

1 2 9 0



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Diogo de Oliveira Goulart Pedrosa

IN SEARCH OF THE GENETIC BASIS OF
VOCAL LEARNING IN SONGBIRDS.
ANALYSIS OF STRUCTURAL
CHARACTERISTICS OF SONG IN CROSSED
RACES OF CANARIES

Dissertação no âmbito do Mestrado em Biologia orientada pelo Professor Doutor Paulo Jorge Gama Mota e pelo Doutor Ricardo Jorge da Silva Pereira Lopes e apresentada ao Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Outubro de 2020



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Diogo de Oliveira Goulart Pedrosa

IN SEARCH OF THE GENETIC BASIS OF
VOCAL LEARNING IN SONGBIRDS.
ANALYSIS OF STRUCTURAL
CHARACTERISTICS OF SONG IN CROSSED
RACES OF CANARIES

Dissertação no âmbito do Mestrado em Biologia orientada pelo Professor Doutor Paulo Jorge Gama Mota e pelo Doutor Ricardo Jorge da Silva Pereira Lopes e apresentada ao Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Outubro de 2020

Agradecimentos

A realização deste trabalho não teria sido possível sem o apoio de todos aqueles que me acompanharam no percurso académico em Coimbra, um obrigado saudosos a todos.

Em primeiro lugar quero agradecer ao Professor Doutor Paulo Gama Mota e ao Doutor Ricardo Jorge Lopes, pela dedicação, motivação e ensinamentos valiosos que me proporcionaram ao longo de todo o projeto.

Aos antigos e presentes integrantes da Real República Rapo-Taxo por me terem acolhido tão calorosamente, ajudarem a ultrapassar os tempos mais difíceis, e adoçarem os momentos mais alegres. Ao Cláudio que tão prontamente me mostrou Coimbra e integrou na comunidade. Ao trio-bio, Phillip e Daniel, embora dispersos foram vitais para o meu crescimento, um abraço para a Califórnia e Aveiro. Aos Complexo de Épico, pelo humor e desenvolvimento artístico que me proporcionaram. À Jéssica, cuja paciência infindável, disponibilidade permanente, e bom espírito me motivaram vezes sem conta.

E por último à minha família, que sempre me apoiaram e incentivaram a ser melhor. Sem eles, não estaria onde estou hoje.

Muito obrigado a todos.

Índice

Agradecimentos.....	i
Resumo	iv
Abstract.....	vi
Capítulo 1 - Introdução	1
1.1 Comunicação animal.....	1
1.2 Comunicação Acústica nas Aves	2
1.3 Anatomia do Canto	4
1.4 Aprendizagem Vocal nas Aves.....	8
1.5 Espécie em Estudo	12
1.6 Objectivos	13
Capítulo 2 – Materiais e Métodos.....	15
2.1 Desenho experimental.....	15
2.2 Produção de playbacks	17
2.3 Análise das Canções.....	18
2.4 Análise Estatística	19
Capítulo 3 - Resultados	21
3.1 Características do canto de tutores	21
3.2 Selecção de variáveis do canto	22
3.3 Classificação das sílabas dos híbridos	22
Capítulo 4 - Discussão	30
Referências	33

Resumo

O canto é uma forma de comunicação com alta importância nas aves, sendo regularmente utilizado na competição entre indivíduos e escolha de parceiros. É sabido que em muitas espécies a canção produzida depende de um processo de aprendizagem vocal. Esta aprendizagem é influenciada pela apresentação de diferentes estímulos durante períodos sensíveis de aquisição sensorial, resultando em diferentes canções produzidas pela ave. Não obstante, as aves preferem aprender canções pertencentes à própria espécie, e a sua capacidade e escolha na aprendizagem é condicionada pela sua base genética. Adicionalmente, experiências de hibridação mostraram que diferenças nas características do canto possuem uma componente genética. Este trabalho procura melhorar o conhecimento sobre os mecanismos genéticos responsáveis pelas diferenças no canto das aves, através da fenotipagem de aves resultantes de cruzamentos. Para tal, foram cruzados canários pertencentes a uma variedade que sofreu selecção artificial ao longo do tempo pelo canto, com canários que não sofreram essa selecção. A variedade que sofreu selecção pelo canto, o Waterslager-Malinois, apresenta canções com uma alta taxa de repetição e uma gama de frequências mais baixa que as restantes variedades de canários, e possui uma deficiência congénita auditiva afetando frequências acima dos 2kHz. Simultaneamente, outras partes do seu canto são semelhantes às outras variedades. Os híbridos resultantes desse cruzamento foram tutorados com canções de ambas as variedades em partes equitativas. Verificou-se que cada híbrido demonstrou a capacidade de aprender sílabas de ambos os tipos de tutores. No entanto, houve variação entre indivíduos, que estará associada às diferentes combinações da componente genética herdada das duas variedades alvo dos cruzamentos. Adicionalmente, híbridos com constituintes genéticos exclusivos a cada variedade, permitirão avaliar a importância de cada componente genético dos progenitores nas características do seu repertório em estudos genéticos.

Abstract

Singing is a form of communication with high importance in birds, being regularly used in competition between individuals and choice of partners. It is known that in many species the song produced depends on a process of vocal learning. This learning is influenced by the presentation of different stimuli during sensitive periods of sensory acquisition, resulting in different songs produced by the bird. Nevertheless, birds prefer to learn songs belonging to their own species, and their ability and choice in learning is conditioned by their genetic basis. In addition, hybridization experiments have shown that differences in singing characteristics have a genetic component. This work seeks to improve knowledge about the genetic mechanisms responsible for the differences in birdsong, through the phenotyping of birds resulting from crossings. To this end, canaries belonging to a variety that underwent artificial selection over time through singing, Waterslager-Malinois, presents songs with a high repetition rate and a lower frequency range than the other varieties of canaries, and has a congenital hearing impairment affecting frequencies above 2kHz. At the same time, other parts of its singing are similar to other varieties. The hybrids resulting from this crossing were tutored with songs of both varieties in equal parts. It was found that each hybrid demonstrated the ability to learn syllables from both types of tutors. However, there was variation between individuals, which will be associated with different combinations of the genetic component inherited from the two target varieties of the crosses. Additionally, hybrids with exclusive genetic constituents for each variety, will allow to assess the importance of each genetic component of the parents in the characteristics of their repertoire in genetic studies.

Capítulo 1 - Introdução

1.1 Comunicação animal

Comunicação é a transmissão de informação sob a forma de sinais (Bradbury & Vehrencamp 1988), na qual existe um emissor e um receptor cujos comportamentos se podem alterar como resultado do sinal. Os sinais são traços fisiológicos, morfológicos ou comportamentais que provêm benefícios na emissão, sendo então passados a descendentes por seleção natural (Searcy & Nowicki 2005). Em casos em que o sinal não beneficia o emissor, é designado como pista (Bradbury & Vehrencamp 1988; Catchpole & Slater 2008).

A comunicação é essencial para a existência das diversas interações sociais e comportamentos associados, como a competição por recursos, defesa territorial, a proteção contra predadores, a escolha de parceiros, os rituais de acasalamento, o reconhecimento individual e formação de hierarquias (Todt & Naguib 2000; Catchpole & Slater 2008).

As origens da comunicação e suas particularidades têm sido alvo de debate ao longo do tempo. Durante décadas teorizou-se que a evolução da comunicação era resultado da cooperação entre indivíduos, devido aos benefícios que os intervenientes obtinham (Smith 1977). Atualmente a comunicação é vista não só como um resultado de cooperação, mas também de conflito (Catchpole & Slater 2008). Em casos em que os interesses do emissor e receptor apresentam conflito, era também aceite que apenas sinais honestos conseguiriam evoluir, apesar das motivações para iludir, devido aos custos associados à sua produção (Zahavi 1975). Indivíduos portadores de sinais com alto custo indicam as suas qualidades ao mostrarem que podem acarretar os custos de produção. Uma analogia de fácil visualização é o consumo conspícuo nas pessoas, que compram artigos de luxo para mostrar estatuto social (Veblen 1899). Porém, sinais honestos não têm necessariamente de ser dispendiosos. Demonstrar que um sinal tem altos custos é insuficiente e nem sempre necessário para provar, e explicar o porquê, de ser um sinal honesto (Grose 2011).

Os sinais podem ser categorizados em visuais, acústicos, químicos e tácteis apresentando vantagens e desvantagens entre si (Tabela 1). No caso das aves, os sinais visuais e acústicos são os mais utilizados tendo alta importância tanto em interações intersexuais como intrasexuais. Os sinais visuais, embora um dos maiores fatores de

atração nos machos (como a plumagem colorida e danças de acasalamento), possuem as suas desvantagens em ambientes de baixa visibilidade como florestas densas ou durante a noite. Por outro lado, sinais acústicos (como o canto) apresentam várias vantagens face a estes desafios. Transmitem-se independentemente das condições de luminosidade, contornam obstáculos, atingem longas distâncias, são omnidirecionais, carregam uma grande quantidade de informação de forma rápida, e apresentam baixo custo energético (Catchpole & Slater 2008).

Tabela 1. Comparação das diferentes vias de comunicação. Adaptado de Catchpole 2008.

	Acoustic	Visual	Chemical	Tactile
Nocturnal use	Good	Poor	Good	Good
Around objects	Good	Poor	Good	Poor
Range	Long	Medium	Long	Short
Rate of change	Fast	Fast	Slow	Fast
Locatability	Medium	Good	Poor	Good
Energetic cost	Low	Low	Low	Low

1.2 Comunicação Acústica nas Aves

Nas aves as vocalizações podem-se categorizar em canções e chamamentos. Os chamamentos são curtos, simples e produzidos por ambos os sexos. São usados em situações específicas, como de alarme face a ameaças, ou para manter contacto com outras aves durante a alimentação e o voo (Catchpole 1982; Catchpole & Slater 2008). As canções são mais longas, complexas, e produzidas maioritariamente por machos durante a época reprodutiva. Há exceções em aves de regiões tropicais e algumas zonas áridas na Austrália e África, nas quais o canto ocorre durante todo o ano, e as fêmeas participam em duetos (Sethi 2012). Tais exceções são atribuídas à irregularidade climática e pouca diferença sazonal nestas regiões, levando as aves a acasalarem sempre que as condições são favoráveis (Slater & Mann 2004). As canções são utilizadas na competição entre machos, para atrair e estimular fêmeas, e na competição territorial entre fêmeas (Langmore 1998; Leboucher 1998; Catchpole & Slater 2008; Kroodsma & Byers 1991), portanto, têm características que permitem tanto rivais como potenciais parceiros obter várias informações essenciais acerca do emissor, tais como: espécie,

população a que pertence, identidade individual, motivação, capacidade em confronto físico, potencial reprodutivo (Mennil & Ratcliffe 2004; Catchpole & Slater 2008).

As canções foram classificadas como inatas ou aprendidas dependendo da espécie. Canções inatas são típicas em aves da subordem Tyranni (suboscinos) e não passeriformes. São canções de estrutura simples e estereotipadas (Slater 1997). Embora aves com canções inatas aparentem mostrar algum nível de aprendizagem, a canção é tão simples e semelhante entre a população que não se considera que tenha ocorrido aprendizagem. Por outro lado, aves da subordem Passeri (oscinos) aprendem as canções a partir de tutores. São também conhecidos como aves canoras ou "songbirds". Estas canções são mais complexas e apresentam variação individual e regional (Catchpole & Slater 2008).

A diversidade de canções existente é imensa. A duração pode variar de alguns milissegundos a vários minutos, e o tamanho do reportório varia de apenas uma canção, o que ocorre num terço de todas as aves canoras (MacDougall-Shackleton 1997), a milhares de canções devido ao diverso número de sílabas que utilizam em diferentes combinações, como no caso do "brown thrasher" (*Toxostoma rufum*) (Boughey & Thompson 1981; Marler & Slabbekorn 2004). Esta variação no tamanho do reportório pode ser explicada em parte por duas hipóteses: a "hipótese do reportório" teoriza que reportórios grandes são resultado da selecção sexual direcional, as fêmeas favorecem o extremo de um traço sexual hereditário, e de facto em algumas espécies machos com reportórios maiores têm um sucesso reprodutivo maior em comparação com machos de reportórios menores (Beecher & Brenowitz 2005; Catchpole & Slater 2008); a "hipótese de partilha de canções" sugere que a competição entre machos seleciona canções simples e homogéneas (Beecher & Brenowitz 2005). Indivíduos com uma maior similaridade no reportório apresentam uma menor agressividade entre si, o que se traduz em menos conflitos e consequentes custos energéticos, tendo alguns casos associado uma maior partilha de reportório a um maior sucesso reprodutivo e aquisição de território (Payne & Payne 1997; Beecher et al. 2000). Quando o objetivo da aprendizagem é adquirir um reportório partilhado por certos indivíduos-chave, como vizinhos territoriais, é geralmente verdade que esse objetivo pode ser alcançado com um reportório relativamente pequeno, pois aves que aprendam todas as canções individuais vão ter um menor índice de partilha.

As canções são formadas por secções designadas de frases, estas consistem em padrões de sílabas (Figura 1). As sílabas podem ser simples ou complexas, dividindo-se em componentes de menor duração, os elementos (Catchpole & Slater 2008). A distinção entre os vários níveis de organização é feita pelos intervalos de tempo, sendo o que

separa canções o maior e o que separa elementos o menor (Mota & Cardoso 2001). Geralmente os intervalos apresentam uma distribuição bimodal, sendo inferiores a 10ms ou superiores a 20ms. Suthers (1997) mostrou que os canários realizam pequenas inspirações durante o canto, mas só são capazes de as fazer nos intervalos superiores a 20ms. Por esse motivo, os elementos são separados por intervalos não superiores a 10ms.

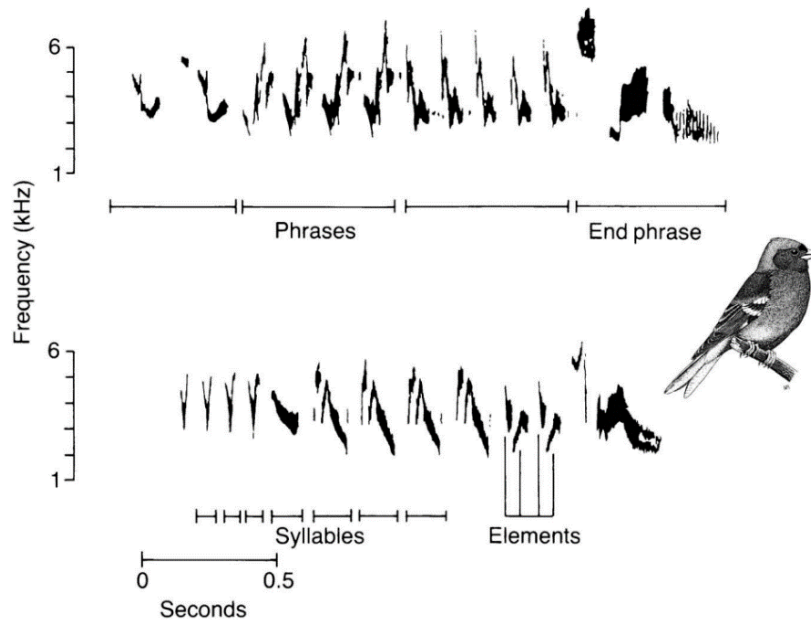


Figura 1. Sonograma de um tentilhão ilustrando a divisão das canções nos seus componentes, frases, sílabas e elementos. (de Slater & Ince 1979, em Catchpole & Slater 2008).

1.3 Anatomia do Canto

A capacidade de produzir canto envolve uma rede neurológica complexa em conjunção com um sistema motor, exigindo perfeita coordenação entre mecanismos respiratórios, vocais e craniomandibulares (Goller et al 1999). É, portanto, um bom indicador de fitness no indivíduo, revelando capacidade física, presença de stress durante o desenvolvimento, potencial genético e a qualidade do seu processo de aprendizagem (Nowicki et al 1998).

A rede neurológica envolvida no canto é formada por 2 vias (Figura 2): a via posterior responsável pela produção do canto, é constituída por 4 áreas distintas, HVC, RA, Nif e nXIIIts; a via anterior responsável pela aprendizagem do canto, composta por 3 áreas, X, LMAN e DLM (Brainard & Doupe 2002). Neste sistema estão associados neurónios dopaminérgicos envolvidos em ambos os processos (Saravanan 2019). A informação

auditiva é transmitida a partir do "field L", a área principal de recepção sonora, análogo ao córtex auditivo primário nos mamíferos.

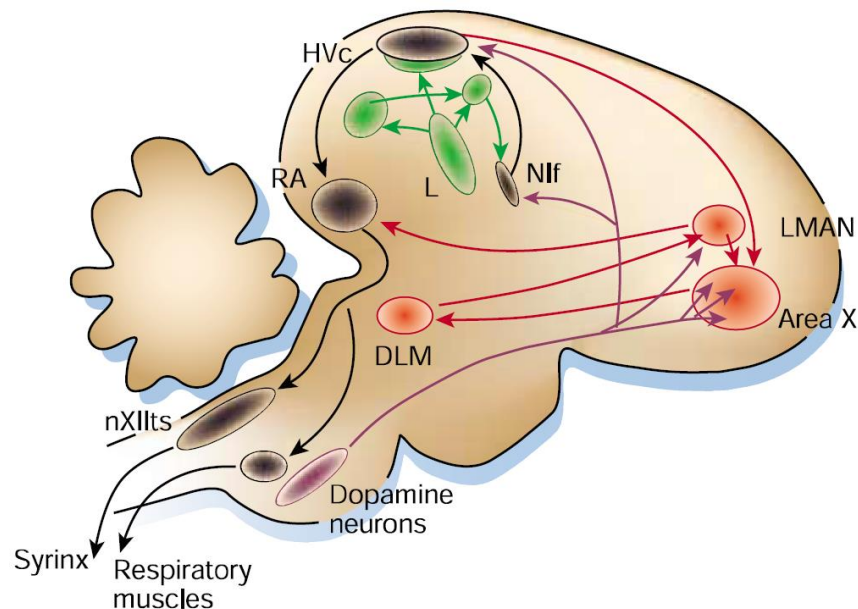


Figura 2. Representação da rede neurológica envolvida na aprendizagem e produção de canções nas aves canoras. A preto a via posterior, a vermelho a via anterior, a roxo os neurónios dopaminérgicos e a verde o field L. (Brainard & Doupe 2002).

Em 1976 Nottenbom e Arnold verificaram que canários (*Serinus canaria*) machos possuíam núcleos HVC e RA com o triplo do tamanho das fêmeas. Garamszegi & Eens (2004) mostraram haver também uma relação entre a quantidade e duração de canções produzidas pelas aves com o tamanho dos seus núcleos HVC e RA. Quanto maior o volume dos núcleos, maior o tamanho do repertório e maior a duração das canções (DeVoogd et al 1993; Pfaff et al 2007; Moore et al 2011). No entanto, Leitner (2004) ao investigar o efeito da idade na morfologia do HVC e RA de canários (*Serinus canaria*), não obteve diferenças no volume dos núcleos entre aves de 1 e 2 anos, nem encontrou uma correlação significativa entre o tamanho do repertório e o volume dos núcleos, mas sim entre o volume do HVC e a proporção de sílabas sexy em indivíduos mais velhos. Isto sugere que indivíduos open-ended learner com 2 anos melhoram o seu canto não por aumentar o repertório ou volume dos núcleos, mas ao modificar o controle das sílabas.

A produção de canções é também dependente de características físicas das aves. Parâmetros como a amplitude, frequência, taxa de repetição e complexidade de sílabas são limitados pelas restrições físicas do indivíduo (Podos, Huber et al. 2004). O tamanho corporal limita o tamanho da caixa de ressonância, que por sua vez vai restringir a produção de certos sons (Ryan & Brenowitz 1985), e apresenta uma correlação negativa com a frequência das canções reproduzidas. Embora o tamanho corporal esteja também relacionado positivamente com a amplitude das canções, a sintaxe e fonologia silábica têm um maior poder explicativo nas variações de amplitude, indicando que o design acústico das canções tem um grande impacto na amplitude (Cardoso 2008). Por outro lado, verificou-se que o comprimento do bico tem uma correlação negativa com a taxa e frequência silábica, e positiva com a duração dos intervalos intersilábicos (García 2018; Podos 2001).

Experiências com "swamp sparrow" (*Melospiza georgiana*) demonstraram que ao tentarem reproduzir canções com uma taxa de repetição acima da habitual, ocorriam falhas na sintaxe e taxa silábica das canções (Podos 1996). Em 1997 Podos também demonstrou uma relação negativa entre a taxa de repetição e banda de frequência. Analisou 34 espécies da família Emberizidae e verificou que a banda de frequência ia diminuindo com o aumento da taxa silábica. Isso evidenciou a existência de um constrangimento vocal que ocorre na produção de canções e a existência de um trade-off entre os dois parâmetros. Esse resultado sugeriu que há um limite de performance, e que canções que se aproximam desse limite são favorecidas pela seleção natural (Vallet et al 1998). Tal é suportado pelo facto de fêmeas de canário comum apresentarem mais exibições de solicitação de copulação quando expostas a sílabas com largas bandas de frequência reproduzidas a taxas de repetição artificialmente aumentadas (Draganoiu 2002). Esta limitação motora foi representada no conhecido triângulo de Podos, que retrata a relação entre estes parâmetros (Figura 3).

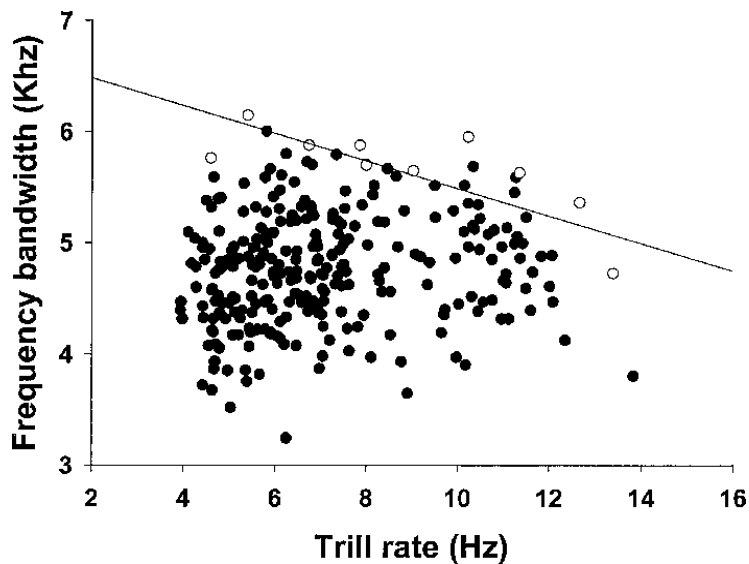


Figura 3. Representação do triângulo de Podos. Banda de frequência vs taxa de repetição, com uma linha de regressão do limite superior. (Ballentine et al. 2004).

O órgão responsável pela produção sonora nas aves canoras é a siringe, o homólogo da laringe nos humanos (Marler e Slabbekorn 2004). É uma estrutura situada no fundo da traqueia, rodeada por um saco de ar que ressoa as ondas sonoras produzidas pelas membranas presentes nas paredes da siringe (Figura 4). É constituída por 5 pares de músculos localizados na junção bronquial, o que possibilita a capacidade de reproduzir dois sons simultaneamente, um de cada brônquio, permitindo a grande complexidade silábica presente nas aves canoras (Catchpole & Slater 2008). Sílabas com características diferentes têm requerimentos físicos distintos. Altas frequências requerem uma grande abertura do bico e maior contração dos músculos da siringe (Catchpole & Slater 2008; Gil & Gahr 2002), enquanto baixas frequências requerem o oposto. Em termos de volume, amplitudes maiores exigem contrações abdominais mais intensas. Os trilos, caracterizados por sílabas repetidas a altas velocidades, necessitam de múltiplas inspirações curtas, o que dificulta a produção de canções longas sem interrupções (Suthers & Goller 1997).

Para ocorrer comunicação eficiente, a capacidade de detectar e discriminar sons é igualmente importante. Este processo começa no ouvido externo, cuja membrana timpânica vibra com as alterações de pressão. Essas vibrações são seguidamente transmitidas pela columela ao ouvido interno, que envia os sinais aos neurónios auditórios, sendo o “field L” a área principal da recepção sonora (Catchpole & Slater 2008). A diferente abordagem no canto entre os oscinos e suboscinos é, portanto, explicada em parte não só pela estrutura cerebral diferenciada, como também pelo

controle motor fino dos oscinos, que possuem um maior número e complexidade de músculos na siringe.

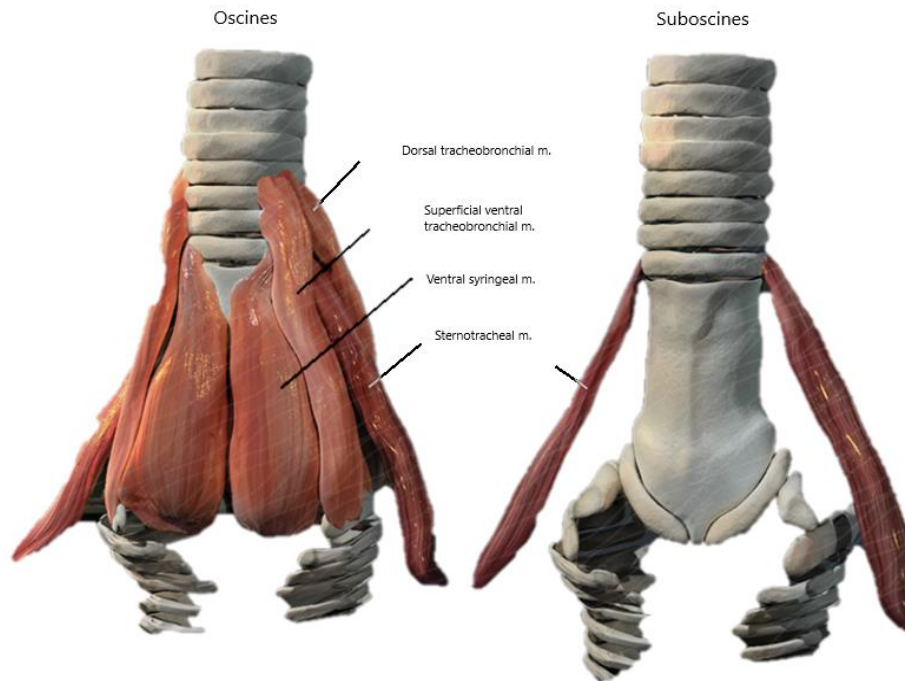


Figura 4. Diferenças na musculatura da siringe entre oscinos e suboscinos. (adaptado de Mientka 2018).

1.4 Aprendizagem Vocal nas Aves

O canto das aves como forma de comunicação tem recebido um crescente interesse na comunidade científica. É tipicamente estudado na área de comportamento animal, e, recentemente, com o intuito de melhorar a compreensão da interação entre os efeitos genéticos e os efeitos do processo de aprendizagem no desenvolvimento do canto (Podos, Huber et al. 2004). Também apresenta propriedades que permitem fazer analogias com a aprendizagem nos humanos (Jarvis 2004). Ocorrem comportamentos convergentes entre os dois incluindo aprendizagem vocal complexa, períodos críticos para ocorrer essa aprendizagem, dependência em feedback auditivo para desenvolver e manter as vocalizações aprendidas e algumas características rudimentares para sintaxe e fonologia (Berwick et al. 2011; Wohlgemuth 2010; Brainard & Doupe 2002).

As aves canoras aprendem a cantar num período sensível durante o desenvolvimento, cuja periodicidade depende da experiência, níveis hormonais e espécie em questão. É composto por duas fases ambas dependentes da experiência auditiva (Figura 5). Numa primeira fase ocorre aquisição sensorial, a ave ouve e memoriza canções de tutores formando um modelo auditivo. A segunda fase envolve aprendizagem sensori-motora, a ave compara as suas canções com o modelo através de um mecanismo de feedback auditivo, permitindo correções da performance. A cristalização da canção, na qual a canção se torna estereotipada e menos dependente do feedback auditivo, sinaliza o final desta fase (Catchpole 2008; Brainard & Douper 2002). Este processo de aprendizagem difere entre espécies: algumas retêm as canções cristalizadas durante toda a vida de adulto, categorizadas de “close-ended learners”; outras têm a capacidade modificar as canções em períodos de maior plasticidade durante toda a vida, chamadas de “open-ended learners”. Para além disso a periodicidade das fases também apresenta diferenças. Em close-ended learners de reprodução sazonal, estas fases estão separadas por um período de 6-10 meses. Por contraste, o mandarim (*Taeniopygia guttata*) apresenta uma sobreposição das duas fases e cristaliza a canção em apenas 3 meses.

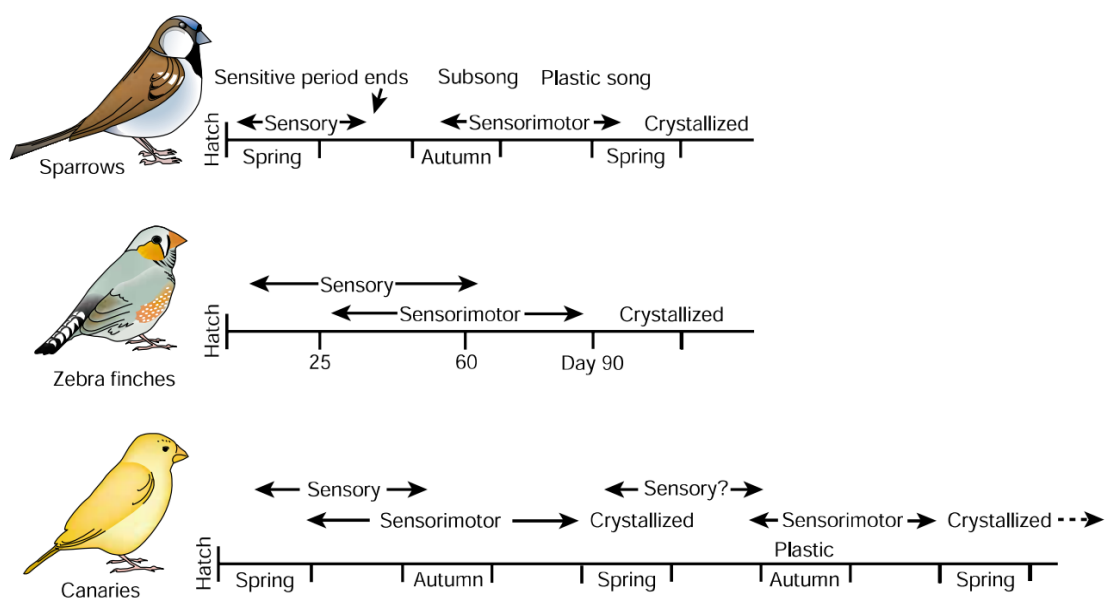


Figura 5. Cronograma do processo de aprendizagem. a) close-ended learner sem sobreposição de fases. b) close-ended learner com sobreposição de fases. c) open-ended learner (Brainard 2002).

A fase de aquisição sensorial nas aves canoras evidencia a importância que a experiência auditiva e social tem na aprendizagem vocal. Baptista e Petrinovich (1984), realizaram experiências nas quais colocaram juvenis de pardais norte-americanos (*Zonotrichia leucophrys nuttalli*) em ninhos com 3 tipos de tutores: da mesma subespécie, de uma

subespécie diferente, e de outra espécie (*Amandava amandava*). Verificou-se que todos os juvenis desenvolveram canções que se assemelhavam às dos novos tutores, incluindo os criados por uma espécie diferente, mesmo com a presença de canções coespecíficas no ambiente acústico. Tal demonstra a plasticidade que as aves canoras possuem durante o processo de aprendizagem. Não obstante, os juvenis apresentam preferência para aprender canções coespecíficas dada a oportunidade, como se comprovou em experiências nas quais eram expostos a uma mistura de canções coespecíficas e heteroespecíficas (Marler 1990). Por outro lado, se os juvenis forem criados sem tutor, reproduzem uma canção rudimentar sem as características típicas da sua espécie (Thorpe 1958; Marler 1970). Nos casos de isolamento o período de aquisição sensorial pode ser expandido por 1 a 2 meses, possibilitando uma aprendizagem tardia (Morrison & Nottebohm 1993; Eales 1987), no entanto a aquisição é menos extensiva que em condições normais, e os indivíduos eventualmente tornam-se incapazes de aprender por tutoria. À semelhança do ser humano, também apresentam dialetos locais que variam entre populações (Marler & Tamura 1964). Talvez o mais surpreendente nas aves canoras seja a capacidade de memorização. Em alguns casos, como no rouxinol (*Luscinia megarhynchos*), são capazes de aprender 10 a 20 canções compostas por um total de 100 sílabas após ouvirem-nas apenas 20 vezes (Hultsch & Todt 1989a,b), para além disso, as memórias auditivas são mantidas durante muitos meses antes da ave começar a cantar (Marler & Peters 1981).

A fase de aprendizagem sensori-motora consiste na reprodução e modificação da própria canção de forma a corresponder ao modelo memorizado. Ocorre tipicamente desfasada da exposição ao tutor, no entanto, juvenis ensurdecidos após a aquisição sensorial, mas antes da aprendizagem sensori-motora, desenvolvem canções extremamente atípicas, mesmo sem os traços rudimentares encontrados em aves criadas em isolamento (Konishi 1966; Marler & Doupe 2000). Tal sugere que os juvenis necessitam de feedback auditivo para ajustar os músculos de forma a aprenderem a reproduzir os sons pretendidos (Figura 6).

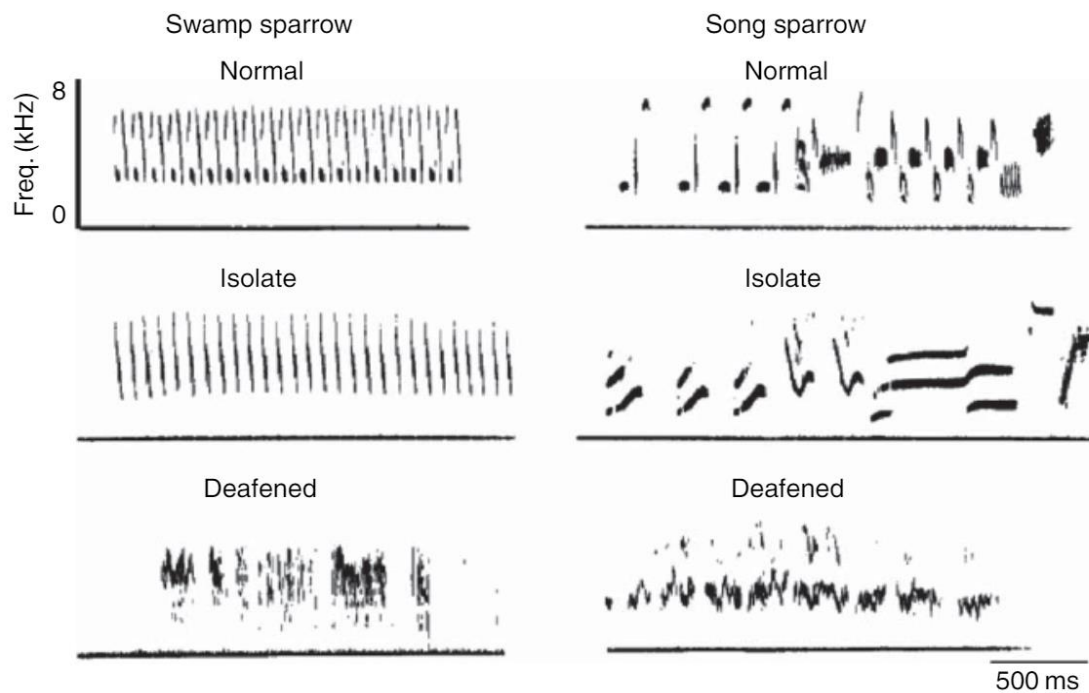


Figura 6. Diferenças na canção reproduzida em “Swamp sparrow” (*Melospiza georgiana*) e “Song sparrow” (*Melospiza melodia*): a) aves criadas em condições normais, b) aves criadas em isolamento acústico, c) aves ensurdecidas após aquisição sensorial. (Marler & Doupe 2000).

Em contraste com a aquisição sensorial, a aprendizagem sensori-motora é um processo lento, composto por vários estádios (Marler & Peters 1982): a subcanção, o exemplo mais precoce de juvenis a cantarem, possui poucas parecenças com a canção típica da espécie, assemelha-se ao balbuciar que ocorre nos bebês; A canção plástica, definida pelos traços acústicos típicos da canção adulta, inclui notas improvisadas, erros na cópia do tutor, e variabilidade na estrutura e sequência de sílabas; A canção cristalizada, caracterizada por uma estrutura e sequência de sílabas altamente estereotipada, surge paralelamente com a maturidade sexual, sugerindo que os níveis de testosterona são o catalisador da cristalização (Alward et al. 2016).

Os recentes avanços tecnológicos em análise sonora e genética têm vindo a possibilitar a investigação de uma área ainda pouco explorada, mas fundamental para a compreensão da aprendizagem: a influência da base genética na aprendizagem vocal. Sabemos que a aprendizagem reflete o efeito da experiência do indivíduo em circuitos determinados geneticamente, porém, pouco se sabe de como a interação entre experiência e genes determinam os fenótipos aprendidos. Mets e Brainard (2018) demonstraram que a variabilidade da velocidade nas canções reproduzidas exibe uma grande influência genética, no entanto, a magnitude do efeito depende no método de tutoria. Tutores ao vivo reduziam o efeito genético, enquanto tutoria por playback

aumentava. Tal sugere que a riqueza do método de aprendizagem pode superar tendências genéticas. Experiências envolvendo a manipulação de pares reprodutores e condições de tutoria revelaram que a combinação dos pares parentais contribui para gerar diferenças na duração da sílaba e na variabilidade na subcanção de juvenis (Sato et al. 2016). Para além disso, Mori (2018), demonstrou que ocorre desenvolvimento de idiosincrasia nas canções de canários ensurdecidos (*Serinus canaria*), apresentando padrões estruturais específicos da espécie. Isto revela que alguns traços estruturais da canção são resultado de um mecanismo inato.

1.5 Espécie em Estudo

O canário (*Serinus canaria*) é uma ave canora da família Fringillidae, que ocorre nos Açores, Madeira, e ilhas Canárias. Não possui dimorfismo sexual evidente e os indivíduos de ambos os sexos têm cerca de 15 cm de altura, 25 cm de altura e pesam entre 18 e 28 g. É uma espécie social e monogâmica, cujos machos não são territoriais (Voigt et al. 2003). No seu estado selvagem, apresenta uma coloração amarelo-esverdeada com traços castanhos nas costas, sendo as cores menos vivas e extensas nas fêmeas. A domesticação dos canários começou no século XV, e desde então que é extensivamente utilizado para criação em cativeiro. Tal como acontece com muitas espécies domesticadas, os criadores selecionaram certas características da espécie. Hoje, existem mais de quarenta variedades classificadas em três estirpes: canários de cor, canários de porte, e canários de canto. Desta última categoria, as mais conhecidas são o Harz-Roller, Spanish Timbrado, American Singer e os Waterslager-Malinois (utilizados neste estudo).

Originário de criadores na Bélgica, o Waterslager possui um nome peculiar que advém do som característico que a ave faz ao cantar, semelhante a água corrente. Apresenta uma coloração amarela e branca, com variação na intensidade das cores. Tem uma deficiência congénita auditiva, resultando numa perda de sensibilidade a frequências acima dos 2kHz (Lauer et al. 2007). Possivelmente esta deficiência auditiva dita as características do seu canto. Produz uma canção distinta com muitos trilos, e uma gama de frequências mais baixa que as restantes variedades de canários. Por contraste, a maioria dos canários domesticados que não foram selecionados pelo seu canto, apresentam um canto muito parecido com os canários selvagens, são sensíveis a frequências que variam entre 20 Hz e 20 kHz, e as sílabas reproduzidas estão tipicamente entre os 0,7kHz e 8,5 kHz.

Experiências de hibridação mostraram que diferenças nas características do canto possuem uma componente genética (Okanoya et al. 1990; Wang et al. 2019). A

compreensão da interação entre genes e comportamento, nomeadamente na aprendizagem vocal, tem sido aprofundada com a utilização do canário como espécie modelo (Mundinger & Lahti 2014). Como tal, este trabalho insere-se no objetivo amplo de melhorar o conhecimento sobre os mecanismos genéticos responsáveis pelas diferenças no canto das aves, através da fenotipagem de aves resultantes de cruzamentos.

1.6 Objectivos

O principal objectivo deste trabalho é fenotipar híbridos F₂ resultantes de cruzamentos entre canários Malinois e canários não seleccionados para o canto. Desta forma, a informação obtida pode ser utilizada para compreender os mecanismos genéticos responsáveis pelas diferenças no canto.

Capítulo 2 – Materiais e Métodos

2.1 Desenho experimental

Os indivíduos utilizados neste estudo são o resultado de um programa de autocruzamentos de híbridos F₁, resultantes do cruzamento de aves da variedade de canário de canto (Malinois), com aves de uma variedade de canário de cor, cujo fenótipo (denominado de “Wild” neste estudo) não sofreu seleção artificial do seu canto (Vermelho) (Figura 7). Este tipo de experiência de hibridação tem como objetivo assegurar a segregação das características de interesse, possibilitando a quantificação de diferenças fenotípicas e genéticas. A geração F₁ apresenta uma menor diversidade de fenótipos devido à alta presença de heterozigóticos com genes dominantes. A segunda geração de híbridos (F₂) possui uma maior diversidade fenotípica devido à maior presença de homozigóticos com genes recessivos.

Os cruzamentos tiveram início em 2015 com 4 casais de canários Malinois e Vermelhos (duas fêmeas e dois machos de cada variedade). Em 2016, foram estabelecidos vários casais (11) de híbridos F₁, os quais produziram entre 2016 e 2017 40-60 híbridos F₂.

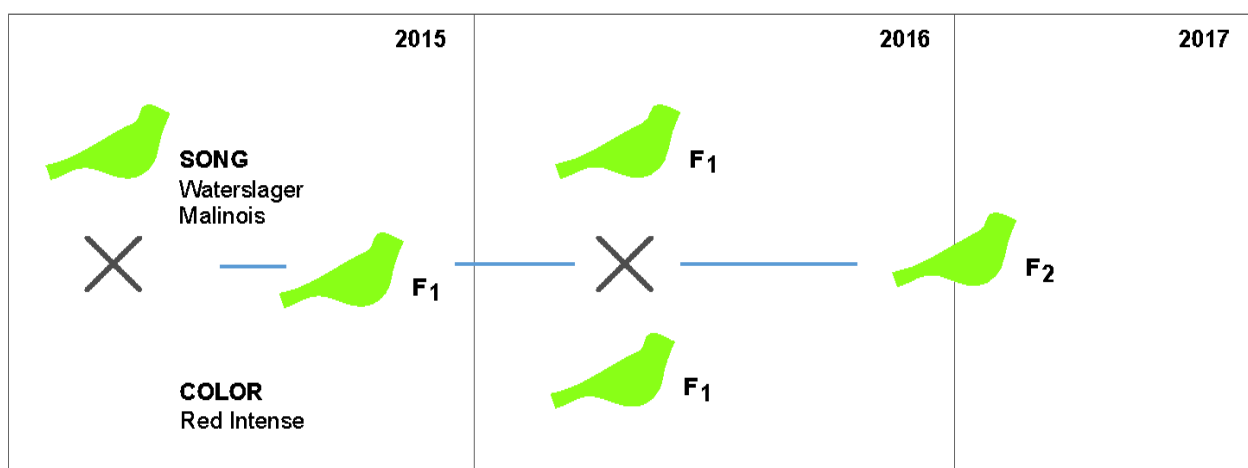


Figura 7. Representação dos cruzamentos entre as aves e as diferentes gerações de híbridos.

A criação dos híbridos F₂ foi realizada em instalações isoladas acusticamente de outras aves canoras. Foram criados pelas suas mães tendo os pais sido retirados durante a incubação, desta forma, o processo de aprendizagem de canções não foi influenciado pela sua presença. Posteriormente procedeu-se à tutoria via playback de canções Wild

e Malinois durante os primeiros 100 dias após o nascimento, na primeira fase de aquisição sensorial (Leitner et al. 2015). As canções de tutoria foram selecionadas de modo a representar uma grande diversidade da canção das duas variedades. Para evitar padrões na apresentação dos playbacks, foram construídos 6 ficheiros com a duração de 1 hora a partir das canções selecionadas. Cada um dos ficheiros apresentava uma duração semelhante de cada tipo de canção e foi assegurada uma repetição equitativa e intercalada das canções das duas variedades. Em cada dia, em dois períodos diferentes (8:00 e 18:00), era realizada uma apresentação de um ficheiro, selecionado aleatoriamente, garantindo que as duas apresentações do mesmo dia não se iniciavam pelo mesmo tipo de canto (M ou W). As apresentações foram realizadas por colunas de som acopladas ao computador.

A criação e a fase de tutoria decorreram em um aviário nas instalações do Departamento das Ciências da Vida, na Universidade de Coimbra. A utilização experimental dos animais e seu cuidado realizaram-se em conformidade com as diretrizes da Direção Geral de Alimentação e Veterinária. Todas as aves foram criadas nas mesmas condições, em pares de reprodução individualizados, sendo fornecidos alimentos e água abundantemente durante toda a experiência. Após o nascimento as aves foram identificadas individualmente assim que possível, com recurso a anilhas numeradas colocadas no tarso.

Após a fase de tutoria, na primavera seguinte, as canções dos híbridos F₂ foram gravadas no Laboratório de Etologia da Universidade de Coimbra, entre os meses de fevereiro e maio (2018 e 2019). Foram utilizadas duas câmaras de isolamento acústico, equipadas com uma coluna associada a um Apple iPod nano 6G que reproduzia uma gravação de playback para incentivar o canto nas aves a cada 10 minutos (Figura 8). O volume de reprodução foi ajustado de forma a não interferir com as gravações, mantendo-se simultaneamente adequado à sua função. Paralelo à coluna, no lado oposto, foi colocado um microfone (AKG C417 PP), conectado a um gravador (Marantz PMD 661). As gravações foram realizadas em formato WAV, profundidade de bits de 24 bits, taxa de amostragem 48kHz, PCM.

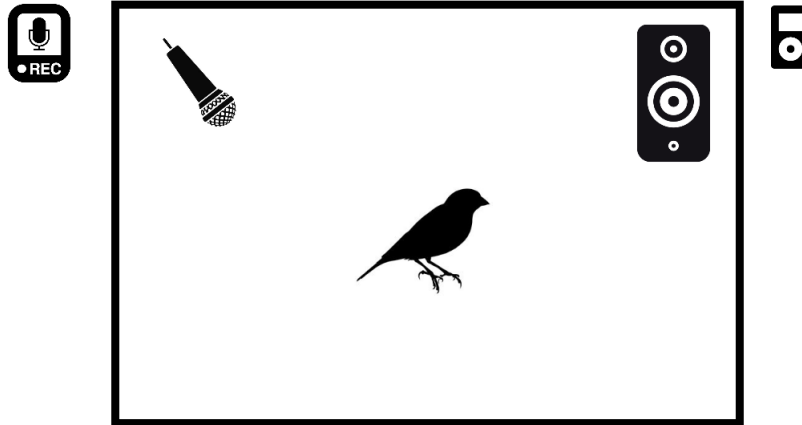


Figura 8. Imagem representativa do processo de gravação.

As aves foram gravadas durante 2 dias, das 7h às 18h. As aves eram colocadas dentro da câmara no final do dia anterior, com o propósito de minimizar o stress da manipulação e facilitar a habituação à câmara. Após cada gravação era efetuada uma breve verificação do conteúdo, de forma a determinar se tinha ocorrido produção de canto. Caso tal não se verificasse, a ave era gravada novamente numa data posterior.

2.2 Produção de playbacks

Foram produzidos seis playbacks com a duração de 60 minutos, para ser usado um em cada sessão de apresentação (Figura 9). Cada playback era constituído por 4 partes de canto - 2 de Malinois e 2 de Wild – com a duração de 10 minutos cada e separadas por pausas de 5 minutos. As sequências eram únicas de cada playback, mas garantiam a mesma quantidade de exposição a canto. Metade dos playbacks começava com apresentação de canções de Malinois e a outra metade de Wild. Com esta estrutura e forma de apresentação procurou assegurar-se que a aprendizagem não era influenciada pela duração relativa do fenótipo ouvido, ou pela ordem de apresentação. Os playbacks foram normalizados para garantir a mesma amplitude.

ESTRUTURA DO PLAYBACK

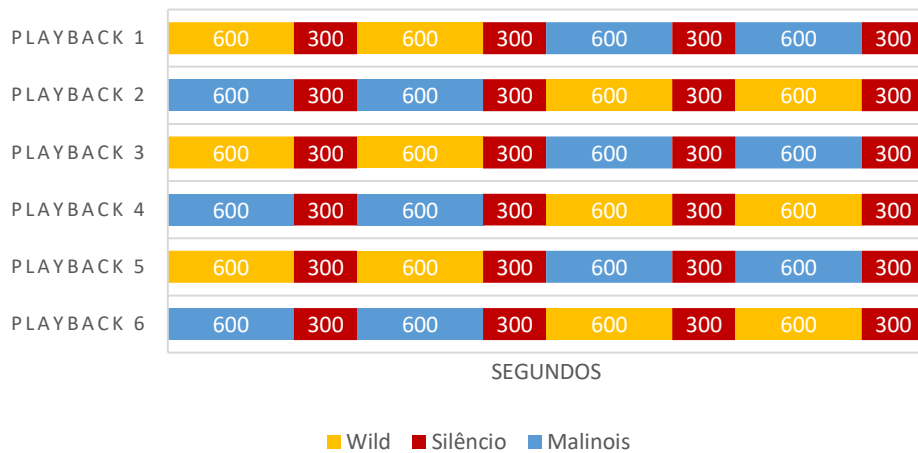


Figura 9. Representação da estrutura do playback. A amarelo canto Wild, a azul canto Malinois, a vermelho o silêncio introduzido entre secções.

2.3 Análise das Canções

Os ficheiros de gravação foram primeiro analisados com o software Audacity versão 2.3.2, para remoção de silêncios entre os períodos de actividade de canto nas gravações. Foi utilizada uma macroinstrução para tratar múltiplos ficheiros de forma sequencial, com um threshold de -30db e duração de 0.5 segundos para deteção e remoção dos silêncios.

Posteriormente as canções foram analisadas utilizando o software Avisoft-SAS Lab Pro versão 5.2.13, com as seguintes configurações: janela Hamming, FFT Length = 1024Hz, Frame size = 75% e Overlap de 93,75%. Tal resulta numa largura de banda de 81 Hz, resolução de frequência de 47 Hz e resolução temporal de 1.3333 ms. Foram testadas várias configurações de modo a obter uma resolução temporal e de frequência adequada à medição sílabas individuais, permitindo o registo do reportório de cada ave gravada.

As sílabas identificadas foram medidas múltiplas vezes em diferentes secções, e verificou-se que os parâmetros medidos apresentavam variações mínimas entre secções (20hz/0.005s).

Os parâmetros medidos foram os seguintes: duração, intervalo, pico de frequência, frequência mínima, frequência máxima e amplitude de frequência, sendo cada uma das medidas de frequência tomada em três pontos: início, final e máximo, num total de 14

medições. Todas as informações obtidas foram colocadas em formato tabular, no software Excel. As sílabas identificadas foram numeradas pela ordem de aparecimento nas gravações do indivíduo, sendo anotados detalhes sobre a sua forma e padrão, facilitando o processo de comparação entre sílabas. Também se calculou a taxa de repetição dos trilos presentes nas gravações, no formato sílabas/segundo, sendo este um parâmetro utilizado frequentemente em análise de canções em aves canoras (Geberzahn & Aubin 2014; Funghi et al. 2015).

2.4 Análise Estatística

A análise exploratória, com inspeção dos parâmetros medidos (média, desvio padrão), permitiu a identificação de potenciais outliers, resultando numa verificação dos parâmetros medidos das sílabas em causa. De forma a quantificar as diferenças que ocorrem entre Malinois e Wild utilizámos modelos lineares generalizados (GLM), distribuição gamma com função log link, sobre as variáveis do canto dos tutores.

Em seguida, para seleccionar as variáveis com o maior poder explicativo a utilizar na classificação de sílabas, realizou-se uma regressão logística sobre os parâmetros dos tutores. Foram testados os modelos enter, stepwise forward, stepwise backwards. Após a selecção das variáveis, foi usado o hierarchical cluster analysis (HCA) (análise hierárquica de agrupamentos) para classificar as sílabas dos híbridos pela sua proximidade às sílabas dos tutores, sendo testados os métodos *average linkage* e *single linkage*, assim como as distâncias de dados *squared Euclidian* e *city block*. As análises realizaram-se com recurso ao software SPSS (versão 26.0.0.1).

Capítulo 3 - Resultados

3.1 Características do canto de tutores

Foram identificados e analisados os reportórios de 27 híbridos e 18 gravações de tutores presentes no playback. Para caracterizar as diferenças entre canto Malinois e Wild, realizaram-se GLMs para cada uma das variáveis, assim como o cálculo da média e erro padrão. Os resultados (Tabela 2) mostraram que todas as variáveis de frequência diferem entre os dois tipos de tutores. Apenas as medidas de tempo, duração e a taxa de repetição, não diferem entre os dois tipos de tutores.

Tabela 2. Variáveis medidas nos dois tipos de tutores, com as médias e erro padrão da média correspondentes. Resultados dos GLMs (Wald Chi-Square, e significância (p), em negrito quando $p < 0.05$).

Variável	Malinois (média +/-ep)	Wild (média +/-ep)	Wald Chi-Square	P
Duração (s)	0.15 (+/-0.01)	0.12 (+/-0.01)	3.153	0.076
pico frequência inicial (Hz)	2087.18 (+/-39.32)	4123.96 (+/-155.92)	312.750	0.000
frequência mínima inicial (Hz)	1558.33 (+/-42.62)	3430.77 (+/-145.41)	227.728	0.000
frequência máxima inicial (Hz)	2605.41 (+/-40.11)	4883.30 (+/-161.78)	353.097	0.000
amplitude de frequência inicial (Hz)	1042.34 (+/-53.01)	1448.02 (+/- 109.50)	12.961	0.000
pico frequência final (Hz)	2016.51 (+/-38.84)	3926.26 (+/-127.32)	335.597	0.000
frequência mínima final (Hz)	1533.78 (+/-40.79)	3017.80 (+/-133.81)	165.575	0.000
frequência máxima final (Hz)	2574.11 (+/-40.21)	4590.33 (+/- 139.50)	324.587	0.000
amplitude de frequência final (Hz)	1035.60 (+/-53.63)	1567.47 (+/-119.41)	18.200	0.000
pico frequência ponto máximo (Hz)	2058.18 (+/-38.18)	4025.05 (+/- 105.90)	402.176	0.000
frequência mínima ponto máximo (Hz)	1750.62 (+/-37.18)	3606.37 (+/- 108.37)	348.534	0.000
frequência máxima ponto máximo (Hz)	2388.80 (+/-39.74)	4436.26 (+/-110.92)	407.780	0.000
amplitude de frequência ponto máximo (Hz)	636.41 (+/-41.96)	826.48 (+/-77.98)	6.677	0.010
taxa de repetição (silabas/s)	10.88 (+/-0.54)	11.56 (+/-0.95)	0.410	0.522

3.2 Seleção de variáveis do canto

Para proceder a uma escolha das variáveis mais adequadas a serem usadas no processo de classificação de sílabas dos híbridos, foi utilizada uma regressão logística sobre os tutores, cuja classificação das sílabas era conhecida. Este procedimento permite uma escolha que não depende da opção subjectiva do investigador. Foram testados 3 modelos, enter, stepwise forward, stepwise backward. O método stepwise backward apresentou os resultados mais interessantes, seleccionando 7 variáveis que explicavam 79,2% da variação. As variáveis escolhidas foram: duração, pico de frequência inicial, frequência máxima inicial, amplitude de frequência inicial, amplitude de frequência final, frequência máxima no ponto máximo, amplitude de frequência no ponto máximo.

Realizou-se uma comparação da distribuição da variação em aves e comparativamente aos tutores. As sílabas dos híbridos apresentam geralmente uma duração menor que as dos tutores (Figura 10), simultaneamente as Malinois possuem durações semelhantes a Wild. O pico de frequência inicial, assim como a frequência máxima (inicial e ponto máximo) dos híbridos aproximam-se mais de valores Wild, que por sua vez são muito superiores aos valores Malinois. A amplitude de frequência (inicial, final, e ponto máximo) nos híbridos mostra uma grande dispersão, tanto com valores superiores como inferiores a ambos os tutores, alguns semelhantes a Wild, e outros semelhantes a Malinois. Como esperado, os Wild possuem amplitudes de frequência mais elevados que Malinois.

3.3 Classificação das sílabas dos híbridos

Após a seleção de variáveis a usar no processo de classificação, realizaram-se 'Hierarchical Cluster Analyses' (HCA) (análise hierárquica de agrupamentos), com o intuito de agrupar sílabas semelhantes entre os híbridos e os tutores. Foram utilizados 2 métodos, o *single linkage*, mais indicado para cadeias longas de clusters, e o *average linkage* que pode ser utilizado tanto em cadeias longas como nuvens de clusters densos. O *single linkage* permitiu que se identificassem potenciais outliers por erros de medição, levando a uma revisão dos parâmetros dessas sílabas. O *average linkage* é geralmente o procedimento mais utilizado, por não maximizar nem minimizar inclusões (Everitt et al, 2015), e foi o utilizado para classificar as sílabas. Foram testados 2 tipos de distância de dados nesta análise, *Squared Euclidian distance*, que diminui a importância de distâncias pequenas e aumenta a importância de distâncias grandes, e o *City Block distance*, também conhecido como *Manhattan distance*. Os valores de cada variável

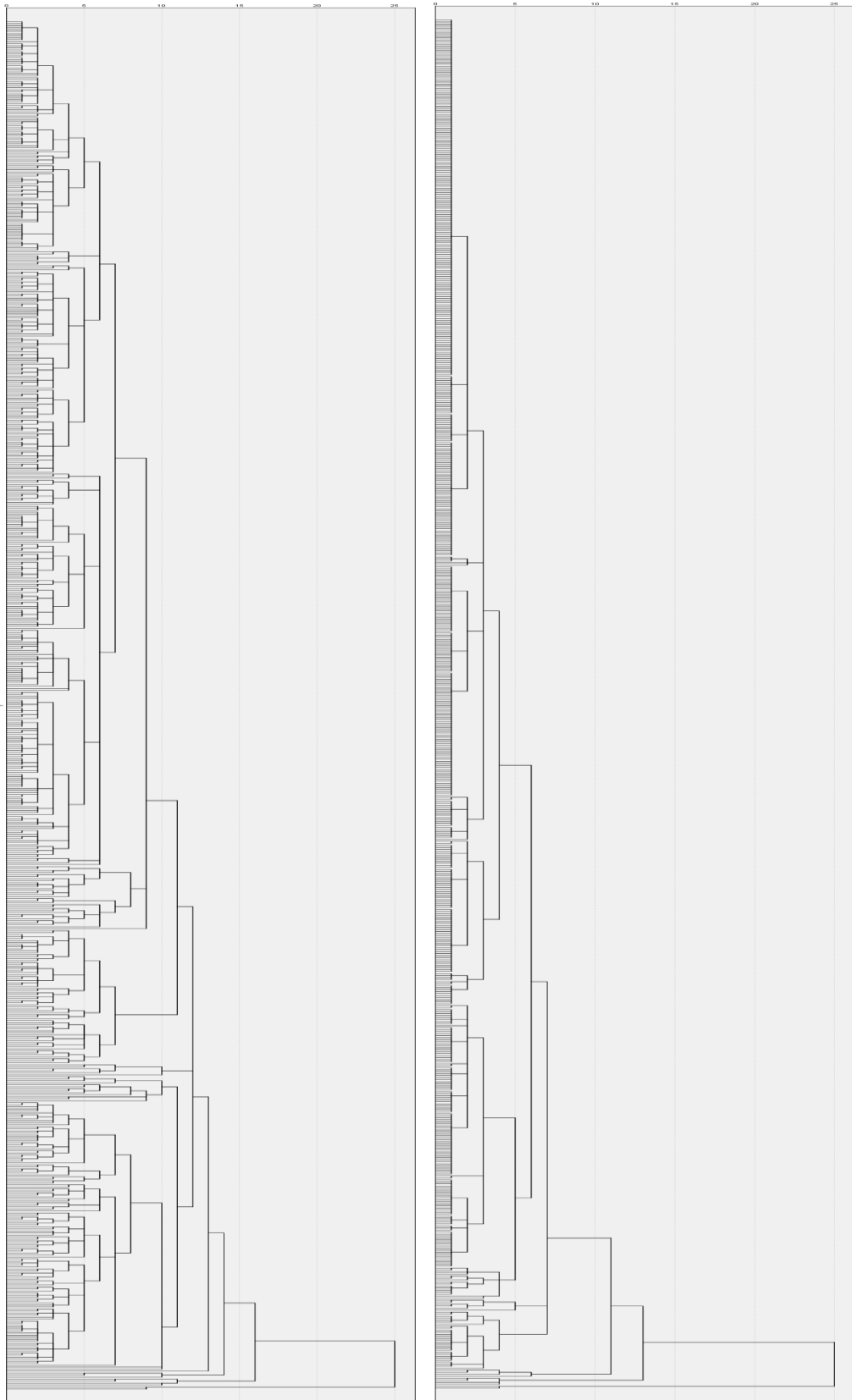


Figura 11. Representação dos dendogramas obtidos na HCA com distância City Block (esquerda) e distância Squared Euclidian (direita).

Uma vez que o dendograma de classificação das sílabas usando a squared Euclidian distance revelou a existência de clusters demasiado grandes (Figura 11), logo nos níveis mais baixos de agregação (clustering), o que prejudica a separação das sílabas, optou-se por utilizar o clustering por City Block, que dá origem a uma maior granulação/separação das sílabas em clusters menores (Figura 11). Uma representação gráfica dos clusters, com corte em 30 clusters, permitiu discriminar a frequência de sílabas das aves. (Figura 12)

A cada cluster foi atribuída uma categoria, designada pela presença/ausência dos 2 tipos de tutores. Tal resultou em 4 tipos de clusters: (1) Wild, (2) Malinois, (3) Mistos (presença de sílabas de ambos), (4) Não classificados (ausência de sílabas de tutores no cluster). Adicionalmente, foram visualizados os espectrogramas das sílabas presentes em clusters Mistos, para se certificar que tinham uma classificação correta. Isto permitiu calcular a percentagem de sílabas que cada ave tinha de cada categoria, relativamente ao seu reportório total. (Figura 13). Verifica-se que a maioria das aves tem um reportório com sílabas dos dois tipos de tutores, ou mistas, que não podem ser diferenciadas entre tutores. Há também um maior número de aves com reportório Wild sem sílabas Malinois que o contrário. De certo modo, isso é expectável porque há uma maior variação nas características das sílabas Wild, em particular nas medidas de frequência (Figura 10). Como exemplo, a comparação entre espectrogramas de aves com canto Wild (73_18) e Malinois (62_18), permite corroborar os resultados da nossa análise de HCA. (Figura 14).

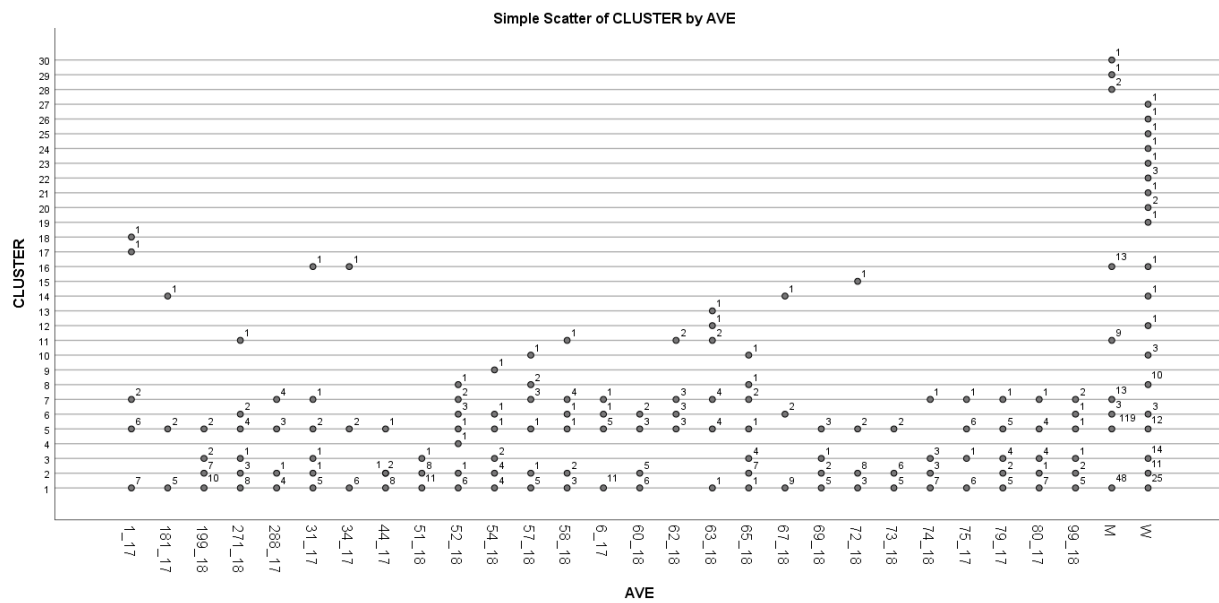


Figura 12. Distribuição das sílabas (número de sílabas ao lado de cada ponto) por cluster e ave na HCA com distância City Block.

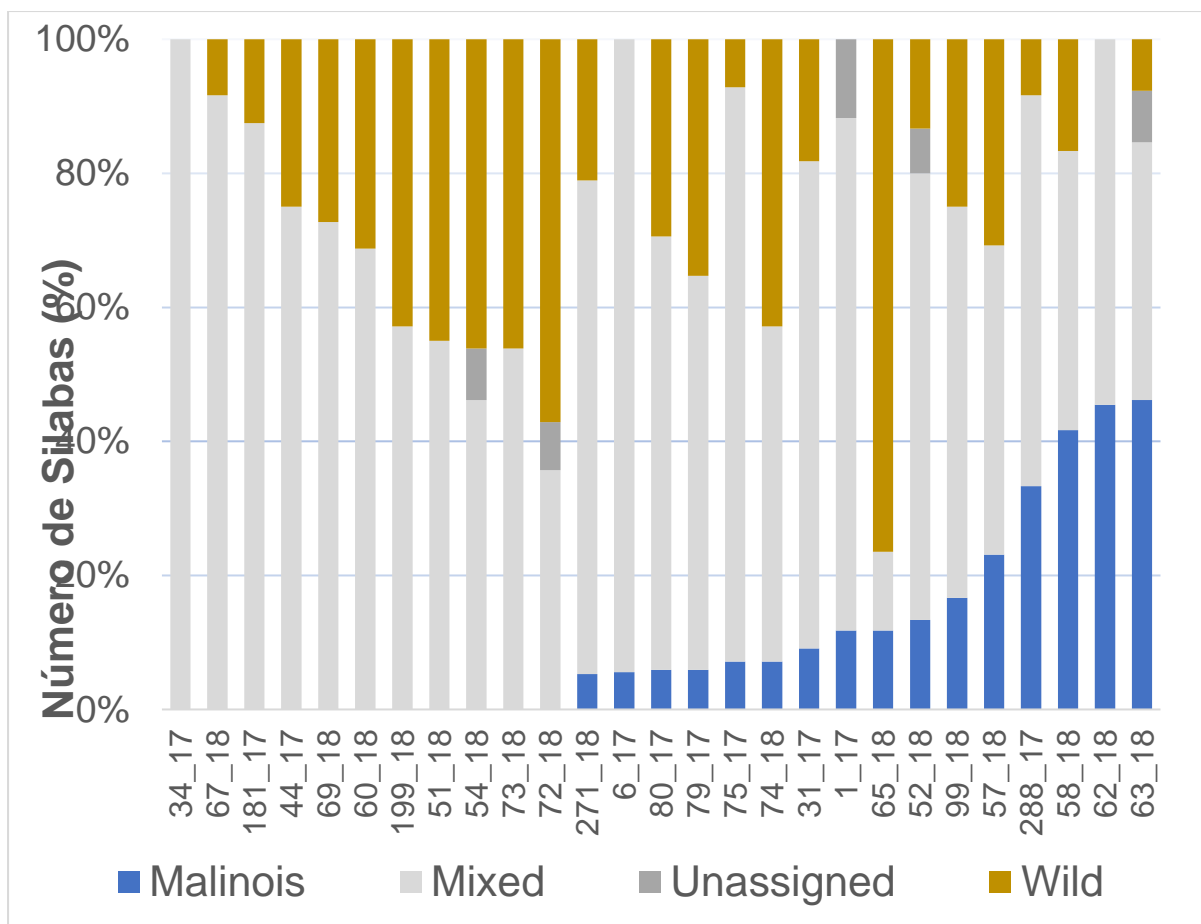


Figura 13. Percentagem do reportório de cada ave nas 4 categorias de cluster: Malinois, Mistos, Não Classificados, Wild. Ordenação ascendente pela percentagem de silabas atribuídas ao grupo Malinois.

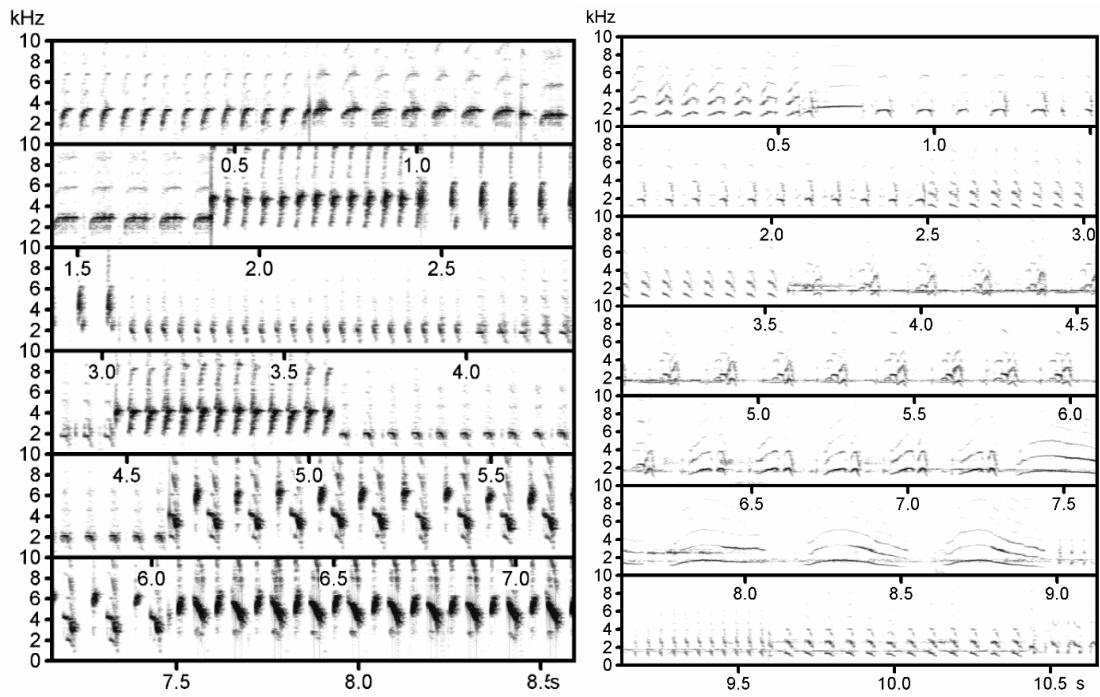


Figura 14. Espectrograma ilustrativos de partes da canção de uma ave classificada como Wild (ave 73_18, à esquerda) e uma ave classificada como Malinois (62_18, à direita).

Capítulo 4 - Discussão

Como esperado, cada híbrido demonstrou a possibilidade de aprender sílabas de ambos os tipos de tutores. No entanto, houve variação entre indivíduos, que estará associada às diferentes combinações da componente genética herdada das duas variedades alvo dos cruzamentos. Havendo uma base genética que possibilitou a selecção artificial do canto Malinois, a variação nos genes associados a este fenótipo estará dissociada na maioria dos híbridos. Nessas circunstâncias é de esperar que a distribuição dos fenótipos, em termos das sílabas aprendidas, tenha uma grande variação, apesar de todos os indivíduos terem sido expostos aos mesmos estímulos. A aprendizagem do canto é um processo contingente, na medida em que os animais podem realizar escolhas diferentes por razões desconhecidas. Mas, uma vez que uma parte das sílabas Wild e Malinois diferencia-se de forma clara, com frequências mais elevadas no caso Wild, era de esperar que algumas aves, que retiveram genes relevantes na seleção de sílabas, apresentem um repertório claramente diferenciado, relativamente aos restantes. Esses híbridos, com constituintes genéticos exclusivos a cada variedade, permitirão avaliar a importância de cada componente genético dos progenitores nas características do seu repertório.

Este tipo de experiência de hibridação permite que várias características fenotípicas fiquem separadas. Um híbrido poderá ter desenvolvimento cerebral de um Malinois, sem a deficiência auditiva característica dessa variedade (Gleich et al. 1994), ou a sua capacidade de modulação do aparelho vocal. Diversas combinações poderão ocorrer. Logo, várias sílabas reproduzidas estarão ligadas à arquitetura genética desse híbrido em particular, enquanto outras poderão ser aprendidas por qualquer canário, independentemente das diferenças entre Malinois e Wild. Tal foi confirmado nos tutoriais, que possuíam sílabas em comum, levando a um nível de complexidade acrescido que distingue esta experiência de outras hibridações entre espécies mais distantes, cujos repertórios são distintos à partida, sem muitas sílabas partilhadas.

Por outro lado, não só essa partilha de sílabas entre as duas variedades causa dificuldades. O repertório da variedade Wild possui muitas sílabas que estão incluídas na gama de frequências ótima para aprendizagem de Malinois com deficiências auditivas, sendo essa gama próxima dos 1000Hz (Lauer et al. 2007). Tal dificultou as análises de classificação.

Cerca de 85% dos híbridos aprenderam sílabas Wild, e vários deles apresentaram valores de pico de frequência muito acima dos 2000 Hz. Isto sugere que a deficiência auditiva

típica nos Malinois não ocorreu nesses híbridos F₂. Adicionalmente, experiências de hibridação entre canários Malinois e canários Roller (Okanoya 1990) apontam para uma relação entre a sensibilidade auditiva e a distribuição de energia nas vocalizações de canários, o que reforça o ponto anterior. 59% dos híbridos aprenderam sílabas que podem ser consideradas exclusivamente Malinois, sendo o número total de sílabas Malinois (38) aprendidas inferior às Wild (100). Tal sugere que pode ter ocorrido uma tendência na aprendizagem favorecendo sílabas com características Wild. Visto que são sílabas menos especializadas, é possível que híbridos heterozigóticos apresentem maior facilidade/capacidade na sua aprendizagem ou reprodução. O tamanho do repertório dos híbridos apresentou-se mais elevado que o esperado, tendo uma média de 14 sílabas, o que está dentro dos valores normais para variedades não-híbridas. Aves híbridas geralmente apresentam repertórios menores que os seus progenitores (Okanoya 1990), e certos estudos indicam que híbridos de aves canoras poderão possuir uma menor capacidade de aprendizagem de memória (McQuillan et al. 2018).

A utilização de playbacks para tutoria é um método comum no estudo do canto nas aves (Mets & Brainard 2018). Apresenta-se como um método fiável que viabiliza a simulação de a presença de tutores, com a vantagem de possibilitar a manipulação das canções presentes. Tal metodologia permitiu que a tutoria dos híbridos se realiza-se com uma distribuição equitativa de ambas as variedades de progenitores, garantindo que todos os híbrido teriam os mesmos estímulos durante a fase sensorial. Isto seria extremamente difícil utilizando tutores in-vivo. Adicionalmente, possibilita a oportunidade de analisar as sílabas tutoriais isoladamente, sem interferência de outras aves. No entanto, alguns dos ficheiros sonoros utilizados para a criação de playbacks não foram gravados nas melhores condições, possuindo ruído e bastante reverberação. As gravações dos híbridos sofreram com menor extensão um problema semelhante, algumas gravações possuíam ruído provocado pelo equipamento, outras ocorria sobreposição do playback devido à baixa intensidade do canto no híbrido. Isto dificultou a análise sonora dos parâmetros das sílabas, cuja deteção automática tinha de ser recalibrada manualmente em grande parte das sílabas. O tratamento dos ficheiros áudio com software específico de remoção de reverberação e ruído (iZotope RX8) poderia ter mitigado o problema.

Como se verificou neste trabalho, o processo de classificação também apresentou certas dificuldades. Um trabalho prévio de agregação de dados sobre as sílabas exclusivas de cada variedade (Wild/Malinois) seria útil para retirar das análises sílabas comuns a ambas as variedades, simplificando a classificação. Simultaneamente, o alto número de sílabas utilizados na tutoria aumentou a dificuldade da HCA classificar corretamente as sílabas dos híbridos. Possivelmente a criação de playbacks mais repetitivos, com um número reduzido de sílabas, teria melhorado o processo de classificação.

Espera-se que os presentes resultados motivem trabalhos futuros para aprofundar o conhecimento sobre a aprendizagem vocal nas aves. Experiências de hibridação semelhantes poderão beneficiar da identificação do repertório global de sílabas dos tutores e dos híbridos, de modo a identificar as sílabas mais comuns, quer para malinois, quer para wild. Tal permitirá a classificação automática das sílabas, a partir de um catálogo, o que possibilitará outro tipo de métodos sem supervisão, utilizando não só parâmetros pontuais das sílabas mas também a análise do sinal integral dos espectrogramas de cada sílaba. Também permitirá analisar as vocalizações à escala das frases e canção, por possibilitar a identificação de outro tipo de variáveis.

Referências

Alward, Beau & Rouse, Jr, Melvin & Balthazart, Jacques & Ball, Gregory. (2016). Testosterone regulates birdsong in an anatomically specific manner. *Animal Behaviour*. 10.1016/j.anbehav.2016.09.013.

Ballentine, Barbara & Hyman, Jeremy & Nowicki, Stephen. (2004). Vocal performance influences female response to male bird song: an experimental test. *Behavioral Ecology*. 15. 163-168.

Baptista, Luis & Petrinovich, Lewis. (1984). Social interaction, sensitive phases and the song template hypothesis in the white-crowned sparrow. *Animal Behaviour*. 32. 172-181.

Beecher, Michael & Brenowitz, Eliot. (2005). Functional aspects of song learning in birds. *Trends in ecology & evolution*. 20. 143-9.

Beecher, M. D., Campbell, S. E., & Nordby, J. C. (2000). Territory tenure in song sparrows is related to song sharing with neighbours, but not to repertoire size. *Animal behaviour*, 59(1), 29-37.

Berwick, Robert & Okanoya, Kazuo & Beckers, Gabriel & Bolhuis, Johan. (2011). Songs to syntax: The linguistics of birdsong. *Trends in cognitive sciences*. 15. 113-21.

Boughey, M.J. and Thompson, N.S. (1981), Song Variety in the Brown Thrasher (*Toxostoma rufum*). *Zeitschrift für Tierpsychologie*, 56: 47-58.

Bradbury, J. and Vehrencamp, S., 1998. *Principles Of Animal Communication*. Sunderland, MA: Sinauer Associates.

Brainard, M., Doupe, A. What songbirds teach us about learning. *Nature* 417, 351-358 (2002).

Cardoso, Gonçalo. (2010). Loudness of birdsong is related to the body size, syntax and phonology of passerine species. *Journal of evolutionary biology*. 23. 212-9.

Catchpole, C.K. 1982. The evolution of bird sounds in relation to mating and spacing behavior. In *Acoustic communication in birds*. Vol. 1. Edited by D.E. Kroodsma and E.H. Miller. Academic Press, Inc., New York. pp. 297-319

Catchpole, C. K. & Slater, P. J. B. 2008. *Bird Song: Biological Themes and Variations*. Cambridge: Cambridge University Press.

Chen, Z., Wiens, J.J. The origins of acoustic communication in vertebrates. *Nat Commun* 11, 369 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14356-3>

Christie, PeterJ & Mennill, DanielJ & Ratcliffe, LaureneM. (2004). Pitch shifts and song structure indicate male quality in the dawn chorus of Black-capped Chickadees. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 55. 341-348.

Devoogd, Timothy & Krebs, J & Healy, S & Purvis, Andy. (1993). Relations between Song Repertoire Size and the Volume of Brain Nuclei Related to Song: Comparative Evolutionary Analyses amongst Oscine Birds. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*. 254. 75-82.

Draganoiu, Tudor & Nagle, Laurent & Kreutzer, Michel. (2003). Directional female preference for an exaggerated male trait in canary (*Serinusanaria*) song. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*. 269. 2525-31.

Eales, Lucy. (1987). Song learning in female-raised zebra finches - Another look at the sensitive phase. *Animal Behaviour*. 35. 1356-1365.

Fishbein, Adam & Fritz, Jonathan & Idsardi, William & Wilkinson, Gerald. (2020). What can animal communication teach us about human language?. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 375. 20190042.

Fitch, W. T., & Jarvis, E. D. (2012). Birdsong and other animal models for human speech, song, and vocal learning. *Language, music and the brain*, 499-540.

Funghi, C., Cardoso, G.C. and Mota, P.G. (2015), Increased syllable rate during aggressive singing in a bird with complex and fast song. *J Avian Biol*, 46: 283-288.

Garamszegi, Laszlo & Eens, Marcel. (2004). Brain space for a learned task: Strong intraspecific evidence for neural correlates of singing behavior in songbirds. *Brain research. Brain research reviews*. 44. 187-93.

Garcia, Natalia & Tubaro, Pablo. (2018). Dissecting the roles of body size and beak morphology in song evolution in the “blue” cardinalids (Passeriformes: Cardinalidae). *The Auk*. 135. 262-275.

Geberzahn, N., Aubin, T. How a songbird with a continuous singing style modulates its song when territorially challenged. *Behav Ecol Sociobiol* **68**, 1–12 (2014).

Gil, Diego & Gahr, Manfred. (2002). The honesty of bird song: Multiple constraints for multiple traits. *Trends in Ecology & Evolution*. 17. 133-141.

Gleich, O., Dooling, R. J., & Manley, G. A. (1994). Inner-ear abnormalities and their functional consequences in Belgian Waterslager canaries (*Serinus canarius*). *Hearing research*, 79(1-2), 123-136.

Grose, J. Modelling and the fall and rise of the handicap principle. *Biol Philos* 26, 677–696 (2011). <https://doi.org/10.1007/s10539-011-9275-1>

Hultsch, Henrike & Todt, Dietmar. (1989a). Memorization and reproduction of songs in nightingales (*Luscinia megarhynchos*): evidence for package formation. *Journal of comparative physiology. A, Sensory, neural, and behavioral physiology*. 165. 197-203. 10.1007/BF00619194.

Hultsch, Henrike & Todt, Dietmar. (1989b). Song acquisition and acquisition constraints in the nightingale, *Luscinia megarhynchos*. *Naturwissenschaften*. 76. 83-85. 10.1007/BF00396717.

Jarvis, Erich. (2004). Learned Birdsong and the Neurobiology of Human Language. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1016. 749-77.

Konishi, Masakazu. (1966). The role of auditory feedback in the control of vocalization in the White-Crowned Sparrow. *Zeitschrift für Tierpsychologie*. 22. 770-83.

Kroodsma, Donald & Byers, Bruce. (1991). The Function(s) of Bird Song. *American Zoologist*. 31. 318-328. 10.1093/icb/31.2.318.

Langmore, Naomi. (1998). Functions of duet and solo songs of female birds. *Trends in ecology & evolution*. 13. 136-40.

Lauer, Amanda & Dooling, Robert & Leek, Marjorie & Poling, Kirsten. (2008). Detection and discrimination of simple and complex sounds by hearing-impaired Belgian Waterslager canaries. *The Journal of the Acoustical Society of America*. 122. 3615-27.

Leboucher, G., Depraz, V., Kreutzer, M., & Nagle, L. (1998). Male song stimulation of female reproduction in canaries: Features relevant to sexual displays are not relevant to nest-building or egg-laying. *Ethology*, 104(7), 613–624.

Leitner, Stefan & Catchpole, Clive. (2004). Syllable repertoire and the size of the song control system in captive canaries (*Serinus canaria*). *Journal of neurobiology*. 60. 21-7.

Leitner, S., Teichel, J., Ter Maat, A., & Voigt, C. (2015). Hatching late in the season requires flexibility in the timing of song learning. *Biology letters*, 11(8), 20150522. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2015.0522>

MacDougall-Shackleton, S. A. "Sexual selection and the evolution of song repertoires." In *Current Ornithology*, vol. 14, eds. V. J. Nolan, E. D. Ketterson, & C. F. Thompson (New York, NY: Plenum Press, 1997): 81–124.

Marler, P. (1970). A comparative approach to vocal learning: Song development in white-crowned sparrows. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 71(2, Pt.2), 1–25.

Marler, Peter. (1990). Marler, P. Innate learning preferences: signals for communication. *Dev. Psychobiol.* 23, 557-568. *Developmental psychobiology.* 23. 557-68. [10.1002/dev.420230703](https://doi.org/10.1002/dev.420230703).

Marler, Peter & Doupe, Allison. (2000). Singing in the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97. 2965-7. [10.1073/pnas.97.7.2965](https://doi.org/10.1073/pnas.97.7.2965).

MARLER, PETER & PETERS, SUSAN. (1981). Sparrows Learn Adult Song and More from Memory. *Science (New York, N.Y.)*. 213. 780-2. [10.1126/science.213.4509.780](https://doi.org/10.1126/science.213.4509.780).

Marler, P. & Slabbekoorn, Hans. (2004). *Nature's music: The science of birdsong*.

Marler, P. & Tamura, Miwako. (1965). Culturally Transmitted Patterns of Vocal Behavior in Sparrows. *Science (New York, N.Y.)*. 146. 1483-6. [10.1126/science.146.3650.1483](https://doi.org/10.1126/science.146.3650.1483).

Marler, Peter & Peters, Susan. (1982). Structural changes in song ontogeny in the swamp sparrow *Melospiza georgiana*. *Auk*. 99.

McQuillan, M. A., Roth, T. C., Huynh, A. V., & Rice, A. M. (2018). Hybrid chickadees are deficient in learning and memory. *Evolution*, 72(5), 1155-1164.

- Mets, David & Brainard, Michael. (2017). Genetic variation interacts with experience to determine interindividual differences in learned song. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 115. 201713031. 10.1073/pnas.1713031115.
- Moore, J. M., Székely, T., Büki, J., & Devoogd, T. J. (2011). Motor pathway convergence predicts syllable repertoire size in oscine birds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(39), 16440–16445.
- Morrison, Robert & Nottebohm, Fernando. (1993). Role of a telencephalic nucleus in the delayed song learning of socially isolated zebra finches. *Journal of Neurobiology*. 24. 1045 - 1064. 10.1002/neu.480240805.
- Mota, Paulo & Cardoso, Gonçalo. (2001). Song organization and patterns of variation in the Serin (*Serinus serinus*). *Acta ethologica*. 3. 141-150.
- Munding PC, Lahti DC. Quantitative integration of genetic factors in the learning and production of canary song. *Proc Biol Sci*. 2014 Mar 5;281(1781):20132631. doi: 10.1098/rspb.2013.2631. PMID: 24598419; PMCID: PMC3953832.
- Nottebohm, F., Stokes, T.M. and Leonard, C.M. (1976), Central control of song in the canary, *Serinus canarius*. *J. Comp. Neurol.*, 165: 457-486.
- Nowicki, Stephen & Peters, Susan & Podos, Jeffrey. (1998). Song Learning, Early Nutrition and Sexual Selection in Songbirds. *American Zoologist*. 38. 10.1093/icb/38.1.179.
- Okanoya, Kazuo & Dooling, Robert & Downing, Jane. (1990). Hearing and vocalizations in hybrid Waterslager-Roller canaries (*Serinus canarius*). *Hearing research*. 46. 271-5. 10.1016/0378-5955(90)90008-D.
- Payne, R. B., & Payne, L. L. (1997). Field observations, experimental design, and the time and place of learning bird songs. *Social influences on vocal development*, 57-84.
- Pfaff, Jeremy & Zann, Liana & MacDougall-Shackleton, Scott & MacDougall-Shackleton, Elizabeth. (2007). Song repertoire size varies with HVC volume and is indicative of male quality in song sparrows (*Melospiza melodia*). *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*. 274. 2035-40.

Podos, Jeffrey. (1996). Motor constraints on vocal development in a songbird. *Animal Behaviour*. 51. 1061-1070.

Podos, Jeffrey. (1997). A Performance Constraint on the Evolution of Trilled Vocalizations in a Songbird Family (Passeriformes: Emberizidae). *Evolution*. 51. 537-551.

Podos, Jeffrey. (2001). Correlated evolution of morphology and vocal signal structure in Darwin's finches. *Nature*. 409. 185-8.

Podos, Jeffrey & Huber, Sarah & Taft, Benjamin. (2004). BIRD SONG: the interface of evolution and mechanism. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*. 35. 55-87.

Ryan, Michael & Brenowitz, Eliot. (1985). The Role of Body Size, Phylogeny, and Ambient Noise in the Evolution of Bird Song. *American Naturalist*. 126. 87-100.

Saravanan, V., Hoffmann, L. A., Jacob, A. L., Berman, G. J., & Sober, S. J. (2019). Dopamine Depletion Affects Vocal Acoustics and Disrupts Sensorimotor Adaptation in Songbirds. *eNeuro*, 6(3), ENEURO.0190-19.2019.

Sato, Daisuke & Mori, Chihiro & Sawai, Azusa & Wada, Kazuhiro. (2016). Familial bias and auditory feedback regulation of vocal babbling patterns during early song development. *Scientific Reports*. 6. 30323.

Searcy, W. A., & Nowicki, S. (2005). *Monographs in behavior and ecology. The evolution of animal communication: Reliability and deception in signaling systems*. Princeton University Press.

Sethi, V., Bhatt, D., & Kumar, A. (2012). Structure and context of female song in a tropical bird, the Pied Bush Chat. *Current Science*, 103(7), 827-832.

Sherzer, J. (1978). W. John Smith, *The behavior of communicating. An ethnological approach*. Cambridge, Mass. and London, England: Harvard University Press, 1977. Pp. viii 545. *Language in Society*, 7(3), 435-438.

Slater, Peter & Mann, Nigel. (2004). Why do females of many bird species sing in the tropics?. *Journal of Avian Biology*. 35. 289 - 294.

Suthers, Roderick & Goller, Franz. (1997). Motor Correlates of Vocal Diversity in Songbirds. *10.1007/978-1-4757-9915-6_6*.

Suthers, RA & Goller, Franz & Pytte, Carolyn. (1999). The neuromuscular control of birdsong. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences.* 354. 927-39. *10.1098/rstb.1999.0444*.

Todt, Dietmar & Naguib, Marc. (2000). Vocal Interactions in Birds: The Use of Song as a Model in Communication. *Advances in the Study of Behavior.* 29. 247-296.

Thorpe, W.H.. (2008). The learning of song patterns by birds, with especial reference of the song of the Chaffinch *Fringilla coelebs*. *Ibis.* 100. 535 - 570. *10.1111/j.1474-919X.1958.tb07960.x*.

Tyack, Peter. (2020). A taxonomy for vocal learning. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences.* 375. 20180406.

VALLET, ERIC & Beme, I. & Kreutzer, Michel. (1998). Two-note syllables in canary song elicit high levels of sexual display. *Animal Behaviour.* 55. 291-297.

Voigt, Cornelia & Leitner, Stefan & Gahr, Manfred. (2003). Mate fidelity in a population of Island Canaries (*Serinus canaria*) in the Madeiran Archipelago. *Journal für Ornithologie.* 144. 86 - 92.

Wohlgemuth, Melville & Sober, Samuel & Brainard, Michael. (2010). Linked Control of Syllable Sequence and Phonology in Birdsong. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience.* 30. 12936-49. *10.1523/JNEUROSCI.2690-10.2010*.

Wang H, Sawai A, Toji N, Sugioka R, Shibata Y, et al. (2019) Transcriptional regulatory divergence underpinning species-specific learned vocalization in songbirds. *PLOS Biology* 17(11): e3000476. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000476>

Zahavi, Amotz (1975). "Mate selection—A selection for a handicap". *Journal of Theoretical Biology.* Elsevier BV. 53 (1): 205-214. doi:10.1016/0022-5193(75)90111-3. ISSN 0022-5193. PMID 1195756.