| Voo depois do “playback” | rápido | 0,44 | 0,222 | 9 | 0,567 |
| | lento | 0,54 | 0,241 | 11 | |

Variáveis do Canto

Foram 22 as aves que voaram em resposta ao “playback”. No entanto 3 abandonaram o local antes do último minuto, pelo que não há registos para a fase depois. Assim, para as 3 fases do desafio temos N=9 para o desafio rápido e N=10 para o desafio lento.

Relativamente à **duração de secção**, existem diferenças significativas entre as 3 fases do desafio ($P < 0,0001$) e também entre a fase e o tipo de estímulo ($P = 0,016$) (tabela 2). Devido à existência de uma interação significativa, procedeu-se à análise para cada tipo de estímulo separadamente. As aves sujeitas a um estímulo rápido não apresentam diferenças significativas entre as fases ($P = 0,193$), já as aves sujeitas ao estímulo lento apresentam uma diferença significativa ($P < 0,0001$) (tabela 3), com uma acentuada aceleração das canções durante e após o “playback” (contrastos significativos sendo as suas significâncias de $P = 0,001$ e $P = 0,002$, respetivamente, tabela 4). Através dos valores de médias e erros padrão foi possível construir o gráfico da figura 9.

Tabela 2 – Teste de efeitos dentro das amostras relativamente à duração de secção.

| Fonte | Tipo III Soma dos Quadrados | GL | Média Quadrada | F | P |
|-------------------------|-----------------------------|----|----------------|------|-------|
| Fase | 0,004 | 2 | 0,002 | 12,1 | 0,000 |
| Fase * tipo de estímulo | 0,001 | 2 | 0,001 | 4,7 | 0,016 |
| Erro (fase) | 0,005 | 34 | 0,000 | | |

Tabela 3 - Teste de efeitos dentro das amostras relativamente à duração de secção para o estímulo lento.

| Fonte | Tipo III Soma dos Quadrados | GL | Média Quadrada | F | P |
|-------------|-----------------------------|----|----------------|------|-------|
| Fase | 0,005 | 2 | 0,002 | 12,1 | 0,000 |
| Erro (fase) | 0,004 | 18 | 0,000 | | |

Tabela 4 – Teste de contrastes dentro das amostras relativamente à duração de secções para o estímulo lento.

| Fonte | Fases | Tipo III Soma dos Quadrados | GL | Média Quadrada | F | P |
|-------------|-----------------------------|-----------------------------|----|----------------|------|-------|
| Fase | fase durante vs. fase antes | 0,007 | 1 | 0,007 | 22,1 | 0,001 |
| | fase depois vs. anteriores | 0,008 | 1 | 0,008 | 18,8 | 0,002 |
| Erro (fase) | fase durante vs. fase antes | 0,003 | 9 | 0,000 | | |
| | fase depois vs. anteriores | 0,004 | 9 | 0,000 | | |

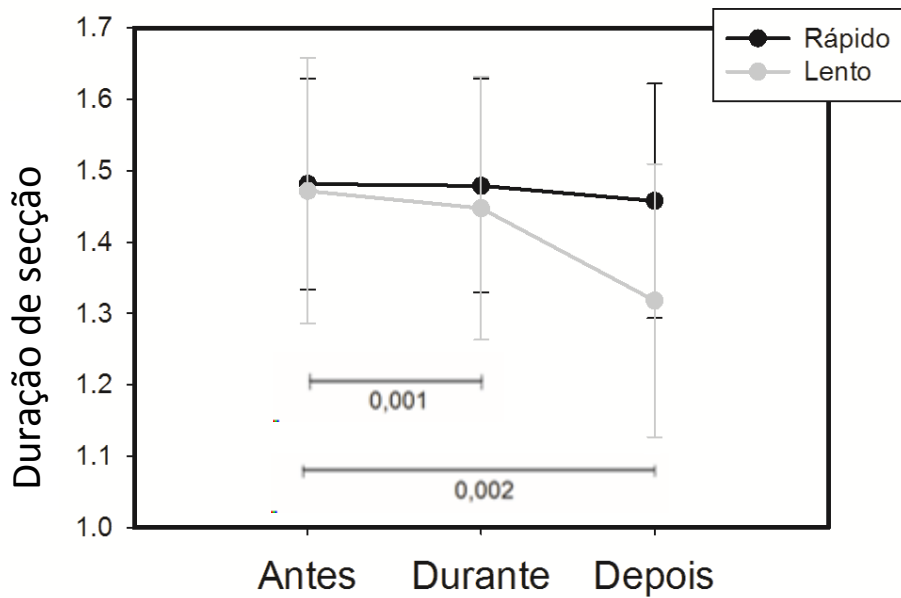


Figura 9 – Representação dos valores médios e respetivos erros padrão para a duração de secção, por tipo de estímulo, para cada fase do desafio.

A **frequência de intensidade máxima** não apresenta diferenças significativas, nem entre as fases do desafio ($P=0,741$), nem relativamente ao tipo de estímulo ($P=0,712$). A partir dos valores de médias e erros padrão foi possível construir o gráfico da figura 10.

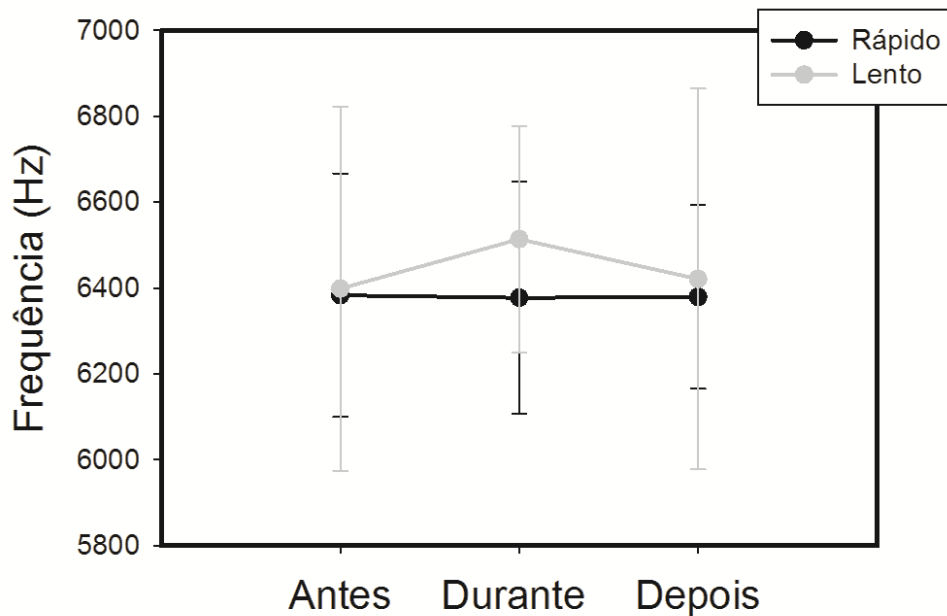


Figura 10 – Valores de médias e erros padrão para a frequência de intensidade máxima (em Hertz), por tipo de estímulo, para cada fase do desafio.

Quanto aos parâmetros relacionados com os **trilos**, os machos de milheirinha não apresentam alterações significativas no número de sílabas em trilos iniciais, no número de trilos na canção, nem no número total de sílabas em trilos na canção (tabela 5), parâmetros para o qual foi construído o gráfico da figura 11.

Tabela 5 – Valores de médias, erro padrão e significância para os parâmetros do canto relacionados com os trilos.

| Parâmetro | Estímulo | Fase | Média | Erro padrão | P |
|--------------------------------------|----------|---------|-------|-------------|-------|
| Trilos no início da canção | rápido | antes | 3,10 | 1,441 | 0,859 |
| | | durante | 3,70 | 1,599 | |
| | | depois | 2,56 | 1,248 | |
| | lento | antes | 3,92 | 1,612 | |
| | | durante | 3,25 | 1,074 | |
| | | depois | 3,00 | 1,135 | |
| Trilos diferentes na canção | rápido | antes | 0,80 | 0,249 | 0,367 |
| | | durante | 0,70 | 0,213 | |
| | | depois | 0,89 | 0,455 | |
| | lento | antes | 1,17 | 0,322 | |
| | | durante | 1,08 | 0,358 | |
| | | depois | 1,10 | 0,348 | |
| Total de sílabas em trilos na canção | rápido | antes | 4,60 | 1,579 | 0,634 |
| | | durante | 4,40 | 1,572 | |
| | | depois | 3,89 | 2,091 | |
| | lento | antes | 5,42 | 1,790 | |
| | | durante | 4,83 | 1,723 | |
| | | depois | 5,60 | 1,956 | |

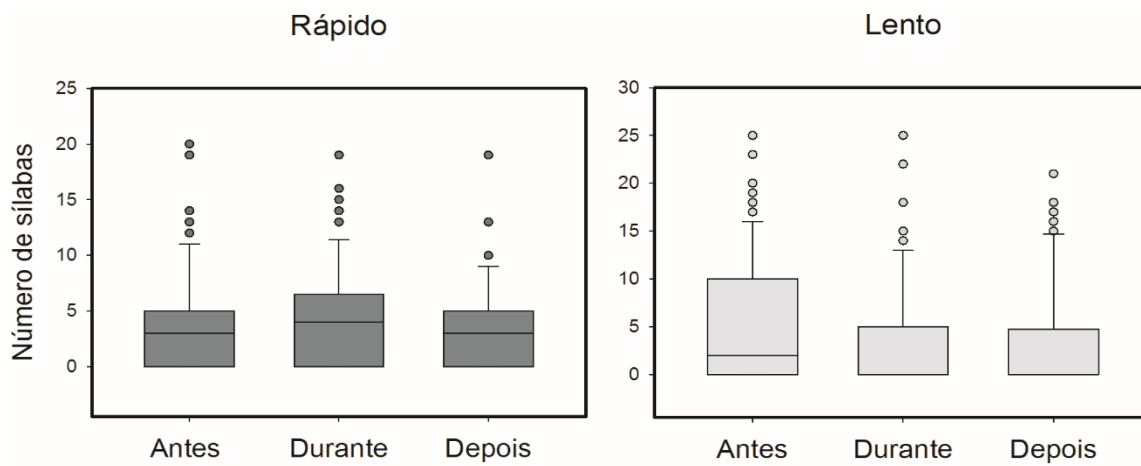


Figura 11 – “Box plot” para o número total de sílabas em trilos na canção, para cada fase do desafio, para o estímulo rápido e lento. As linhas horizontais dentro das caixas representam as medianas, os limites das caixas são os percentis de 25% e 75%, as linhas referem-se aos percentis de 5% e 95% e os pontos mostram os “outliers”.

Capítulo 4 – Discussão



Resposta aos Desafios

Após o estudo em questão verificou-se que os machos de milheirinha respondem, efetivamente, de forma diferente a estímulos acústicos rápidos ou lentos. Em termos vocais aumentam a taxa silábica em resposta a estímulos lentos (duração de secção da canção diminuiu), não alterando em resposta a estímulos rápidos. Em termos comportamentais, estes aproximam-se mais depressa da coluna quando o estímulo é lento.

Relativamente à taxa silábica, um estudo de Funghi et al (2015) em milheirinhas, assim como outros estudos em outras espécies (DuBois et al 2009, Geberzahn & Aubin 2014, Linhart et al 2013, Vehrencamp et al 2013), mostrou que os machos respondem com um aumento da taxa silábica quando desafiados por um “playback” interativo com canções não manipuladas. Em Linhart et al (2013) são também apresentados estímulos acelerados/desacelerados artificialmente, tal como no presente trabalho, no entanto, nesse estudo em felosa-comum (*Phylloscopus collybita*), as aves aumentaram a sua taxa silábica em resposta a estímulos rápidos e não alteraram em resposta a estímulos lentos. Tendo em conta este estudo, seria de esperar que as milheirinhas aumentassem a sua taxa silábica em resposta aos estímulos rápidos e que mantivessem em resposta a estímulos lentos, o que não se verificou. Aparentemente os machos de milheirinha agem de forma mais agressiva em resposta a um estímulo de velocidade normal ou desacelerado, mas, no entanto, evitam uma escalada do conflito quando expostas a canções mais agressivas por parte do oponente, não intensificando elas próprias a velocidade das suas canções.

No caso da milheirinha, uma vez que não aumentaram a taxa silábica em resposta a estímulos rápidos, pode significar que estes já estão no limite da sua performance ou que querem evitar uma escalada do conflito, já que as canções mais rápidas podem ser um sinal de agressividade. Esta hipótese está de acordo com o facto da latência de aproximação ser menor nestes casos, uma vez que estudos anteriores, tanto em milheirinhas (Cardoso et al 2007) como em “banded wrens” (*Thryothorus pleurostictus*) (Illes et al 2006), sugerem que as canções mais rápidas são percebidas como um sinal de ameaça e afastam os machos, pois segundo os resultados desses estudos, os machos aproximaram-se menos de estímulos mais rápidos.

Ao nível do canto todas as alterações ocorrem na taxa silábica, não se verificando alterações na frequência, o que já seria de esperar uma vez que para esta espécie este é um traço com função intersexual (Cardoso et al 2007). Também não ocorrem alterações na composição em termos de trilos na canção, o que está de acordo com Neves (2013), onde se mostrou que embora um elevado número de trilos na canção gere um comportamento mais agressivo, em termos de resposta vocal não há uma variação consistente em número de trilos.

Quanto à resposta comportamental, excluindo a latência de aproximação já aqui debatida, não foram encontradas diferenças na resposta a estímulos rápidos ou lentos. Uma possibilidade será o facto de não ser uma espécie territorial, não agindo de forma agressiva perante a presença de outros machos nas proximidades que não tentem uma maior aproximação. Designou-se “flyover” quando um macho voou de poleiro em poleiro ou sobre a coluna. Este é um comportamento não tanto de ameaça, comparativamente a uma aproximação direta à coluna, mas como que um comportamento de demarcação de espaço ou defesa do par, já que durante a época reprodutiva é comum o macho seguir a fêmea de modo a evitar a aproximação de outros machos (Mota 1999). Contrariamente a este estudo em milheirinhas, um trabalho recente em “white-crowned sparrow” (*Zonotrichia leucophrys*), mostrou que os machos dessa espécie respondem com uma maior aproximação a estímulos de alta performance, consistindo estes em elevadas taxas de trilos e bandas de frequência mais largas, do que a estímulos de baixa performance, com baixa taxa de trilos e estreita banda de frequências (Phillips & Derryberry 2017).

Considerações Metodológicas

Relativamente aos métodos utilizados neste trabalho, o uso de “playbacks” interativos é um método comum no estudo da comunicação entre as aves (McGregor et al 1992), sendo assim um método fiável que possibilita simular a presença de outro indivíduo com a vantagem de poder manipular as canções e o momento em que o desafio ocorre. Ainda que dentro da variação natural da espécie (Mota & Cardoso 2001), foram usadas canções diferentes para a produção de cada estímulo, tendo, portanto, durações e taxas silábicas diferentes de origem. Ao acelerar uma canção originalmente mais lenta, esta deu origem a

um estímulo não tão rápido quanto a aceleração de uma canção originalmente mais rápida. Este facto pode ter tido influência na resposta das aves ao desafio, apesar da mesma canção ter sido usada para a produção de um estímulo de cada tipo, o que resulta numa clara separação entre os estímulos rápidos e lentos. Futuramente pretendemos medir a aceleração/desaceleração de cada estímulo produzido e ter isso em conta na análise dos dados.

A gravação de um minuto anterior ao desafio permitiu-nos ter uma fase controlo (fase antes) de modo a conseguir avaliar as alterações dentro de cada indivíduo, uma técnica usada pela primeira vez no trabalho de Funghi et al (2015).

O trabalho de campo foi realizado sempre durante o mesmo período do dia, maioritariamente de manhã, em dias com boa condição atmosférica e apenas durante a época reprodutiva de modo a evitar efeitos dessas variáveis.

Conclusão

O canto é uma forma fundamental de comunicação entre as aves, podendo transmitir muitas informações acerca das características e condição do indivíduo. Os resultados deste trabalho sugerem que a elevada taxa silábica em milheirinhas seja um sinal de agressividade, uma vez que inibe a aproximação dos indivíduos à coluna.

Referências

- Botero CA, Rivero JM, Vehrencamp SL. 2007. Relative threat and recognition ability in the responses of tropical mockingbirds to song playback. *Animal Behaviour* 73: 661-69
- Brainard MS, Doupe AJ. 2002. What songbirds teach us about learning. *Nature* 417: 351-58
- Cardoso GC, Mota PG. 2007. Song diversification and complexity in canaries and seedeaters (*Serinus* spp.). *Biological Journal of the Linnean Society* 92: 183–94
- Cardoso GC, Mota PG, Depraz V. 2007. Female and male serins (*Serinus serinus*) respond differently to derived song traits. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 61: 1425-36
- Catchpole CK, Slater PJB. 2008. *Bird Song: Biological Themes and Variations*. Cambridge: Cambridge University Press. 335 pp.
- Cramp S, Perrins CM. 1994. *Handbook of the birds of Europe, the Middle East and North Africa - the birds of the Western Palearctic*. Oxford: Oxford University Press.
- Dabelsteen T, Pedersen SB. 1990. Song and information about aggressive responses of blackbirds, *Turdus merula*: evidence from interactive playback experiments with territory owners *Animal Behaviour* 40: 1158-68
- DuBois AL, Nowicki S, Searcy WA. 2009. Swamp sparrows modulate vocal performance in an aggressive context. *Biology Letters* 5: 163-65
- Funghi C, Cardoso GC, Mota PG. 2015. Increased syllable rate during aggressive singing in a bird with complex and fast song. *J. Avian Biol.* 46: 283-88
- Geberzahn N, Aubin T. 2014. How a songbird with a continuous singing style modulates its song when territorially challenged. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 68: 1-12
- Gil D, Gahr M. 2002. The honesty of bird song: multiple constraints for multiple traits. *Trends Ecol. Evol.* 17: 133-41
- Grafe TU, Bitz JH. 2004. Functions of duetting in the tropical boubou, *Laniarius aethiopicus*: territorial defence and mutual mate guarding. *Animal Behaviour* 68: 193-201
- Grafen A. 1990. Biological signals as handicaps. *Journal of Theoretical Biology* 144: 517-46
- Große J. 2011. Modelling and the fall and rise of the handicap principle. *Biology & Philosophy* 26: 677–96
- Illes AE, Hall ML, Vehrencamp SL. 2006. Vocal performance influences male receiver response in the banded wren. *Proceedings of the Royal Society B* 273: 1907–12
- Kroodsma DE, Byers BE. 1991. The Function(s) of Bird Song. *American Zoologist* 31: 318-28
- Langmore NE. 1998. Functions of duet and solo songs of female birds. *Trends Ecol. Evol.* 13: 136-40
- Leitão AV, Monteiro AH, Mota PG. 2014. Ultraviolet reflectance influences female preference for colourful males in the European serin. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 68: 63-72
- Linhart P, Jařska P, Petrusková T, Petrusek A, Fuchs R. 2013. Being angry, singing fast? Signalling of aggressive motivation by syllable rate in a songbird with slow song. *Behavioural Processes* 100: 139–45
- Mamede AT, Mota PG. 2012. Limited Inter-Annual Song Variation in the Serin (*Serinus serinus*). *Ethology* 118: 1157-64
- Marler P. 2004. Bird calls: a cornucopia for communication In *Nature's Music: The Science of Birdsong*, ed. P Marler, H Slabbekoorn, pp. 132-77. San Diego, California, USA: Elsevier Academic Press

- McGregor PK, Catchpole CK, Dabelsteen T, Falls JB, Fusani L, et al. 1992. *Playback and Studies of Animal Communication*. New York: Plenum Press.
- Mota PG. 1995. *Ecologia comportamento da reprodução no Serino (Serinus serinus, Aves: Fringillidae)*. Universidade de Coimbra, Coimbra
- Mota PG. 1999. The functions of song in the Serin. *Ethology* 105: 137–48
- Mota PG, Cardoso GC. 2001. Song organisation and patterns of variation in the serin (*Serinus serinus*). *acta ethologica* 3: 141-50
- Naguib M. 1999. Effects of song overlapping and alternating on nocturnally singing nightingales. *Animal Behaviour* 58: 1061–67
- Naguib M, Mennill DJ. 2010. The signal value of birdsong: empirical evidence suggests song overlapping is a signal. *Animal Behaviour* 80: e11ee15
- Neves ATF. 2013. *Estudo do efeito da estrutura do canto da Milheirinhas (Serinus serinus) na competição entre os machos*. University of Coimbra, Coimbra, Portugal. 79 pp.
- Nowicki S, Peters S, Podos J. 1998. Song Learning, Early Nutrition and Sexual Selection in Songbirds. *American Zoologist* 38: 179-90
- Phillips JN, Derryberry EP. 2017. Vocal performance is a salient signal for male–male competition in White-crowned Sparrows. *The Auk* 134: 564–74
- Podos J. 1996. Motor constraints on vocal development in a songbird. *Animal Behaviour* 51: 1061–70
- Podos J. 1997. A performance constraint on the evolution of trilled vocalizations in a songbird family. *Evolution* 51: 537–51
- Podos J, Huber SK, Taft B. 2004. BIRD SONG: The Interface of Evolution and Mechanism. *The Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 35: 55–87
- Rehsteiner U, Geisser H, Reyer H-U. 1998. Singing and mating success in water pipits: one specific song element makes all the difference. *Animal Behaviour* 55: 1471–81
- Rohwer S, Ewald PW. 1981. The Cost of Dominance and Advantage of Subordination in a Badge Signaling System. *Evolution* 35: 441-54
- Ryan MJ, Brenowitz EA. 1985. The role of body size, phylogeny, and ambient noise in the evolution of bird song. *The American Naturalist* 126: 87-100
- Searcy WA, Andersson M. 1986. Sexual Selection and the Evolution of Song. *Annual Review of Ecology and Systematics* 17: 507-33
- Searcy WA, Beecher MD. 2009. Song as an aggressive signal in songbirds. *Animal Behaviour* 78: 1281–92
- Sethi VK, Bhatt D, Kumar A. 2012. Structure and context of female song in a tropical bird, the Pied Bush Chat. *Current Science* 103: 827-32
- Slater PJB. 1997. Ecology and evolution of acoustic communication in birds. *Ethology* 103: 876-77
- Smith WJ. 1977. *The Behavior of Communicating*. Cambridge, Mass. and London, England: Harvard University Press: An ethnological approach.
- Suthers R, Goller F. 1997. Motor correlates of vocal diversity in songbirds In *Current Ornithology*, pp. 235–88: Springer US
- Suthers RA, Goller F, Pytte C. 1999. The neuromuscular control of birdsong. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 354: 927-39
- Todt D, Naguib M. 2000. Vocal Interactions in Birds: The Use of Song as a Model in Communication. *Advances in the Study of Behavior* 29: 247-96
- Vallet E, Beme I, Kreutzer M. 1998. Two-note syllables in canary songs elicit high levels of sexual display. *Animal Behaviour* 55: 291–97

- Vehrencamp SL, Yantachka J, Hall ML, de Kort SR. 2013. Trill performance components vary with age, season, and motivation in the banded wren. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 67: 409-19
- Zahavi A. 1975. Mate selection - A selection for a handicap. *Journal of Theoretical Biology* 53: 205-14
- Zahavi A. 1980. Ritualization and the Evolution of Movement Signals *Behaviour* 2: 77-81
- Zahavi A. 1987. The Theory of Signal Selection and Some of its Implications. *In Proceedings of the International Symposium on Biological Evolution*: 305-27
- Zahavi A, Zahavi A. 1997. *The Handicap Principle: A missing piece of Darwin's puzzle*. New York: Oxford University Press.

Anexos

Anexo 1 – Informação sobre local e data de cada gravação e respetivos comportamentos registados para cada indivíduo.

| Indivíduo | Tipo de estímulo | Local | Data | Voo durante o "playback" | latência de voo (s) | distância mínima à coluna (m) | "flyovers" | voo depois do "playback" |
|-----------|------------------|---------------------------|------------|--------------------------|---------------------|-------------------------------|------------|--------------------------|
| 01a | rápido | Escola Agrária | 15/05/2017 | sim | 22,7 | 10 | sim | sim |
| 01b | lento | Choupal | 28/03/2017 | sim | 14 | 5 | sim | não |
| 02a | rápido | Escola Agrária | 15/05/2017 | não | 60 | 30 | não | não |
| 02b | lento | Pereira | 18/05/2017 | sim | 5,9 | 10 | sim | - |
| 03a | rápido | Vale de Canas | 21/05/2017 | não | 60 | 30 | não | não |
| 03b | lento | Estrada do Campo | 30/03/2017 | sim | 16 | 10 | sim | não |
| 04a | rápido | Condeixa-a-Nova/Gorgulhão | 12/06/2017 | não | 60 | 30 | não | - |
| 04b | lento | Carvalhosas | 21/04/2017 | não | 60 | 30 | não | não |
| 05a | rápido | Rio Velho | 04/04/2017 | não | 60 | 30 | não | sim |
| 05b | lento | Rio Velho | 04/04/2017 | sim | 30 | 1 | sim | sim |
| 06a | rápido | Pereira | 05/04/2017 | sim | 38 | 2 | não | sim |
| 06b | lento | Arzila | 24/05/2017 | não | 60 | 30 | não | não |
| 07a | rápido | Pereira | 05/04/2017 | não | 60 | 30 | não | não |
| 07b | lento | Sebal | 18/05/2017 | não | 60 | 30 | não | sim |
| 08a | rápido | Taveiro | 06/04/2017 | não | 60 | 30 | não | não |
| 08b | lento | Escola Agrária | 15/05/2017 | sim | ? | 20 | não | sim |

| | | | | | | | | |
|------------|--------|---------------------|------------|-----|-----|----|-----|-----|
| 09a | rápido | Corujeira | 06/04/2017 | não | 60 | 30 | não | não |
| 09b | lento | Corujeira | 06/04/2017 | não | 60 | 30 | não | não |
| 10a | rápido | Ribeira de Frades | 22/05/2017 | não | 60 | 30 | não | - |
| 10b | lento | Arzila | 24/05/2017 | sim | 20 | 20 | sim | não |
| 11a | rápido | S. João do Campo | 16/05/2017 | sim | 12 | 15 | sim | - |
| 11b | lento | S. João do Campo | 16/05/2017 | não | 60 | 30 | não | não |
| 12a | rápido | Alcarragues | 20/04/2017 | não | 60 | 30 | não | não |
| 12b | lento | Inclua | 24/05/2017 | sim | 15 | 10 | sim | - |
| 13a | rápido | Adémia | 24/04/2017 | não | 60 | 30 | não | - |
| 13b | lento | Adémia | 24/04/2017 | sim | 6,5 | 20 | não | sim |
| 14a | rápido | Adémia | 24/04/2017 | sim | 37 | 30 | não | não |
| 14b | lento | Adémia | 24/04/2017 | sim | 12 | 10 | sim | não |
| 15a | rápido | Dianteiro | 25/04/2017 | sim | 27 | 20 | sim | não |
| 15b | lento | Covões | 04/05/2017 | não | 60 | 30 | não | não |
| 16a | rápido | Venda da Luísa | 12/06/2017 | sim | 24 | 4 | sim | não |
| 16b | lento | Escola Agrária | 04/05/2017 | sim | 38 | 10 | sim | sim |
| 17a | rápido | Fornos | 09/05/2017 | sim | 21 | 15 | não | sim |
| 17b | lento | Casal Seco | 24/05/2017 | não | 60 | 30 | não | não |
| 18a | rápido | Vila Pouca do Campo | 22/05/2017 | não | 60 | 30 | não | não |
| 18b | lento | Arzila | 22/05/2017 | sim | 7,6 | 15 | não | sim |
| 19a | rápido | Rapoila | 16/06/2017 | sim | 25 | 25 | não | sim |

| | | | | | | | | |
|------------|--------|-------------------------------|------------|-----|----|----|-----|-----|
| 19b | lento | Redonda | 23/06/2017 | sim | 41 | 15 | não | sim |
| 20a | rápido | Campos da Agrária - Gorgulhão | 15/05/2017 | sim | 22 | 20 | sim | não |
| 20b | lento | Montes de Cima | 14/06/2017 | não | 60 | 30 | não | não |
| 21a | rápido | Estrada do Campo | 15/05/2017 | não | 60 | 30 | não | não |
| 21b | lento | Montes de Cima | 14/06/2017 | não | 60 | 30 | não | não |
| 23a | rápido | São Facundo | 22/06/2017 | sim | 30 | 20 | não | não |
| 23b | lento | Póvoa | 22/06/2017 | não | 60 | 30 | não | não |
| 25a | rápido | Casal do Minhoto | 16/06/2017 | não | 60 | 30 | não | sim |
| 25b | lento | São Facundo | 22/06/2017 | não | 60 | 30 | não | não |

Anexo 2 – Valores de duração de secção e frequência de intensidade máxima para as fases antes, durante e depois do desafio.

| Indivíduo | Tipo de estímulo | Voo durante o desafio | Duração de secção | | | Frequência de intensidade máxima | | |
|------------|------------------|-----------------------|-------------------|---------|--------|----------------------------------|---------|--------|
| | | | antes | durante | depois | antes | durante | depois |
| 01a | rápido | sim | 1,374 | 1,353 | 1,343 | 6359 | 6170 | 6115 |
| 01b | lento | sim | 1,946 | 1,944 | 1,899 | 6551 | 6630 | 6516 |
| 02a | rápido | não | 2,136 | 2,142 | 2,101 | 6834 | 6247 | 6170 |
| 02b | lento | sim | 1,802 | 1,809 | - | 6274 | 6253 | - |
| 03a | rápido | não | 1,238 | 1,229 | 1,219 | 6601 | 6283 | 6510 |
| 03b | lento | sim | 1,032 | 0,980 | 1,014 | 6416 | 6110 | 5696 |
| 04a | rápido | não | 2,443 | 2,441 | - | 6956 | 6397 | - |
| 04b | lento | não | 1,646 | 1,658 | 1,652 | 6327 | 6413 | 6421 |
| 05a | rápido | não | 0,872 | 0,871 | 0,881 | 6555 | 6318 | 6587 |
| 05b | lento | sim | 1,431 | 1,391 | 1,384 | 6438 | 6718 | 6406 |
| 06a | rápido | sim | 1,049 | 1,060 | 1,041 | 6558 | 6503 | 6320 |
| 06b | lento | não | 0,956 | 0,960 | 0,959 | 6191 | 5957 | 6215 |
| 07a | rápido | não | 1,116 | 1,114 | 1,130 | 5960 | 6240 | 7010 |
| 07b | lento | não | 0,921 | 0,933 | 0,931 | 6390 | 6240 | 6155 |
| 08a | rápido | não | 1,297 | 1,295 | 1,298 | 5438 | 5472 | 5498 |

| | | | | | | | | |
|------------|--------|-----|-------|-------|-------|------|------|------|
| 08b | lento | sim | 1,416 | 1,389 | 1,377 | 7203 | 6572 | 7328 |
| 09a | rápido | não | 1,336 | 1,329 | 1,346 | - | - | - |
| 09b | lento | não | 0,793 | 0,795 | 0,789 | - | - | - |
| 10a | rápido | não | 1,274 | 1,251 | - | 6189 | 6328 | - |
| 10b | lento | sim | 1,059 | 1,044 | 1,054 | 6455 | 6378 | 6359 |
| 11a | rápido | sim | 1,620 | 1,627 | - | 6589 | 6540 | - |
| 11b | lento | não | 1,111 | 1,115 | 1,124 | 6329 | 6274 | 6755 |
| 12a | rápido | não | 0,934 | 0,950 | 0,939 | - | - | - |
| 12b | lento | sim | 2,393 | 2,355 | - | 6340 | 6410 | - |
| 13a | rápido | não | 1,281 | 1,286 | - | 7189 | 7149 | - |
| 13b | lento | sim | 1,884 | 1,858 | 1,863 | 6145 | 6527 | 6095 |
| 14a | rápido | sim | 1,440 | 1,439 | 1,446 | 6975 | 6738 | 6692 |
| 14b | lento | sim | 1,544 | 1,514 | 1,534 | 6088 | 6048 | 5998 |
| 15a | rápido | sim | 1,763 | 1,760 | 1,744 | 6079 | 6666 | 6613 |
| 15b | lento | não | 0,790 | 0,785 | 0,785 | 6448 | 6410 | 6485 |
| 16a | rápido | sim | 1,421 | 1,391 | 1,394 | 6050 | 6317 | 6471 |
| 16b | lento | sim | 0,645 | 0,628 | 0,613 | 6479 | 6721 | 6637 |
| 17a | rápido | sim | 0,931 | 0,932 | 0,932 | 6411 | 6053 | 6249 |
| 17b | lento | não | 0,789 | 0,752 | 0,741 | 6404 | 6722 | 6204 |
| 18a | rápido | não | 0,776 | 0,776 | 0,792 | 6911 | 6884 | 6513 |
| 18b | lento | sim | 2,269 | 2,224 | 2,203 | 5555 | 6863 | 6683 |

| | | | | | | | | |
|------------|--------|-----|-------|-------|-------|------|------|------|
| 19a | rápido | sim | 0,948 | 0,940 | 0,952 | 6455 | 6518 | 6528 |
| 19b | lento | sim | 0,240 | 0,238 | 0,238 | 6659 | 6574 | 6495 |
| 20a | rápido | sim | 1,798 | 1,799 | 1,796 | 6406 | 6475 | 6358 |
| 20b | lento | não | 1,131 | 1,138 | 1,124 | 7003 | 7415 | 7107 |
| 21a | rápido | não | 1,163 | 1,161 | 1,166 | 6342 | 6560 | 6053 |
| 21b | lento | não | 1,063 | 1,061 | 1,068 | 5981 | 6023 | 6268 |
| 23a | rápido | sim | 2,474 | 2,491 | 2,472 | 6156 | 5958 | 6073 |
| 23b | lento | não | 1,274 | 1,288 | 1,310 | 6456 | 6563 | 6289 |
| 25a | rápido | não | 0,492 | 0,488 | 0,484 | 6264 | 6070 | 6280 |
| 25b | lento | não | 1,493 | 1,525 | 1,510 | 5818 | 6478 | 6195 |

Anexo 3 – Médias e erros padrão por tipo de estímulo e fase do desafio para a duração de secção.

| Estímulo | Fase | Média | Erro Padrão |
|-----------------|-------------|--------------|--------------------|
| Rápido | Antes | 1,4816445 | 0,14817331 |
| | Durante | 1,4790549 | 0,14973111 |
| | Depois | 1,4577981 | 0,16448552 |
| Lento | Antes | 1,4716690 | 0,18591598 |
| | Durante | 1,4476492 | 0,18461266 |
| | Depois | 1,3179326 | 0,19143975 |

Anexo 4 – Médias e erros padrão por tipo de estímulo e fase do desafio para a frequência de intensidade máxima.

| Estímulo | Fase | Média | Erro Padrão |
|-----------------|-------------|--------------|--------------------|
| Rápido | Antes | 6383,2536 | 283,68375 |
| | Durante | 6377,5012 | 270,40628 |
| | Depois | 6379,8333 | 214,23438 |
| Lento | Antes | 6398,8655 | 424,39964 |
| | Durante | 6514,1104 | 263,68449 |
| | Depois | 6421,1778 | 443,10675 |