

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO DA**  
**NATUREZA**

**Lucas Nascimento Morgado**

**Ocorrência e evolução da vocalização em alta frequência**  
**em beija-flores (Aves: Trochilidae)**

**Juiz de Fora**

**2023**

**Lucas Nascimento Morgado**

**Ocorrência e evolução da vocalização em alta frequência  
em beija-flores (Aves: Trochilidae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação da Natureza da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre. Área de concentração: Comportamento, Ecologia e Sistemática.

Orientador: Dr. André de Camargo Guaraldo

Co-orientadora: Dra. Mariana Fonseca Rossi

**Juiz de Fora**

**2023**

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Morgado, Lucas Nascimento.  
Ocorrência e evolução da vocalização em alta frequência em beija-flores (Aves: Trochilidae) / Lucas Nascimento Morgado. -- 2023.  
48 f. : il.

Orientador: André de Camargo Guaraldo  
Coorientadora: Mariana Fonseca Rossi  
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação da Natureza, 2023.

1. bioacústica. 2. hipótese da adaptação acústica. 3. sinal filogenético. 4. estado ancestral. 5. evolução fenotípica. I. Guaraldo, André de Camargo, orient. II. Rossi, Mariana Fonseca, coorient. III. Título.

Lucas Nascimento Morgado

**Ocorrência e evolução da vocalização em alta frequência  
em beija-flores (Aves: Trochilidae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação da Natureza da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre. Área de concentração: Comportamento, Ecologia e Sistemática.

Aprovada em 27 de abril de 2023.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dr. André, de Camargo Guaraldo (Orientador)  
Universidade Federal do Paraná

---

Dra. Mariana Fonseca Rossi (Co-orientadora)  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Dra. Beatriz Mello Carvalho  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Dr. Israel Schneiberg de Castro Lima  
Universidade Federal do Paraná



---

Documento assinado eletronicamente por **Beatriz Mello Carvalho, Usuário Externo**, em 27/04/2023, às 10:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Mariana Fonseca Rossi, Professor(a)**, em 27/04/2023, às 10:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **André de Camargo Guaraldo, Usuário Externo**, em 27/04/2023, às 10:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Israel Schneiberg de Castro Lima, Usuário Externo**, em 28/04/2023, às 11:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf ([www2.ufjf.br/SEI](http://www2.ufjf.br/SEI)) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1204469** e o código CRC **CC13C10E**.

---

## RESUMO

O número crescente de estudos em bioacústica trouxe à luz comportamentos anteriormente desconhecidos para vários grupos animais, tais como a capacidade dos beija-flores (Aves: Trochilidae) de vocalizarem em frequências altas (i.e., frequência pico >10kHz). Por se tratar de uma descoberta recente, os estudos sobre o tema ainda são escassos, sendo possível que outras espécies desta família tenham esta mesma capacidade, cuja origem evolutiva e manutenção no grupo ainda são pouco conhecidas. Assim, este estudo visou responder: 1) Quantas e quais espécies de beija-flor são capazes de produzir vocalizações de alta frequência? 2) As frequências de vocalização, hábitat e massa corporal das espécies são fatores que apresentam sinal filogenético em Trochilidae? 3) Qual foi a origem e o modo de evolução da vocalização de alta frequência e o tipo de hábitat associado às vocalizações de alta frequência em Trochilidae (“hipótese de adaptação acústica”)? 4) Existe uma relação entre a morfologia das espécies e os seus parâmetros acústicos? Determinamos as frequências de vocalização de 82% das espécies da família. Em seguida, analisamos o sinal filogenético e efetuamos a reconstrução do estado ancestral para 81% das espécies de Trochilidae, com base na mais recente e ampla hipótese filogenética para o grupo. Os resultados do nosso estudo expandem o número de espécies de beija-flor capazes de vocalizar em frequências elevadas de cinco para 29, além de não ter encontrado fatores evolutivos que relacionem hábitat e massa corporal com a frequência de vocalização. Os resultados sugerem que a evolução da vocalização em altas frequências em beija-flores pode estar relacionada com fatores comportamentais e não ambientais, sendo importante que estudos em curso e futuros investiguem (i) a influência do contexto comportamental na vocalização de indivíduos e espécies de Trochilidae e (ii) a capacidade neurológica de processar sinais acústicos a alta frequência pelos beija-flores. A ampla escala taxonômica do nosso estudo em Trochilidae é pioneira e foi possível por meio de dados de ciência cidadã. As nossas descobertas podem ser revistas com a inclusão de sequências moleculares nas bases de dados dos representantes de Trochilidae que ainda não foram caracterizados molecularmente expandindo a inferência de um cenário macroevolutivo acústico ainda mais robusto para Trochilidae.

Palavras-chave: bioacústica, frequência pico, hipótese de adaptação acústica, sinal filogenético, reconstrução do estado ancestral, evolução fenotípica.

## ABSTRACT

The growing number of studies in bioacoustics has brought to light previously unknown behaviors for several animal groups, such as the ability of hummingbirds (Aves: Trochilidae) to vocalize at high frequencies (i.e., peak frequency >10kHz). Due to this recent finding, studies are scarce, and it is possible that other species of this family have this same ability, whose evolutionary origin and maintenance in the group are still poorly known. Thus, this study aimed to answer: 1) How many and which hummingbird species are able to produce high-frequency vocalizations? 2) Are vocalization frequencies, habitat and species mass factors that present a phylogenetic signal in Trochilidae? 3) What was the origin and mode of evolution of high-frequency vocalization and the type of habitat associated with high-frequency vocalizations in Trochilidae (acoustic adaptation hypothesis)? 4) Is there a relationship between species morphology and acoustic parameters? We determined the vocalization frequencies of 82% of the species in the family. Then, we subsequently analyzed the phylogenetic signal and performed ancestral state reconstruction for 81% of Trochilidae species, based on the most recent and broad phylogenetic hypothesis for the group. Our study expanded the number of hummingbird species able to vocalize at high frequencies from five to 29 and found no evolutionary factors that relate habitat and mass to vocalization frequency. The results suggest that the evolution of vocalization at high frequencies in hummingbirds may be related to behavioral rather than environmental factors, and it is important that ongoing and future studies investigate (i) the influence of behavioral context on the vocalization of Trochilidae individuals and species and (ii) the neurological ability to process acoustic signals at high frequency. The taxonomic scale of our study in Trochilidae is pioneer and was possible through citizen science data. Our findings may be revisited with the inclusion of molecular sequences in databases of those representatives of Trochilidae that have not yet been molecularly characterized expanding the inference of an even more robust acoustic macroevolutionary scenario for Trochilidae.

**Keywords:** bioacoustics, peak frequency, acoustic adaptation hypothesis, phylogenetic signal, ancestral state reconstruction, phenotypic evolution.

## RESUMO PARA DIVULGAÇÃO

Os beija-flores são aves bastante chamativas e que cativam as pessoas. No entanto, até o presente há poucos estudos sobre os cantos dessas aves tão ágeis. Além das belas cores da plumagem, o canto é uma das principais formas de comunicação entre as aves, podendo sinalizar desde agressividade até comunicar alertas a outros indivíduos da espécie ou atrair parceiras e parceiros para a reprodução. A maioria das aves é capaz de cantar em frequências entre 0,5 e 6kHz, mas recentemente foi descoberto que cinco espécies de beija-flores conseguem cantar em frequências muito além de 10kHz, podendo chegar a até pouco mais de 13kHz. As teorias sugerem que aves de menor porte tendem a apresentar cantos mais agudos, uma limitação morfológica, portanto. Entretanto, esta habilidade também pode ter evoluído entre os beija-flores para contornar o ruído do ambiente, a chamada “hipótese de adaptação acústica”. Neste sentido, em locais de vegetação aberta e com muito vento, por exemplo, os ancestrais dos beija-flores viventes devem ter sido selecionados para desenvolverem cantos mais agudos e, desse modo, comunicar-se de modo mais eficiente, contornando os ruídos ambientais que, em geral, possuem frequências mais graves (i.e., baixas). Como há, no mundo, cerca de 340 espécies de beija-flores, este estudo ampliou as buscas por espécies capazes de cantar em frequências mais agudas (>10kHz), avaliando se esta habilidade dos beija-flores atuais está de algum modo associado ao tamanho corporal dessas aves e/ou aos tipos de ambientes (i.e., florestal, arbustivo, bosque ou campo) em que viviam seus ancestrais. Após analisar os cantos de 82% das espécies de beija-flores do mundo, identificamos 29 capazes de cantar em frequências mais agudas, portanto sextuplicando o número conhecido até então de espécies com esta habilidade. Entretanto, não encontramos uma relação entre esta habilidade e o tamanho corporal das aves, nem ao tipo de ambiente em que viveram seus ancestrais. Assim, é plausível que os cantos em frequências mais altas sejam consequência de contextos comportamentais em que as aves se encontrem. Por exemplo, este tipo de canto talvez seja mais frequente em contextos de brigas entre indivíduos, com a possibilidade de que cantar em frequências mais altas possa ser mais efetivo para negociar com os rivais. Assim avança a ciência: propondo e respondendo algumas perguntas, que geram novas questões e sugestões para novos caminhos a serem trilhados.



## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	2
1.1 COMUNICAÇÃO ENTRE OS ANIMAIS	2
1.2 Comunicação em beija-flores (Aves: Trochilidae)	4
2 CAPÍTULO 1	7
Introdução	9
Material e Métodos	13
Coleta de dados de vocalização, habitat e morfologia das espécies	13
Análise dos dados de vocalização	14
Análise filogenética	15
Sinal filogenético	15
Resultados	16
Discussão	21
Agradecimentos	27
Referências	28
ANEXO I	43
Introduction	45
Methods	48
Results	51
Discussion	56
Acknowledgements	61
References	62
Supplement	69

# 1 INTRODUÇÃO GERAL

## 1.1 COMUNICAÇÃO ENTRE OS ANIMAIS

A comunicação é uma estratégia evolutiva pela qual os organismos transmitem e recebem as mais diversas informações, sendo fundamental, ainda que não exclusivo (e.g., fungos; Bouwmeester et al., 2007), para os mais diversos grupos animais, desde organismos unicelulares (Timsit et al., 2021) a invertebrados (O'Connell, 1986) e vertebrados (Chen & Wiens, 2020). Entre os animais, existem diversos modos de comunicação, alguns restritos a poucos grupos (p.ex., sinalização elétrica; Carlson & Hopkins, 2003), mas outros comuns a vários grupos e bastante frequentes. Dentre estes últimos, destacam-se as sinalizações químicas, visuais e sonoras. A comunicação realizada por sinais químicos é observada, por exemplo, entre os insetos sociais e utilizadas para identificar um integrante da colônia ou sinalizar os caminhos até uma fonte de alimento para outros indivíduos (Jackson & Ratnieks, 2006). A segunda modalidade de sinalização, a comunicação visual, é bastante desenvolvida em vários grupos de invertebrados, como Hymenoptera (e.g., formigas; Yilmaz & Spaethe, 2022), e vertebrados como as aves (Martin, 2022). Alguns sinais visuais têm funções de alerta, como as colorações aposemáticas indicativas de potencial toxicidade em invertebrados, anfíbios e répteis (Caro & Ruxton, 2019), as sinalizações motoras que podem ser usadas para indicar a eventuais competidores conspecíficos um maior tamanho corporal (Vanderbilt, 2019), ou então demonstrar agressividade ou risco potencial a eventuais predadores (e.g., Whiting & Miles, 2019). Sinalizações vibracionais (ou sísmicas) também são emitidas por vários grupos animais para as mais diversas finalidades, como a atração de parceiros, disputa intraespecífica (e.g., Eberhard et al., 2020) ou sinalização de alerta para conspecíficos (e.g., O'Connell-Rodwell, 2007). A sinalização acústica completa esta lista de formas de comunicação mais frequentes entre os animais, em alguns casos podendo ser emitida e recebida a vários quilômetros de distância (Fisher et al., 2017; Garstang, 2004; Lengagne et al., 1999).

Em ambientes cujas condições ambientais restringem a propagação luminosa e, por conseguinte, a habilidade visual dos animais, outros meios de comunicação tornam-se mais eficientes e recorrentes entre os organismos que ali habitam, como ocorre, por exemplo, entre os cetáceos (Parks et al., 2014). O som se propaga melhor na água do que no ar, ao contrário do que acontece com a luz, gerando condições ambientais específicas que favoreceram a seleção de vocalizações singulares e complexas nos mamíferos marinhos, incluindo a emissão de sons

em frequências ultrassônicas que são capazes de percorrer grandes distâncias (Dawson, 1991; Reidenberg e Laitman, 2018).

Uma estratégia de comunicação eficiente é importante, por diversas razões, para qualquer que seja a espécie. Na natureza, poupar energia é essencial para a sobrevivência, portanto uma comunicação eficiente pode evitar que o indivíduo tenha um gasto energético desnecessário. Ao encontrar um potencial rival ou uma possível ameaça, uma comunicação eficiente entre os indivíduos pode evitar um conflito físico potencialmente nocivo. Além disso, o maior investimento energético em uma comunicação eficiente pode aumentar as chances no sucesso reprodutivo do indivíduo, estratégia notável nas aves que possuem dimorfismos sexuais marcantes.

Quando se trata de comunicação, as aves se destacam da maioria dos outros grupos animais, especialmente em relação à comunicação associada às estratégias reprodutivas. Muitas espécies se destacam por apresentar os mais marcantes dicromatismos sexuais na natureza, em que macho e fêmea podem ter colorações tão diferentes que podem ser considerados por leigos como espécies diferentes (Owens & Hartley, 1998). Em alguns casos, o dicromatismo é complementado por ornamentos que demandam investimento energético do macho para a síntese e manutenção, especialmente no caso de penas pouco aerodinâmicas (p.ex. as caudas longas em *Alectrurus risora*, *Alectrurus tricolor*, *Tyrannus savana*, *Chiroxiphia caudata*, *Discosura longicaudus*, *Hydropsalis torquata* e *H. forcipata*) ou em cores vivas, chamativas ou contrastantes com o ambiente, o que em muitos casos pode tornar os machos mais conspícuos para o ataque por predadores (Gotmark et al., 1997; Promislow et al., 1992). Ainda que alguns ornamentos e colorações não necessariamente representem sinalizações honestas (Hill & Yasukawa, 2014), é recorrente a função dos ornamentos dos machos em comunicar uma melhor condição corporal à fêmea e a competidores conspecíficos, por vezes às custas de modificações morfológicas que podem, por exemplo, aumentar os custos energéticos do voo (Bostwick et al., 2012). Essa comunicação visual é funcional apenas quando o emissor e o receptor estão próximos, entretanto, as aves também se destacam na comunicação acústica, a qual pode se manter efetiva em maiores distâncias, além de ser produzida de forma não-vocal, como a estridulação e a sonação de penas (Clark, 2021) e o tamborilado (Moody et al., 2022). Por exemplo, algumas espécies de pica-pau alertam outros machos próximo ao seu território bicando ritmicamente troncos de árvores ocas, produzindo um som que pode ser ouvido a grandes distâncias. Outro exemplo são os sons produzidos pelo bater das penas da asa, como ocorre nas exibições reprodutivas da rendeira (*Manacus manacus*) e do alerta em voo emitido por *Columbina squammata* (Amorim & Dias, 2019). Entretanto, o que se destaca nas aves são

suas sinalizações acústicas vocais (i.e., vocalizações), possibilitados pela ação de órgão especializado, a siringe (Nowicki & Marler, 1988; Wild, 1997). Diferentemente de outros invertebrados, como algumas mariposas (Barber et al., 2021) e vertebrados, como alguns cetáceos e morcegos, cuja comunicação acústica inclui frequências ultrassônica, a vocalização das aves geralmente varia entre 0,5 e 6,0kHz (Dooling et al., 2000). Por vezes, essa comunicação envolve sinais simples como os chamados, com funções variadas como o alerta da presença de um predador ou um filhote chamando pela mãe, ou sinais mais complexos como nos cantos, em grande parte com função territorialista e de atração de fêmeas.

## **1.2 Comunicação em beija-flores (Aves: Trochilidae)**

Dentre as mais de dez mil espécies viventes de aves, os beija-flores apresentam todos esses tipos de comunicação característicos das aves: colorações exuberantes, ornamentos na plumagem e produção de sons não-vocais e vocais (Gruson et al., 2021; Hogan & Stoddard, 2018; Hunter, 2008; Olson et al., 2018; Duque et al., 2018). Os beija-flores são aves pertencentes à família Trochilidae, que apresentam características morfológicas e comportamentais únicas entre as aves. São extremamente bem adaptados a uma dieta quase exclusivamente nectarívora, possuindo importantíssimo papel na polinização de flores (Kessler et al., 2019; Waser, 1978). Além do bico adaptado primariamente para a coleta do néctar, os beija-flores apresentam um estilo de voo pairado único entre as aves por conseguirem voar inclusive para trás, permitindo que se posicionem para se alimentar em flores pouco acessíveis a outras aves (Warrick et al., 2012). Esse estilo de voo e pequeno tamanho corporal em relação às demais aves culmina em um metabolismo acelerado e que demanda constante reposição energética (Suarez & Gass, 2022). Trochilidae é um grupo de espécies exclusivas das Américas, se distribuindo desde o Alasca até a Terra do Fogo. De acordo com McGuire (2014), esse grupo se separou dos outros representantes Apodiformes mais próximos, os andorinhões, há cerca de 40 milhões de anos. Em um estudo com menor representatividade taxonômica para o grupo, esta estimativa de separação é de aproximadamente 55 milhões de anos (Prum et al. 2015). Ainda de acordo com McGuire (2014), o fóssil do representante ancestral mais antigo da família na América do Sul tem entre 20 e 24 milhões de anos e entre 34 e 28 milhões de anos para o ancestral mais antigo, na Europa, sugerindo que esta é uma família evolutivamente recente em relação a outras aves. A Cordilheira dos Andes pode ter sido um fator importante na diversificação, já que a maior parte da diversidade de beija-flores encontra-se na América do Sul, com presença marcante nos Andes (Benham & Witt, 2016; Bleiweiss, 1998; McGuire et

al. 2014). Apesar da origem recente do grupo, existem aproximadamente 340 espécies de beija-flor distribuídas pelo continente, com marcada diversificação e adaptação do grupo aos mais diferentes habitats (Winkler et al. 2020).

Em relação às vocalizações dos beija-flores, estudos recentes demonstram que algumas espécies são capazes de emitir sons em frequências mais altas do que o usualmente feito pela maioria das aves. Olson et al. (2018) relatou, pela primeira vez para a família Trochilidae, que o beija-flor-preto (Apodiformes, Trochilidae: *Florisuga fusca*) é capaz de produzir vocalizações de ~11.8 kHz, bem acima do usual para aves. Posteriormente, Duque et al. (2018) também relatou vocalizações em altas frequências em quatro espécies andinas desta família. Uma das espécies estudada (*Oreotrochilus chimborazo*) habitava ambientes campestres e apresentou uma vocalização em frequência pouco acima de 13.0 kHz, maior do que qualquer outra ave já estudada. Já as outras três espécies (*Boissonneaua flavescens*, *Adelomyia melanogenys*, *Agelaiocercus coelestis*), habitantes de florestas nebulares, apresentaram vocalizações em frequências inferiores aos sons produzidos por insetos (11.0 kHz), mas superiores à média de frequências emitidas por outras aves (0,5-6,0kHz; Duque et al., 2018). Entretanto, o fato de um animal vocalizar em altas frequências não significa necessariamente que conseguem ouvir esses sons. É comum que os órgãos vocais dos animais possam emitir sons involuntários em frequências acima da capacidade auditiva daquele animal, de modo que esse som, portanto, não apresenta função de comunicação intraespecífica (Brumm, 2013). Com uma abordagem experimental e análises neurológicas, Duque et al. (2020) observaram que *O. chimborazo* é capaz de ouvir e reagir metabolicamente a altas frequências, sendo um forte indício do uso dessas frequências na comunicação da espécie. Nesse contexto, os autores sustentam a hipótese de que essas espécies de beija-flores capazes de vocalizar em altas frequência o fazem para (i) minimizar a competição acústica com outras espécies (Duque et al., 2018), mas também como (ii) uma possível resposta evolutiva que os permitiu contornar os ruídos ambientais e barreiras impostas pela estrutura do habitat (Duque et al., 2021).

A habilidade de vocalizar em altas frequências pode estar relacionada com modificações evolutivas na estrutura mais complexa da siringe em beija-flores, apresentando características convergentes às de aves canoras (i.e., aves de cantos elaborados) e distanciando-os de outros Apodiformes, como os andorinhões, cujas vocalizações e siringe são menos complexas (Riede & Olson, 2020). No entanto, os poucos estudos acerca desse tema limitam a clara compreensão de como essa habilidade surgiu e se manteve em beija-flores, isto é, se há fatores evolutivos subjacentes a esse comportamento. Nesse contexto, é premente identificar se outras espécies de beija-flor também apresentam a capacidade de vocalizar em altas frequências, permitindo

identificar se essa é uma característica exclusiva de algumas poucas espécies ou se é recorrente no grupo, bem como compreender melhor o papel e peso de diferentes pressões (fatores ambientais e competição acústica) e de respostas comportamentais (Brumm & Zollinger, 2011) na origem e manutenção desta estratégia incomum de comunicação neste grupo peculiar e especioso dentre as aves.

O presente estudo está estruturado em um capítulo central, no qual buscamos identificar o comportamento de vocalização em altas frequências em outras espécies de beija-flores, bem como avaliar a evolução deste comportamento frente a hipótese da adaptação acústica (i.e., hábitat) e do tamanho corporal das espécies.

## 2 CAPÍTULO 1

*Manuscrito formatado e submetido à revista Bioacoustics*

*Versão original, em inglês, incluída como ANEXO I neste documento*

### **Ocorrência e evolução de vocalizações em altas frequências em beija-flores (Aves: Trochilidae)**

Lucas Nascimento Morgado<sup>ac\*</sup>, Mariana Fonseca Rossi<sup>ab</sup> and André de Camargo Guaraldo<sup>ac</sup>

*<sup>a</sup>Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Conservação da Natureza, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brasil; <sup>b</sup>Departamento de Zoologia, Laboratório de Protozoologia (LabProto). Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brasil; <sup>c</sup>Departamento de Zoologia, Laboratório de Ecologia Comportamental e Ornitologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil*

\*Rua Arthur Max Degwert, 49, Quintas da Avenida, 36046-570, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil, lucasmnascimento@gmail.com

## **Ocorrência e evolução de vocalizações em altas frequências em beija-flores (Aves: Trochilidae)**

O crescimento de estudos em bioacústica trouxe à tona comportamentos antes desconhecidos para diversos grupos animais, como a capacidade de vocalização em altas frequências em alguns beija-flores (Aves: Trochilidae). Devido ao caráter recente dessa descoberta, os estudos são escassos, sendo possível que outras espécies dessa família apresentem essa mesma capacidade, cuja origem e manutenção no grupo ainda são pouco conhecidas. Assim, o presente estudo teve como objetivos responder às seguintes questões: 1) Quantas e quais espécies de beija-flor são capazes de produzir vocalizações em altas frequências? 2) As frequências de vocalização, hábitat e massa das espécies são fatores que apresentam sinal filogenético em Trochilidae? 3) Qual foi a origem e o modo de evolução da vocalização em alta frequência e do tipo de hábitat associados às vocalizações de alta frequência em Trochilidae (hipótese da adaptação acústica)? 4) Existe uma relação entre a morfologia das espécies e os parâmetros acústicos? Determinamos as frequências das vocalizações de 82% das espécies da família, em que posteriormente analisamos o sinal filogenético e realizamos a reconstrução de estado ancestral para 81% das espécies de Trochilidae, com base na mais recente e ampla hipótese filogenética do grupo. Nosso estudo expandiu de cinco para 29 o número de espécies de beija-flores capazes de vocalizar em frequências altas (i.e., frequência pico >10kHz), sendo que não foram encontrados fatores evolutivos que relacionem habitat e massa com a frequência da vocalização. Os resultados sugerem que a evolução da vocalização em altas frequências em beija-flores pode estar mais relacionada a fatores comportamentais do que ambientais, sendo importante que estudos em andamento e futuros investiguem (i) a influência do contexto comportamental sobre a vocalização dos indivíduos e espécies de Trochilidae e (ii) a capacidade neurológica de processamento dos sinais acústicos em alta frequência. Exploramos aqui uma temática da acústica em beija-flores em uma escala taxonômica pioneira e viabilizada pela ciência cidadã. Tais resultados ainda podem ser revisitados com a inclusão de sequências moleculares em bancos de dados daqueles representantes de Trochilidae que ainda não foram caracterizados



do ponto de vista molecular, ampliando a inferência de um cenário macroevolutivo acústico ainda mais robusto para Trochilidae.

Keywords: bioacústica, frequência pico, hipótese da adaptação acústica, sinal filogenético, reconstrução de estado ancestral, evolução fenotípica

## **Introdução**

Análises quantitativas em bioacústica são relativamente recentes na Ciência e viabilizaram estudos aprofundados que nos permitem compreender melhor, por exemplo, a complexa comunicação entre as espécies animais (Slater 2003). Diversos grupos animais têm sido estudados e novas perguntas têm sido feitas à medida que essa área do conhecimento e as tecnologias associadas aos métodos bioacústicos avançam. Ilustra esse aspecto a recente descoberta da capacidade de algumas aves vocalizarem em grandes amplitudes (Podos e Cohn-Haft 2019) e até mesmo em altas frequências (Olson et al. 2018).

Os membros da classe Aves são os que mais chamam a atenção em relação à comunicação sonora, sendo suas vocalizações muitas vezes predominantes na paisagem acústica dos ambientes naturais terrestres, principalmente nos mais biodiversos como as florestas tropicais. A vocalização em Aves apresenta importantes funções na obtenção e delimitação de território, aviso contra predadores e atração de parceiros (Brumm 2013). Entretanto, estas comunicações ocorrem em um ambiente acústico não-exclusivo e diferentes fatores podem prejudicar a qualidade da informação transmitida pelo emissor aos seus receptores. Um exemplo de ambiente acústico disputado é o coro matutino em aves, em que diversas espécies vocalizam ao mesmo tempo nas primeiras horas do dia, influenciados por disputas territoriais, fertilidade das fêmeas, menor investimento em forrageamento devido à pouca luz e até melhores condições atmosféricas (e.g., maior umidade relativa) para a propagação do sinal sonoro (Kacelnik e Krebs 1983; Mace 1987). Em termos de paisagem, a

eficiência da comunicação acústica das aves depende da capacidade das espécies contornarem as diversas barreiras impostas à propagação do som pelo ambiente que as cercam (Brumm e Naguib 2009). Além da competição acústica, cada hábitat também apresenta diferentes padrões de ruídos abióticos que podem interferir na comunicação eficiente entre as aves, como o vento, quedas d'água e, mais recentemente na história evolutiva das aves, ruídos antropogênicos (Brumm e Naguib 2009; Walters et al. 2019). O ruído ambiental interfere tanto na percepção do sinal sonoro em si quanto na compreensão da mensagem que aquele sinal transmite (Wiley e Richards 1982; Wiley 1994, 2006). Em contextos mais ruidosos, pode emergir o “Efeito Lombard”, por meio do qual os indivíduos de uma dada espécie asseguram sua comunicação aumentando sua amplitude vocal em resposta proporcional ao ruído ambiental (Brumm e Zollinger 2011). Alternativamente, os indivíduos podem ajustar a banda de frequência da sua vocalização, minimizando o mascaramento pelo ruído de fundo e/ou a competição acústica interespecífica (“hipótese do nicho acústico”; Krause 1993; Lohr et al. 2003; Luther e Gentry 2013).

A audição das aves é, em geral, mais eficiente nas frequências entre 1 e 5 kHz, enquanto sua capacidade vocal vai de 0.5 kHz a 6 kHz (Dooling et al. 2000). Entretanto, Olson et al. (2018) relataram pela primeira vez para a família Trochilidae que o beija-flor-preto (Apodiformes, Trochilidae: *Florisuga fusca*) é capaz de produzir vocalizações de ~11.8 kHz, bem acima do que se conhecia para a maioria das aves (Dooling et al. 2000). Posteriormente, Duque et al. (2018) também relataram vocalizações em frequências igualmente elevadas em quatro espécies andinas desta família. Uma das espécies estudadas foi *Oreotrochilus chimborazo*, habitante de ambientes campestres e que apresentou uma vocalização com frequência de ~13.0 kHz, acima de qualquer outra ave já estudada. Já as outras três espécies deste estudo - *Boissonneaua flavescens* ( $F_0=9.7$  kHz), *Adelomyia melanogenys* ( $F_0=11.7$  kHz), e *Agelaiocercus coelestis* ( $F_0=11.9$  kHz), - são habitantes de florestas nebulares e vocalizam em

frequências inferiores aos sons produzidos por insetos (12.5–15.0 kHz), mas superiores à média de frequências emitidas por outras aves (3.0–9.0 kHz; Duque et al., 2018). Ainda que a literatura não defina um limiar a partir do qual uma vocalização pode ser considerada de alta frequência em Aves, esta definição é arbitrariamente e usualmente aplicada quando uma dada vocalização tem frequência fundamental que extrapola o valor médio usual das espécies dessa classe, podendo ser razoavelmente assumido em 10kHz para Aves. Todavia, o fato de um animal vocalizar em altas frequências não significa necessariamente que conseguem ouvir esses sons. É comum que os órgãos vocais produzam sons involuntários em frequências acima da capacidade auditiva daquele animal, de modo que esse som não apresente função de comunicação (Brumm 2013). Com uma abordagem experimental e análises neurológicas, Duque et al. (2020) observaram que *O. chimborazo* é capaz de ouvir e reagir a altas frequências, sendo este um forte indício do seu uso na comunicação da espécie. Nesse contexto, os autores reforçam a hipótese da adaptação acústica (Morton 1975) como alternativa ao “Efeito Lombard”, sugerindo que espécies de beija-flores capazes de vocalizar em altas frequência o fazem como uma possível resposta evolutiva para contornar os ruídos ambientais e barreiras impostas pela estrutura do hábitat (Duque et al. 2018; Duque et al. 2021). Ambientes mais abertos geralmente têm mais ruído de fundo em frequências mais baixas (e.g., ventos), portanto é plausível que vocalizações em altas frequências fossem positivamente selecionadas em aves que vivem primariamente em hábitats desse tipo (Wiley e Richards 1982; Padgham 2004). Entretanto, trabalhos com outros grupos de aves, como os Passeriformes, indicam que essas variações nas frequências das vocalizações podem estar mais relacionadas com fatores morfológicos e comportamentais do que a pressões ambientais. Por exemplo, o tamanho corporal do animal pode alterar a frequência pico da vocalização do animal, sendo que geralmente indivíduos maiores, i.e., com maior massa corporal, tendem a vocalizar em frequências mais baixas (Demery et al. 2021). Além disso, alterações na vocalização ocorrem

durante disputas territoriais entre os indivíduos ou em exibições de acasalamento, em que tais alterações podem ser um indicativo de vigor físico e agressividade do animal (Mikula et al., 2021).

Outra hipótese também plausível pode não ter relação com nenhum dos fatores citados anteriormente. As frequências das vocalizações dos beija-flores podem resultar de modificações evolutivas na estrutura da sua siringe, a qual apresenta características convergentes às de aves canoras (i.e., Passeriformes) e distancia-se de outros Apodiformes, como os andorinhões (Riede e Olson 2020). No entanto, os estudos acerca desse tema são insuficientes para que se possa compreender com clareza como essa habilidade surgiu em beija-flores e os fatores evolutivos que influenciam as manifestações desse comportamento (Duque et al., 2018; Duque et al., 2020; Duque et al., 2021; Olson et al., 2018). Subjacente às hipóteses associadas à vocalização em altas frequências por Trochilidae, residem incertezas sobre quantas e quais outras espécies de beija-flor também apresentam a capacidade de realizar estas vocalizações. Somente após compreender holisticamente como essa habilidade surgiu e se manteve no grupo serão possíveis avanços consistentes sobre o papel e peso de diferentes pressões evolutivas (e.g., fatores ambientais e competição acústica) e de respostas comportamentais (Brumm e Zollinger 2011) sobre esta habilidade vocal incomum nas aves. Porém, é importante atentar que o processo evolutivo desse grupo vai muito além da sua vocalização e os parâmetros acústicos são apenas um dos fatores que podem ter norteado a evolução dos beija-flores dentro dos mais variados habitats e comportamentos.

O presente trabalho teve como objetivo explorar mais profundamente a habilidade de alguns membros da família Trochilidae vocalizarem em frequências superiores à de outras aves, testando hipóteses evolutivas associadas a esse parâmetro vocal. Especificamente, buscamos responder: 1) Quantas e quais espécies de beija-flor são capazes de produzir vocalizações em altas frequências, i.e., acima de 10 kHz, frequência acima do limite da capacidade de

vocalização da maioria das aves? 2) Há sinal filogenético para vocalizações em altas frequências e para o principal habitat utilizado pelas espécies de Trochilidae? 3) A origem e o modo de evolução da vocalização em alta frequência em Trochilidae apresenta relação com o modo de evolução do tipo de hábitat (hipótese da adaptação acústica)? 4) A morfologia das espécies de Trochilidae (i.e., massa corporal) é um preditor de seus parâmetros vocais?

## **Material e Métodos**

### ***Coleta de dados de vocalização, habitat e morfologia das espécies***

Para identificar, dentre o total de espécies da família Trochilidae (349 espécies; Winkler et al. 2020), outras espécies capazes de vocalizar em alta frequência, além das já descritas por Duque et al. (2018) e Olson et al. (2018), foi feita uma compilação das gravações disponíveis no banco de dados online de ciência cidadã xeno-canto ([www.xeno-canto.org](http://www.xeno-canto.org)). Foi selecionada uma gravação por espécie disponível na plataforma, tendo como critério inicial aquelas gravações de melhor qualidade (classificadas como ‘A’ ou ‘B’ pelos moderadores da plataforma). Assim, foram rejeitadas aquelas gravações ruidosas, com baixo volume, com sobreposição de vocalização de indivíduos ou espécies e aquelas cuja identidade da espécie emissora era incerta ou duvidosa. Dentre o total de espécies com registros vocais na plataforma (n=338; 97% do total da família), foram analisadas gravações para 287 espécies (82% do total). Complementarmente, compilamos o hábitat primário e a medida média da massa corporal descrita de cada espécie em Tobias et al. (2022) e Winkler et al. (2022).

### *Análise dos dados de vocalização*

As análises acústicas descritivas dos cantos e chamados compilados foram feitas utilizando o software Raven Pro 1.6 (Cornell Laboratory of Ornithology, Ithaca, NY, USA). Para cada gravação, foram selecionadas as três notas com a maior frequência aparente, independente de se tratar de um chamado ou canto. Foram selecionadas três notas para cada espécie, evitando notas sobrepostas a ruídos, a outras vocalizações, a outras notas e a harmônicos distintos do fundamental. Cada seleção foi salva em um arquivo em formato *wave* 16 bits. Para cada nota, foram extraídas a frequência pico (i.e., frequência em que se concentrou a maior energia da vocalização), a frequência mínima, a frequência máxima e a frequência média, em ambiente R v.4.2.1 (R Core Team 2020), utilizando funções dos pacotes áudio (Urbanek 2020), *seewave* (Sueur et al. 2008) e *tuneR* (Ligges et al. 2018). Utilizamos a frequência pico como parâmetro determinante do uso de alta frequência na vocalização das espécies analisadas por ser o parâmetro acústico que descreve a maior energia investida pela ave na vocalização. Através do Power Spectrum da nota selecionada, foi possível analisar como se distribuiu a energia da daquela vocalização (eixo y) ao longo dessa paisagem sonora, ou paisagem de frequência (eixo x). Foi assumido 10 kHz como valor de corte mínimo para delimitar emissões em alta frequência, um valor conservador, tendo em conta que não existe uma definição exata do valor que é considerado vocalização de alta frequência em Aves. Este valor se aproxima do limiar anteriormente sugerido para a frequência superior emitida pelas aves (Dooling 2004) e um valor próximo da menor frequência dominante média entre quatro espécies de beija-flores previamente registrados emitindo vocalizações consideradas de altas frequências (Duque et al. 2018).

### ***Hipótese filogenética***

Para a realização das análises macroevolutivas foi feita uma Inferência Filogenética a partir da filogenia datada mais recente e com maior amostragem para o grupo, composta por 284 espécies de beija-flores e seis marcadores moleculares (McGuire et al. 2014), portanto considerando 81% da diversidade de Trochilidae. Estes dados foram obtidos mediante solicitação ao autor. A partir dos dados do xeno-canto foi possível obter o parâmetro acústico de 97% (n=274) dos taxa representados na hipótese filogenética de McGuire et al. (2014).

### ***Sinal filogenético***

A análise de sinal filogenético foi utilizada para verificar se os caracteres acústicos, de hábitat e de morfologia (i.e., massa corporal) apresentados pelas espécies da família Trochilidae podem refletir a história evolutiva do grupo. Para o cálculo do sinal filogenético foi utilizado o índice de  $\lambda$  de Pagel (Pagel 1999), o que tem sido sugerido entre outros índices, o mais satisfatório (Münkemüller et al. 2012). Além disso, o índice de  $\lambda$  de Pagel permite utilizar dados ausentes, o que no presente estudo foi adequado. O índice de  $\lambda$  de Pagel utiliza o método de máxima verossimilhança, e os valores de  $\lambda$  podem variar de zero a um, sendo que zero resulta em nenhum sinal filogenético, e valores de  $\lambda > 0$  mostram a existência de sinal, sendo valores mais próximos de um indicativo de sinal filogenético mais forte (Pagel 1999). Este índice foi calculado utilizando os pacotes phylosignal (Keck et al. 2016), phylobase (Hackathon et al. 2013) e ape (Paradis et al. 2004) na plataforma R a partir das quatro medidas de frequência extraídas para cada espécie, do seu tipo de hábitat primário e do valor médio de sua massa corporal (Tobias et al. 2022).

### ***Reconstrução de estado ancestral***

A reconstrução de estado ancestral foi inferida de modo a obter um cenário macroevolutivo completo para os traços bioacústicos, ecológicos e morfológicos citados no tópico anterior para a família Trochilidae. A árvore datada segundo McGuire et al. (2014) foi utilizada para reconstruir os estados ancestrais de caráter utilizando o pacote Phytools v. 0.6–99 (Revell 2012). Para isso, foi utilizado a função “ace” com dados discretos para o tipo de hábitat e com dados contínuos para as quatro frequências analisadas (mínima, pico, máxima e média) e para a massa média de cada espécie. Os estados de caráter utilizados para o tipo de hábitat foram "Florestal", "Arbustivo", "Bosque" e "Campestre" e o modelo utilizado foi o “ER”, o qual assume mesmo peso para todas as possíveis transições de estado de caráter.

### **Resultados**

As vocalizações analisadas (n=287) se distribuíram de forma desigual entre os tipos de hábitat, sendo maior o número de espécies habitantes de ambientes florestais (71% do total de espécies) e arbustivos (20%; Figura 1). As análises indicaram ocorrência de vocalização em altas frequências (Frequência pico >10kHz) em 28 espécies, não se restringindo àquelas que ocorrem primariamente em ambientes abertos (campestres/arbustivos; Figura 1 e 2). Considerando a riqueza da família Trochilidae analisada (n=287), a proporção de espécies capazes de vocalizarem em altas frequências se distribuiu de modo similar entre os habitats de vegetação lenhosa (i.e., florestal e bosque; ~9%) e os habitats de vegetação arbustiva e campestre (~12%), mas dentre este grupo seletivo de espécies, a sua maioria se concentrou nos ambientes florestal e de bosque (71%; n=20; Figura 1 e 2). Além das cinco espécies reconhecidamente capazes de vocalizar em frequência superior a 10 kHz (*F. fusca*, *O. chimborazo*, *B. flavescens*, *A. melanogenys* e *A. [coelestis] kingii*; Duque et al. 2018), nossas análises revelaram outras 23



espécies capazes de emitir vocalizações em alta frequência (Figura 1 e 2), portanto totalizando 28 espécies. Dentre as 28 espécies para as quais registramos vocalização em alta frequência, detectamos 16 capazes de vocalizar em frequências acima de 11 kHz, sendo cinco espécies capazes de vocalizar acima da frequência pico de 12 kHz (Figura 2).

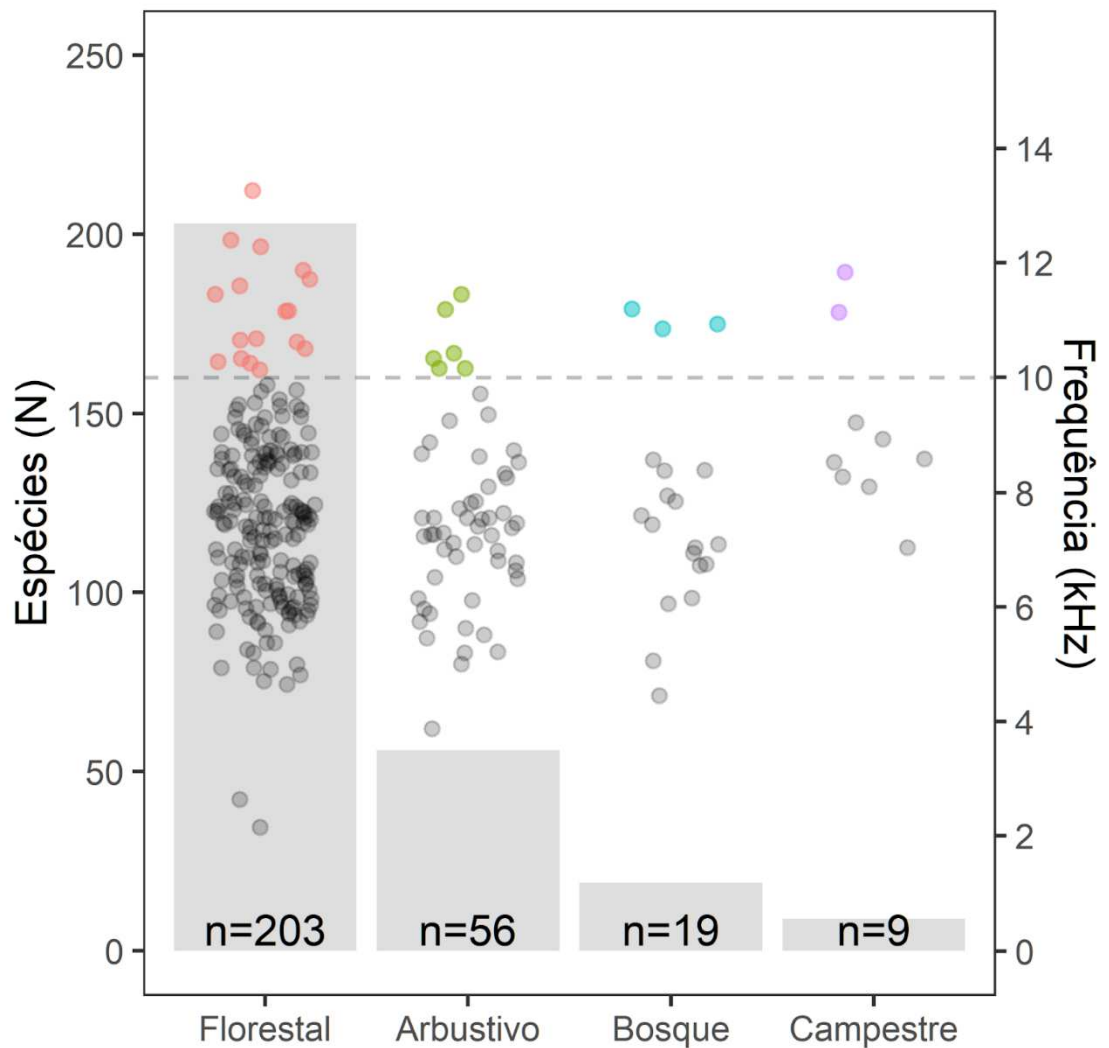


Figura 1. Abundância de espécies de beija-flores por hábitat (barras) e distribuição das frequências pico das vocalizações das espécies (pontos coloridos: altas frequências, i.e., frequência pico >10kHz). Hábitats *sensu* Tobias et al. (2022) e Winkler et al. (2022).

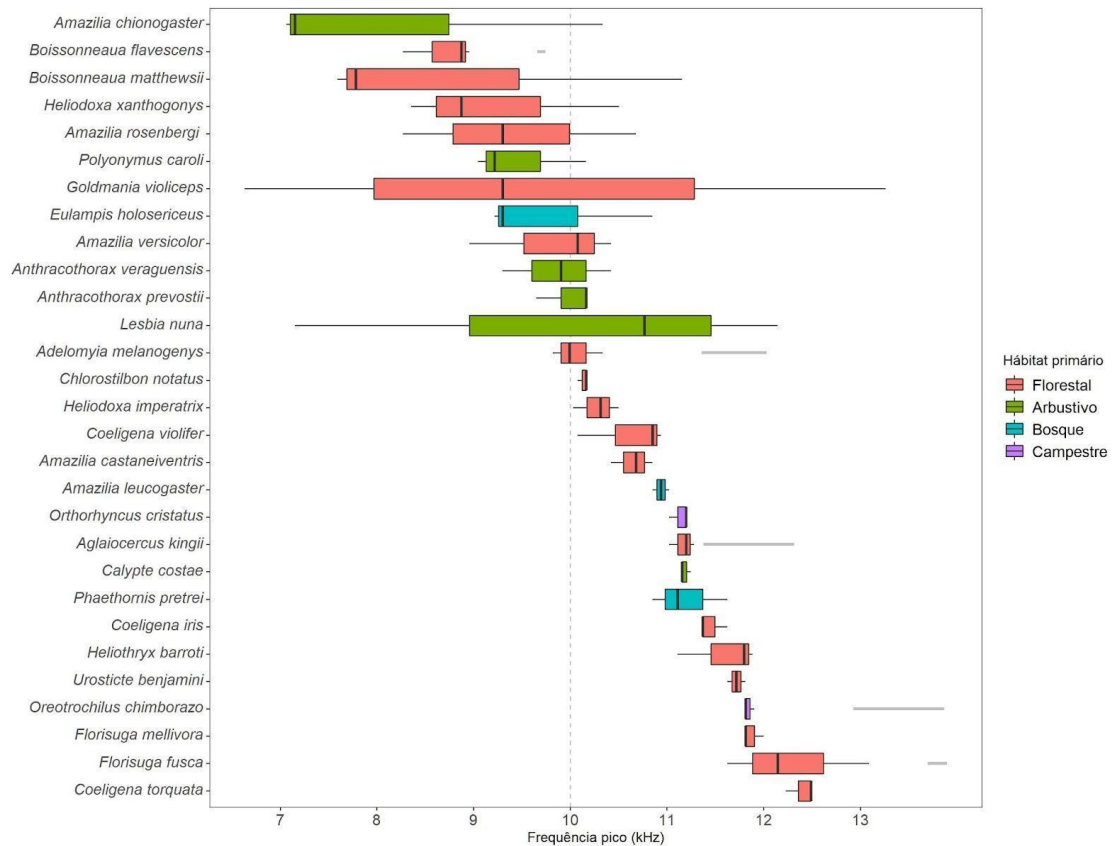


Figura 2. Frequências pico (kHz) de vocalizações ( $n = 3$ ) de 28 espécies de beija-flores para as quais foram registradas vocalizações em alta frequência ( $>10\text{kHz}$ ) no presente estudo. Linhas cinza delimitam a banda média  $\pm$  EP da frequência pico das cinco espécies já registradas na literatura com vocalização de alta frequência, incluindo *Boissonneaua flavescens* (Duque et al. 2018; Olson et al. 2018).

Em relação às análises macroevolutivas, há evidências de sinal filogenético para o tipo de habitat e para a massa média das espécies, o que demonstra que, ao longo da evolução de Trochilidae, a escolha do habitat e o tamanho corporal refletem divergências evolutivas nas espécies (Tabela 1, figura S1). Dentre os parâmetros vocais considerados, apenas a frequência mínima apresentou sinal filogenético (Tabela 1). Holisticamente, as reconstruções de estado

ancestral revelam inexistência de uma correlação qualitativa clara entre o tipo de habitat, e a frequência pico de vocalização em beija-flores (Figura 3A e 3B). De maneira geral, as mudanças observadas nos quatro parâmetros de frequência considerados não se associaram a mudanças nos habitats ocupados pelos beija-flores ao longo da evolução do grupo. A análise de reconstrução do estado ancestral sugeriu que o ancestral comum de Trochilidae provavelmente ocupava habitats florestais e continuou dominando este ambiente ao longo da evolução do grupo (Figura 3A). De acordo com os resultados, a transição para os demais habitats ocorreu, no mínimo, 73 vezes e de forma independente em diferentes grupos ao longo do tempo (figura 3A). As transições mais frequentes foram recuperadas a partir do ambiente florestal para o arbustivo (n=38 vezes), para bosques (n=18) e para campos (n=8). Além disso, as análises sugerem poucos eventos de regressão para o habitat ancestral florestal, como ocorre para as transições oriundas de áreas arbustivas (n=2), de bosques (n=1) e campos (n=1). A reconstrução de estado ancestral com relação à massa corporal também não demonstrou uma relação direta com as frequências de vocalização, indicando que esse fator morfológico foi pouco relevante para a evolução dos parâmetros acústicos do grupo considerados neste estudo. Entretanto, o fato de a massa apresentar sinal filogenético é um indicativo de que ela pode não ter relação com a acústica, mas ainda assim ter relação com a evolução do grupo, possivelmente influenciando outros parâmetros dentro dele.

Tabela 1. Sinal filogenético atribuído aos parâmetros de frequência de vocalização, ao hábitat principal e à massa média das espécies de beija-flores (Trochilidae; n=294 espécies). Hábitats e massa *sensu* Tobias et al. (2022) e Winkler et al. (2022).

Parâmetro	$\lambda$ de Pagel	p-valor
Frequência mínima	0.1035	0.010*
Frequência pico	0.0635	0.113
Frequência máxima	0.0387	0.406
Frequência média	0.0703	0.069
Hábitat	0.3245	0.001*
Massa	0.8961	0.001*

\*p-valor significativo, assumindo  $\alpha=0.05$ .

Em relação ao modo de evolução da frequência da vocalização em beija-flores, a reconstrução de estado ancestral sugere um ancestral comum com uma capacidade de emitir frequências relativamente altas, com frequências pico superiores ao que ocorre na maioria das Aves (Figura 3B). A ocorrência de vocalizações em frequências mais altas se mostrou difusa ao longo da filogenia, apresentando características bioacústicas similares em grupos filogenéticos distantes. Esse padrão sugere que a evolução dos parâmetros de frequência de vocalização em beija-flores considerados neste estudo pode advir de convergência adaptativa (i.e., evolução independente), inclusive entre as espécies cuja vocalização apresenta altas frequências pico (i.e., >10kHz; Figura 3B).

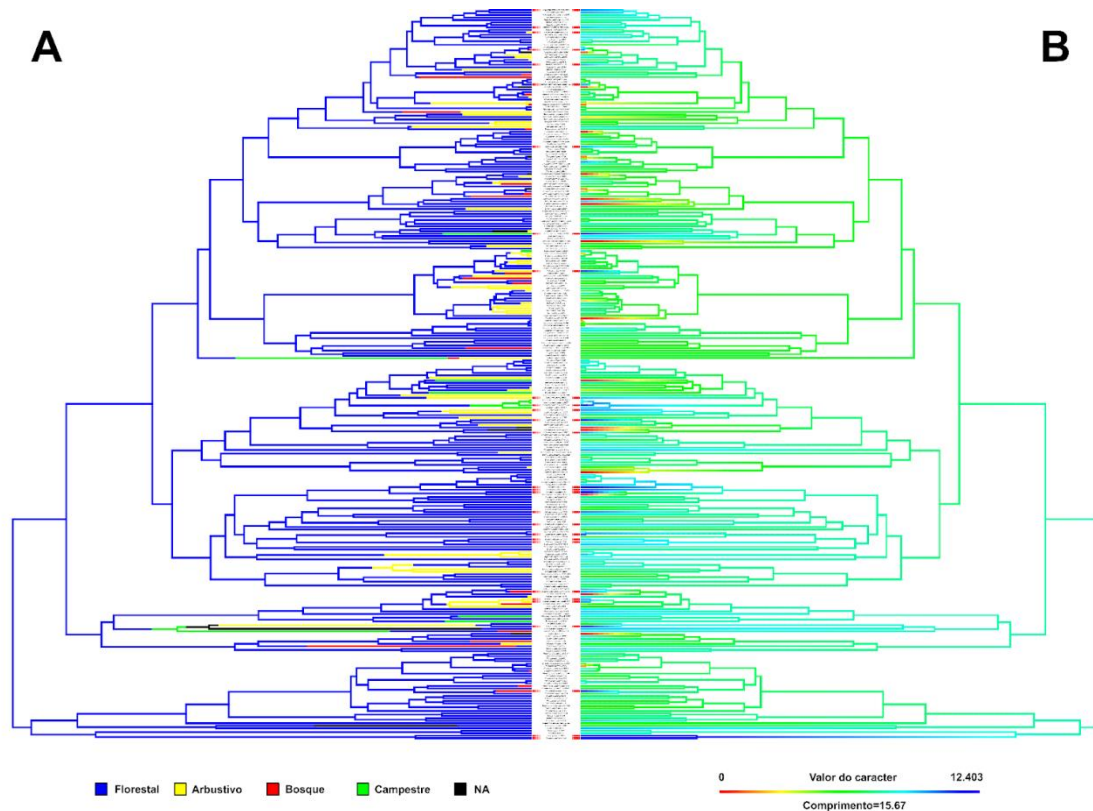


Figura 3. Reconstrução do estado ancestral para a família Trochilidae, com ênfase nas principais transições entre habitats (A) e frequência pico (B). Marcas em vermelho ao lado do nome das espécies na coluna central da figura sinalizam todas as 28 espécies para as quais identificamos vocalização de alta frequência (frequência pico >10kHz), além de *Boissonneaua flavescens* (Duque et al. 2018). (A) As cores dos ramos mostram a maior probabilidade relativa de ocorrência ancestral de cada habitat. (B) As cores nos ramos representam a maior probabilidade relativa de ocorrência ancestral de cada frequência pico.

## Discussão

Estudar aspectos acústicos de uma família de aves com 349 espécies que se distribuem de um trópico ao outro das Américas é um desafio mais facilmente superável quando se tem acesso aos registros de cientistas cidadãos em escala continental. O registro de vocalizações de beija-flores no banco de dados online xeno-canto nos permitiu expandir o conhecimento que se tinha

acerca da capacidade de vocalização em beija-flores, antes limitados a estudos geograficamente restritos. O presente estudo permitiu quase sextuplicar, de cinco para 29, a lista de espécies de beija-flores capazes de vocalizar em altas frequências, ainda que tenhamos assumido um valor de corte arbitrário e conservador para este caráter (frequência pico >10kHz).

Buscando entender alguns motivos que podem ter levado algumas espécies a apresentarem esse tipo de vocalização, relacionamos as 29 espécies com seus respectivos habitats e também com seu tamanho corporal (i.e., massa média da espécie). Segundo a hipótese de adaptação acústica proposta por Morton (1975), espécies de florestas vocalizariam em frequências menores que espécies de ambientes abertos, deste modo conseguindo sobrepor sua comunicação às barreiras físicas impostas pelo ambiente à propagação sonora. Análises taxonomicamente amplas identificaram resposta da frequência pico em Aves em relação ao tipo de ambiente e seu ruído associado (Boncoraglio 2007). Contudo, e em linha com outro estudo focado em Thraupidae (Mason e Burns 2015), nossos resultados refutaram esta hipótese clássica para Trochilidae, demonstrando que as espécies de beija-flores capazes de vocalizar em altas frequências se distribuem de modo proporcionalmente similar entre os diferentes habitats. Nesta mesma linha, as análises de reconstrução de estado ancestral revelaram inexistência de uma clara correlação qualitativa entre o tipo de habitat e a frequência pico de vocalização em beija-flores. Outra hipótese levantada seria uma relação de que os aspectos morfológicos também são fatores que podem influenciar a frequência de vocalização. Nesse contexto, espécies maiores e mais pesadas tenderiam a vocalizar mais grave devido à estrutura do seu aparelho vocal, conseqüentemente apresentando frequências mais baixas (Demery et al., 2021). Entretanto, tal hipótese não foi confirmada em nosso estudo. Espécies do gênero *Florisuga*, por exemplo, são espécies de beija-flor particularmente grandes quando comparadas à outras, tendo a característica de serem animais dominantes e bastante territorialistas

(Observação pessoal), sendo aqui mencionadas como duas das espécies com as maiores frequências pico de vocalização em Trochilidae.

O acentuado incremento promovido pelo nosso estudo no número de espécies capazes de vocalizar em altas frequências evidencia a escassez de estudos de história natural de aves Neotropicais (Xiao et al. 2017). Nesse contexto, destaca-se a importância e potencial das plataformas de ciência cidadã (e.g., xeno-canto, Wikiaves, eBird) para viabilizarem o avanço dessa e de outras áreas da ciência, uma vez que disponibilizam dados que, em situações convencionais, podem ser extremamente desafiadores de serem coletados devido às eventuais limitações geográficas, de infraestrutura, logística e financeira dos pesquisadores (e.g., Jaric et al. 2020; Sugai et al. 2019; Jiménez-Valverde et al. 2019). Entretanto, é evidente que as pesquisas derivadas de dados de ciência cidadã devem respeitar e reconhecer as limitações inerentes a este método de coleta e armazenamento de dados. Estruturar desenhos amostrais adequados para explorar estas plataformas é um grande desafio aos pesquisadores, especialmente pelo grande volume e qualidade variável de certos tipos de dados (Schubert et al. 2019). Para ser possível englobar o máximo de espécies de Trochilidae (~80%) e realizar análises acústica e evolutiva de amplitude taxonômica pioneira para a família, nosso estudo se limitou a três amostras de vocalização com boa qualidade por espécie, ainda que registradas em contextos comportamentais não controlados. Considerando que o contexto deve influenciar o padrão vocal dos indivíduos (Medina e Francis 2012; Smith et al. 2013), é possível que outras espécies de beija-flores além daquelas 28 identificadas em nossos resultados emitam vocalizações em alta frequência. Além disso, nossos dados revelaram frequências pico das vocalizações ligeiramente inferiores às descrições prévias das vocalizações de alta frequência para estas espécies (Figura 2; Duque et al. 2018).

Nossa metodologia foi capaz de replicar frequências pico acima de 10 kHz para quatro das cinco espécies de beija-flores para as quais este comportamento já era conhecido (Duque et

al. 2018; Olson et al. 2018), sendo *B. flavescens* a exceção. Neste caso em particular, Duque et al. (2018) concluem que a espécie vocaliza em alta frequência (média±SE: 9.70±0.04 kHz) sem explicitar um limite inferior para a categorização deste comportamento. Aparentemente, as amostras disponíveis em plataformas de ciência cidadã e aqui analisadas para esta espécie possuem tendência de valores médios de frequência pico ligeiramente inferiores às amostras obtidas por cientistas em campo. Portanto, novas gravações sistematizadas de vocalizações de Trochilidae em campo podem ampliar ainda mais o limite superior da banda de frequência das vocalizações não apenas para esta espécie, mas para outros Trochilidae. Um estudo desta natureza vem sendo conduzido desde 2021 e deve, além de refinar a presente lista de espécies de beija-flores capazes de vocalizar em altas frequências, confirmar a hipótese da influência contextual comportamental na frequência pico da vocalização de beija-flores (Morgado et al. dados não publicados). Por exemplo, Olson et al. (2018) relataram que as vocalizações em altas frequências de *F. fusca* são emitidas principalmente durante o voo e em momentos de interações agonísticas com outros indivíduos. Isso pode sugerir que um dos fatores que apresenta influência na evolução de vocalizações em frequências mais altas seja a necessidade do macho se impor comportamentalmente em relação a outro, além de sinalizar vigor durante exibições para atração de fêmeas (Olson et al. 2018). Assim, tornam-se justificáveis e essenciais futuros estudos neurológicos e experimentos de campo (e.g., Duque et al. 2020) de ampla abrangência taxonômica para confirmar também a capacidade de captação e interpretação dos sinais de alta frequência emitidos pelas espécies de Trochilidae.

Ainda que as espécies viventes de beija-flores se distribuam pelos mais diversos habitats (Winkler et al. 2022), nossos dados demonstram predominância florestal dentre as 287 espécies analisadas (Figura 3A). Entretanto, não detectamos desvio marcado para a ocorrência de espécies que vocalizam em altas frequências em ambientes florestais (~9% do total de espécies florestais vs. ~12% das espécies de ambientes abertos). Deste modo, o tipo de habitat (i.e.,



aberto vs. fechado) não influencia na seleção de vocalizações em alta frequência em beija-flores. Este resultado refuta, para Trochilidae, a hipótese da adaptação acústica (Morton 1975; Rothstein e Fleischer 1987), isto é, das vocalizações em alta frequência resultarem de seleção sobre as espécies mediada pelo ambiente, seja como resultado evolutivo associado a menores atenuações por barreiras físicas em ambientes abertos (Wiley e Richards 1982; Ey e Fischer 2009; Padgham 2004) ou à minimização da sobreposição acústica com ruídos abióticos (e.g., vento; Brumm e Slabbekoorn 2005) e minimização da competição acústica (e.g., com outras aves e insetos; Lohr et al. 2003; Luther e Gentry 2013), em linha com as cautelas levantadas por Duque et al. (2018). Resultado semelhante foi observado para Passeriformes por Mikula et al. (2021), em estratégia amostral semelhante à do presente estudo. Novamente, como os contextos em que as vocalizações gravadas foram emitidas geralmente não constam nas bases de dados de ciência cidadã, reforçamos aqui a necessidade de aprimoramento destas plataformas para solicitar aos colaboradores a contextualização comportamental dos emissores das vocalizações amostradas (Mikula et al. 2021).

Nosso estudo é pioneiro em inferir um cenário macroevolutivo bioacústico para Trochilidae suportado na hipótese evolutiva com mais extensa representatividade taxonômica da família (McGuire et al. 2014). Até o momento, os estudos evolutivos envolvendo a família Trochilidae enfocaram na plumagem (e.g., Eliason et al. 2020), na evolução de comunidades (e.g., Roy et al. 1998) e de espécies (e.g., Rodríguez-Gómez et al. 2021; Hernández-Baños 2020). No contexto bioacústico, os estudos evolutivos são numerosos e de espectros teóricos amplos, propondo compreender desde a capacidade de produção, à percepção e à seleção sexual de sinais vocais em invertebrados (e.g., Orthoptera: Nattier et al. 2011) e vertebrados (e.g., anfíbios: Bezerra et al. 2021; peixes: Parmentier et al. 2022), incluindo as aves (e.g., Podos et al. 2022). Ainda que paralelo ao estudo de Mason & Burns (2015) para Thraupidae, este estudo é inédito em utilizar análises macroevolutivas para inferir um cenário completo para o modo de

evolução acústica em Trochilidae e os fatores ambientais e morfológicos a que ela pode estar relacionada. Adicionalmente, detectamos espécies que não foram contempladas na árvore filogenética de McGuire et al. (2014) para as quais há dados acústicos disponíveis online. Assim, é importante que sejam feitos novos depósitos de sequências moleculares para atualizar a filogenia do grupo e o consequente maior refinamento dos resultados do presente estudo.

A análise de sinal filogenético mostrou que o tipo de hábitat é um fator importante na história evolutiva do grupo, com uma marcada divergência evolutiva a partir de um ancestral florestal para colonizar outros ambientes (i.e., arbustivo, bosques e campos), com raros eventos de regressão para o hábitat ancestral. Visto que os tipos de hábitats refletem divergência evolutiva em Trochilidae, é possível ainda que estudos futuros possam prever hábitats de espécies filogeneticamente próximas que ainda não foram caracterizadas ou coletadas. Da mesma forma, o tamanho corporal de cada espécie também é um fator que norteou a história evolutiva em beija-flores, apesar de, no presente estudo, não parecer estar diretamente relacionado à forma como vocalizam esses animais (figura S1). No entanto, só com uma filogenia completa e dados em bancos de dados acústicos e de biodiversidade mais robustos, poderemos validar tais informações. Já a frequência pico de vocalização não mostrou sinal filogenético, o que pode indicar uma convergência adaptativa em que as emissões em altas frequências podem, por exemplo, ter evoluído de forma independente, levando os beija-flores a se adequarem às diferentes condições ecológicas encontradas ao longo da evolução da sua distribuição espacial. Nesse sentido, reforçamos novamente a relevância do contexto comportamental (e.g., defesa territorial e seleção sexual) como norteador do surgimento e seleção de altas frequências em Trochilidae.

O presente estudo revelou que as frequências das vocalizações dos beija-flores que destoam do que se conhece para Aves em geral inclui muito mais espécies do que se havia observado e descrito anteriormente. Nossos dados expandiram de cinco para 29 o número de

espécies descritas capazes de apresentar vocalizações com altas frequências (i.e., frequência pico > 10 kHz). Considerando as eventuais limitações da metodologia para a coleta e análises de dados a partir de plataformas de ciência cidadã, reforçamos que esse número pode ser ainda maior. Além disso, nossas análises evolutivas refutaram uma relação entre o tipo de hábitat e as altas frequências pico de vocalização, assim como entre a frequência e o tamanho corporal das espécies. Assim, nossos dados indicam que a evolução deste comportamento vocal em beija-flores está mais relacionada a fatores comportamentais do que ambientais e morfológicos. Análises preliminares de dados coletados em campo com *Phaethornis pretrei* sugerem suporte para a relação entre a frequência da vocalização com fatores de disputa territorial e seleção sexual (Morgado et al., dados não publicados). Exploramos aqui uma temática da acústica em beija-flores em uma escala taxonômica pioneira e viabilizada pela ciência cidadã. Ainda que o uso destes dados esteja sujeito a limitações, seu valor à história natural e evolução da vocalização em Trochilidae ficam evidentes em nossos resultados e abrem portas para estudos futuros mais refinados em Aves como um todo.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem ao PPG em Biodiversidade e Conservação da Natureza pela estrutura fornecida para o desenvolvimento deste estudo. Agradecemos também à Jimmy A. McGuire por ceder os arquivos de alinhamento e árvore filogenética para a realização das análises macroevolutivas. Por fim, à CAPES pela bolsa de mestrado concedida a LNM.

## Referências

- Araújo CB, Jardim M, Saturnino NSF, Rosa GM, Lima MR, Anjos L. 2020. The optimal listening period for an effective assessment of bird richness and composition: a case study of neotropical forest. *Journal of Ornithology*. 162:303-306.
- Bezerra AM, Carvalho-e-Silva SP, Gonzaga LP. 2021. Evolution of acoustic signals in Neotropical leaf frogs. *Animal Behaviour*. 181:41-49.
- Bischi B, Lang M, Bossek J, Horn D, Richter J, Surmann D. 2022. BBmisc: miscellaneous helper functions for b. Bischi. R package version 1.12. <https://CRAN.R-project.org/package=BBmisc>
- Boncoraglio G, Saino N. 2007. Habitat structure and the evolution of bird song: a meta-analysis of the evidence for the acoustic adaptation hypothesis. *Functional Ecology*. 21:1–10.
- Brumm H. 2013. *Animal communication and noise*. Springer Science & Business Media.
- Brumm H, Naguib M. 2009. Environmental acoustics and the evolution of bird song. In: Naguib M, Janik VM, Zuberbühler K, Clayton NS, eds. *Advances in the study of behaviour*, Amsterdam: Elsevier. 1–33.
- Brumm H, Slabbekoorn H. 2005. Acoustic communication in noise. *Advances in the Study of Behavior*. 151–209.
- Brumm H, Zollinger SA. 2011. The evolution of the Lombard effect: 100 years of psychoacoustic research. *Behaviour*. 148:1173-1198.
- Demery AJC, Burns KJ, Mason NA. 2021. Bill size, bill shape, and body size constrain bird song evolution on a macroevolutionary scale. *Ornithology*. 138:1-11.

- Dooling RJ, Lohr B, Dent ML. 2000. Hearing in birds and reptiles. In: Comparative hearing: birds and reptiles. 308-359. Springer.
- Dooling R. 2004. Audition: can birds hear everything they sing. In Nature's Music. The Science of Birdsong., H. Slabbekoorn and P. R. Marler, eds. (San Diego: Elsevier Academic Press). 206–225.
- Duque FG, Rodríguez-Saltos CA, Wilczynski W. 2018. High-frequency vocalizations in andean hummingbirds. *Current Biology*. 28: R927-R928.
- Duque FG, Rodriguez-Saltos CA, Uma S, Nasir I, Monteros MF, Wilczynski W, Carruth LL. 2020. High-frequency hearing in a hummingbird. *Science Advances*. 6: eabb9393.
- Duque F, Rodriguez-Saltos C, Monteros M, Wilczynski W. 2021. Transmission of high-frequency vocalizations from hummingbirds living in diverse habitats. *Biological Journal of the Linnean Society*. 132:148-160.
- Eliason CM, Maia R, Parra JL, Shawkey MD. 2020. Signal evolution and morphological complexity in hummingbirds (Aves: Trochilidae). *Evolution*. 74(2):447-458.
- Ey E, Fischer J. 2009. The “acoustic adaptation hypothesis”- A review of the evidence from birds, anurans and mammals. *Bioacoustics*. 19(1-2):21–48.
- Galili T. 2015. Dendextend: an R package for visualizing, adjusting, and comparing trees of hierarchical clustering. *Bioinformatics*.
- Grant BR, Grant PR. 2010. Songs of Darwin's finches diverge when a new species enters the community. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107:20156–20163.
- Hackathon R, Bolker B, Butler M, Cowan P, De Vienne D, Eddelbuettel D, Holder M, Jombart T, Kembel S, Michonneau F, et al. 2020. Phylobase: base package for phylogenetic

structures and comparative data. R package version 0.8.10. <https://CRAN.R-project.org/package=phylobase>

Hernández-Baños BE, Zamudio-Beltrán LE, Milá B. 2020. Phylogenetic relationships and systematics of a subclade of Mesoamerican emerald hummingbirds (Aves: Trochilidae: Trochilini). *Zootaxa*. 4748(3):581-591.

Hill AP, Prince P, Snaddon JL, Doncaster CP, Rogers A. 2019. AudioMoth: a low-cost acoustic device for monitoring biodiversity and the environment. *HardwareX*, 10: e00073.

Jaric I, Correia RA, Brook BW, Buettel JC, Courchamp F, Di Minin E, Firth JA, Gaston KJ, Jepson P, Kalinkat G, et al. 2020. iEcology: harnessing large online resources to generate ecological insights. *Trends Ecol Evol*. 35(7):630-639.

Jiménez-Valverde A, Peña-Aguilera P, Barve V, Burguillo-Madrid L, Leather S, Stewart A. 2019. Photo-sharing platforms key for characterising niche and distribution in poorly studied taxa. *Insect Conservation and Diversity*. 12(5):389-403.

Kacelnik A, Krebs JR. 1983. The dawn chorus in the great tit (*Parus major*): proximate and ultimate causes. *Behaviour*. 83(3):287–308.

Keck F, Rimet F, Bouchez A, Franc A. 2016. Phylosignal: an R package to measure, test, and explore the phylogenetic signal. *Ecology and Evolution*. 6(9):2774-2780.

Krause BL. 1993. The niche hypothesis: a virtual symphony of animal sounds, the origins of musical expression and the health of habitats. *The Soundscape Newsletter*. 6:6-10.

Ligges U, Krey S, Mermann O, Schnackenberg S. 2018. TuneR: analysis of music and speech. URL: <https://CRAN.R-project.org/package=tuneR>

- Lohr B, Wright TF, Dooling RJ. 2003. Detection and discrimination of natural calls in masking noise by birds: estimating the active space of a signal. *Animal Behaviour*. 65(4):763–777.
- Luther D, Gentry K. 2013. Sources of background noise and their influence on vertebrate acoustic communication. *Behaviour*. 150:1045-1068.
- Mace R. 1987. The dawn chorus in the great tit *Parus major* is directly related to female fertility. *Nature*. 330(6150):745–746.
- Mason NA, Burns KJ. 2015. The effect of habitat and body size on the evolution of vocal displays in Thraupidae (tanagers), the largest family of songbirds. *Biological Journal of the Linnean Society*. 114(3):538-551.
- Medina I, Francis CD. 2012. Environmental variability and acoustic signals: a multi-level approach in songbirds. *Biology Letters*. 8(6):928–931.
- Mikula P, Valcu M, Brumm H, Bulla M, Forstmeier W, Petrusková T, Albrecht T. 2020. A global analysis of song frequency in passerines provides no support for the acoustic adaptation hypothesis but suggests a role for sexual selection. *Ecology Letters*.
- Mcguire JA, Witt CC, Remsen JV Jr, Corl A, Rabosky DL, Altshuler DL, Dudley R. 2014. Molecular phylogenetics and the diversification of hummingbirds. *Current Biology*. 24:910-6.
- Morton ES. 1975. Ecological sources of selection on avian sounds. *The American Naturalist*. 109(965):17-34.
- Nattier R, Robillard T, Amedegnato C, Couloux A, Cruaud C, Desutter-Grandcolas L. 2011. Evolution of acoustic communication in the Gomphocerinae (Orthoptera: Caelifera: Acrididae). *Zoologica Scripta*. 40(5):479-497.

- Nudds TD. 1977. Quantifying the vegetative structure of wildlife cover. *Wildlife Society Bulletin*. 5:113-117.
- Olson CR, Fernández-Vargas M, Portfors CV, Mello CV. 2018. Black Jacobin hummingbirds vocalize above the known hearing range of birds. *Current Biology*. 28: R204-R205.
- Padgham M. 2004. Reverberation and frequency attenuation in forests- implications for acoustic communication in animals. *The Journal of the Acoustical Society of America*. 115(1):402–410.
- Paradis E, Claude J, Strimmer K. 2004. APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics*. 20(2):289–290.
- Parmentier E, Scalbert R, Raick X, Gache C, Frédérick B, Bertucci F, Lecchini D. 2022. First use of acoustic calls to distinguish cryptic members of a fish species complex. *Zoological Journal of the Linnean Society*. 195(3):964-975.
- Podos J, Cohn-Haft M. 2019. Extremely loud mating songs at close range in white bellbirds. *Current Biology*. 29: R1068-R1069.
- Podos J, Webster MS. 2022. Ecology and evolution of bird sounds. *Current Biology*. 32(20):R1100-R1104.
- Prum RO, Berv JS, Dornburg A, Field DJ, Townsend JP, Lemmon EM, Lemmon AR. 2015. A comprehensive phylogeny of birds (Aves) using targeted next-generation DNA sequencing. *Nature*. 526: 569-577.
- R Core Team. 2020. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Riede T, Olson CR. 2020. The vocal organ of hummingbirds shows convergence with songbirds. *Scientific Reports*. 10:2007.



- Rodríguez-Gómez F, Licona-Vera Y, Ornela JF. 2021. Phylogeography, morphology and ecological niche modelling to explore the evolutionary history of azure-crowned hummingbird (*Amazilia cyanocephala*, Trochilidae) in Mesoamerica. *Journal of Ornithology*. 162(2):529-547.
- Rothstein SI, Fleischer RC. 1987. Vocal dialects and their possible relation to honest status signalling in the brown-headed cowbird. *The Condor*. 89(1):1.
- Roy MS, Torres-Mura JC, Hertel F. 1998. Evolution and history of hummingbirds (Aves: Trochilidae) from the Juan Fernandez islands, Chile. *Ibis*. 140(2):265-273.
- Schubert SC, Manica LT, Guaraldo ADC. 2019. Revealing the potential of a huge citizen-science platform to study bird migration. *Emu-Austral Ornithology*. 119(4):364-373.
- Slater PJB. 2003. Fifty years of bird song research: a case study in animal behaviour. *Animal Behaviour*. 63:633–639.
- Smith TB, Harrigan RJ, Kirschel ANG, Buermann W, Saatchi S, Blumstein DT, Slabbekoorn H. 2013. Predicting bird song from space. *Evolutionary Applications*. 6(6):865–874.
- Sueur J, Aubin T, Simonis C. 2008. Seewave: a free modular tool for sound analysis and synthesis. *Bioacoustics*. 18:213-226.
- Sugai LSM, Silva TSF, Ribeiro Jr JW, Llusia D. 2019. Terrestrial passive acoustic monitoring: review and perspectives. *BioScience*. 69(1):15-25.
- Tobias JA, Sheard C, Pigot AL, Devenish AJ, Yang J, Sayol F, Neate-Clegg MH, Alioravainen N, Weeks TL, Barber RA. 2022. AVONET: morphological, ecological and geographical data for all birds. *Ecology Letters*. 25(3):581-597.
- Urbanek S. 2020. Audio: audio interface for R. R package version 0.1-7. <https://CRAN.R-project.org/package=audio>

- Walters MJ, Guralnick RP, Kleist NJ, Robinson SK. 2019. Urban background noise affects breeding song frequency and syllable-type composition in the Northern Mockingbird. *The Condor*. 121:1–13.
- Weir JT, Wheatcroft DJ, Price TD. 2012. The role of ecological constraint in driving the evolution of avian song frequency across a latitudinal gradient. *Evolution*. 66:2773–2783.
- Wiley RH, Richards DG. 1982. Adaptations for acoustic communication in birds: sound transmission and signal detection. *Acoustic Communication in Birds*. 131–181.
- Winkler DW, Billerman SM, Lovette IJ. 2020. Hummingbirds (Trochilidae), version 1.0. In *Birds of the World* (S. M. Billerman, B. K. Keeney, P. G. Rodewald, and T. S. Schulenberg, Editors). Cornell Lab of Ornithology, Ithaca, NY, USA.
- Xiao H, Hu Y, Lang Z, Fang B, Guo W, Zhang Q, Pan X, Lu X. 2017. How much do we know about the breeding biology of bird species in the world? *Journal of Avian Biology*. 48(4):513-518.

## Material suplementar

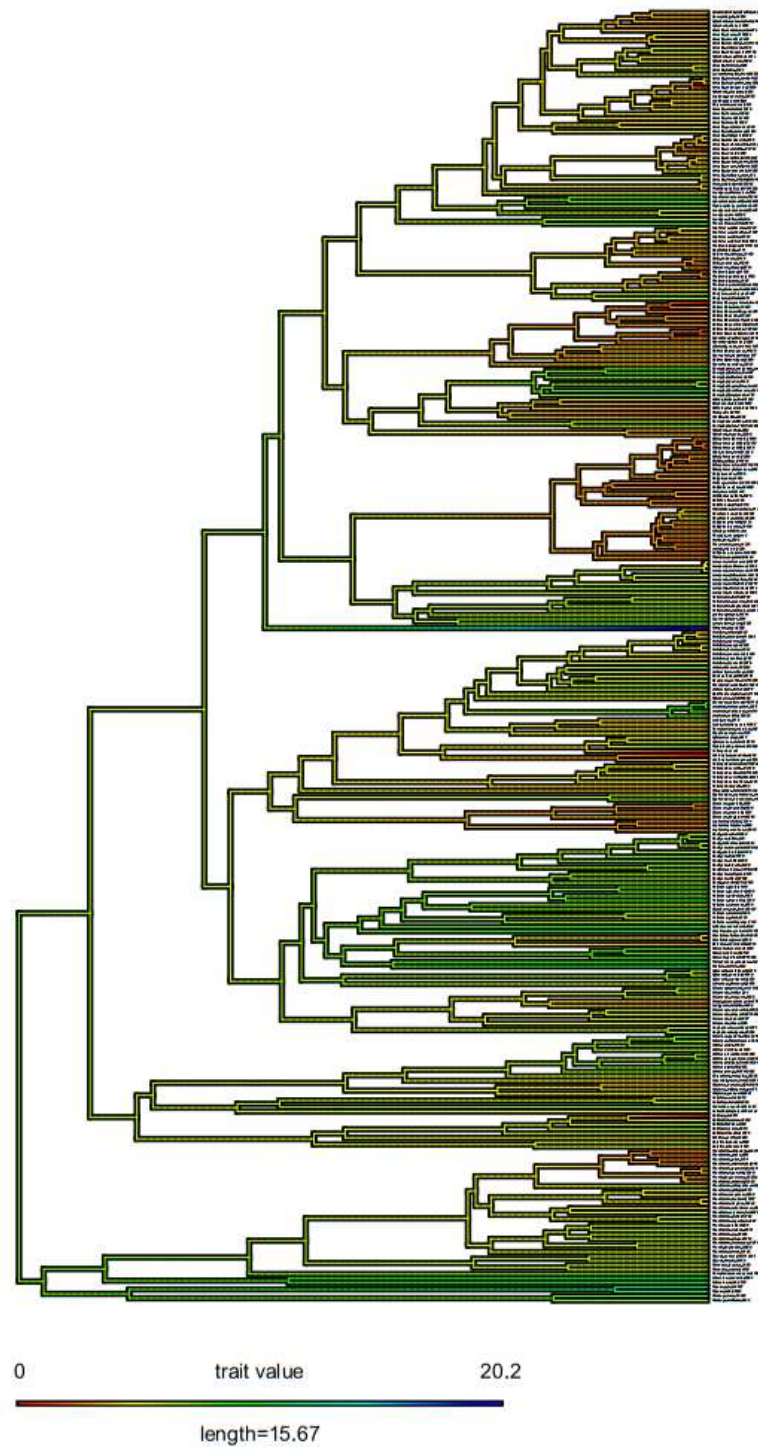


Figura S1. Reconstrução do estado ancestral para a família Trochilidae mostrando a massa média (g) por espécie ao longo do período evolutivo, sendo a coloração em vermelho um indicativo de espécies mais leves e a coloração azulada as espécies mais pesadas.

### **3 Considerações finais**

#### **3.1 Avanços**

Ao explorar os dados de ciência cidadã, estratégia que vem ganhando cada vez mais relevância e confiabilidade, fomos capazes de explorar as vocalizações dos beija-flores de uma forma inédita para a família, abrangendo mais de 80% das espécies. Aliado às análises evolutivas, este é um estudo macroevolutivo com amplitude taxonômica e escopo pioneiros para inferir o cenário mais completo possível para a evolução da vocalização em altas frequências em Trochilidae e os eventuais fatores ambientais subjacentes. Explorando as gravações de diversas espécies de troquilídeos disponíveis nos bancos de dados online, descobrimos que as vocalizações em altas frequências em beija-flores são ainda mais comuns do que se tinha conhecimento anteriormente, expandindo de cinco para 29 o número de espécies descritas com essa habilidade. Além disso, descobrimos também que a evolução deste comportamento vocal em beija-flores não sofreu influência da estrutura do ambiente, estimulando testes futuros da hipótese de relevância de fatores comportamentais (e.g., competição intra- e interespecífica) nesse comportamento.

#### **3.2 Limitações**

Apesar dos avanços, nosso estudo enfrentou certas limitações que, agora identificadas, podem orientar estudos futuros que visem explorar mais profundamente os resultados que encontramos. O exemplo mais evidente é a limitação da própria base explorada de dados de ciência cidadã, que, apesar da crescente relevância dentro do meio científico, ainda carece de melhorias para fornecer dados de melhor qualidade para estudos refinados de bioacústica em ampla escala taxonômica. Conseguimos obter na base de dados utilizada (i.e., Xeno-canto), vocalizações para mais de 80% das espécies da família Trochilidae. Todavia, o cenário ideal seria de fato obter a vocalização de todas as espécies da família ou o mais próximo possível desse quantitativo. Além disso, muitas das espécies contempladas na base de dados possuíam poucas gravações disponíveis ou de baixa qualidade. Nesta estratégia amostral, os dados analisados são extraídos de gravações produzidas por pessoas diferentes, utilizando

equipamentos e principalmente configurações diferentes. Padronizar estes parâmetros na plataforma seria de grande relevância para ampliar as possibilidades e rigor analíticos dos dados ali disponibilizados. Outro fator é a falta de experiência de muitos dos autores dessas gravações, já que cientistas cidadão não são necessariamente cientistas de formação. Com isso, erros ou incertezas na identificação das espécies podem comprometer a qualidade e/ou o tamanho amostral dos estudos derivados destes dados. Por fim, nosso estudo sugere que o contexto em que as vocalizações ocorrem são importantes para a estrutura acústica dos sons emitidos, sendo, portanto, relevante que a plataforma estimule que seus usuários informem corretamente não apenas o tipo de vocalização registrado (i.e., canto, chamado), como as condições ambientais (i.e., clima, ruído) e o contexto comportamental dos animais no momento da gravação.

Restrições para uma análise integral da família também foram notados do ponto de vista evolutivo. Algumas espécies que não foram contempladas na árvore filogenética de McGuire et al. (2014) possuem bons registros de vocalização, os quais tiveram que ser descartados nas nossas análises evolutivas. Muitas dessas espécies são muito raras, com uma distribuição geográfica muito limitada, como em algumas ilhas do Caribe, ou então estão ameaçadas de extinção. É compreensível que dados genéticos sejam de mais difícil obtenção para estes casos, mas esforços podem ser direcionados no futuro para preencher estas lacunas e permitir análises bioacústicas evolutivas mais refinadas e abrangentes para a família.

### **3.3 Futuro**

Os resultados desse estudo abrem caminho para se aprofundar ainda mais os estudos acerca da vocalização dos beija-flores, não só com relação às altas frequências, mas também a todos os aspectos da comunicação entre esses animais (chamados de alerta, vocalizações territoriais, agonísticas e durante o forrageio). Porém, também é necessário que haja maiores investimentos na quantidade e qualidade dos dados fornecidos para os bancos de dados de ciência cidadã. Além disso, é importante que sejam feitos novos depósitos de sequências moleculares para atualizar a filogenia do grupo e o consequente refinamento dos resultados que encontramos nesse estudo.

Ao contrário das predições iniciais deste estudo, o habitat não foi o fator norteador da evolução de vocalização em alta frequência pelos beija-flores, sugerindo que questões

comportamentais possam ser mais relevantes nesse sentido. Por isso é importante que sejam feitos estudos em campo com múltiplas espécies, explorando a influência do contexto comportamental sobre a frequência das vocalizações emitidas pelos indivíduos. Levantamentos e análises preliminares realizadas ao longo do período da execução desse estudo, indicam, por exemplo, que em *Phaethornis pretrei* há suporte para a relação entre a frequência da vocalização com fatores de disputa territorial e seleção sexual (Morgado et al., dados não publicados). Esses dados estão atualmente em análise e em breve devem expandir nossa compreensão da influência do contexto comportamental sobre os parâmetros acústicos das vocalizações em beija-flores.

#### 4 Referências

- AMORIM, P.S.; DIAS, R.I. (2019). "Non-vocal communication as an anti-predator strategy in Scaled Doves (*Columbina squammata*). *Journal of Ethology* 37(2): 157-165.
- BARBER, J.R.; PLOTKIN, D.; RUBIN, J.J.; HOMZIAK, N.T.; LEAVELL, B.C.; HOULIHAN, P.; MINER, K.A.; et al. (2022). Anti-Bat Ultrasound Production in Moths is Globally and Phylogenetically Widespread. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 119(25): e2117485119.
- BENHAM, P. M.; WITT, C. C. (2016). The dual role of Andean topography in primary divergence: functional and neutral variation among populations of the hummingbird, *Metallura tyrianthina*. *BMC Evolutionary Biology*, 16(1):1-16.
- BLEIWEISS, R. (1998). Origin of hummingbird faunas. *Biological Journal of the Linnean Society*, 65: 77-97.
- BOUWMEESTER, H. J.; ROUX, C.; LOPEZ-RAEZ, J. A. BÉCARD, G. (2007). Rhizosphere communication of plants, parasitic plants and AM fungi. *TRENDS in Plant Science*. 12(5): 224-230.
- CARLSON, B. A.; HOPKINS, C. D. (2004). Stereotyped temporal patterns in electrical communication. *Animal Behaviour*, 68(4), 867-878.
- CARO, T.; RUXTON, G. (2019). Aposematism: unpacking the defences. *Trends in Ecology & Evolution*, 34(7): 595-604.
- CLARK, C.J. (2021). Ways that animal wings produce sound. *Integrative and Comparative Biology* 61, 2 (2021): 696-709.
- CHEN, Z.; WIENS, J. J. (2020). The origins of acoustic communication in vertebrates. *Nature Communications*, 11(1):369.
- DAWSON, S. M. (1991). Clicks and Communication: The Behavioural and Social Contexts of Hector's Dolphin Vocalizations. *Ethology*. 88: 265-276.
- BERHARD, M.J.B.; MACHNIS, A.; & UHL, G. (2020). Condition-dependent differences in male vibratory pre-copulatory and copulatory courtship in a nuptial gift-giving spider. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 74(11): 1-12.

- FISCHER, J., WADEWITZ, P., & HAMMERSCHMIDT, K. (2017). Structural variability and communicative complexity in acoustic communication. *Animal Behaviour*, 134: 229-237.
- GARSTANG, M. (2004). Long-distance, low-frequency elephant communication. *Journal of Comparative Physiology A* 190(10): 791-805.
- GÖTMARK, F., POST, P., OLSSON, J., HIMMELMANN, D.; GOTMARK, F. (1997). Natural Selection and Sexual Dimorphism: Sex-Biased Sparrowhawk Predation Favours Crypsis in Female Chaffinches. *Oikos*, 80(3): 540-548.
- GRUSON, H.; ELIAS, M.; PARRA, J. L.; ANDRAUD, C.; BERTHIER, S.; DOUTRELANT, C.; GOMES, D. (2021). Distribution of iridescent colours in hummingbird communities results from the interplay between selection for camouflage and communication. *Peer Community Journal*, 1: e64.
- HILL, G.E.; YASUKAWA, K. (2014). The evolution of ornaments and armaments. *Animal behavior: how and why animals do the things they do*. Pp. 145-172. Praeger.
- HOGAN, B. G.; STODDARD, M. C. (2018). Synchronization of speed, sound and iridescent color in a hummingbird aerial courtship dive. *Nature Communicatios*, 9: 5260.
- HUNTER, T. A. (2008). On the role of wing sounds in hummingbird communication. *The Auk*, 125(3): 532–541.
- JACKSON, D. E.; RATNIEKS, F. L. W. (2006). Communication in ants. *Current Biology*. 16(15):R570-574.
- KESSLER, M.; ABRAHAMCZYK, S.; KRÖMER, T. (2019). The role of hummingbirds in the evolution and diversification of Bromeliaceae: unsupported claims and untested hypotheses. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 192(4): 592-608.
- LENGAGNE, T., JOUVENTIN, P.; AUBIN, T. (1999). Finding One's Mate in a King Penguin Colony: Efficiency of Acoustic Communication. *Behaviour*, 136(7): 833–846.
- MARTIN, G. R. (2022). Avian vision. *In Sturkie's Avian Physiology*. Pp. 139-158. Academic Press.
- MOODY, N.M.; VIVLAMORE, E.K.; FUXJAGER, M.J. (2022). Woodpecker drum evolution: An analysis of covariation in elements of a multicomponent acoustic display among and within species. *Evolution* 76(7): 1469-1480.



- NOWICKI, S.; MARLER, P. (1988). How Do Birds Sing? Music Perception: An Interdisciplinary Journal, 5(4): 391-426.
- O'CONNELL, R. J. (1986). Chemical communication in invertebrates. Pp. 222. The Worcester Foundation for Experimental Biology.
- O'CONNELL-RODWELL, C.E. (2007). Keeping an "ear" to the ground: seismic communication in elephants. Physiology 22(4): 287-294.
- OWENS, I. P. F.; HARTLEY, I. R. (1998). Sexual dimorphism in birds: why are there so many different forms of dimorphism? Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 265(1394): 397-407.
- PARKS, S. E., CUSANO, D. A., STIMPERT, A. K., WEINRICH, M. T., FRIEDLAENDER, A. S.; WILEY, D. N. (2014). Evidence for acoustic communication among bottom foraging humpback whales. Scientific Reports, 4(1): 1-7.
- PROMISLOW, D. E. L.; MONTGOMERIE, R.; MARTIN, T. E. (1992). Mortality Costs of Sexual Dimorphism in Birds. Proceedings: Biological Sciences. 250: (1328): 143-150.
- REIDENBERG, J. S.; LAITMAN, J. T. (2018). Anatomy of Underwater Sound Production With a Focus on Ultrasonic Vocalization in Toothed Whales Including Dolphins and Porpoises. Handbook of Behavioral Neuroscience. Pp. 509–519.
- SUAREZ, R. K.; GASS, C. L. (2002). Hummingbird foraging and the relation between bioenergetics and behaviour. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 133(2): 335–343.
- TIMSIT, Y.; LESCOT, M.; VALIADI, M.; NOT, F. (2021). Bioluminescence and photoreception in unicellular organisms: Light-signalling in a bio-communication perspective. International Journal of Molecular Sciences 22(21): 11311.
- VANDERBILT, C. C. (2019). Understanding Variation in Complex Displays and Mate Choice in a Lekking Species with Cooperative Dual-Male Courtship. Tese de doutorado. The Florida State University. 24p.
- WARRICK, D.; HEDRICK, T.; FERNÁNDEZ, M. J.; TOBALSKE, B.; BIEWENER, A. (2012). Hummingbird flight. Current Biology, 22 (12):R472-477.

WASER, N. M. (1978). Competition for Hummingbird Pollination and Sequential Flowering in Two Colorado Wildflowers. *Ecology*, 59(5): 934-944.

WHITING, M. J.; MILES, D. B. (2019). Behavioral ecology of aggressive behavior in lizards. *Behavior of Lizards*. Pp. 289-319. Taylor & Francis Group.

WILD, J. M. (1997). Functional anatomy of neural pathways contributing to the control of song production in birds. *European Journal of Morphology*, 35(4): 303-325.

YILMAZ, A.; SPAETHE, J. (2022). Colour vision in ants (Formicidae, Hymenoptera). *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 377(1862): 20210291.

**ANEXO I**

*Versão em inglês do manuscrito referente ao capítulo 1,  
formatado e submetido à revista Bioacoustics (Qualis CAPES A1)*

**Occurrence and evolution of high-frequency vocalizations in hummingbirds (Aves:  
Trochilidae)**

Lucas Nascimento Morgado<sup>ac</sup>, Mariana Fonseca Rossi<sup>ab</sup> and André de Camargo Guaraldo<sup>acd\*</sup>

<sup>a</sup>*Programa de Pós Graduação em Biodiversidade e Conservação da Natureza, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brasil;* <sup>b</sup>*Departamento de Zoologia, Laboratório de Protozoologia (LabProto). Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brasil;*

<sup>c</sup>*Departamento de Zoologia, Laboratório de Ecologia Comportamental e Ornitologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil;* <sup>d</sup>*ORCID: 0000-0003-1705-2926*

\*Av. Francisco H. dos Santos, s/n, Depto. Zoologia, 81531-980, Curitiba, Paraná, Brazil, guaraldo@ufpr.br

## **Occurrence and evolution of high-frequency vocalizations in hummingbirds (Aves: Trochilidae)**

The growing number of bioacoustics studies has been unveiling interesting behaviours, such as the ability of hummingbirds (Trochilidae) to vocalize at high frequencies. This is such a recent finding, thus its taxonomic spread, evolutionary origin and maintenance in Trochilidae are still uncertain. Thus, this study asked: 1) How many and which hummingbirds can produce high-frequency vocalizations? 2) Do vocalization frequencies, habitat, and species mass present a phylogenetic signal in Trochilidae? 3) What was the origin and mode of evolution of high-frequency vocalization and the type of habitat associated with high-frequency vocalizations in Trochilidae? 4) Is there a relationship between species morphology and acoustic parameters? We determined the vocalization frequencies of 82% of the species in the family and analysed the phylogenetic signal and performed ancestral state reconstruction for 81% of Trochilidae species. Our study six-folded (five to 29) the number of hummingbird species able to vocalize at high frequencies, concluding that the evolution of vocalization at high frequencies in hummingbirds may relate to behavioural rather than morphological and environmental factors. Our findings may be revisited with the inclusion of molecular sequences in databases for Trochilidae species not yet molecularly characterized, thus expanding the inference to a more robust acoustic macroevolutionary scenario.

**Keywords:** bioacoustics, peak frequency, acoustic adaptation hypothesis, phylogenetic signal, ancestral state reconstruction, phenotypic evolution

## **Introduction**

Quantitative analyses in bioacoustics are relatively new in science and have enabled in-depth studies that allow us to better understand, for example, the complex communication between animal species (Slater 2003). Several animal groups have been studied and new questions have been asked as this area of knowledge and the technologies associated with bioacoustic methods advance. This is exemplified by the recent discovery of the ability of some birds to vocalize at high amplitudes (Podos and Cohn-Haft 2019) and at high frequencies (Olson et al. 2018).

Members of the class Aves are the most noteworthy in relation to sound communication, and their vocalizations are often predominant in the acoustic landscape of terrestrial natural environments, especially in the most biodiverse ones such as tropical forests. Vocalization in birds has important functions in obtaining and delimiting territory, warning against predators, and mate attraction (Brumm 2013). However, these communications occur in a non-exclusive acoustic environment and different factors can impair the quality of the information transmitted by the sender to its receivers. An example of a contested acoustic environment is the morning chorus in birds, in which several species vocalize at the same time early in the day, likely influenced by territorial disputes, female fertility, lower foraging investment due to low light conditions, and even better atmospheric conditions (e.g., higher relative humidity) for sound signal propagation (Kacelnik and Krebs 1983; Mace 1987). In terms of landscape, the efficiency of acoustic communication by birds depends on the ability of species to circumvent the various barriers imposed on sound propagation by their surroundings (Brumm and Naguib 2009). In addition to acoustic competition, each habitat also presents different abiotic noise patterns that can interfere with efficient communication among birds, such as wind, waterfalls, and, more recently in the evolutionary history of birds, anthropogenic noises (Brumm and Naguib 2009;

Walters et al. 2019). Environmental noise interferes with both the perception of the sound signal itself and the understanding of the message that the signal conveys (Wiley and Richards 1982; Wiley 1994, 2006). In noisier contexts, the ‘Lombard Effect’ may emerge, whereby individuals of a given species secure their communication by increasing their vocal amplitude in proportionate response to environmental noise (Brumm and Zollinger 2011). Alternatively, individuals may adjust the frequency band of their vocalization, reducing masking by background noise and/or interspecific acoustic competition (‘acoustic niche hypothesis’; Krause 1993; Lohr et al. 2003; Luther and Gentry 2013).

Bird hearing is generally most efficient at frequencies between 1 and 5 kHz, while their vocal capacity ranges from 0.5 kHz to 6 kHz (Dooling et al. 2000). However, Olson et al. (2018) reported, for the first time for the family Trochilidae, that the black hummingbird (Apodiformes, Trochilidae: *Florisuga fusca*) can produce vocalizations of ~11.8 kHz, thus well above what was known for most birds (Dooling et al. 2000). Subsequently, Duque et al. (2018) also reported vocalizations at similarly high frequencies in four Andean species of this family. One of the species studied was *Oreotrochilus chimborazo*, which is an inhabitant of grassland environments and showed a vocalization with a frequency of ~13.0 kHz, higher than any other ever studied bird species. On the other hand, the other three species in this study - *Boissonneaua flavescens* (F0=9.7 kHz), *Adelomyia melanogenys* (F0=11.7 kHz), and *Agelaiocercus coelestis* (F0=11.9 kHz)-, are inhabitants of cloud forests and vocalize at frequencies lower than sounds produced by insects (12.5-15.0 kHz), but higher than the average frequency emitted by other birds (3.0-9.0 kHz; Duque et al, 2018). Although the literature does not define a threshold beyond which a vocalization can be considered high frequency in birds, this definition is arbitrarily and usually applied when a given vocalization has a fundamental peak frequency that extrapolates the usual average value of species in this class and can be reasonably assumed to be 10kHz for birds. However, the fact that an animal vocalizes at high frequencies does not

necessarily mean that it can hear these sounds. It is common for the vocal organs to produce involuntary sounds at frequencies above the hearing capacity of that animal, so that this sound has no communication function (Brumm 2013). With an experimental approach and neurological analyses, Duque et al. (2020) observed that *O. chimborazo* can hear and react to high frequencies, this being a strong indication of its use in the species' communication. In this context, the authors reinforce the acoustic adaptation hypothesis (Morton 1975) as an alternative to the 'Lombard Effect,' suggesting that hummingbird species able to vocalize at high frequencies do so as a possible evolutionary response to circumvent environmental noise and natural barriers in the habitat (Duque et al. 2018; Duque et al. 2021). More open environments generally have more background noise at lower frequencies (e.g., winds), so it is plausible that vocalizations at high frequencies would be positively selected in birds that primarily live in such habitats (Wiley and Richards 1982; Padgham 2004). However, work with other groups of birds, such as Passerines, indicates that these variations in vocalization frequencies may be related to morphological and behavioural factors rather than to environmental pressures. For example, the body size of an animal can relate to its peak vocalization frequency, with larger individuals generally tending to vocalize at lower frequencies (Demery et al. 2021). In addition, changes in vocalization occur during territorial disputes between individuals or in mating displays, where such changes may be an indication of physical vigour and aggressiveness of the individual (Mikula et al.,2021).

Another plausible hypothesis may be unrelated to any of the factors cited above and states that the frequencies of hummingbird vocalizations may result from evolutionary modifications in the structure of their siring, which characteristics converge to those of songbirds (i.e., Passeriformes) instead of the more closely related Apodiformes, such as swifts (Riede and Olson 2020). However, this topic is too understudied to clearly enlighten how this ability arose in hummingbirds and the evolutionary factors influencing manifestations of this

behavior (Duque et al., 2018; Duque et al., 2020; Duque et al., 2021; Olson et al., 2018). Underlying the hypotheses associated with vocalization at high frequencies by Trochilidae lie uncertainties about how many and which other hummingbird species also exhibit the ability to perform these vocalizations. Only after holistically understanding how this ability emerged and was maintained in this family one will be able to advance on the role of different evolutionary pressures (e.g., environmental factors and acoustic competition) and behavioural responses (Brumm and Zollinger 2011) on this unusual vocal ability in birds. It is noteworthy that the evolutionary complexity of this family goes far beyond its vocalization, and acoustic parameters are only one of the factors that may have guided the evolution of hummingbirds within a variety of habitats and behavior.

The present work sought to further explore the ability of some members of Trochilidae to vocalize at higher frequencies than other birds, testing evolutionary hypotheses associated with this vocal parameter. Specifically, we asked: 1) How many and which hummingbird species are capable of producing vocalizations at high frequencies, i.e., above 10 kHz, thus above the usual upper limit of most birds? 2) Are there phylogenetic signals for vocalizations at high frequencies and the main habitat used by Trochilidae species? 3) Is the origin and the mode of evolution of high-frequency vocalization in Trochilidae related to the mode of evolution of habitat type (i.e., the acoustic adaptation hypothesis)? 4) Is the morphology of Trochilidae species a predictor of their vocal parameters?

## **Methods**

### ***Data collection on species vocalization, habitat, and morphology***

We selected recordings available on the online citizen science database xeno-song ([www.xeno-canto.org](http://www.xeno-canto.org)) to identify, among the Trochilidae (349 species; Winkler et al. 2020) and in addition to those already described by Duque et al. (2018) and Olson et al. (2018), the species able of vocalizing at high frequency. We selected one recording per species available on the platform,



i.e. those classified as high-quality recordings by the platform moderators, with little background noise and high volume, as well as with no overlapping vocalizations of individuals or species, and those whose identity of the emitting species was undoubtful. Among all Trochilidae species recordings on the platform (n=338; 97% of the family total), we analysed recordings for 287 species (82% of the total). In addition, we compiled the primary habitat and mean body mass measurement for each species from Tobias et al. (2022) and, where necessary, from Winkler et al. (2022).

### ***Vocalization data analysis***

We run the descriptive acoustic analyses of the compiled songs and calls using Raven Pro 1.6 software (Cornell Laboratory of Ornithology, Ithaca, NY, USA). For each recording, we selected each of the three notes and saved in a 16-bit wave file. For each note, we extracted the peak frequency (i.e., frequency at which the highest energy of the vocalization was concentrated), the minimum frequency, the maximum frequency, and the average frequency in R environment v. 4.2.1 (R Core Team 2020) using functions from the audio (Urbanek 2020), seewave (Sueur et al. 2008), and tuneR (Ligges et al. 2018) packages. We used peak frequency as the parameter determining the use of high frequency in the vocalization of the analysed species because it is the acoustic parameter that describes the highest energy invested by the bird in vocalization. Through the Power Spectrum of the selected note, it was possible to analyse how the energy of that vocalization was distributed (y-axis) along that soundscape, or frequency landscape (x-axis). We considered 10 kHz as the threshold value for delimiting high frequency emissions, thus a conservative value given that there is no exact definition of what is considered a high frequency vocalization in birds. This value is close to the previously suggested threshold for the higher usual frequency emitted by birds (Dooling 2004) and a value close to the lowest average dominant frequency among the four hummingbird species

previously recorded emitting vocalizations considered to be of high frequency (Duque et al. 2018).

### ***Phylogenetic analysis***

To perform the macroevolutionary analyses, we did a Phylogenetic Inference from the most recent and dated phylogeny, based on the largest sampling for the family that consists of a six molecular markers for 284 hummingbird species (McGuire et al. 2014), thus 81% of the Trochilidae diversity. To run the analysis, we obtained the acoustic parameters of 97% (n=274) of the taxa represented in the phylogenetic hypothesis of McGuire et al. (2014) from the xeno-song data.

### ***Phylogenetic signal***

We run a phylogenetic signal analysis to verify whether the acoustic, habitat, and morphology (i.e., body mass) displayed by the Trochilidae species can reflect the evolutionary history of the group. We considered the Pagel's  $\lambda$  index (Pagel 1999) to calculate the phylogenetic signal, which has been suggested among other indices to be the most satisfactory (Münkemüller et al. 2012). Furthermore, Pagel's  $\lambda$  index allows using missing data, which was adequate to the present dataset. Pagel's  $\lambda$  index uses the maximum likelihood method and can range from zero (no signal) to one (strongest signal; Pagel 1999). This index was calculated using the phylosignal (Keck et al. 2016), phylobase (Hackathon et al. 2013), and ape (Paradis et al. 2004) packages on the R platform from the four frequency measures extracted for each species, its primary habitat type, and its mean body mass value (Tobias et al. 2022).

### ***Ancestral state reconstruction***

We inferred the ancestral state reconstruction to obtain a complete macroevolutionary scenario for the bioacoustic, ecological, and morphological traits mentioned in the previous topic for the Trochilidae. We used the dated tree from McGuire et al. (2014) to reconstruct the ancestral

character states through the Phytools v. 0.6-99 package (Revell 2012). Specifically, we used the function `ace` with discrete data for habitat type and continuous data for the four analysed frequencies (minimum, peak, maximum and mean), as well as for the species' mean mass. The character states used for the habitat type were 'Forest', 'Shrub', 'Woodland', and 'Grassland' and the model used was the 'ER', which assumes the same weight for all possible character state transitions.

## Results

The analysed vocalizations (n=287) were unevenly distributed among habitat types, with more species inhabiting forest (71% of total species) and shrub habitats (20%; Figure 1). The analysis indicated the occurrence of vocalization in high frequencies (i.e., peak frequency >10kHz) in 28 species, not limited to those primarily living in open environments (i.e., field/shrub; Figures 1 and 2). Considering the analysed Trochilidae species (n=287), the proportion of those able to vocalize in high frequencies was similarly distributed between woody (i.e., forest and woodland; ~9%) and shrub and field habitats (~12%), but among this select group of high frequency vocalizers, most were forest and woodland inhabitants (71%; n=20; Figure 1 and 2). In addition to the five species known to vocalize in frequencies above 10 kHz (*F. fusca*, *O. chimborazo*, *B. flavescens*, *A. melanogenys*, and *A. [coelestis] kingii*; Duque et al. 2018), our analyses revealed another 23 species (Figure 1 and 2), therefore totalling 28 species. Among the 28 species for which we recorded high-frequency vocalization, we detected 16 capable of vocalizing in frequencies above 11 kHz, five of them capable of vocalizing even above a peak frequency of 12 kHz (Figure 2).

[figure 1 here]

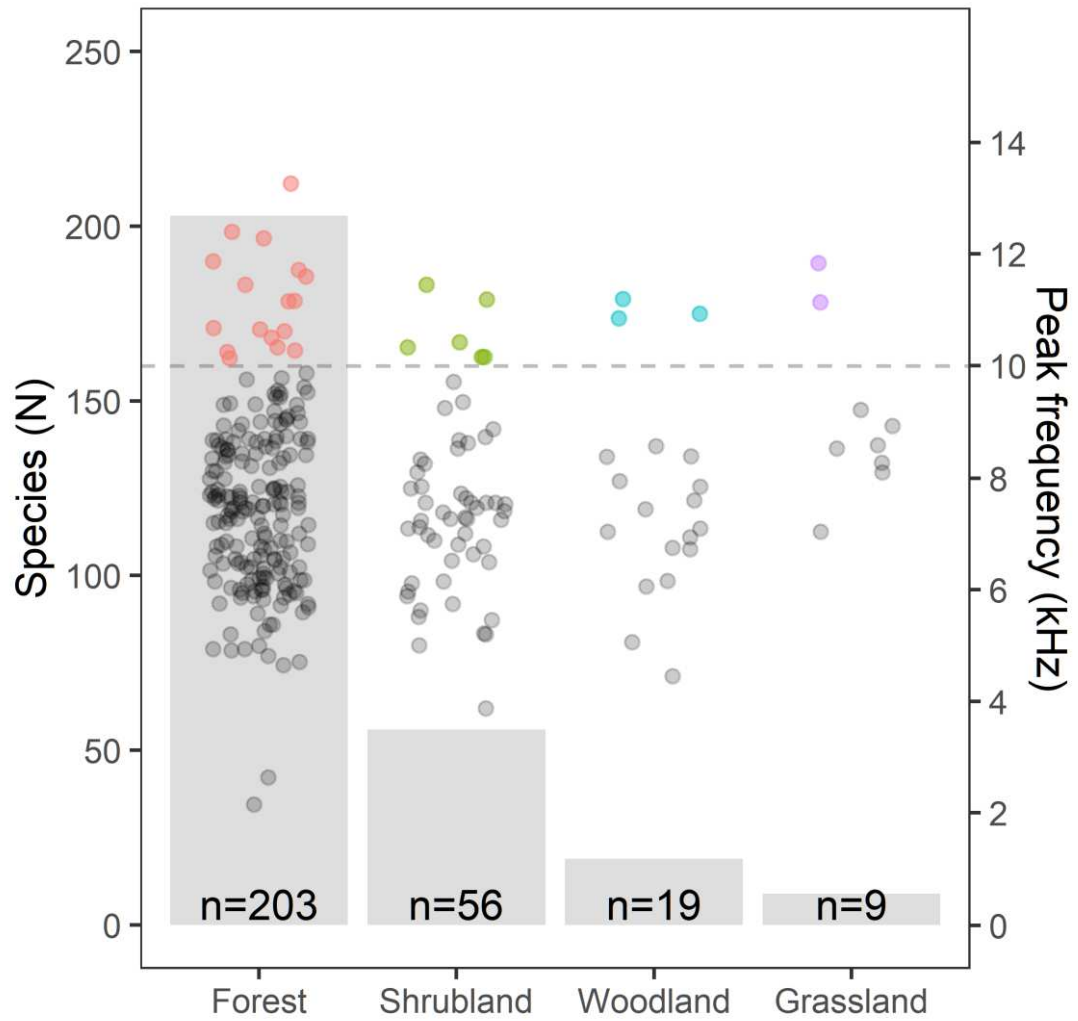


Figure 1. Abundance of hummingbird species by habitat (bars) and distribution of peak frequencies of species' vocalizations (coloured dots: high frequencies, i.e., peak frequency >10kHz). Habitats *sensu* Tobias et al. (2022) and Winkler et al. (2022).

[figure 2 here]

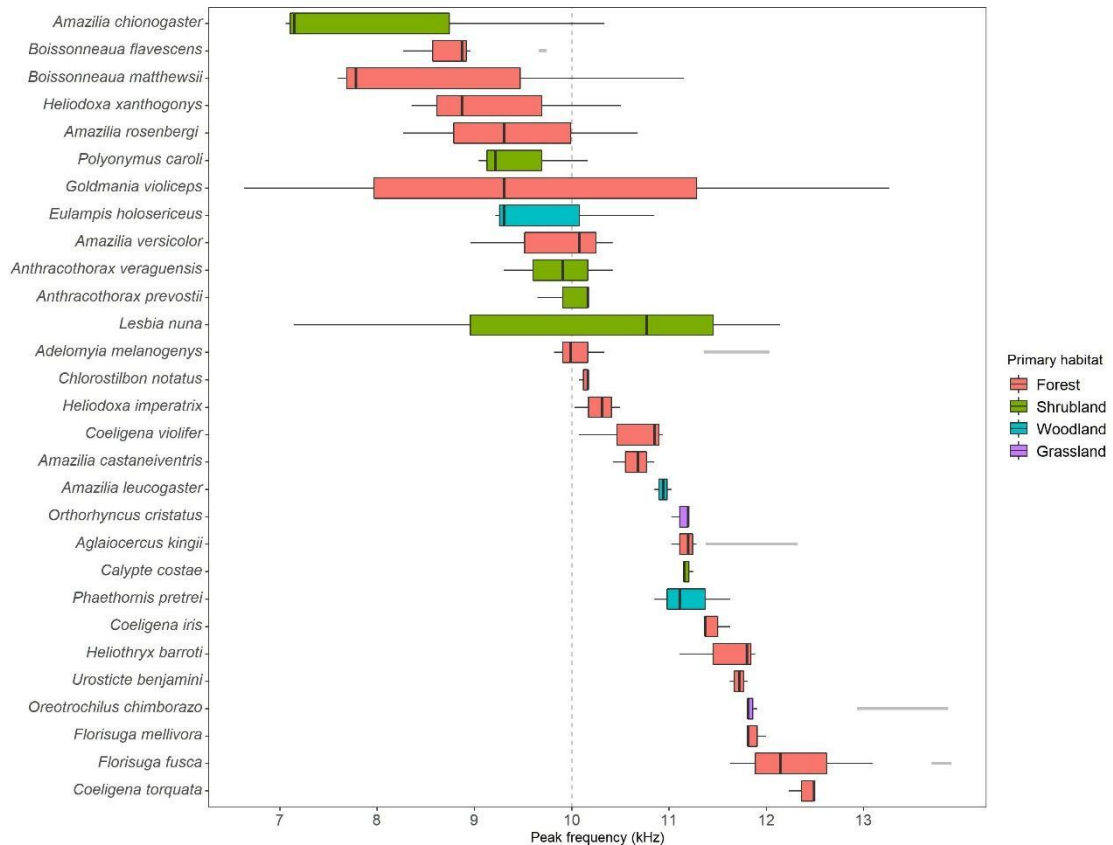


Figure 2. Peak frequencies (kHz) of vocalizations ( $n = 3$ ) of 28 hummingbird species for which high frequency vocalizations ( $>10\text{kHz}$ ) were recorded in the present study. Gray lines signal the mean  $\pm$  SE band of the peak frequency of the five species already recorded in the literature with high frequency vocalization, including *Boissonneaua flavescens* (Duque et al. 2018; Olson et al. 2018).

Regarding the macroevolutionary analyses, we found evidence of phylogenetic signal for habitat type and mean species mass, which demonstrates that, throughout the evolution of Trochilidae, habitat and body size reflect evolutionary divergences (Table 1, figure S1). Among the considered vocal parameters, only the minimum frequency showed phylogenetic signal (Table 1). Holistically, ancestral state reconstructions revealed no clear qualitative correlation between habitat type and peak vocalization frequency in hummingbirds (Figure 3A and 3B). Overall, the observed changes in the four considered frequency parameters were not associated

with changes in the habitats occupied by hummingbirds throughout the group evolution. The ancestral state reconstruction analysis suggested that the Trochilidae common ancestor probably occupied forest habitats and continued to dominate this environment throughout its evolution (Figure 3A). According to the results, the transition to the other habitats occurred independently in different groups and at least 73 times over time (Figure 3A). The most frequent transitions were recovered from the forest to shrub habitats (n=38 times), to woodlands (n=18), and to grasslands (n=8). Furthermore, the analyses suggest few regression events to the ancestral forest habitat, those originating from shrubland (n=2), woodland (n=1), and grassland (n=1). With respect to body mass, the ancestral state reconstruction also showed no direct relationship with vocalization frequencies, indicating that this morphological trait was of little relevance to the evolution of the acoustic parameters of the considered group species in this study. However, the fact that mass showed phylogenetic signal is an indication that it may be unrelated to acoustic parameters, but still related to the evolution of the group, possibly influencing other parameters within it.

[Table 1 here]

Table 1. Phylogenetic signals assigned to vocalization frequency parameters, primary habitat, and mean mass of hummingbird species (Trochilidae; n=294 species). Habitats and mass *sensu* Tobias et al. (2022) and Winkler et al. (2022).

Parameter	Pagel's $\lambda$	p-value
Minimum frequency	0.1035	0.010*
Peak frequency	0.0635	0.113
Maximum frequency	0.0387	0.406
Average frequency	0.0703	0.069
Habitat	0.3245	0.001*

Mass 0.8961 0.001\*

\*Significant p-value, considering  $\alpha=0.05$ .

Regarding the evolution mode of vocalization frequency in hummingbirds, the ancestral state reconstruction suggests a common ancestor capable of emitting relatively high frequencies, with peak frequencies higher than those emitted by most birds (Figure 3B). The vocalizations in higher frequencies were shown to be diffuse throughout the Trochilidae phylogeny, showing similar bioacoustic characteristics in phylogenetically distant groups. This pattern suggests that the evolution of vocalization frequency parameters in the hummingbirds considered in this study may arise from adaptive convergence (i.e., independent evolution; Figure 3B).

[figure 3 here]

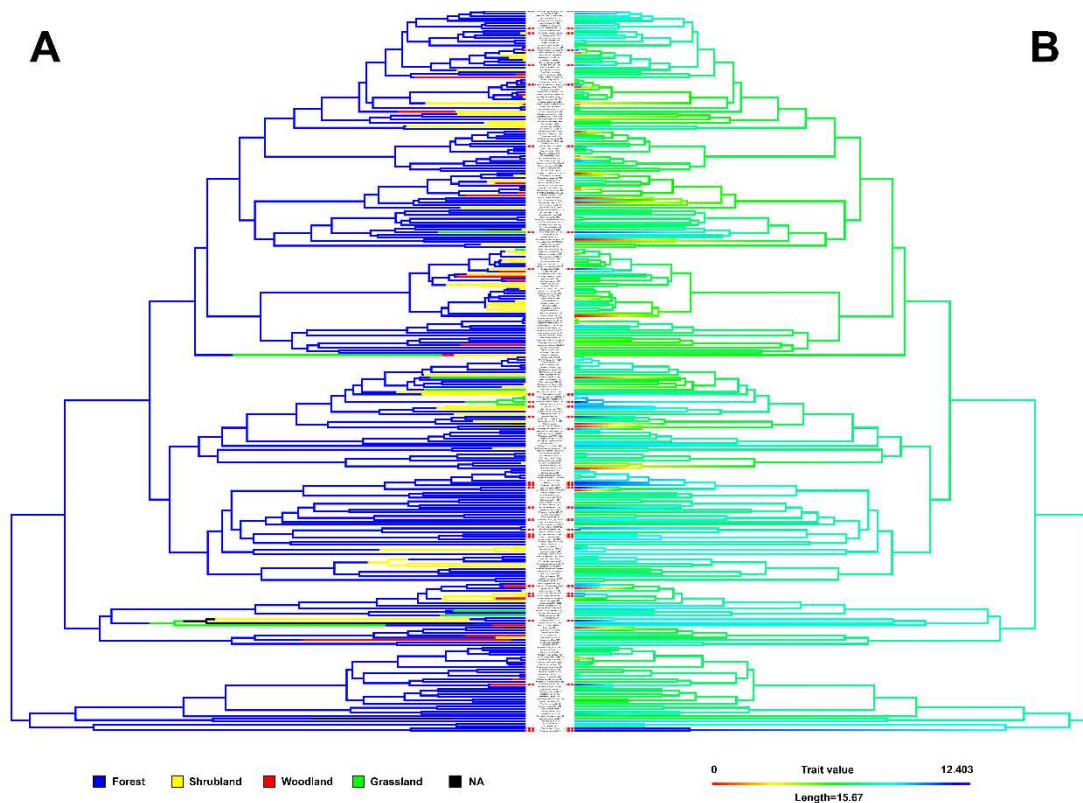


Figure 3. Ancestral state reconstruction for the Trochilidae, with emphasis on major transitions between habitats (A) and peak frequency (B). Red marks next to species names in the centre column of the figure signal all 28 species for which we identified high frequency vocalization (i.e., peak frequency >10kHz), in addition to *Boissonneaua flavescens* (Duque et al. 2018). (A) The colours on the branches show the highest relative probability of ancestral occurrence in each habitat. (B) The colours on the branches represent the highest relative probability of each ancestral peak frequency.

## Discussion

Studying acoustic aspects of a bird family with 349 species that are distributed from one tropic to the other of the Americas becomes more manageable when one has access to citizen scientist's records on a continental scale. Recording hummingbird vocalizations in the online database xeno-canto has allowed us to expand the knowledge about the vocalization ability in hummingbirds, which was previously limited to geographically restricted studies. This study allowed us to almost sixfold, from five to 29, the list of hummingbird species able to vocalize in high frequencies, even though we assumed an arbitrary and conservative threshold value for this character (i.e., peak frequency >10kHz).

Looking to understand what may have led some species to present this type of vocalization, we related the 29 species to their respective habitats and body masses. According to the 'acoustic adaptation hypothesis' by Morton (1975), forest species vocalize in lower frequencies than those inhabitant of open habitats as a strategy that results in their communication overcome the physical barriers imposed to sound propagation by the environment. Extensive taxonomic analyses have identified that birds shift to higher peak frequencies as a response to the type of environment and its associated noise (Boncoraglio 2007). However, and in line with another study focused on Thraupidae (Mason and Burns



2015), our results refuted this classical hypothesis for Trochilidae, demonstrating that hummingbird species capable of vocalizing in high frequencies are proportionally similarly distributed among different (i.e., open and closed) habitats. Moreover, ancestral state reconstruction analyses revealed no clear qualitative correlation between habitat type and hummingbird peak frequency vocalization. An alternative hypothesis would be that morphological aspects can also influence vocalization frequency. In this context, larger and heavier species would tend to vocalize lower due to the structure of their vocal apparatus, consequently presenting lower frequencies (Demery et al., 2021). Such a hypothesis was also refuted in our study. For instance, species of the genus *Florisuga* are particularly large and territorial hummingbirds in comparison to other species, but our analysis revealed them as two of the species with the highest peak vocalization frequencies in Trochilidae.

The sharp increase promoted by our study in the number of species able to vocalize at high frequencies highlights the scarcity of natural history studies of Neotropical birds (Xiao et al. 2017). In that respect, we highlight the importance and potential of citizen science platforms (e.g., xeno-song, Wikiaves, eBird) to enable the progress of this and other science areas, as they make available data that, in conventional situations, may be extremely challenging to collect by researchers' due to geographical, infrastructure, logistical, and financial limitations (e.g., Jaric et al. 2020; Sugai et al. 2019; Jiménez-Valverde et al. 2019). However, it is clear that research derived from citizen science data must respect and acknowledge the inherent limitations of this method of data collection and storage. Structuring appropriate sampling designs to explore these platforms is a major challenge for researchers, especially given the large volume and variable quality of certain types of data (Schubert et al. 2019). To encompass the maximum number of Trochilidae species (~80%) and perform acoustic and evolutionary analyses of pioneering taxonomic breadth for the family, our study was limited to three vocalization samples with good quality per species, even if recorded in uncontrolled

behavioural contexts. Considering that context should influence the vocal pattern of individuals (Medina and Francis 2012; Smith et al. 2013), it is possible that other hummingbird species besides those 28 identified in our results emit vocalizations in high frequency. Furthermore, our data revealed vocalizations peak frequencies that were slightly lower than previous descriptions of high-frequency vocalizations for these species (see *B. flavescens* in Figure 2; Duque et al. 2018).

Our methodology could replicate peak frequencies above 10 kHz for four of the five hummingbird species already known for this behavior (Duque et al. 2018; Olson et al. 2018), with *B. flavescens* being the exception. In this case, Duque et al. (2018) concluded that this species vocalizes at high frequency (mean  $\pm$  SE:  $9.70 \pm 0.04$  kHz) but failed to clearly state a frequency threshold to categorize this behavior. Apparently, the samples available on citizen science platforms and analysed here for this species tend to have slightly lower mean peak frequency values than samples obtained by scientists in the field. This raises the question whether systematized recordings of Trochilidae vocalizations in the field may further extend the upper limit of the frequency band of vocalizations not only for this species, but for other Trochilidae. A study of this nature has been conducted since 2021 and should, in addition to refining the present list of hummingbird species able of vocalizing in high frequencies, check for the hypothesis of a behavioural context influence on the peak frequency of hummingbird vocalization (Morgado et al., Unpublished data). For example, Olson et al. (2018) reported that vocalizations in high frequencies of *F. fusca* are mainly emitted during flight and at times of agonistic interactions with other individuals. This may suggest that one of the factors presenting an influence on the evolution of vocalizations at higher frequencies is the individual's need to behaviourally impose itself over another, in addition to signalling vigour during displays for attracting partners (Olson et al. 2018). Thus, future neurological studies and field experiments such as the one run by Duque et al. (2020), but of broader taxonomic scope, seems to be

essential to confirm the ability to receive and process the high-frequency signals emitted by Trochilidae species.

Although living hummingbird species are distributed across a wide range of habitats (Winkler et al. 2022), our data demonstrated forest dominance among the 287 species analysed (Figure 3A). However, we detected no marked deviation for the occurrence of species that vocalize in high frequencies in forest environments (~9% of total forest species vs. ~12% of open environment species). Thus, habitat type (i.e., open vs. closed) does not influence the selection of high frequency vocalizations in hummingbirds. This result refutes, for Trochilidae, the ‘acoustic adaptation hypothesis’ (Morton 1975; Rothstein and Fleischer 1987), i.e., of high-frequency vocalizations resulting from selection mediated by the environment, either as an evolutionary outcome associated with lower attenuation by physical barriers in open environments (Wiley and Richards 1982; Ey and Fischer 2009; Padgham 2004), with minimizing acoustic overlap with abiotic noises (e.g., wind; Brumm and Slabbekoorn 2005), and/or minimizing acoustic interspecific competition (e.g., with other birds and insects; Lohr et al. 2003; Luther and Gentry 2013), in line with the cautions raised by Duque et al. (2018). A similar result was observed for Passeriformes by Mikula et al. (2021), after a sampling design similar to the present study. Again, as the contexts in which the recorded vocalizations were emitted are often omitted in citizen science databases, we reinforce here the need for the enhancement of these platforms to request collaborators to provide, whenever it is possible, the behavioural contextualization of the emitters of the sampled vocalizations (Mikula et al. 2021).

Our study pioneers in inferring a macroevolutionary bioacoustic scenario for Trochilidae supported by the evolutionary hypothesis that considered the most extensive taxonomic representation of the family (McGuire et al. 2014). To date, evolutionary studies involving the family Trochilidae have focused on plumage (e.g., Eliason et al. 2020), community (e.g., Roy et al. 1998), and species evolution (e.g., Rodríguez-Gómez et al. 2021;

Hernández-Baños 2020). In the bioacoustic context, evolutionary studies are numerous and of broad theoretical spectrums, proposing to understand from production capacity to perception and sexual selection of vocal signals in invertebrates (e.g., Orthoptera: Nattier et al. 2011) and vertebrates (e.g., amphibians: Bezerra et al. 2021; fish: Parmentier et al. 2022), including birds (e.g., Podos et al. 2022). While parallel to Mason & Burns' (2015) study on Thraupidae, our study is unprecedented in using macroevolutionary analyses to infer a complete scenario for the mode of acoustic evolution in Trochilidae and the environmental and morphological factors to which it may be related. Additionally, we detected species that were not contemplated in the phylogenetic tree of McGuire et al. (2014) for which acoustic data are available online. Thus, it is important that new molecular sequence deposits be made to update the phylogeny of the group and the consequent further refinement of the results of the present study.

Phylogenetic signal analysis showed that habitat type is an important factor in the Trochilidae evolutionary history, with a marked evolutionary divergence from a forest ancestor to colonize other environments (i.e., shrub, woodland, and grassland), with rare regression events to the ancestral habitat. Since habitat types reflect evolutionary divergence in Trochilidae, it is also possible that future studies could predict habitats of phylogenetically close species that have not yet been characterized or collected. Similarly, the body size of each species is also a factor that has guided evolutionary history in hummingbirds, although our analysis reveal that it does not seem to be directly related to how these animals vocalize (figure S1). Only through a complete phylogeny of the family paralleled with a comprehensive acoustic database will we be able to validate such information. The peak frequency of vocalization showed no phylogenetic signal in Trochilidae, which may indicate an adaptive convergence in which emissions in high frequencies may, for example, have evolved independently, leading hummingbirds to adapt to different ecological conditions found throughout the evolution of their spatial distribution. Thus, we reinforce the relevance of the behavioural context (e.g.,

territorial defence and sexual selection) as guiding the emergence and selection of high frequencies in Trochilidae.

Our study revealed that the number of hummingbird species that can vocalize in high frequencies (i.e., peak frequency  $> 10$  kHz) is way above what was thus far known, an almost six-fold increase from five to 29 species). Considering the possible limitations of our sampling and analytical methods based on citizen science platforms, we reinforce that this number may be even higher. Furthermore, our evolutionary analyses refuted a relationship between habitat type and high peak vocalization frequencies, as well as between frequency and species body size. Thus, our data indicate that the evolution of this vocal behavior in hummingbirds is related to behavioural rather than environmental and morphological factors. Preliminary analyses of field data collected with *Phaethornis pretrei* suggest a support for a relationship between vocalization frequency and factors of territorial dispute and sexual selection (Morgado et al., Unpublished data). We explored here a theme of hummingbird acoustics on a taxonomic scale pioneered and made possible by citizen science. Although the use of these data is subject to limitations, their value to the natural history and evolution of vocalization in Trochilidae is evident in our results and shall open doors for more refined studies in birds.

### **Acknowledgements**

The authors thank the PPG in Biodiversity and Nature Conservation for the infrastructure provided for the development of this study. We also thank Jimmy A. McGuire for providing the alignment files and phylogenetic tree for the macroevolutionary analyses. The authors report there are no competing interests to declare. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001 to LNM.

## References

- Araújo CB, Jardim M, Saturnino NSF, Rosa GM, Lima MR, Anjos L. 2020. The optimal listening period for an effective assessment of bird richness and composition: a case study of neotropical forest. *Journal of Ornithology*. 162:303-306.
- Bezerra AM, Carvalho-e-Silva SP, Gonzaga LP. 2021. Evolution of acoustic signals in Neotropical leaf frogs. *Animal Behaviour*. 181:41-49.
- Bischi B, Lang M, Bossek J, Horn D, Richter J, Surmann D. 2022. BBmisc: miscellaneous helper functions for b. Bischi. R package version 1.12. <https://CRAN.R-project.org/package=BBmisc>
- Boncoraglio G, Saino N. 2007. Habitat structure and the evolution of bird song: a meta-analysis of the evidence for the acoustic adaptation hypothesis. *Functional Ecology*. 21:1–10.
- Brumm H. 2013. *Animal communication and noise*. Springer Science & Business Media.
- Brumm H, Naguib M. 2009. Environmental acoustics and the evolution of bird song. In: Naguib M, Janik VM, Zuberbühler K, Clayton NS, eds. *Advances in the study of behaviour*, Amsterdam: Elsevier. 1–33.
- Brumm H, Slabbekoorn H. 2005. Acoustic communication in noise. *Advances in the Study of Behavior*. 151–209.
- Brumm H, Zollinger SA. 2011. The evolution of the Lombard effect: 100 years of psychoacoustic research. *Behaviour*. 148:1173-1198.
- Demery AJC, Burns KJ, Mason NA. 2021. Bill size, bill shape, and body size constrain bird song evolution on a macroevolutionary scale. *Ornithology*. 138:1-11.
- Dooling RJ, Lohr B, Dent ML. 2000. Hearing in birds and reptiles. In: *Comparative hearing: birds and reptiles*. 308-359. Springer.

- Dooling R. 2004. Audition: can birds hear everything they sing. In *Nature's Music. The Science of Birdsong.*, H. Slabbekoorn and P. R. Marler, eds. (San Diego: Elsevier Academic Press). 206–225.
- Duque FG, Rodríguez-Saltos CA, Wilczynski W. 2018. High-frequency vocalizations in andean hummingbirds. *Current Biology*. 28: R927-R928.
- Duque FG, Rodríguez-Saltos CA, Uma S, Nasir I, Monteros MF, Wilczynski W, Carruth LL. 2020. High-frequency hearing in a hummingbird. *Science Advances*. 6: eabb9393.
- Duque F, Rodríguez-Saltos C, Monteros M, Wilczynski W. 2021. Transmission of high-frequency vocalizations from hummingbirds living in diverse habitats. *Biological Journal of the Linnean Society*. 132:148-160.
- Eliason CM, Maia R, Parra JL, Shawkey MD. 2020. Signal evolution and morphological complexity in hummingbirds (Aves: Trochilidae). *Evolution*. 74(2):447-458.
- Ey E, Fischer J. 2009. The “acoustic adaptation hypothesis”- A review of the evidence from birds, anurans and mammals. *Bioacoustics*. 19(1-2):21–48.
- Galili T. 2015. Dendextend: an R package for visualizing, adjusting, and comparing trees of hierarchical clustering. *Bioinformatics*.
- Grant BR, Grant PR. 2010. Songs of Darwin's finches diverge when a new species enters the community. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107:20156–20163.
- Hackathon R, Bolker B, Butler M, Cowan P, De Vienne D, Eddelbuettel D, Holder M, Jombart T, Kembel S, Michonneau F, et al. 2020. Phylobase: base package for phylogenetic structures and comparative data. R package version 0.8.10. <https://CRAN.R-project.org/package=phylobase>

- Hernández-Baños BE, Zamudio-Beltrán LE, Milá B. 2020. Phylogenetic relationships and systematics of a subclade of Mesoamerican emerald hummingbirds (Aves: Trochilidae: Trochilini). *Zootaxa*. 4748(3):581-591.
- Hill AP, Prince P, Snaddon JL, Doncaster CP, Rogers A. 2019. AudioMoth: a low-cost acoustic device for monitoring biodiversity and the environment. *HardwareX*, 10: e00073.
- Jaric I, Correia RA, Brook BW, Buettel JC, Courchamp F, Di Minin E, Firth JA, Gaston KJ, Jepson P, Kalinkat G, et al. 2020. iEcology: harnessing large online resources to generate ecological insights. *Trends Ecol Evol*. 35(7):630-639.
- Jiménez-Valverde A, Peña-Aguilera P, Barve V, Burguillo-Madrid L, Leather S, Stewart A. 2019. Photo-sharing platforms key for characterising niche and distribution in poorly studied taxa. *Insect Conservation and Diversity*. 12(5):389-403.
- Kacelnik A, Krebs JR. 1983. The dawn chorus in the great tit (*Parus major*): proximate and ultimate causes. *Behaviour*. 83(3):287–308.
- Keck F, Rimet F, Bouchez A, Franc A. 2016. Phylosignal: an R package to measure, test, and explore the phylogenetic signal. *Ecology and Evolution*. 6(9):2774-2780.
- Krause BL. 1993. The niche hypothesis: a virtual symphony of animal sounds, the origins of musical expression and the health of habitats. *The Soundscape Newsletter*. 6:6-10.
- Ligges U, Krey S, Mermann O, Schnackenberg S. 2018. TuneR: analysis of music and speech. URL: <https://CRAN.R-project.org/package=tuneR>
- Lohr B, Wright TF, Dooling RJ. 2003. Detection and discrimination of natural calls in masking noise by birds: estimating the active space of a signal. *Animal Behaviour*. 65(4):763–777.
- Luther D, Gentry K. 2013. Sources of background noise and their influence on vertebrate acoustic communication. *Behaviour*. 150:1045-1068.



- Mace R. 1987. The dawn chorus in the great tit *Parus major* is directly related to female fertility. *Nature*. 330(6150):745–746.
- Mason NA, Burns KJ. 2015. The effect of habitat and body size on the evolution of vocal displays in Thraupidae (tanagers), the largest family of songbirds. *Biological Journal of the Linnean Society*. 114(3):538-551.
- Medina I, Francis CD. 2012. Environmental variability and acoustic signals: a multi-level approach in songbirds. *Biology Letters*. 8(6):928–931.
- Mikula P, Valcu M, Brumm H, Bulla M, Forstmeier W, Petrusková T, Albrecht T. 2020. A global analysis of song frequency in passerines provides no support for the acoustic adaptation hypothesis but suggests a role for sexual selection. *Ecology Letters*.
- Mcguire JA, Witt CC, Remsen JV Jr, Corl A, Rabosky DL, Altshuler DL, Dudley R. 2014. Molecular phylogenetics and the diversification of hummingbirds. *Current Biology*. 24:910-6.
- Morton ES. 1975. Ecological sources of selection on avian sounds. *The American Naturalist*. 109(965):17-34.
- Nattier R, Robillard T, Amedegnato C, Couloux A, Cruaud C, Desutter-Grandcolas L. 2011. Evolution of acoustic communication in the Gomphocerinae (Orthoptera: Caelifera: Acrididae). *Zoologica Scripta*. 40(5):479-497.
- Nudds TD. 1977. Quantifying the vegetative structure of wildlife cover. *Wildlife Society Bulletin*. 5:113-117.
- Olson CR, Fernández-Vargas M, Portfors CV, Mello CV. 2018. Black Jacobin hummingbirds vocalize above the known hearing range of birds. *Current Biology*. 28: R204-R205.
- Padgham M. 2004. Reverberation and frequency attenuation in forests- implications for acoustic communication in animals. *The Journal of the Acoustical Society of America*. 115(1):402–410.

- Paradis E, Claude J, Strimmer K. 2004. APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics*. 20(2):289–290.
- Parmentier E, Scalbert R, Raick X, Gache C, Frédérick B, Bertucci F, Lecchini D. 2022. First use of acoustic calls to distinguish cryptic members of a fish species complex. *Zoological Journal of the Linnean Society*. 195(3):964-975.
- Podos J, Cohn-Haft M. 2019. Extremely loud mating songs at close range in white bellbirds. *Current Biology*. 29: R1068-R1069.
- Podos J, Webster MS. 2022. Ecology and evolution of bird sounds. *Current Biology*. 32(20): R1100-R1104.
- R Core Team. 2020. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Riede T, Olson CR. 2020. The vocal organ of hummingbirds shows convergence with songbirds. *Scientific Reports*. 10:2007.
- Rodríguez-Gómez F, Licona-Vera Y, Ornela JF. 2021. Phylogeography, morphology and ecological niche modelling to explore the evolutionary history of azure-crowned hummingbird (*Amazilia cyanocephala*, Trochilidae) in Mesoamerica. *Journal of Ornithology*. 162(2):529-547.
- Rothstein SI, Fleischer RC. 1987. Vocal dialects and their possible relation to honest status signalling in the brown-headed cowbird. *The Condor*. 89(1):1.
- Roy MS, Torres-Mura JC, Hertel F. 1998. Evolution and history of hummingbirds (Aves: Trochilidae) from the Juan Fernandez islands, Chile. *Ibis*. 140(2):265-273.
- Schubert SC, Manica LT, Guaraldo ADC. 2019. Revealing the potential of a huge citizen-science platform to study bird migration. *Emu-Austral Ornithology*. 119(4):364-373.
- Slater PJB. 2003. Fifty years of bird song research: a case study in animal behaviour. *Animal Behaviour*. 63:633–639.

- Smith TB, Harrigan RJ, Kirschel ANG, Buermann W, Saatchi S, Blumstein DT, Slabbekoorn H. 2013. Predicting bird song from space. *Evolutionary Applications*. 6(6):865–874.
- Sueur J, Aubin T, Simonis C. 2008. Seewave: a free modular tool for sound analysis and synthesis. *Bioacoustics*. 18:213-226.
- Sugai LSM, Silva TSF, Ribeiro Jr JW, Llusia D. 2019. Terrestrial passive acoustic monitoring: review and perspectives. *BioScience*. 69(1):15-25.
- Tobias JA, Sheard C, Pigot AL, Devenish AJ, Yang J, Sayol F, Neate-Clegg MH, Alioravainen N, Weeks TL, Barber RA. 2022. AVONET: morphological, ecological and geographical data for all birds. *Ecology Letters*. 25(3):581-597.
- Urbanek S. 2020. Audio: audio interface for R. R package version 0.1-7. <https://CRAN.R-project.org/package=audio>
- Walters MJ, Guralnick RP, Kleist NJ, Robinson SK. 2019. Urban background noise affects breeding song frequency and syllable-type composition in the Northern Mockingbird. *The Condor*. 121:1–13.
- Weir JT, Wheatcroft DJ, Price TD. 2012. The role of ecological constraint in driving the evolution of avian song frequency across a latitudinal gradient. *Evolution*. 66:2773–2783.
- Wiley RH, Richards DG. 1982. Adaptations for acoustic communication in birds: sound transmission and signal detection. *Acoustic Communication in Birds*. 131–181.
- Winkler DW, Billerman SM, Lovette IJ. 2020. Hummingbirds (Trochilidae), version 1.0. In *Birds of the World* (S. M. Billerman, B. K. Keeney, P. G. Rodewald, and T. S. Schulenberg, Editors). Cornell Lab of Ornithology, Ithaca, NY, USA.
- Xiao H, Hu Y, Lang Z, Fang B, Guo W, Zhang Q, Pan X, Lu X. 2017. How much do we know about the breeding biology of bird species in the world? *Journal of Avian Biology*. 48(4):513-518.



## Supplement

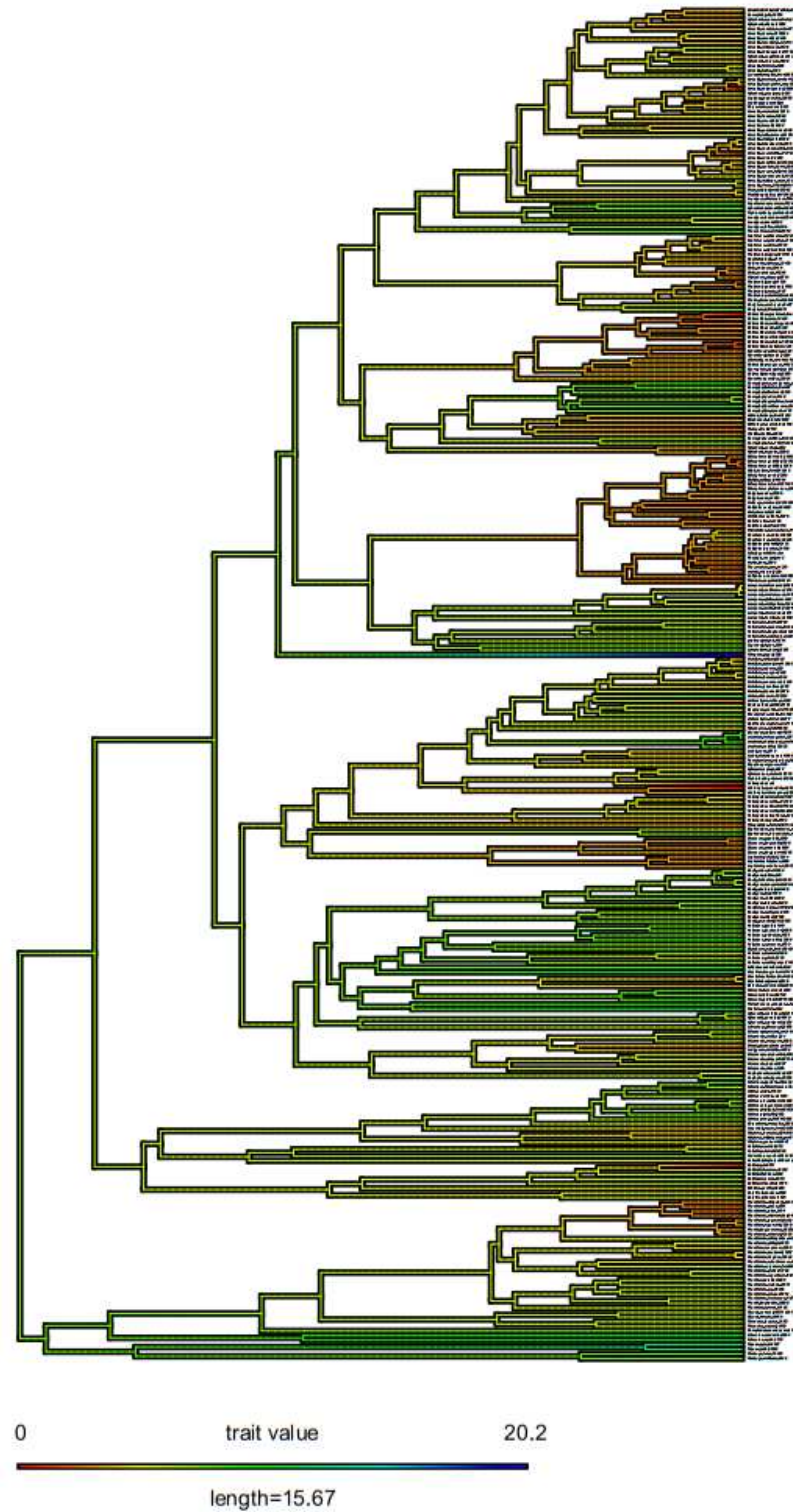


Figure S1. Reconstruction of the ancestral state for the family Trochilidae showing the average mass (g) per species over the evolutionary period, with red coloration indicating lighter species and blue colouration the heavier species.