



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Délkelet-ázsiai denevérek szisztematikai vizsgálata

Doktori (PhD) értekezés

Győrössy Dorottya

Gödöllő

2026

A doktori iskola

megnevezése: MATE Természettudományok Doktori Iskola

tudományága: Biológiai tudományi Doktori Program

vezetője: **Prof. Dr. Nagy Zoltán DSc**
Növényélettan és Növényökológia Tanszék vezetője
Növénytermesztési-tudományok Intézet
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem (MATE)

Témavezetők: **Dr. Görföl Tamás**
Tudományos munkatárs
Virologiai Nemzeti Laboratórium
Pécsi Tudományegyetem (PTE)

Dr. habil Estók Péter
Egyetemi docens
Állattani Tanszék
Biológiai Intézet
Eszterházy Károly Katolikus Egyetem (EKKE)

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	1
1.1 A denevérek sokfélesége és ökológiai jelentősége	1
1.2 A globális biodiverzitás-krízis és a trópusi emlősfauna sérülékenysége	1
1.3 Biodiverzitási forrópontok és természetvédelmi kihívások Délkelet-Ázsiában.....	2
1.4 A denevérek kutatásának módszertani kihívásai a trópusokon	3
1.5 A rendszertan és a természetvédelem kapcsolata.....	5
1.6 Expedíciós kutatások és integrált taxonómia szerepe Délkelet-Ázsiában	6
1.7 Az értekezés főbb célkitűzései	7
1.7.1 Első tanulmány – ChiroVox: a denevérhangok nyilvános adatbázisa	8
1.7.2 Második tanulmány – A vietnámi denevérfauna akusztikus leírása	8
1.7.3 Harmadik tanulmány – A <i>Murina walstoni</i> (Chiroptera: Vespertilionidae) első előfordulása Délkelet-Ázsián kívül.....	9
1.7.4 Negyedik tanulmány – A <i>Lyroderma lyra</i> (Chiroptera: Megadermatidae) alfajainak taxonómiai revíziója és elterjedésük újraértékelése	10
1.7.5 Ötödik tanulmány – A taxonómia „szürke zónája” – a <i>Myotis sicarius</i> (Chiroptera: Vespertilionidae) példája	10
2 ANYAG ÉS MÓDSZER	11
2.1 Első tanulmány – ChiroVox: a denevérhangok nyilvános adatbázisa	11
2.2 Második tanulmány – A vietnámi denevérfauna akusztikus leírása	12
2.3 Harmadik tanulmány – A <i>Murina walstoni</i> (Chiroptera: Vespertilionidae) első előfordulása Délkelet-Ázsián kívül	13
2.4 Negyedik tanulmány – A <i>Lyroderma lyra</i> (Chiroptera: Megadermatidae) alfajainak taxonómiai revíziója és elterjedésük újraértékelése	14
2.5 Ötödik tanulmány – A taxonómia „szürke zónája” – a <i>Myotis sicarius</i> (Chiroptera: Vespertilionidae) példája	15
3 EREDMÉNYEK	16
3.1 Első tanulmány – ChiroVox: a denevérhangok nyilvános adatbázisa	16
3.2 Második tanulmány – A vietnámi denevérfauna akusztikus leírása	17
3.3 Harmadik tanulmány – A <i>Murina walstoni</i> (Chiroptera: Vespertilionidae) első előfordulása Délkelet-Ázsián kívül	18
3.4 Negyedik tanulmány – A <i>Lyroderma lyra</i> (Chiroptera: Megadermatidae) alfajainak taxonómiai revíziója és elterjedésük újraértékelése	18
3.5 Ötödik tanulmány – A taxonómia „szürke zónája” – a <i>Myotis sicarius</i> (Chiroptera: Vespertilionidae) példája	19
4 KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK	20
4.1 Bioakusztikai kutatások és online hangadatbázisok	21

4.2	A genetikai és morfológiai adatok integrációja	23
5	ÖSSZEFOGLALÓ	28
6	ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	29
7	IRODALOMJEGYZÉK	31
8	AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN KÉSZÜLT PUBLIKÁCIÓK	45
8.1	Publikációk lektorált folyóiratokban.....	45
8.2	Konferenciaközlemények, absztraktok és előadások.....	45
9	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	47
10	MELLÉKLET	47

1. BEVEZETÉS

1.1 A denevérek sokfélesége és ökológiai jelentősége

A denevérek (Chiroptera) rendje a rágcsálók (Rodentia) után a második legfajgazdagabb emlőscsoport, jelenleg több, mint 1400 képviselővel. Ez a fajszám azonban folyamatosan növekszik az újfajta gyűjtési módszereknek, a bioakusztikai és a molekuláris biológiai vizsgálatok fejlődésének és a taxonómiai revízióknak köszönhetően (pl. Csorba és mtsai. 2011; Francis és Eger 2012; Csorba és mtsai. 2014; Görföl és mtsai. 2014; Csorba és mtsai. 2015). A denevérek rendje két fő alrendre osztható: Yinpterochiroptera és Yangochiroptera. A Yinpterochiroptera alrendbe tartoznak a nagyobb méretű repülőkutya (Pteropodidae), amelyek korábban külön alrendet, a Macrochiroptera alkották, valamint néhány kisebb méretű csoport is, mint például a patkósdenevérek (Rhinolophidae), amelyeket korábban a Microchiroptera-hoz soroltak. A másik alrend, a Yangochiroptera, magába foglalja a többi denevércsoportot, köztük a simaorrú-denevérek (Vespertilionidae) családját is, mely a denevérek rendjének legnagyobb fajszámú csoportja (Teeling és mtsai. 2005). A denevérek kivételes alkalmazkodóképességüknek köszönhetően számos különböző élőhelyet meghódítottak, és rendkívüli változatosságot mutatnak méretükben, színükben, táplálkozásukban és életmódjukban. Táplálkozási szokásaik révén kulcsszerepet töltenek be az ökoszisztémákban: a rovarevő fajok természetes kártevő-szabályozóként működnek a mezőgazdasági területeken, a gyümölcssevő és nektáryalagató fajok a magterjesztésben és a beporzásban vesznek részt a trópusi és szubtrópusi területeken, míg a hematofág és ragadozó fajok a táplálékhálózatok stabilitásához járulnak hozzá (Kunz és mtsai. 2011). Annak ellenére, hogy a denevéreknek számos ökoszisztéma működésében elengedhetetlen szerepük van, sok fajuk fennmaradását komoly veszélyek fenyegetik. A természetes élőhelyek átalakítása és pusztítása, a barlangi és épületekben található kolóniák rendszeres zavarása, az intenzív mezőgazdasági tevékenységek, valamint az olyan fertőző betegségek, mint például a fehérorr-szindróma, mind hozzájárulnak a populációk csökkenéséhez (Blehert és mtsai. 2009; Russo és Ancillotto 2015). Egyes populációk drasztikus csökkenése pedig nemcsak a globális biodiverzitást, hanem hosszú távon az általuk nyújtott ökoszisztéma-szolgáltatások stabilitását is veszélyezteti.

1.2 A globális biodiverzitás-krízis és a trópusi emlősfauna sérülékenysége

A Föld élővilága napjainkban jelentős mértékű átalakuláson megy keresztül, amelyet összefoglalóan biodiverzitás-krízisnek nevezünk. Az élőhelyek kiterjedt pusztulása és feldarabolódása, az intenzív földhasználat, a túlhasznosítás, az inváziós fajok terjedése, valamint

a klímaváltozás együttes hatása világszerte a fajok állományainak csökkenéséhez és kihalásához vezet (Allan és mtsai. 2019). A jelenlegi kihalási ráta nagyságrendekkel meghaladja a természetes kihalás ütemét, ami nem csupán az egyes fajok eltűnését, hanem az ökoszisztémák működésének és stabilitásának megbomlását is eredményezi (Ceballos és mtsai. 2015).

A biodiverzitás csökkenése nem egyenletesen érinti a Föld különböző térségeit: a trópusi régiók különösen sérülékenyek, miközben ezek adják a szárazföldi élővilág fajgazdagságának jelentős részét. A trópusokon zajló gyors erdőirtás, az élőhelyek mezőgazdasági és ipari célú átalakítása, valamint az infrastruktúra-fejlesztések rövid idő alatt nagymértékben csökkentették a természetes élőhelyek kiterjedését és összefüggőségét. Ezek következtében számos faj populációi izolálódnak, állományaik lecsökkennek, és nő a lokális, majd globális kihalás kockázata (Myers és mtsai. 2000; Sodhi és mtsai. 2004).

A trópusi emlősfauna különösen érzékenyen reagál ezekre a változásokra, mivel sok faj szűk ökológiai igényekkel rendelkezik, vagy speciális élőhelyekhez kötődik. A nagytestű emlősök mellett egyre több bizonyíték utal arra is, hogy a kisebb termetű, rejtőzködő életmódot folytató csoportok – köztük a denevérek is – szintén jelentős veszteségeket szenvednek el, annak ellenére, hogy ezek a változások gyakran kevésbé látványosak és nehezebben dokumentálhatók (Frick és mtsai. 2020).

A biodiverzitás-krízis egyik különösen problémás aspektusa, hogy a trópusi térségekben a fajpusztulás üteme gyakran meghaladja a tudományos feltárás sebességét. Számos faj tűnhet el úgy, hogy rendszertani státuszuk, elterjedésük vagy ökológiai szerepük soha nem kerül részletesen dokumentálásra (Mora és mtsai. 2011). Ez az úgynevezett „ismeretlen kihalás” különösen súlyos következményekkel járhat a természetvédelmi tervezés szempontjából, mivel a hiányos taxonómiai és faunisztikai ismeretek megnehezítik a védelmi prioritások meghatározását és a hatékony beavatkozások kidolgozását.

1.3 Biodiverzitási forrópontok és természetvédelmi kihívások Délkelet-Ázsiában

Délkelet-Ázsia a Föld egyik biológiailag legösszetettebb és legsokszínűbb térsége, ugyanakkor a biodiverzitás-krízis által az egyik legsúlyosabban érintett trópusi régió. A térség esőerdői a világ 25 biodiverzitási forrópontja közül négyet foglalnak magukba, köztük az Indo-Burma, Szunda-föld, Wallacea és a Fülöp-szigetek térségét (Myers és mtsai. 2000). Ezeket a területeket kiemelkedően magas endemizmus, ugyanakkor rendkívül gyors ütemű élőhelyvesztés jellemzi, ezáltal a világ legveszélyeztetettebb élőhelyei közé tartoznak (Myers és mtsai. 2000; Sodhi és mtsai. 2004; Furey és mtsai. 2010). Mindezek miatt ezen területek élővilágának feltárása napjaink egyik legsürgetőbb és legfontosabb alapkutatása.

A denevérek fontos részei ennek a sokféleségnek, mivel Délkelet-Ázsiában az emlősfajok közel egyharmadát teszik ki (Kingston 2010, 2013; Simmons és Cirranello 2024), ugyanakkor a régióban a legkevésbé ismert gerincesek közé tartoznak, mind taxonómiai, elterjedési és ökológiai szempontból (Kingston 2010). Számos faj kizárólag néhány példány vagy egyetlen lelőhely alapján ismert, miközben más esetekben a morfológiailag hasonló, kriptikus fajok jelenléte nehezíti a pontos fajszintű azonosítást (Csorba és mtsai. 2011; Srinivasulu és mtsai. 2019). Becslések szerint, a jelenlegi erdőirtási ütem folytatódása esetén a régió denevérfajainak mintegy 40%-a kihalhat a 21. század végére (Lane és mtsai. 2006; Kingston 2010; Tuan és mtsai. 2023). Ennek következtében sokkal átfogóbb természetvédelmi kutatásokra és taxonómiai-szisztematikai vizsgálatokra van szükség, amelyek lehetővé teszik ennek a sokféleségnek a mélyebb megértését és pontosabb feltérképezését (Francis és mtsai. 2010; Kingston 2010, 2013).

1.4 A denevérek kutatásának módszertani kihívásai a trópusokon

A denevérek rejtőzködő életmódja jelentős módszertani kihívásokat állít a faunisztikai és ökológiai vizsgálatokkal szemben, mivel elsősorban éjszaka aktívak, nappal pedig gyakran eldugott szálláshelyeiken pihennek. A hagyományos befogási módszerekkel, mint például a függönyháló és a húrcsapda, leginkább a föld felszínéhez közel (pár méter magasságban) repülő fajokat lehet vizsgálni, míg a lombkorona szintjében vagy az a felett repülő denevérek rendszerint alulreprezentáltak az ilyen típusú felmérésekben. Az Óvilági gyümölcsevő denevérek (Pteropodidae) kivételével a denevérek többsége magas frekvenciájú ultrahangokat bocsát ki és azok visszaverődését érzékelve, úgynevezett echolokációval tájékozódik. Ez a sajátos rendszer lehetővé teszi számunkra, hogy a fajokat akusztikusan vizsgáljuk anélkül, hogy az állatokat fizikailag be kellene fogni vagy felesleges stresszhatásnak tennénk ki őket. Az echolokációs hangok kulcsszerepet játszanak a térbeli tájékozódásban és a zsákmányszerzésben (Jones és Teeling 2006; Jones és Holderied 2007), miközben rendkívüli módon alkalmazkodnak az adott faj életmódjához és élőhelyi sajátosságaihoz (Jones és mtsai. 2000; Parsons és Jones 2000; Russo és Jones 2002; Pfalzer és Kusch 2003; Schnitzler és mtsai. 2003; Jones és Holderied 2007). Az akusztikus monitoring széles körben elterjedt módszerré vált, különösen a mérsékelt égövi területeken (Brigham és mtsai. 2004) és egyre nagyobb szerepet kap Délkelet-Ázsiában is, ahol azonban még számos hiányosság van a helyi denevérekkel kapcsolatos ismereteinkben (Furey és mtsai. 2009a; Phauk és mtsai. 2013; Voigt és Kingston 2016; Chakravarty és mtsai. 2020; López-Bosch és mtsai. 2021; McArthur és Khan 2021; Pham és mtsai. 2021; Rai és mtsai. 2021; Raman és Hughes 2021; Thong és mtsai. 2022a). Az ázsiai denevérek akusztikai jellemzése alapvető fontosságú a megbízható monitorozáshoz és a fajok vagy fajcsoportok azonosításához, azonban ehhez szükség van nyílt hozzáférésű, lokális akusztikai adatbázisokra. Mivel a denevérek hangjai

nem csak fajok között, hanem fajon belül is jelentős változatosságot mutatnak – többek között az ivar, kor, testméret, élőhely, földrajzi elhelyezkedés, repülési magasság és egyéb környezeti tényezők hatására (Barclay és mtsai. 1999; Jones és mtsai. 2000; O’Farrell és mtsai. 2000; Russo és Jones 2002; Schnitzler és mtsai. 2003; Sun és mtsai. 2013) – elengedhetetlen, hogy ezek az adatbázisok egy adott taxon különböző körülmények között rögzített hangfelvételeit tartalmazzák. Ennek következtében a fajszerű akusztikus azonosítás csak akkor lehet megbízható, ha jól dokumentált, nyílt hozzáférésű, regionális referenciaadatokra támaszkodik. Bár több kisebb tanulmány már vizsgálta a délkelet-ázsiai denevérfajok echológiai paramétereit, ritkák az átfogó munkák. A rejtőzködő vagy ritka fajok pedig gyakran hiányoznak ezekből a tanulmányokból, és maguk a hangelemzések is csak esetenként ismételhetők meg, mivel a hangfelvételek nem állnak rendelkezésre további vizsgálatokhoz.

Vietnám különösen gazdag denevérfajokban (Kruskop 2013), hiszen az eddigi felmérések alapján 129 fajt regisztráltak az ország területéről (nem publikált adat). Az elmúlt néhány évtized intenzív taxonómiai kutatásai során közel 40 fajt írtak le újként: vagy a tudomány számára eddig ismeretlenként, vagy Vietnám területén először dokumentált előfordulásként. Ezek között megtalálhatók például a *Kerivoula titania*, *Murina eleryi*, *Mu. beelzebub*, *Mu. walstoni*, *Mu. annamitica*, *Myotis ancricola*, *My. annamitica*, *My. annatessae*, *My. indochinensis*, *My. phanluongi*, *Hipposideros griffini* (Csorba és mtsai. 2007; Furey és mtsai. 2009b; Csorba 2011; Francis és Eger 2012; Thong és mtsai. 2012; Tu és mtsai. 2018). Borissenko és Kruskop (2003) munkája szolgáltatja az első adatokat a vietnámi denevérek echológiai hangjairól, míg az első célzott akusztikai vizsgálatot Furey és munkatársai (2009a) végezték el. Tanulmányukban az észak-vietnámi Kim Hy Természetvédelmi Területen előforduló 31 denevérfaj hangját jellemezték, és eredményeik alapján arra a következtetésre jutottak, hogy lehetséges a helyi denevérfajok hangalapú azonosítása. Azóta több tanulmány bővítette az ország denevérfaunájának akusztikai jellemzését (Thong és mtsai. 2011; Thong 2019; Fukui és mtsai. 2020; Pham és mtsai. 2021; Son és mtsai. 2021; Thong és mtsai. 2022a, 2022b, 2022c; Thong 2023a, 2023b; Győrössy és mtsai. 2024), de még mindig számos kérdés vár megválaszolásra. Fontos azonban kiemelni, hogy az akusztikus adatok alapján a fajszerű határozás nem mindig lehetséges, ezért gyakran tágabb fajcsoportokat (például nemzetségeket) adunk meg az azonosítás során. Ez azonban így is értékes információ lehet a természetvédelmi döntéshozatal szempontjából, hiszen, ha egy adott nemzetségbe főként védett vagy veszélyeztetett fajok tartoznak, az önmagában elegendő érv lehet bizonyos védelmi intézkedések meghozatalához.

1.5 A rendszertan és a természetvédelem kapcsolata

A rendszertan és a természetvédelem szoros kapcsolatban áll egymással, mivel a természetvédelmi döntések alapját minden esetben a fajok pontos azonosítása és elterjedésük megbízható ismerete képezi. Egy taxon felismerése, újraértelmezése, rendszertani státuszának módosítása, elterjedési területének meghatározása vagy a populációi állapotának felmérése közvetlen hatással lehet annak természetvédelmi megítélésére, veszélyeztetettségi besorolására és a számára kidolgozott védelmi stratégiákra (Mace 2004). A taxonómiai bizonytalanság ezért nem csupán elméleti probléma, hanem gyakorlati következményekkel is járhat, különösen az olyan fajgazdag, de adathiányos régiókban, mint Délkelet-Ázsia.

A denevérek taxonómiája összetett és folyamatosan változó tudományterület, amely jelentős kihívásokkal jár, különösen a fajok és alfajok elkülönítésének kérdésében. Az új fajok leírása, az alfajok faji rangra emelése és a korábban különállónak vélt taxonok szinonimizálása folyamatosan alakítja a csoport filogenetikai és rendszertani hátterét. A klasszikus morfológiai alapú határozás sok esetben nehézségekbe ütközik, mivel számos denevérfaj morfológiailag rendkívül hasonló, vagy csupán finom bélyegeken különbözik egymástól. A kriptikus fajok jelenléte, valamint a populációsintű variabilitás tovább nehezíti a fajhatárok egyértelmű meghúzását. A friss gyűjtések és a múzeumi példányok revíziója alapvető fontosságú a taxonómiai problémák tisztázásában, különösen, ha típuspéldányokkal való összehasonlítás is lehetséges. Sok esetben azonban a régi leírások nem tartalmaznak elegendő információt, a típuspéldányok elvesztek, rossz állapotban vannak (törött koponya, kifakult bunda), vagy nem hozzáférhetők, ami megnehezíti az egyes taxonok pontos értelmezését (Tsang és mtsai. 2015).

A fajok pontos elkülönítése a biológiai sokféleség feltárásának és megőrzésének egyik alapvető feltétele, ugyanakkor a rendszertan egyik legösszetettebb és legvitatottabb kérdése. A „fajprobléma” különösen hangsúlyosan jelentkezik a denevérek esetében, ahol a nagy fajgazdagság, a morfológiai bélyegeken mutatkozó korlátozott változatosság, valamint a gyakran rejtett genetikai diverzitás együttesen nehezítik a taxonómiai értelmezést. A biológiai fajfogalom a reprodukzív izolációt tekinti meghatározónak, amely azonban vadon élő populációk esetében gyakran nem vizsgálható közvetlenül. A filogenetikai fajfogalom ezzel szemben a leszármazási vonalak genetikai elkülönülésére helyezi a hangsúlyt, amely jól alkalmazható molekuláris adatok alapján, ugyanakkor érzékeny lehet a mintavétel térbeli lefedettségére és a vizsgált markerek tulajdonságaira (Baker és Bradley 2006; Hauser 2009). A morfológiai fajfogalom szintén széles körben alkalmazott, de önmagában gyakran nem elegendő a kriptikus fajok elkülönítésére.

A kriptikus fajok jelenléte a denevérek esetében széles körben dokumentált jelenség, különösen a trópusi régiókban, ahol az evolúciós diverzifikáció gyakran gyors, míg a morfológiai változás mértéke csekély. Számos esetben genetikai vizsgálatok tártak fel olyan, egymástól jól

elkülönülő leszármazási vonalakat, amelyek korábban egyetlen fajként voltak kezelve (Csorba és mtsai. 2011; Kuo és mtsai. 2017; Tu és mtsai. 2018; Kusuminda és mtsai. 2022; Novaes és mtsai. 2023). Ezek felismerése alapvetően módosíthatja a fajsámra, elterjedési területekre és veszélyeztetettségre vonatkozó ismereteinket, és közvetlen természetvédelmi következményekkel járhat. Az alfajok rendszertani státusza szintén vitatott, mivel az eltérések gyakran vezethetők vissza populációsintű variabilitásra. Sokszor szubjektív döntés kérdése az, hogy egy forma külön faji vagy csupán alfaji szintre kerül besorolásra (Zachos 2018). A taxonómiai értelmezést tovább bonyolítja a hibridizáció jelensége is, amely nem ritka közeli rokonságban álló denevérfajok között (Mao és mtsai. 2013; Kruskop és Artyushin 2021). A génáramlás következtében létrejövő átmeneti vagy mozaikos genetikai mintázatok tovább nehezítik a fajhatárok egyértelmű meghúzását, különösen akkor, ha a vizsgálatok kizárólag mitokondriális markerekre támaszkodnak. Ilyen esetekben a mitokondriális és a nukleáris DNS eltérő evolúciós dinamikája eltérő taxonómiai következtetésekhez vezethet (Hassanin és mtsai. 2017).

Ezek a jelenségek együtt alkotják a taxonómia úgynevezett „szürke zónáját”, ahol sem a morfológiai, sem a genetikai adatok nem szolgáltatnak önmagukban egyértelmű választ arra a kérdésre, hogy adott populációkat külön fajként vagy egyetlen taxon részeként érdemes-e kezelni. Ilyen esetekben az egyértelmű döntések meghozatala csak többféle adat együttes értékelésével, vagyis integrált taxonómiai megközelítések alkalmazásával, illetve kritikus adatértékeléssel lehetséges (Solari és mtsai. 2019).

1.6 Expedíciós kutatások és integrált taxonómia szerepe Délkelet-Ázsiában

A célzott expedíciók kiemelt szerepet játszanak az elterjedési mintázatok pontosításában és a taxonómiai kérdések tisztázásában, hiszen számos, korábban nem dokumentált vagy félrehatározott faj csak ilyen módon kerülhet elő. A magyar kutatók évtizedek óta meghatározó szerepet töltenek be Délkelet-Ázsia denevéreinek kutatásában a helyi szakemberek mellett, azonban a képzett taxonómusok hiánya nagymértékben akadályozza az átfogó revíziók elvégzését. A trópusi régiók rendkívüli fajgazdagsága és az egymáshoz nagyon hasonló, gyakran kriptikus fajok azonosítása olyan speciális szakértelmet igényel, amelyet sok esetben még a genetikai módszerek sem képesek teljes mértékben kiváltani (Tsang és mtsai. 2015). Ha nem tudjuk pontosan elkülöníteni az egyes taxonokat, az jelentősen befolyásolhatja vizsgálataink eredményeit és akár téves következtetésekhez is vezethet.

A modern taxonómiai vizsgálatokban egyre nagyobb szerepet kap a morfológiai, akusztikai és genetikai (mitokondriális és/vagy nukleáris DNS) adatok integrált alkalmazása. Mivel egyetlen módszer önmagában gyakran nem elegendő a pontos meghatározáshoz, a különböző forrásokból származó adatok együttes értékelése – beleértve az ökológiai

sajátosságokat is – biztosítja a legmegbízhatóbb eredményeket (Will és mtsai. 2005; Mayer és mtsai. 2007). A filogenetikai elemzés különösen nagy segítséget nyújt az újonnan gyűjtött minták rendszertani besorolásában, amely mára a taxonómiai kutatások alapvető eszközévé vált. Az elmúlt két évtizedben jelentős fejlődésen ment keresztül a „Barcoding of Life” projekt, amely a citokróm c-oxidáz I (*COI*) gén bázissorendje alapján tipizálja az élőlényeket (Blaxter 2004; Hebert és Gregory 2005). Ez az eljárás (bárkódolás) nemcsak az új taxonok felismerését segíti elő, hanem lehetővé teszi a morfológiailag nehezen elkülöníthető fajok DNS szekvencia alapján történő pontos azonosítását is, azonban önmagában nem minden esetben alkalmas a taxonómiai kérdések végleges eldöntésére. A projekt számos régió denevérfaunáját érintette, többek között Délkelet-Ázsiát (Francis és mtsai. 2010) és az újvilági trópusokat (Clare és mtsai. 2007) is.

Az integrált taxonómia szemlélet alkalmazása nemcsak a fajok pontosabb elkülönítését teszi lehetővé, hanem hozzájárul az elterjedési területek újraértelmezéséhez, a rejtett diverzitás feltárásához és a természetvédelmi prioritások megalapozásához is. Különösen a fajgazdag, de taxonómiailag még hiányosan feltárt trópusi régiókban ez a megközelítés kulcsfontosságú a denevérek sokféleségének megértéséhez.

1.7 Az értekezés főbb célkitűzései

Az értekezés keretében bemutatott tanulmányok közül négynek fő célkitűzése a délkelet-ázsiai denevérek egyes csoportjainak bioakusztikai és/vagy taxonómiai revíziója, elterjedési területeik pontosítása és ökológiai sajátosságaik jellemzése volt. Kiemelt figyelmet fordítottunk a fajok és alfajok közötti morfológiai és genetikai eltérések feltárására is. A taxonómiai kutatások során szem előtt tartottuk az integratív megközelítést, vagyis a morfológiai, genetikai, bioakusztikai és ökológiai adatok együttes felhasználását, annak érdekében, hogy minél pontosabb és megbízhatóbb rendszertani következtetéseket vonhassunk le. Az első tanulmány ezekhez a kutatási irányokhoz kapcsolódva egy nyílt hozzáférésű denevérhang-adatbázis koncepcióját és felépítését mutatja be. Az ilyen típusú repozitóriumok jelentősége abban rejlik, hogy a referenciahangok segítik a taxonómiai határozást és a bioakusztikai vizsgálatok pontosságát.

Ezen túlmenően a kutatások célja volt a vizsgált taxonok földrajzi elterjedésének és élőhely-preferenciáinak pontosítása, ami hozzájárulhat a fajok védelmi helyzetének jobb megértéséhez és a természetvédelmi stratégiák hatékonyabb kidolgozásához. A populációk közötti genetikai eltérések feltárása nemcsak a fajhatárok értékelésében játszik szerepet, hanem evolúciós és biogeográfiai folyamatok megértéséhez is hozzájárul. Az egyes tanulmányok célkitűzései ezen általános célok mentén kerültek meghatározásra, az adott vizsgálati terület és kutatási kérdés sajátosságainak figyelembevételével.

1.7.1 Első tanulmány – ChiroVox: a denevérhangok nyilvános adatbázisa

Az akusztikai módszerek nagy előnye, hogy zavarás nélkül rengeteg adat gyűjthető a denevérekről és az automata detektorok akár több napra vagy hónapra is kihelyezhetők egy adott mintavételi helyre. Emellett több készülék párhuzamosan is használható nagyobb területeken, lehetővé téve például az élőhely-összehasonlító vizsgálatokat (pl. Frick 2013, Gibb és mtsai. 2019). A fajok pontos azonosítása ugyanakkor kihívást jelent, mivel sok faj echológiai hangja hasonló, és a hangparaméterek egyedenként és földrajzilag is változhatnak (Russo és Voigt 2016; Rydell és mtsai. 2017; Goerlitz 2018; Russo és mtsai. 2018). Ezek miatt szükség van a nagy, nyílt hozzáférésű adatbázisokra, amelyek információt nyújtanak a fajok közötti és a fajon belüli echológiai variabilitásról, különösen a magas diverzitású trópusi területeken.

Az elmúlt években egyre több tanulmány foglalkozott a trópusi denevérek hangtani sajátosságainak jellemzésével (pl. Hughes és mtsai. 2011; Phauk és mtsai. 2013; Zamora-Gutierrez és mtsai. 2016; Hackett és mtsai. 2017; Monadjem és mtsai. 2017; Raman és Hughes 2021; López-Bosch és mtsai. 2021; McArthur és Khan 2021), azonban az eltérő terminológia és az akusztikai adatok közlésének különböző módjai megnehezítik az összehasonlítást. Ezzel szemben, a referencia hangfelvételekhez való szabad hozzáférés jelentősen javítja a fajok azonosításának hatékonyságát és megbízhatóságát, mivel lehetőséget biztosít arra, hogy a kutató közvetlenül, ugyanabban a szoftverben összehasonlítsa az ismeretlen egyedtől származó hangfelvételt az adatbázisban található, hozzá legközelebbi élőhelyről származó referenciahangokkal. Az ilyen típusú hangkönyvtárak létrehozásának szükségességét már régóta hangsúlyozzák (Karine és Kalko 2001), és bár több adatbázis már létezik (pl. Collen 2012; Zamora-Gutierrez és mtsai. 2020), ezek többsége nem nyilvános, nem fed le nagy geográfiai régiókat vagy nem frissül rendszeresen.

Felismervén a szükségességét egy átfogó, rendszeresen karbantartott és folyamatosan frissülő denevérhang adatbázisnak, létrehoztuk a ChiroVox adatbázist, amelynek célja, hogy egy szabadon elérhető referencia denevérhang-gyűjteményként működjön, földrajzi és taxonómiai korlátozások nélkül. Az adatbázis lehetőséget biztosít a denevérhangok tárolására és összehasonlítására, továbbá célunk volt, hogy csak biztosan meghatározott (szükség esetén genetikailag alátámasztott) fajoktól származó hangok kerüljenek fel, így garantálva a referenciahangok hitelességét.

1.7.2 Második tanulmány – A vietnámi denevérfauna akusztikus leírása

Az akusztikai monitoring megbízható és standardizált módszert biztosít a denevérek gyors felmérésére, azonban hatékonysága nagymértékben függ a helyi (országos vagy tartományi szintű) referenciahang-gyűjtemények meglététől. Emiatt elengedhetetlen, hogy a világ különböző térségeiből származó akusztikai kutatások szélesebb körben elérhetővé váljanak. Bár számos

tanulmány foglalkozott már a délkelet-ázsiai, ezen belül is a vietnámi denevérfajok echológiai hangjaival (Borissenko és Kruskop 2003; Furey és mtsai. 2009a; Thong és mtsai. 2011; Fukui és mtsai. 2020; Pham és mtsai. 2021, Son és mtsai. 2021; Thong és mtsai. 2022a, 2022b, 2022c; Thong 2023a, 2023b), az összehasonlító kutatások száma még mindig alacsony, és ezek jellemzően egy-egy adott barlangra, városi területre vagy egy természetvédelmi területre korlátozódnak. A rejtett vagy ritka fajok gyakran kimaradnak ezekből a vizsgálatokból, ráadásul a felvételek többsége nem hozzáférhető további kutatásokhoz, ami megnehezíti a hangelemzések megismételhetőségét.

Kutatásunk célja a vietnámi denevérek akusztikai sajátosságainak összefoglaló és részletes leírása volt, ezzel támogatva a szélesebb körű délkelet-ázsiai kutatásokat és a denevérek védelmére irányuló természetvédelmi erőfeszítéseket. További célunk volt az is, hogy ingyenesen elérhető hangelemző szoftvert alkalmazzunk az ismételhetőség biztosítása érdekében, valamint, hogy az összes elemzett hangfájlt feltöltsük a ChiroVox adatbázisba, lehetővé téve az összehasonlító vizsgálatokat és az ismeretlen egyedektől származó hangok pontosabb azonosítását.

1.7.3 Harmadik tanulmány – A *Murina walstoni* (Chiroptera: Vespertilionidae) első előfordulása Délkelet-Ázsián kívül

A denevérek alkotják Nepál legfajgazdagabb emlőscsoportját. Az ország területéről eddig 55 faj jelenlétét dokumentálták, amelyek az alföldi síkvidéki területektől egészen a Himalája térségéig előfordulnak (Dahal és mtsai. 2024b). A legnagyobb fajszerű család a simaorrú-denevérek családja, mely jelenleg 32 fajt foglal magába. Ezen belül a *Murina* (csövesorrú-denevérek) nemzetség is képviselteti magát: 2020 előtt négy fajt írtak le ebből a csoportból az országban (Bates és Harrison 1997; Acharya és mtsai. 2010; Thapa 2014). Nepál területének jelentős része, beleértve nyolc védett területet is, denevérfaunisztikai szempontból még mindig kevésbé kutatott, így a további vizsgálatok mind országos, mind globális szinten új fajok felfedezéséhez vezethetnek (Acharya és Ruedas 2007; Thapa és mtsai. 2021; Dahal és mtsai. 2024a, 2024b). Az elmúlt évtizedben jelentősen intenzívebbé vált a denevérek kutatása, és az utóbbi hat évben négy faunára új fajt sikerült azonosítani az ország különböző régióiból (Sharma és mtsai. 2019, 2021; Dahal és mtsai. 2022a; 2022b).

Kutatásunk célja a nepáli denevérfauna alaposabb megismerése volt, különös tekintettel egy korábban még nem dokumentált faj előfordulására. A vizsgálat során egy csövesorrú-denevért fogtak be a helyi szakemberek, amely feltehetően a *Murina walstoni* (Walston csövesorrú-denevér) fajhoz tartozik. Morfológiai bélyegei és mitokondriális DNS-alapú vizsgálata alapján célunk volt a fajazonosság megerősítése. Ezzel egyúttal hozzájárulhattunk az elterjedési terület pontosításához is, hiszen ennek a fajnak eddig nem volt adata Dél-Ázsiából.

1.7.4 Negyedik tanulmány – A *Lyroderma lyra* (Chiroptera: Megadermatidae) alfajainak taxonómiai revíziója és elterjedésük újraértékelése

A *Lyroderma lyra* a Megadermatidae (álvampírok) család hat jelenleg ismert fájának egyike, amelynek két alfaját különítették el: a névadó *L. lyra lyra* alfaj főként Dél-Ázsiában fordul elő, míg a *L. lyra sinense* Dél-Kínában és Délkelet-Ázsiában található meg (Soisook és mtsai. 2015; Wilson és Mittermeier 2019; Singh és Sharma 2023), azonban még nem tisztázott a két alfaj elterjedésének pontos földrajzi határa. Korábbi vizsgálatok egyértelmű morfológiai különbségeket mutattak ki a két alfaj között (Csorba és Topál 1994), viszont ezek molekuláris módszerekkel történő alátámasztása eddig nem történt meg.

Kutatásunk célja a két alfaj taxonómiai státuszának felülvizsgálata volt integratív taxonómiai megközelítés alkalmazásával. Ennek érdekében részletes morfológiai elemzéseket és mitokondriális DNS-szekvencia vizsgálatokat végeztünk, a lehető legtöbb egyedet és mintavételi helyet bevonva, hogy tisztázzuk, indokolt-e a két alfaj faji rangra emelése.

1.7.5 Ötödik tanulmány – A taxonómia „szürke zónája” – a *Myotis sicarius* (Chiroptera: Vespertilionidae) példája

A délkelet-ázsiai denevérek szisztematikai feltárása során 2014-ben sikerült befogni egy egérfülű-denevér példányt egy vietnámi természetvédelmi területen, a laoszi határ közelében. Az egyed a *Myotis sicarius* fajhoz lehetett sorolni a morfológiai bélyegek alapján, amely fajt korábban csupán néhány előfordulási adat alapján ismertek, elsősorban Nepál és India hegyvidéki területeiről (Bates és Harrison 1997; Srinivasulu és Srinivasulu 2019). Mivel jelentős biogeográfiai akadályok nehezítik a faj terjedését, és a két ismert populáció között több, mint 1700 km távolság van, ez felveti a génáramlás korlátozottságának lehetőségét, ezért mindenképpen további vizsgálatokra volt szükség ennek megerősítésére (Slatkin 1985; Avise 2000; Castella és mtsai. 2008).

Kutatásunk egyik fő célja ennek a Vietnámban gyűjtött *Myotis sicarius* példánynak a morfológiai és genetikai vizsgálata volt, mitokondriális és nukleáris DNS-markerek használatával. Ezzel egyrészt szeretnénk volna megerősíteni a morfológiai bélyegek alapján történt fajazonosítást, másrészt feltárni a vietnámi példány és az eddig ismert, India és Nepál területéről leírt populációk közötti filogenetikai kapcsolatot.

A *Myotis* nemzetségre jellemző a kriptikus és pseudokriptikus fajok előfordulása, valamint a morfológiai és molekuláris filogenetikai eredmények közötti eltérés, ezért elengedhetetlen az integratív taxonómiai megközelítés alkalmazása (Ruedi és mtsai. 2015, 2021; Novaes és mtsai. 2022; Kruskop és mtsai. 2023). Mivel a *M. sicarius* morfológiai hasonlóságot mutat a *montivagus*-komplex több fájával, különösen a *M. indochinensis* és a *M. annectans*

taxonokkal (Son és mtsai. 2013), kutatásunk másik célja ezek morfológiai és genetikai eltéréseinek vizsgálata volt. Ezzel szemben azonban egy korábbi filogenetikai elemzés (Ruedi és mtsai. 2013) szerint a *M. sicarius* nem a *montivagus*-komplex tagjaival, hanem a *M. frater*, *M. bechsteinii* és *M. daubentonii* fajokkal alkot közös kládot, ami ellentmond a morfológiai hasonlóságok alapján feltételezett rokonsági viszonyoknak. Ezen túlmenően, a *Myotis annectans* intraspecifikus variabilitása, különösen a fogképlet eltérései (Topál 1970), további taxonómiai kérdéseket vetnek fel, amelyeket új nepáli és vietnámi minták vizsgálatával kívántunk tisztázni.

2 ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1 Első tanulmány – ChiroVox: a denevérfajok nyilvános adatbázisa

A ChiroVox egy nyilvánosan hozzáférhető adatbázisként jött létre, amely denevérek echolokációs és szociális hangfelvételeit tartalmazza. Az adatgyűjtés három fő forrásból történt: (1) a Southeast Asian Bat Conservation Research Unit (SEABCRU) Biodiversity Information Fund for Asia (BIFA) adatmobilizációs projektjéből, (2) a Magyar Természettudományi Múzeum (MTM) gyűjteményéből, valamint (3) egyéni kutatói hozzájárulásokból. Minden beküldött hangfelvétel keresztülment egy egységes minőségellenőrzési folyamaton, az adatok pontosságának biztosítása érdekében. A denevérek taxonómiai besorolását szakértők végezték, elsősorban Wilson és Mittermeier (2019), valamint szükség szerint Simmons és Cirranello (2020) taxonómiai rendszerét alkalmazva. Az egyes fajok azonosításának bizonyosságát egy 1-től 5-ig terjedő skálán értékeltük, ahol az 5-ös érték jelentette a legnagyobb bizonyosságot (pl. morfológiai vagy genetikai vizsgálat alapján). A szükséges genetikai vizsgálatokat (amennyiben rendelkezésünkre álltak szövetminták) a MTM Molekuláris Taxonómiai Laboratóriumában végeztük. A fajazonosításhoz bárkódolást használtunk, vagyis a denevérek mitokondriális genomjának a *COI* génjének szekvenciáját határoztuk meg.

A metaadatok a Darwin Core szabvány szerint kerültek formázásra az adatok globális biodiverzitási adatbázisokkal való kompatibilitása érdekében. Minden felvétel egyedi azonosítót (UID) kapott, mely szükség esetén összekapcsolható olyan külső adatbázisokkal, mint a Global Biodiversity Information Facility (GBIF), a National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank és a Barcode of Life Data System (BOLD). A legfontosabb metaadatok közé tartozott a denevérfaj neve, a hang típusa, a rögzítési módszer, a felvételi eszköz specifikációi és a földrajzi koordináták.

A felvételek és a hozzájuk kapcsolódó metaadatok egy strukturált SQL adatbázisban tárolódnak, amelyet dedikált webszerveren helyeztünk el. A weboldal újabb verzióját az OpenBioMaps platformon alapulva HTML, CSS és PHP használatával fejlesztettük, lehetővé téve a felvételek böngészését, keresését és letöltését a felhasználók számára. Az adatokat fajok,

földrajzi régiók és hozzájárulók (felvételt készítő)k) szerint kategorizáltuk, ezzel biztosítva az egyszerű hozzáférhetőséget és használhatóságot.

A hangfelvételek kétféle hozzáférési szint szerint érhetők el: (1) nyílt hozzáférésű felvételek, amelyek szabadon letölthetők Creative Commons licenc alatt, valamint (2) engedélyhez kötött felvételek, amelyekhez a metaadatok nyilvánosan elérhetők, de a letöltéshez az adatközlő engedélye szükséges. A felvételek kereskedelmi célú felhasználása korlátozott, hacsak a hozzájáruló kutató nem ad rá külön engedélyt.

2.2 Második tanulmány – A vietnámi denevérfauna akusztikus leírása

A vietnámi denevérek hangjainak minél alaposabb feltárása érdekében 2006 és 2023 között rögzített, Vietnám szinte teljes területéről, összesen 30 tartományból származó hangokat használtunk fel vizsgálatunkhoz. Magyar kutatók mellett helyi partnerek is részt vettek a terepi munkákban és a hangfelvételek készítésében. A denevérek befogásához függőhálót és/vagy húrscapdát használtunk, majd az állatokat szövetszakokban tartottuk a további vizsgálatokig. Ha a körülmények lehetővé tették, a lombkorona szintjébe is igyekeztünk hálókat kihelyezni. A befogott példányokat előzetesen meghatároztuk morfológiai jellegek alapján. A következő biotikai adatokat rögzítettük: nem, kor, alkarhossz, testtömeg. Amennyiben a példányt nem lehetett egyértelműen meghatározni, DNS bárkódolást és referencia-példányokkal történő összehasonlító morfológiai vizsgálatot alkalmaztunk. A bárkódolást a MTM Molekuláris Taxonómiai Laboratóriumában végeztük.

A denevérek hangjait különböző körülmények között rögzítettük: kézben, repsátorban, kézből elengedve vagy szabadon repülve. A repsátras felvételeknél megkülönböztettük a nyugalmi állapotban és repülés közben kibocsátott hangokat. A hangfelvételek rögzítéséhez különböző típusú detektorokat használtunk, mivel a mintavételezés hosszú időszakot ölelt fel, a technológia folyamatosan fejlődött és a választás attól is függött, hogy az adott kutatónak milyen eszköz állt rendelkezésére. Néhány régebbi felvétel a D240x (Pettersson Elektronik AB) vagy az Echo Meter Touch 1 (Wildlife Acoustics) eszközzel készült 256 kHz-es mintavételi frekvenciával (amely legfeljebb 128 kHz-ig rögzített), ezért az ezekkel az eszközökkel felvett, magas frekvenciájú hangokat kibocsátó fajok (pl. Kerivoulinae) adatait nem minden esetben tudtuk felhasználni. A legtöbb hangfelvétel azonban a D980, D1000x, M500 (Pettersson Elektronik AB), SM4BAT-FS (Wildlife Acoustics) detektorokkal és a PCTape rendszerrel (Tübingeni Egyetem) készült. A mintavételi frekvenciákat minden rögzítő eszköznél a lehető legmagasabbra állítottuk (legfeljebb 500 kHz-ig). Egyes esetekben ugyanattól az egyedtől több felvételt is készítettünk a legjobb minőség elérése érdekében.

A hangok elemzéséhez és méréséhez a nyílt hozzáférésű Sonic Visualiser (4.5.2.) szoftvert használtuk (Cannam és mtsai. 2010). Az adataink összehasonlíthatóságának érdekében standardizált módszereket alkalmaztunk. A spektrogramoknál a következő beállításokat használtuk: 512-es FFT (Fast Fourier Transformation) méret, 93,75%-os átfedés és Hann-ablak. Minden egyedi hangfelvételtől három egymást követő impulzust mértünk le. Ezeket a "tripletteket" a legjobb jel-zaj arányú (legalább 20 dB-lel a háttérzaj fölötti) szakaszokból választottuk ki. A szakirodalomban leggyakrabban használt, akár fajazonosításra is alkalmas paramétereket mértük le (Kingston és mtsai. 1999; Jones és mtsai. 2000; Papadatou és mtsai. 2008; Hughes és mtsai. 2011; Phauk és mtsai. 2013; Barataud 2015; Hackett és mtsai. 2017; Görföl és mtsai. 2020; López-Bosch és mtsai. 2021; Pham és mtsai. 2021; Zamora-Gutierrez és mtsai. 2021), mely általában nyolc paramétert jelentett, a hang típusától függően: maximális energiájú frekvencia (FmaxE, kHz), kezdő frekvencia (SF, kHz), záró frekvencia (EF, kHz), legmagasabb frekvencia (HF, kHz), legalacsonyabb frekvencia (LF, kHz), sávszélesség (BW, kHz), impulzus időtartama (D, ms), impulzusok közötti idő (IPI, ms). Az SF és EF értékeket vizuálisan határoztuk meg. Az időparamétereket (D és IPI) oszcillogramokból, az SF, EF, HF és LF értékeket szonogramokból, míg a BW és az FmaxE értékeket teljesítmény-spektrumokból nyertük ki.

A különböző hangtípusokhoz további jellemző paramétereket is mértünk. Például az FM-CF-FM (frekvenciamodulált - konstans frekvencia - frekvenciamodulált) és FM-QCF (frekvenciamodulált - kvázi konstans frekvencia) hangok esetében rögzítettük a CF és QCF komponensek időtartamát (DCF, DQCF, ms), valamint frekvenciáját (FCF, FQCF, kHz). A harmonikusok (az adott impulzus különböző, n-szeres frekvenciájú változatai) számát és a mért harmonikusokat is rögzítettük. Amennyiben több harmonikus esetében is lehetőség volt a mérésre, azokat is elemeztük, kivéve a Rhinolophidae, Hipposideridae (levélorrú-denevérek), Emballonuridae (szabadfarkú-denevérek) és Megadermatidae családok esetében, ahol mindig a második harmonikus tartalmazta a hang maximális energiáját. Azoknál a denevéreknél, amelyek széles frekvenciasávot átfogó hangokat adnak ki (például a *Myotis* fajok), ha az FmaxE nem volt egyértelmű, a kurzort a spektrum közepére helyeztük. A paraméterek átlagát és szórását minden faj esetében kiszámoltuk. Az összes felvétel és a hozzájuk tartozó metaadatok elérhetők a ChiroVox adatbázisban (www.chirovox.org) (Görföl és mtsai. 2022).

2.3 Harmadik tanulmány – A *Murina walstoni* (Chiroptera: Vespertilionidae) első előfordulása Délkelet-Ázsián kívül

Nepál denevérfaunája feltárásának érdekében a helyi kutatók rendszeres terepi mintavételeket végeznek az ország különböző régióiban. 2020 áprilisában a Tunibote településtől 2 km-re lévő erdős térségben végeztek mintavételezéseket. A felmérés során függönyhálót és

húrcspadát használtak. A befogott egyedek között volt egy csövesorrú-denevér példány, melynek terepen történő azonosítása nem volt lehetséges, ezért múzeumi gyűjteménybe került bizonyító példányként. A mintát a Tribhuvan Egyetem Zoológiai Tanszékének Múzeumában (CDZ) helyezték el. Az egyed külső, koponya- és fogazati méreteit digitális tolómérővel, 0,01 mm pontossággal rögzítettük.

A példányból mellizomszövetet vettünk, melyet etanolban konzerváltunk. A minta bárkódolása során kapott *COI* szekvenciát feltöltöttük az NCBI GenBank adatbázisába (PQ060030 azonosító), majd összehasonlítottuk az NCBI-ből letölthető rokon szekvenciákkal.

A DNS szekvenciák illesztését és a genetikai távolságok számítását a MEGA11 szoftverrel végeztük (Tamura és mtsai. 2021). Az evolúciós eltérések becsléséhez a Kimura 2-paraméteres modellt alkalmaztuk (Kimura 1980), ahol a pozíciók közötti variációt gamma-eloszlás modellezte. A filogenetikai fát IQ-TREE programmal (Minh és mtsai. 2020) állítottuk elő Maximum Likelihood (ML) módszerrel, a legjobb illeszkedési modellként a HKY+G+I (Hasegawa-Kishino-Yano + Gamma distributed With Invariant Sites) modellt alkalmazva, 1000 bootstrap ismétléssel.

2.4 Negyedik tanulmány – A *Lyroderma lyra* (Chiroptera: Megadermatidae) alfajainak taxonómiai revíziója és elterjedésük újraértékelése

A kutatás során 71 *L. lyra* és 11 *Megaderma spasma* példányt használtunk a morfológiai összehasonlításhoz, valamint részben a többváltozós statisztikai elemzésekhez. A *M. spasma* a Megadermatidae család egy másik gyakori faja, mely szintén széles körben elterjedt és szimpatikus fordul elő a *L. lyra*-val. A vizsgált példányok különböző múzeumi gyűjteményekből származtak, többek között Kínából, Magyarországról, az Egyesült Királyságból, Thaiföldről, Szlovéniából, Malajziából és Indiából.

A morfológiai elemzéshez kizárólag felnőtt példányokat használtunk, mely során egy külső (alkarhossz) és 13 koponya- és fogazati paramétert (Bates és Harrison 1997) vizsgáltunk. A külső bélyegeket a terepen rögzítettük, a belső koponya- és fogazati bélyegeket a preparálás után, digitális tolómérővel, mikroszkóp alatt mértük, 0,01 mm pontossággal. Emellett a hím példányok péniszcsont (baculum) preparálását és konzerválását is elvégeztük Friley (1947) módszere alapján. A péniszcsont morfológiai változatosságát közvetlen szelekció formálja, mivel fontos szerepet játszik a párzás során (Stockley 2012; Rakotondramanana és Goodman 2017). A felnőtt egyedek baculumának teljes hossza és formája határozóbélyegként használható a fajok elkülönítésére (Thomas 1915; Douangboubpha és mtsai. 2010; Vercillo és Ragni 2011; Soisook és mtsai. 2015; Srinivasulu és mtsai. 2020; Latorre 2023). A Megadermatidae család nemzetségei között jelentős baculum-morfológiai eltérések figyelhetők meg, ami alátámasztja, hogy ezek a bélyegek fontos szerepet játszanak a család rendszerezésében (Soisook és mtsai. 2015). A baculumot lerajzoltuk,

és digitális tolómérővel szintén lemértük mikroszkóp alatt. A nemek közötti különbségek vizsgálatára független mintás t-próbát és Mann-Whitney U-tesztet alkalmaztunk.

A többváltozós statisztikai elemzésekhez 58 példány adatait használtuk fel, amelyeken főkomponens-analízist (PCA) és lineáris diszkriminancia-analízist (LDA) végeztünk. Az adatok homogenitásának biztosítása érdekében logaritmikus transzformációt alkalmaztunk. Az elemzéseket az R 4.3.1. (R Core Team, 2024) statisztikai szoftver segítségével végeztük.

A genetikai vizsgálatok során a mitokondriális *COI* és *cytb* (citokróm-b) szekvenciákat elemeztük, melyeket különböző múzeumi példányok szövetmintáiból nyertünk ki. Az újonnan kapott szekvenciákat az NCBI GenBank adatbázisba töltöttük fel PQ615380–PQ615394 és PQ619736–PQ619752 azonosítókra, majd a szekvenciák összehasonlítását további referencia szekvenciák felhasználásával a MEGA7 szoftverben (Kumar és mtai. 2016) végeztük. Ennek során 43 *COI* és 14 *cytb* szekvenciát használtunk fel. A leszármazási kapcsolatok értékelésére ML filogenetikai elemzést alkalmaztunk, 1000 bootstrap ismétléssel. A genetikai távolságok számítását szintén a MEGA7 szoftverrel végeztük.

2.5 Ötödik tanulmány – A taxonómia „szürke zónája” – a *Myotis sicarius* (Chiroptera: Vespertilionidae) példája

A kutatás során egy 2014-ben, Vietnámban befogott kérdéses *Myotis* egyedét vizsgáltunk, illetve három új, 2016-ban, Nepálban befogott *M. sicarius* egyedét is bevontuk a vizsgálatokba. A vietnámi denevérből bizonyító példány is rendelkezésünkre állt, míg a három nepáli példány külső morfológiai vizsgálatok és szövetminta-vétel után elengedésre került.

A morfológiai elemzéshez a nepáli példány esetében külső (alkar), a vietnámi példány esetében pedig a külső és a koponya-fogazati méreteit is rögzítettük, digitális tolómérő segítségével, 0,1 és 0,01 mm pontossággal. Csak felnőtt egyedeket vizsgáltunk, amit az ujjpercek csontosodása alapján állapítottunk meg. A kapott méreteket összevetettük a faj típuspéldányával, valamint más, biztosan határozott nepáli példányokkal. Emellett, összehasonlító anyagként több, morfológiailag hasonló *Myotis* fajt is bevontunk vizsgálatainkba, kiemelten a morfológiailag hasonló *montivagus*-komplex tagjait (*M. annectans*, *M. indochinensis*). Az adatok feldolgozásához az R 4.2.1. (R Core Team, 2018) szoftvercsomagot használtuk.

A legtöbb ázsiai *Myotis* faj genetikai szekvenciája elérhető a GenBank adatbázisban, azonban ezek között inkonzisztenciák tapasztalhatóak, valószínűleg a példányok félrehatározásának következtében. Annak érdekében, hogy minél pontosabb filogenetikai adatokat kapjunk, két mitokondriális (*COI* és *cytb*) és egy nukleáris (*Rag2*) markert szekvenáltunk meg példányainkból. Elemzéseink második szakaszában három további nukleáris gén (*THY* - Thyrotropin, *PRKCI* - Protein kináz C Iota, *ABHD11* - Abhidroláz domént tartalmazó fehérje 11)

szekvenálását is elvégeztük annak érdekében, hogy megerősítsük a mitokondriális és *Rag2* alapú filogenetikai eredményeket. A laboratóriumi munkát a vietnámi minta esetében az MTM Molekuláris Taxonómiai Laboratóriumában, a nepáli minták esetében a Center for Molecular Dynamics Nepal laboratóriumában végeztük. A szekvenálást a Macrogen Europe, Maastricht (Hollandia) végezte. A kapott szekvenciákat feltöltöttük az NCBI GenBank adatbázisába (OR413179, OR413180, OR413539 - OR413554 azonosítók alatt), majd összehasonlítottuk ezeket az adatbázisból letölthető hasonló szekvenciákkal. A *COI*, *cytb* és *Rag2* szekvenciákat más *Myotis* fajokkal, valamint néhány külcsoportként használt nemzetséggel (*Kerivoula*, *Murina*, *Harpiocephalus*) együtt illesztettük (Ruedi és Mayer 2001; Kawai és mtsai. 2003; Stadelmann és mtsai. 2004a, 2004b; Jones és mtsai. 2006; Lack és mtsai. 2010; Ruedi és mtsai. 2012, 2013; Wang és mtsai. 2017) a MAFFT v.7.505 programmal (Katoh és Standley 2013). Külön filogenetikai fákat készítettünk a három génre a Bayesi inferencia módszerrel, MrBayes v.3.2.7a programmal (Ronquist és Huelsenbeck 2003), 10 millió generációig futtatva, minden ezredik generációt mintázva. A modell paramétereiket a MrModeltest2 v. 2.4 programmal határoztuk meg (Nylander 2004). A fákat iTOL v.3 segítségével jelenítettük meg (Letunic és Bork 2016). A páronkénti genetikai távolságokat Kimura 2-paraméteres modell (Kimura 1980) alapján számítottuk ki a MEGAX v.10.2.6 szoftverrel (Kumar és mtsai. 2018).

3 EREDMÉNYEK

3.1 Első tanulmány – ChiroVox: a denevérhangok nyilvános adatbázisa

A ChiroVox 2022-es indulása óta a világ legnagyobb nyílt hozzáférésű adatbázisává nőtte ki magát, amely denevérek echolokációs és szociális hangjait gyűjti össze globális léptékben. Az adatbázis jelenleg több, mint 250 fajtól származó mintegy 5800 hangfelvételt tartalmaz, 16 országot és négy kontinenst (Európa, Amerika, Ázsia, Afrika) lefedve. A hangfelvételek készítéséhez több, mint 50 kutató járult már hozzá. Minden felvételhez részletes metaadatok és UID tartozik, ami biztosítja az akusztikai elemzések és tudományos publikációk reprodukálhatóságát.

2024 végén elkészítettük a ChiroVox második verzióját (jelenleg teszt fázisban van), amely számos jelentős fejlesztést tartalmaz, hogy még jobban kiszolgálja a kutató közösség igényeit. Az új felhasználó-kezelési rendszer lehetővé teszi a regisztrált felhasználók számára, hogy nyomon kövessék saját hozzájárulásait, nagy adatállományokat töltsenek fel hatékonyan, valamint egyedileg szabályozzák felvételeik hozzáférhetőségét. A kibővített metainformációs lehetőségek révén a platform már különféle elemzési célokra is alkalmas, beleértve például az automata fajhatározó szoftverek fejlesztését. Újdonságként tömeges letöltési funkció is elérhető, amely jelentősen lerövidíti az adatok eléréséhez szükséges időt, valamint beépítettünk egy visszajelzési

rendszer is, ahol a felhasználók megjegyzéseket fűzhetnek a felvételekhez, ezzel is növelve az adatok megbízhatóságát. A ChiroVox emellett támogatja a GIS-alapú eszközöket, és lehetőséget biztosít egyedi formátumú adatletöltésekre, elősegítve az adatok más rendszerekkel való kompatibilitását és jelentések készítését.

A ChiroVox adatbázist a megjelenése óta számos tudományos közlemény idézte, különböző kutatási célokra (pl. Flanders és mtsai. 2022; Tanshi és mtsai. 2022; Alipek és mtsai. 2023; Fundel és mtsai. 2023; Poma-Urey és mtsai. 2023; Kolev és mtsai. 2024; Miller és mtsai. 2024). Az egyik legjelentősebb alkalmazási terület az automata fajazonosítás, ahol a referenciahangok lehetővé tették új gépi tanulási modellek betanítását és tesztelését (Fundel és mtsai. 2023).

3.2 Második tanulmány – A vietnámi denevérfauna akusztikus leírása

A kutatás során több, mint 3400 hangimpulzust elemeztünk manuálisan 1042 hangfelvételtől. Bizonyos fajok esetében a hang több harmonikusát is lemértük. A felvételek 87 olyan fajtól származnak, amelyeket terepen azonosítottunk morfológiai bélyegek alapján, illetve amelyeket szükség esetén megerősítettünk DNS-alapú vizsgálatokkal. Az állatok összesen nyolc családba tartozó 28 nemzetséget képviselnek. A vizsgált taxonok a Vietnámban előforduló, echolokációt használó denevérfajok 74%-át teszik ki, így a kutatás jelentős előrelépést jelent az ország – és egyben Délkelet-Ázsia – denevérfaunájának akusztikus karakterizálásában.

A tanulmányunkban rövid leírást adunk minden család hangparamétereiről, ismertetve az elemzett fajok hangjainak alapvető akusztikai jellemzőit. Összességében a vietnámi denevérfauna echolokációs hangjai jelentős akusztikus változatosságot mutatnak, ami összhangban áll a taxonómiai és ökológiai sokféleséggel. A vizsgált fajok különböző hangtípusokat alkalmaznak, a rövid, széles frekvenciasávot átfogó FM impulzusoktól a hosszú, állandó frekvenciájú CF, illetve kvázi konstans frekvenciájú QCF hangokig. Ezen paraméterek jól tükrözik az adott faj élőhely preferenciáit, tájékozódási stratégiáját és táplálkozási szokásait. A zárt erdőhöz alkalmazkodott, alacsonyan repülő fajok, mint a *Murina* és *Kerivoula* nemzetségek tagjai, jellemzően szélessávú, rövid FM hangtípusokat bocsátanak ki, amelyek maximum energiái gyakran 70-140 kHz között mozognak és rendkívül változatos formát mutatnak. E fajok hangjai gyakran gyenge intenzitásúak és alacsony amplitúdójúak, ami technikailag is kihívást jelent a rögzítésük során. Ezzel szemben a nyílt élőhelyeken aktív, nagyobb termetű fajok (pl. *Scotophilus* spp.) hosszabb, keskenyebb frekvenciasávot átfogó QCF típusú hangokat alkalmaznak. A Hipposideridae és Rhinolophidae családok CF típusú hangjai fajspecifikus frekvenciáik révén, bizonyos esetekben alkalmasak lehetnek akusztikus azonosításra. A legtöbb család esetében megfigyelhetőek voltak a rájuk jellemző, jól elkülöníthető hangtípusok, de a legnagyobb változatosságot a simaorrú-denevérek

családja mutatta, amelyen belül jelentős eltérések figyelhetők meg mind a hangok szerkezetében, mind a frekvenciatartományokban.

Ezek mellett külön figyelmet fordítottunk öt olyan fajra, amelyek echológiai hangjai most kerülnek első alkalommal tudományos közlésre. Ezek a fajok a *Glischropus bucephalus*, a *Kerivoula depressa*, a *Kerivoula dongduongana*, a *Myotis laniger* és a *Myotis sicarius*. Ezen fajok részletes akusztikai leírása hozzájárul az ázsiai denevérek hangalapú azonosításához és a régió biodiverzitásának pontosabb feltérképezéséhez.

A vizsgálat során minden családhoz részletes összefoglaló táblázatot is készítettünk, amelyek tartalmazzák az egyes fajok echológiai paramétereinek átlagértékeit, szórását és a lemért hangok számát. Emellett összehasonlító ábrákat is készítettünk, amelyeken minden vizsgált faj egy tipikus hangimpulzusa jelenik meg, vizuális segítséget nyújtva a fajok közötti különbségek megértéséhez. Az öt olyan faj esetében, amelyek hangjai most kerültek először közlésre, egy közös ábrát is bemutatunk, amelyen mindegyik fajtól látható egy-egy impulzussorozat.

3.3 Harmadik tanulmány – A *Murina walstoni* (Chiroptera: Vespertilionidae) első előfordulása Délkelet-Ázsián kívül

A Nepálban gyűjtött példány morfológiai jellemzői alapján közepes termetű csövesorrú-denevérnek bizonyult. Habár a háti szőrzete kissé világosabb árnyalatú a vietnámi és kambodzsai egyedek színétől, minden külső és koponya-fogazati bélyeg megegyezik a *Murina walstoni* típuspéldányának jellemzőivel.

A *COI* gén alapján a dél-ázsiai (nepáli) példány monofiletikus csoportot alkot a délkelet-ázsiai (vietnámi és laoszi) *M. walstoni* példányokkal, ami közeli rokonságra utal. A genetikai távolság a nepáli és laoszi példányok között 4,6–5,4%, a nepáli és a vietnámi példányok között 4,6%. Az elemzésbe bevontuk a morfológiailag és filogenetikailag közeli *M. suilla* fajt is, melynek genetikai távolsága a nepáli *M. walstoni* fajjal 12,2–12,8%. A vizsgálat eredményei tehát megerősítik, hogy a nepáli példány *Murina walstoni*-ként azonosítható, ezzel új elterjedési adatot szolgáltatva a faj számára. Ez különös jelentőséggel bír, mivel mintegy 2000 kilométerrel bővíti a faj areáját és jelenleg ez képviseli a *M. walstoni* legészakibb és legnyugatibb dokumentált előfordulását.

3.4 Negyedik tanulmány – A *Lyroderma lyra* (Chiroptera: Megadermatidae) alfajainak taxonómiai revíziója és elterjedésük újraértékelése

Az alkarhossz morfológiai vizsgálata során a páros mintás T-próba nem mutatott ki statisztikailag szignifikáns ($p=0,295$) különbséget a két alfaj, *L. l. sinense* ($67,76\pm 1,06$ mm) és *L. lyra lyra* ($67,30\pm 1,55$ mm) között. A 13 koponya-morfológiai bélyeg összehasonlításakor a Mann-

Whitney U-teszt szignifikáns nemi különbségeket mutatott ki mindkét alfaj esetében. Ugyanazon nemen belül a *L. l. sinense* koponyája átlagosan hosszabb és szélesebb volt, mint a *L. l. lyra*-é, bár a legtöbb mért érték átfedést mutatott egymással. Ugyanakkor, az interorbitális régió és a prenasális bemélyedés anatómiai felépítése egyértelműen eltért a két taxon között, Andersen és Wroughton (1907) megfigyeléseivel megegyezően.

A PCA elemzés alapján az első főkomponens (PC1) elsősorban a koponya, különösen a felső állcsont méretét reprezentálta és a teljes koponyaméret-variancia több, mint 93%-át fedte le. A PC1 tengely mentén a *Megaderma spasma* és a két *Lyroderma* alfaj (mind hímek, mind nőstények) között nem volt átfedés, viszont a PC2 tengely mentén minimális átfedés jelentkezett. A hímeknél és a nőstényeknél a faktorok súlyai azt mutatták, hogy a PC1-hez tartozó változók terhelési értékei nagyon hasonlóak voltak. A legfontosabb elkülönítő tényezők hímeknél a koponya és állcsont hosszához, valamint szélességéhez kapcsolódó paraméterek, nőstényeknél pedig főként a szélességi paraméterek voltak.

A baculum vizsgálata során mindkét alfajnál két vékony, pálcaszerű csontot találtunk, amelyek csak részben kapcsolódtak egymáshoz szalagokkal. A *L. l. sinense* példányaiban ezek a csontok hosszabbak (1,01 mm) voltak és egyenes lefutásúak, míg a *L. l. lyra* példányok esetében rövidebbek (0,69-0,72 mm) és jellegzetesen dorzoventrális irányban meghajlottak.

A filogenetikai elemzések során nyolc *L. l. sinense*, tíz *L. l. lyra* és egy *M. spasma* példányból származó új *COI* és *cytb* szekvenciát kaptunk. A referencia szekvenciákkal együtt az ML módszerrel készült filogenetikai fák mindkét gén esetében hasonló kapcsolatot mutattak, mely szerint a *L. l. sinense* és a *L. l. lyra* szoros rokonságban állnak egymással és testvérládat alkotnak. Ezzel szemben a *M. spasma* a Megadermatidae család más nemzetségeinek fajjaival került egy csoportba. Fontos megjegyezni, hogy a filogenetikai fa és az elágazási pontok statisztikai alátámasztottsága gyenge volt, így az eredmények óvatos interpretációt igényelnek. A két alfaj közötti átlagos genetikai távolság a *COI* gén esetében 12,61%, a *cytb* esetében 9,86% volt. Ezek az értékek jóval alacsonyabbak, mint a *Lyroderma* és a *Megaderma* nemzetségek közötti átlagos genetikai távolság (amely meghaladja a 17%-ot), ami alátámasztja a két *Lyroderma* alfaj közeli rokonságát, mely azonban meghaladja a szokásos alfaji elkülönülés mértékét.

3.5 Ötödik tanulmány – A taxonómia „szürke zónája” – a *Myotis sicarius* (Chiroptera: Vespertilionidae) példája

A vizsgálat során rögzített külső morfológiai bélyegek egyértelműen jellemzőek voltak a *M. sicarius* fajra és alapvetően megegyeztek a három nepáli, a vietnámi példány, valamint a típuspéldány esetében is. Egyetlen eltérésként megfigyelhető volt egy jól fejlett, világosabb színű bőrpárna a vietnámi egyed hüvelykujján. A koponya- és fogazati bélyegek vizsgálata alapján a *M.*

sicarius koponyája robusztusabbnak bizonyult a közel rokon *Myotis* fajokhoz képest és a fajra jellemző, tipikus eltérések egyértelműen kimutathatók voltak. A *M. sicarius* típuspéldány, valamint egy nepáli példány koponyája és fogazata minden lényeges részletében megegyezett a vietnámi példányéval. Összességében a himalájai és vietnámi példányok külső és koponya morfológiai méretei is összhangban voltak, jelentős különbséget csak a vietnámi példány keskenyebb AOB (szemüreg elülső része közötti távolság) régiója mutatott.

A filogenetikai elemzéseink a *COI* és *cytb* gének alapján megerősítették a morfológiai fajazonosítás eredményeit. Az újonnan vizsgált nepáli és vietnámi *M. sicarius* példányok, valamint a korábbi kutatásokból ismert nepáli és indiai egyedek (pl. Stadelmann és mtsai. 2004b; Chakravarty és mtsai. 2020) egy jól alátámasztott monofiletikus csoportot alkotnak (PP=1). Ez a csoport leginkább a *M. longicaudatus kaguyae*, *M. bechsteinii*, *M. frater* és *M. daubentonii* fajokkal mutatott közeli rokonságot, míg a *M. annectans*-al távolabbi kapcsolatot mutatott. A *M. sicarius* nepáli példányai között rendkívül alacsony volt a genetikai variabilitás (K2P távolság $\leq 0,53\%$), viszont a vietnámi példány 8,30–9,78% genetikai távolságot mutatott a nepáli példányokhoz képest. A *M. annectans* vizsgált példányai (köztük két vietnámi egyed) egy csoportot alkottak, szintén nagyon alacsony genetikai eltéréssel (K2P $\leq 0,60\%$).

A mitokondriális DNS markerek eredményeit megerősítette a nukleáris *Rag2* gén elemzése is, amely szintén jelentős genetikai távolságot mutatott a *M. sicarius* és *M. annectans* között (~1% K2P távolság), ami a *Myotis* fajok közötti minimális interspecifikus eltérésként értelmezhető (Ruedi és mtsai. 2013). A *M. annectans* csoporton belül alacsony genetikai diverzitást figyeltünk meg (K2P $\leq 0,44\%$). A nepáli és vietnámi *M. sicarius* példányok között ennél is alacsonyabb (K2P = 0,088%) genetikai eltérést találtunk, csak néhány heterozigóta pozícióval. Hasonlóan alacsony eltérést mutattak a három további nukleáris gén (*ABHD11*, *PRKCI*, *THY*) szekvenciái is a két vizsgált *M. sicarius* példány között.

4 KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

A denevérek diverzitásának és elterjedésének pontos megértése alapvető fontosságú mind taxonómiai, mind természetvédelmi szempontból. Az integratív taxonómia, az akusztikai vizsgálatok és a nyílt hozzáférésű adatbázisok kidolgozása és fejlesztése, mint modern kutatási módszerek, jelentősen hozzájárulnak a fajok pontos azonosításához, az elterjedési mintázatok feltárásához és a természetvédelmi stratégiák kidolgozásához. Jelen értekezés is ezen modern módszertani megközelítésekre épült és az egyes tanulmányok során következetesen alkalmaztuk az adott kutatási kérdéshez leginkább illeszkedő módszereket.

4.1 Bioakusztikai kutatások és online hangadatbázisok

A nyílt hozzáférésű online adatbázisok használata ma már szinte elengedhetetlen a modern zoológiai kutatásokban. Ezek az adatbázisok nemcsak a globális adatok gyors elérését és összehasonlíthatóságát teszik lehetővé, hanem alapvetően támogatják a taxonómiai revíziókat, elősegítik a természetvédelmi döntéshozatalt és biztosítják a kutatások megismételhetőségét is. Disszertációm egyik kiemelkedő eredménye a ChiroVox bioakusztikai adatbázis létrehozása, mely mára a világ legnagyobb online denevérhang gyűjteményévé nőtte ki magát, ami a világ minden tájáról fogad felvételeket. Jelenleg közel 5800 felvétel érhető el az adatbázisban, több, mint 250 fajtól, melyek jelentős része olyan egyedektől származik, amelyeket nagy bizonyossággal határoztak meg. Ez különösen fontos olyan régiókban, ahol magas a fajok diverzitása, viszont a faji szintű határozás speciális taxonómiai ismereteket igényel. A szabadon repülő denevérek azonosítása nagymértékben függhet a referenciafelvételek elkészítésének körülményeitől is. A felvételek mintegy 75%-a zárt térben (repsátorban) vagy kézben tartott egyedektől származik, mivel ez tette lehetővé a biztos fajazonosítást. Ezek között a Hipposideridae és a Rhinolophidae családok tagjai vannak túlsúlyban, amelyek esetében a környezettől függetlenül stabil a fő echolokációs paraméterek frekvenciája (pl. FCF). Ennek köszönhetően ezek a hangok referenciaanyagként is szolgálhatnak ismeretlen eredetű felvételek faji szintű meghatározásához. Ugyanakkor, több olyan faj felvétele is elérhető, melyek hangparaméterei erősen függenek a rögzítés körülményeitől (Kingston és mtsai. 2003; Siemers 2004; Russ 2012), így ezek használata során mindig figyelembe kell venni a kontextust. A jövőben célszerű lenne ösztönözni a kutatókat, hogy a befogott egyedek szabadon engedése előtt minél több hangfelvételt készítsenek és lehetőség szerint szövettani mintákat is vegyenek az állatoktól. Ezáltal olyan referenciafelvételek gyűlhetnek össze, amelyek még megbízhatóbban segítik a szabadon repülő denevérek faji szintű azonosítását. A ChiroVox adatbázis taxonómiai lefedettsége a Délkelet-Ázsiában előforduló közel 300 echolokáló denevérfaj csaknem felét érinti. Számos fajtól elsőként tartalmaz nyilvánosan elérhető hangfelvételeket, mint pl. *Aselliscus dongbacanus*, *Glischropus aquilus*, *Hipposideros kunzi*, *Kerivoula dongduongana*, *Tylonycteris tonkinensis* vagy a *Mirostrellus joffrei*. Ezekon kívül még formálisan le nem írt új fajok hangjai is megtalálhatóak benne (pl. *Phoniscus sp.*, *Submyotodon sp.*). Az adatbázis hozzájárulhat kevésbé ismert fajok azonosításához, elterjedési adatainak bővítéséhez, földrajzi variációk feltárásához és taxonómiai kérdések tisztázásához (Kingston és Rossiter 2004; Ith és mtsai. 2015; Tu és mtsai. 2017a). A ChiroVox különösen értékes lehet olyan kevésbé feltárt régiók – például Afrika, valamint Amerika és Dél-Ázsia trópusi területei – hanganyagainak befogadására, melyek jelenleg alulreprezentáltak a bioakusztikai adatbázisokban. Tudomásunk szerint a világ echolokáló denevérfajai közül több, mint 150 olyan faj szerepel az adatbázisunkban, amelyeket más online források egyelőre nem tartalmaznak. A

ChiroVox jövőbeni bővülése, különösen a denevércutató közösség aktív közreműködésével, megbízható forrásként szolgálhat majd a denevérek bioakusztikai kutatásához és monitorozásához.

Az online adatbázis létrehozása mellett kutatásaink során kiemelt figyelmet fordítottunk arra is, hogy a délkelet-ázsiai régió fajainak akusztikus sajátosságait részletesen feltárjuk és rendszerezünk. A denevérek akusztikus határozásának alapja, hogy egy adott területen ismert fajoktól megbízható referencia hangok álljanak rendelkezésre, amely figyelembe veszi a fajon belüli esetleges földrajzi eltéréseket is. Vietnám esetében már elérhetőek voltak bizonyos alapvető akusztikai adatok (pl. Furey és mtsai. 2009a), ugyanakkor korábban nem készült olyan átfogó tanulmány, amely ilyen nagyszámú, morfológiailag és/vagy genetikailag jól elkülöníthető fajt foglalt volna magába. Vizsgálatunk során a Vietnámban jelenleg ismert 118 echológáló denevérfaj közül 87 faj referenciahangjait elemeztük, így ez a munka a legátfogóbb bioakusztikai tanulmány az ázsiai denevérekkel kapcsolatban. Számos faj esetében sikerült elemeznünk nagy mennyiségű hangfelvételt, köztük olyan kevésbé ismert fajokét is, mint az *Aselliscus dongbacanus*, *Hypsugo cadornae*, *Kerivoula titania*, *Murina feae*, *Myotis alticraniatus* és *Myotis ater*. Ugyanakkor, néhány faj esetében (pl. *Hipposideros pratti*, *Miniopterus magnater*, *Miniopterus pusillus*, *Myotis altarium*) a vizsgált hangok száma korlátozott volt, így kellő óvatossággal kell értelmezni az ezeknél megfigyelt variabilitást. Ezek mellett tanulmányunk írja le öt faj echológációs hangját első alkalommal. Minden elemzett hangfelvétel elérhető a nyilvános ChiroVox adatbázisban (Görföl és mtsai. 2022), így a felvételek bármikor újraelemezhetők, további paraméterek mérhetők vagy akár új azonosítási módszerekkel is vizsgálhatók. A denevérek echológációs hangjainak részletes leírása hasznos eszköz a faunisztikai felmérésekben, ökológiai kutatásokban, taxonómiai vizsgálatokban, valamint természetes élőhelyeket érintő fejlesztések tervezésekor is (Furey és mtsai. 2009a; Barlow és mtsai. 2015; Stathopoulos és mtsai. 2018). Délkelet-Ázsiában például egyre több szélerőmű épül és a környezeti hatásvizsgálatok jó gyakorlatának részeként ajánlott a helyi denevércutató populációk alapadatainak felmérése a kivitelezés és üzemeltetés előtt (Frick és mtsai. 2017; Millon és mtsai. 2018). Mivel a szélerőműveket gyakran nyílt területeken létesítik, ahol a befogáson alapuló, hagyományos módszerek hatékonysága korlátozott, az akusztikus vizsgálatok fontos szerepet játszhatnak abban, hogy megbízható kiindulási adatokat szolgáltatassanak a helyi denevércutató közösségek hosszú távú monitorozásához (Voigt és mtsai. 2024). Az utóbbi években számos szoftvert fejlesztettek ki (pl. SonoChiro, Kaleidoscope, BatClassify), amelyek képesek automatikusan észlelni és határozni denevéreket hangfelvételek alapján, nagyméretű hangadatbázisokra támaszkodva. Bár ezek az eszközök jelentősen megkönnyítik a denevérek akusztikus adatainak feldolgozását, használatuk során körültekintés szükséges, még mérsékelt égövi régiókban is (Rydell és mtsai. 2017) és a nagy biodiverzitású területeken az azonosítás

pontossága még inkább kérdéses lehet. Tanulmányunk eredményei hozzájárulhatnak e korlátok leküzdéséhez, és segítséget nyújthatnak ezen szoftverek eredményeinek validálásában is.

4.2 A genetikai és morfológiai adatok integrációja

Bár a bioakusztikai adatbázisok kiemelkedő szerepet játszanak a fajok hangalapú azonosításában, a denevérkutatásban — és általában a zoológiai vizsgálatokban — a genetikai referencia-adatbázisok jelentősége sem hagyható figyelmen kívül. A GenBank világszerte elismert, nyílt hozzáférésű online referencia-adatbázis, mely genetikai szekvenciákat tartalmaz a Föld valamennyi élőlénycsoportjából. Genetikai vizsgálataink során feltöltöttünk minden újonnan előállított mitokondriális és nukleáris szekvenciát az adatbázisba. Ezzel elősegítettük a fajok molekuláris azonosítását, valamint lehetővé tettük más kutatók számára is az adatok szabad hozzáférését és felhasználását. Munkánk különösen hozzájárult a dél- és délkelet-ázsiai denevérek genetikai adatainak bővítéséhez és pontosításához, mivel ezen térség számos fajának genetikai adatai eddig hiányosak, vagy épp tévesek voltak. Fontos hangsúlyozni, hogy bár a GenBank egy alapvető referencia gyűjtemény, a benne található adatok nem mindig származnak megbízható forrásból, a feltöltések nem frissülnek rendszeresen, előfordulhatnak bennük hibák, ezért a pontos fajazonosítás érdekében különös körültekintésre és kritikus adatértékelésre van szükség az adatbázis használata közben.

A genetikai vizsgálatok különösen értékes eszközt jelentenek a morfológiailag hasonló, de genetikailag kisebb vagy nagyobb mértékben elkülönülő taxonómiai egységek azonosítására. Integrációjuk ezért elengedhetetlen a taxonómiai kutatásokban, legyen szó rejtett fajdiverzitás feltárásáról, taxonómiai státuszok újraértékeléséről vagy elterjedési mintázatok pontosításáról. Disszertációmban három tanulmány is foglalkozott ezzel a témával, amelyek mind eltérő eseteket vizsgáltak, és ennek megfelelően különböző módszertani megközelítéseket igényeltek. Minden esetben kritikusán értékeltük az alkalmazott módszerek eredményeit és azok korlátait.

A *Murina walstoni* esetében a vizsgált dél- és délkelet-ázsiai egyedek morfológiailag egységes képet mutatnak. Genetikai vizsgálataink alapjául a *COI* gén szekvenciáit vettük, mivel ez a marker széles körben elfogadott és alkalmazott a Murininae alcsalád filogenetikai vizsgálataiban (Li és mtsai. 2024). A *COI* gén alapján kb. 5% genetikai eltérés mutatható ki a különböző földrajzi populációk között. Ez a mértékű eltérés, a morfológiai hasonlóságokkal együtt, alátámasztja azt a feltételezést, hogy ezek az egyedek ugyanahhoz a fajhoz tartoznak. Ugyanakkor figyelemre méltó a kimutatott genetikai eltérés és különálló leszármazási vonalak jelenlétére utalhat a *M. walstoni* fajon belül. Noha ez az eredmény érdekes, egyelőre túl korai lenne egyértelmű taxonómiai következtetéseket levonni pusztán a *COI* gén adatok alapján. További vizsgálatok szükségesek ennek a hipotézisnek a megerősítéséhez és pontosításához, ideértve más

mitokondriális és nukleáris gének elemzését, valamint bioakusztikai vizsgálatokat is. A *M. walstoni* fajt eredetileg a kambodzsai Veun Sai védett erdőből írták le, és azóta csak néhány előfordulási adata volt Thaiföldről, Kambodzsából, Vietnámból és Laoszból (Csorba és mtsai. 2011; Francis és Eger 2012; Kruskop 2013; Son és mtsai. 2015; Soisook és mtsai. 2017; Csorba és mtsai. 2020). A jelen tanulmány tehát a faj legnyugatibb és legészakibb előfordulását dokumentálja, egyben az első dél-ázsiai adatot is közli (Francis és Eger 2012; Soisook és mtsai. 2013; Csorba és mtsai. 2020). Korábban a fajt száraz szubtrópusi lombhullató erdőkből jelezték (Kruskop 2013; Csorba és mtsai. 2020; Yu és mtsai. 2020), és ismert, hogy jobban tolerálja a bolygatott élőhelyeket, mint más *Murina* fajok (Francis és Eger 2012; Csorba és mtsai. 2020). Bár a jelenlegi nepáli előfordulás egy viszonylag jó állapotú, folyó menti szubtrópusi lombdöböl származik, a környező dombokat száraz erdők borítják, és a területet jelentős bolygatás érte tűzifa-kitermelés, takarmánygyűjtés, erdőtüzek és túllegeltetés miatt. A Walston csövesorrú-denevér IUCN (Természetvédelmi Világszövetség) természetvédelmi státusza jelenleg „Adathiányos” (Data Deficient, DD), mivel nagyon kevés információ áll rendelkezésre elterjedéséről, populációjának állapotáról, viselkedéséről, veszélyeztetettségéről és ökológiájáról (Csorba és mtsai. 2020). A jelen tanulmány új adatot szolgáltat a faj elterjedésére vonatkozóan, de nem ad egyértelmű válaszokat a védelmi helyzetével kapcsolatban, ezért nem tartjuk indokoltnak az IUCN besorolás megváltoztatását.

A *Lyroderma lyra* esetében a jelen tanulmány az első, amely a faj mindkét korábbi alfaját filogenetikai keretbe helyezte, és eddig a legszélesebb földrajzi mintavételt alkalmazta a „*sinense*” taxon esetében. Vizsgálataink során jelentős különbségeket találtunk a koponya- és fogazati bélyegek egyes mért értékeiben (PCA és LDA eredményei), valamint a péniszcsont méretében. A thaiföldi *Lyroderma* példány baculumának hossza megközelítőleg 1 mm volt (Soisook és mtsai. 2015), míg egy indiai példányé körülbelül 0,5 mm (Srinivasulu és mtsai. 2020), ami összhangban áll a jelen vizsgálatunk során mért értékekkel. Noha a két taxon baculumának szerkezete hasonló, a hosszúságban megfigyelt különbség alátámasztja azt a feltevést, hogy a *L. sinense* és a *L. lyra* két önálló, de közeli rokonságban álló faj. A *COI* és *cytb* szekvenciákon alapuló filogenetikai elemzések valamennyi *Lyroderma* mintát egyetlen kládba helyezték, amely testvérkládként viszonyul a család többi nemzetségéhez. Ez az eredmény összhangban áll korábbi filogenetikai tanulmányokkal, és alátámasztja a *Lyroderma* nemzetség érvényességét (Eick és mtsai. 2005; Kanuch és mtsai. 2015; Soisook és mtsai. 2015). A filogenetikai elemzések azt is kimutatták, hogy a *L. lyra* két független kládra oszlik. A *COI* génszakaszok közötti genetikai távolság *L. l. lyra* és *L. l. sinense* között meghaladta a 12%-ot, a *cytb* génszakaszok esetében pedig majdnem elérte a 10%-ot. Az általánosan elfogadott nézetekkel összhangban (Bradley és Baker 2001) ez a nagyságrendű genetikai távolság inkább faji szintű elkülönülésre, mint alfaji szintre utal. A jelen

tanulmány morfológiai, morfometriai és molekuláris elemzéseinek összhangban lévő eredményei erősen alátámasztják Andersen és Wroughton (1907) megállapítását, miszerint a *Lyroderma* nemzetség két fajt foglal magába. Ez az integratív megközelítés tehát egyértelmű bizonyítékot szolgáltat arra, hogy a két korábbi alfaj különálló fajokat képvisel: *L. lyra* és *L. sinense*. Tanulmányunk másik célja az volt, hogy pontosítsuk a *Lyroderma lyra* és *L. sinense* fajok földrajzi elterjedését. Ezt azonban megnehezítette, hogy egyes kulcsfontosságú területekről – például Pakisztánból és Afganisztánból – nem álltak rendelkezésre megfelelő összehasonlító múzeumi példányok vagy molekuláris adatok, ezért csupán a korábbi leírások kritikus értékelésére és alacsony felbontású fényképekre támaszkodtunk. Shahbaz és mtsai. (2020) Pakisztánból származó példányait morfológiai bélyegek alapján *L. lyra*-hoz soroltuk. Benda és Gaisler (2015) afganisztáni példányainak IOB (szemüregek közötti legkisebb távolság) -mérései (4,66–4,79 mm) szintén ezt támasztották alá. Eredményeik összhangban vannak a korábbi szerzők (Khajuria 1980; Corbet és Hill 1992; Bates és Harrison 1997; Srinivasulu és Srinivasulu 2012) azon következtetésével, hogy a legnyugatibb populációk az *L. lyra* fajhoz tartoznak. Eredményeinket tovább erősítik a brit Természettudományi Múzeumban őrzött mianmari példányok vizsgálata. Habár e példányok méretei meghaladják a Sinha (1980) által megadott *L. lyra* mérettartomány felső határát, a szemüreg közötti régió, az orrnyílás bemetszése és az interpterygoid régió morfológiája egyértelműen *L. lyra*-ként azonosítja őket. Eredményeink azt is alátámasztják, hogy a *Lyroderma* legnyugatibb és mianmari populációi az *L. lyra*-hoz tartoznak. Összefoglalva, a *L. sinense* Dél-Kínában, Thaiföldön, Laoszban, Vietnámban, Kambodzsában és Malajziában fordul elő, míg a *L. lyra* elterjedési területe Afganisztántól Mianmarig terjed. Mivel feltételezhető, hogy a *L. lyra* Kelet-Mianmarban is előfordul, a jövőbeli kutatások során célszerű lenne több mintát gyűjteni Mianmarból és a környező területekről annak érdekében, hogy pontosabban feltárjuk az ottani populációk filogenetikai viszonyait, és meghatározzuk a két faj elterjedésének határait.

A *Myotis sicarius* esetében kutatásunk a taxonómia úgynevezett „szürke zónájába” esett, ahol a fajhatárok pontos meghatározása igen komplex folyamat (Roux és mtsai. 2016; Zachos 2018). A *COI* génre alapozott genetikai vizsgálataink 8-10%-os eltérést mutattak a nepáli és az új vietnámi példányok között, mely érték hasonló a *Myotis* nemzetség több, hagyományosan elfogadott testvérfaj párhuzamosított példányai közötti eltérések mértékével (pl. *M. fimbriatus* vs. *M. pilosus*, *M. emarginatus* vs. *M. formosus*) (Ruedi és mtsai. 2013). A minták közötti nagy földrajzi távolság szintén két feltételezett, szaporodás szempontjából izolált taxonómiai egység létezésére utal, mivel korlátozhatja a génáramlást még a jó terjedőképességű denevérek esetében is. Ugyanakkor, a morfológián és nukleáris filogenetikán alapuló eredményeink nem támasztották alá egyértelműen a faj szétválasztásának szükségességét. A nukleáris gének alacsony variabilitása (0,088%) a lassabb evolúciós ütemmel magyarázható (Allio és mtsai. 2017) és a morfológiai változások

hiánya sem kizárt a fajképződés során, ahogyan azt más denevércsoportokban is kimutatták (Tu és mtsai. 2015; Kuo és mtsai. 2017; Tu és mtsai. 2017b; Tu és mtsai. 2018; Kruskop és mtsai. 2023). A *M. sicarius* esetében a kimutatott genetikai struktúra leginkább a nőstények helyhez kötöttségével (filopátia) és a hímek diszperziójával magyarázható (Funk és Omland 2003). Ezt a jelenséget már korábbi ökológiai vizsgálatok is igazolták számos denevérfaj, különösen a *Myotis* nemzetség esetében, ahol a nőstények hűségesek a nyári szülőkolóniákhoz és az őszi gyülekezőhelyekhez (Rivers és mtsai. 2005). Jelenlegi eredményeink alapján tehát nem támasztható alá a földrajzi populációk külön fajként történő kezelése. Ugyanakkor mindenképp szükség van további vizsgálatokra a nukleáris gének alacsony variabilitásának megerősítésére, valamint a vietnámi populáció pontosabb morfológiai jellemzésére, mivel eddig csupán egyetlen vietnámi példány ismert. Korábbi tanulmányokban a *M. sicarius*-t hegyvidéki erdőkből jelezték, elsősorban a Himalája déli lejtőiről, 950 és 1600 méteres tengerszint feletti magasságból (Srinivasulu és Srinivasulu 2019). Az új vietnámi előfordulási adatunk mintegy 1700 km-rel bővítette a faj ismert elterjedési területét délkelet felé, egészen a Vietnám és Laosz között húzódó határig. A vietnámi lelőhely összeköttetésben áll a Himalája déli részével a közöttük lévő hegyvonulatokon keresztül Észak-Vietnámban, Észak-Laoszban, Észak-Mianmarban és Dél-Kínában. A vietnámi példányt egy kevert örökzöld másodlagos erdő szélén fogtuk be, egy teraszos rizsföldekkel, patakokkal, kertekkel és Vin falu házaival szomszédos területen, 717 m tengerszint feletti magasságban. A mintavételi hely feletti terület azonban egészen a hegycsúcsig (kb. 1500 m t.sz.f. magasság.) emelkedik, és kevésbé bolygatott örökzöld erdők borítják. Adataink alapján arra következtetünk, hogy a faj alkalmazkodóképessége nagyobb lehet a korábban feltételezetténél és hogy az egyedek diszperzióját kevésbé befolyásolják a fizikai és ökológiai barrierék (Tu és mtsai. 2021). Az egyedek közötti génáramlás (különösen a hímek révén) valószínűleg hosszú távon is fennmaradt a Pleisztocén környezeti változások alatt, lehetővé téve a faj széleskörű elterjedését és generalista életmódjának kialakulását (Uhrin és mtsai. 2010; Hollander és mtsai. 2014; Tu és mtsai. 2021). A *M. sicarius* látszólagos ritkasága inkább a Mianmar, Laosz és Északkelet-India hiányos feltérképezettségéből fakadhat, így ezen régiókban várható további előfordulások feltárása. A jelenlegi tudományos ismeretek alapján javasoljuk, hogy a faj IUCN besorolása továbbra is az érvényben lévő „Sebezhető” (Vulnerable, VU) státusz maradjon. Ugyanakkor a jövőben, a régióban végzett intenzívebb kutatások és az előfordulási adatok gyarapodása esetén indokolt lehet a faj természetvédelmi státuszának újraértékelése. Tanulmányunk jó példája a taxonómiai „szürke zóna” problematikájára, és hangsúlyozza a sűrű földrajzi mintavételezés, a bizonyítópéldányok, valamint a többféle módszertani megközelítés (mitokondriális és nukleáris gének, morfológia) integrálásának szükségességét a pontos fajhatárok meghatározásához.

Összességében a genetikai, morfológiai és bioakusztikai adatok együttes értelmezése napjainkra a denevértaxonómia megkerülhetetlen alapjává vált. Az ebben a dolgozatban bemutatott vizsgálatok jól példázzák, hogy a faji hovatartozás értékelése, a rejtett diverzitás feltárása és az elterjedési mintázatok újraértelmezése csakis integratív megközelítéssel valósítható meg. A taxonómiai helyzet újragondolása nem pusztán elméleti kérdés, hanem közvetlen természetvédelmi következményekkel jár. Egy faj különválasztása vagy egy fajpár, csoport taxonómiai revíziója alapvetően befolyásolhatja annak természetvédelmi státuszát, különösen olyan biológiailag kiemelkedően gazdag, de adathiányos térségekben, mint a délkelet-ázsiai régió. E terület élővilága rendkívül sokszínű és sérülékeny, ezért kiemelt figyelmet érdemel a denevérfauna további kutatása.

5 ÖSSZEFOGLALÓ

A doktori értekezés célja a délkelet-ázsiai denevérfauna diverzitásának, taxonómiai összetettségének és elterjedési mintázatainak vizsgálata volt bizonyos taxonok esetében, különös tekintettel azokra a módszertani kihívásokra, amelyek a trópusi régiók rendkívüli fajgazdagságából és hiányos ismereteiből adódnak. A dolgozat öt tanulmányra épül, melyek közös alapját az integrált taxonómiai megközelítés adja, ötvözve a bioakusztikai, morfológiai és molekuláris genetikai adatokat.

A disszertáció egyik alapvető eredménye a ChiroVox nyílt hozzáférésű bioakusztikai adatbázis létrehozása és fejlesztése. A ChiroVox jelenleg a világ egyik legnagyobb, szabadon elérhető denevérhang-gyűjteménye, amely biztosan határozott egyedektől származó referenciafelvételeket tartalmaz és ezzel alapvető eszközzé vált a trópusi denevérek akusztikus kutatásában. Az adatbázis nem csak az egyes fajok azonosítását segíti elő, hanem hozzájárul a kutatások megismételhetőségéhez, a taxonómiai revíziókhoz és a természetvédelmi alkalmazásokhoz is.

A második tanulmány a vietnámi denevérek bioakusztikai jellemzését mutatja be, amely az eddigi egyik legátfogóbb ilyen jellegű vizsgálat Ázsiában. A kutatás során a Vietnámban előforduló echolokáló denevérfajok 74%-ának referenciahangjait elemeztük és öt faj esetében ezek először kerültek részletes leírásra. Az eredmények rámutattak arra, hogy az akusztikus adatok kulcsszerepet játszanak a fajok felismerésében, ugyanakkor hangsúlyozzák a lokálisan gyűjtött referenciahangok fontosságát a földrajzi variabilitás kezelése érdekében. Az ilyen adatbázisok alapvető háttérrel biztosítanak a nem invazív természetvédelmi felmérésekhez, valamint az automatikus fajazonosító rendszerek fejlesztéséhez és validálásához is.

A további három kutatás esettanulmányokon keresztül szemlélteti az integrált taxonómia gyakorlati alkalmazását. A *Murina walstoni* vizsgálata során a morfológiai egységesség és a *COI* gén alapján kimutatott, mérsékelt genetikai eltérés együttese új elterjedési adatot eredményezett Dél-Ázsiából, miközben felhívta a figyelmet az intraspecifikus struktúrák jelentőségére. A *Lyroderma lyra* esetében a morfológiai, morfometriai és molekuláris eredmények egybehangzóan alátámasztották a korábban alfajként kezelt taxonok faji rangra emelését, valamint lehetővé tették az elterjedési területek pontosítását. A *Myotis sicarius* példája pedig jól illusztrálja a taxonómia ún. „szürke zónáját”, ahol a nagy földrajzi távolság, a mitokondriális genetikai divergencia, a nukleáris markerek alacsony variabilitása és a morfológiai hasonlóság együttes értékelése rávilágít az eltérő adatforrások integrált és kritikus alkalmazásának szükségességére.

Összességében a disszertáció eredményei hozzájárulnak Délkelet-Ázsia denevérfaunájának pontosabb megismeréséhez és iránymutatást adnak a jövőbeli kutatások számára, amelyek kulcsszerepet játszhatnak a térség biológiai sokféleségének megőrzésében.

6 ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

Doktori munkám öt, egymáshoz szorosan kapcsolódó tanulmányra épül, amelyek a bioakusztikai adatbázis-építéstől a genetikai és morfológiai vizsgálatokig több modern módszertani megközelítést alkalmaztak. Az alábbiakban összefoglalom e kutatások főbb tudományos eredményeit.

Első tanulmány: ChiroVox: a denevérhangok nyilvános adatbázisa

A ChiroVox online, nyílt hozzáférésű denevérhang-adatbázis létrehozása és folyamatos fejlesztése a doktori munkám egyik fontos eredménye. Az adatbázis mára a világ legnagyobb, közösségi alapú denevérhang-gyűjteményévé vált, amely több mint 250 faj mintegy 5800 felvételét tartalmazza. Hozzájárul a fajok akusztikus azonosításához, különösen a trópusi régiók kevésbé ismert faunájának feltárásához.

Második tanulmány: A vietnámi denevérfauna akusztikus leírása

A második tanulmányban a Vietnámban előforduló közel 120 echolokáló denevérfaj közül 87 faj referenciahangjait elemeztük. Ez a legátfogóbb bioakusztikai tanulmány trópusi denevérekről, amely során öt faj echolokációs hangjai először kerültek részletes tudományos leírásra. Az összes hanganyag feltöltésre került a ChiroVox adatbázisba, így az eredmények más kutatók számára is szabadon hozzáférhetők és újraelemezhetők.

Harmadik tanulmány: A *Murina walstoni* (Chiroptera: Vespertilionidae) első előfordulása Délkelet-Ázsián kívül

Egy nepáli példány genetikai (*COI*) és morfológiai vizsgálatai megerősítették, hogy az eddig csak Délkelet-Ázsiából ismert *Murina walstoni* faj új előfordulását dokumentáltuk Dél-Ázsiában. Az elemzések 5%-os genetikai eltérést mutattak a két populáció között, ami bizonyos mértékű elkülönülést mutat, de a nagyfokú morfológiai hasonlóság miatt a nepáli példányokat is a *M. walstoni* fajba soroltuk. Ezzel az adattal a faj elterjedési területe mintegy 2000 km-rel bővült, elérve legészakibb és legnyugatibb pontját.

Negyedik tanulmány: A *Lyroderma lyra* (Chiroptera: Megadermatidae) alfajainak taxonómiai revíziója és elterjedésük újraértékelése

A negyedik tanulmányban *COI*, *cytb* és morfológiai adatok alapján sikerült bizonyítani, hogy a *Lyroderma lyra* korábban ismert két alfaja (*L. l. lyra* és *L. l. sinense*) valójában különálló fajokat képvisel. Eredményeink alapján pontosítani tudtuk e fajok földrajzi elterjedését is, és elvégeztük ezeknek a széles elterjedésű, viszonylag gyakori fajoknak a taxonómiai revízióját.

Ötödik tanulmány: A taxonómia „szürke zónája” – a *Myotis sicarius* (Chiroptera: Vespertilionidae) példája

A *Myotis sicarius* vietnámi és nepáli példányai közötti 8-10%-os mitokondriális eltérés, valamint a morfológiai és nukleáris gének közötti ellentmondásos eredmények jól illusztrálják a taxonómia ún. „szürke zónáját”. Bár az eltérések figyelemre méltók, jelenlegi adataink alapján nem indokolt külön fajként kezelni a távoli földrajzi populációkat. A vietnámi előfordulás a faj elterjedési területét 1700 km-rel bővítette, és rámutatott arra is, hogy a faj ökológiai tűrőképessége szélesebb lehet, mint korábban feltételezték.

7 IRODALOMJEGYZÉK

1. Acharya, P.R., Adhikari, H., Dahal, S., Thapa, A. & Thapa, S. (Szerk.) (2010). Bats of Nepal: A field guide. Small Mammals Conservation and Research Foundations (SMCRF). 114 p.
2. Acharya, P.R. & Ruedas, L.A. (2007). The bat fauna of Nepal: A current conspectus. Bat Net Newsletter. Newsletter of the Chiroptera Conservation and Information Network of South Asia CCINSA and the IUCN SSC Chiroptera Specialist Group of South Asia (CSGSA) 8: 16–19.
3. Alipek, S., Maelzer, M., Paumen, Y., Schauer-Weissahn, H. & Moll, J. (2023). An Efficient Neural Network Design Incorporating Autoencoders for the Classification of Bat Echolocation Sounds. *Animals* 13, 2560.
4. Allan, J., Watson, J., Di Marco, M., O’Bryan, C., Possingham, H., Atkinson, S., Venter, O. (2019). Hotspots of human impact on threatened terrestrial vertebrates. *PLOS Biology* 17, e3000158.
5. Allio, R., Donega, S., Galtier, N. & Nabholz, B. (2017). Large variation in the ratio of mitochondrial to nuclear mutation rate across animals: Implications for genetic diversity and the use of mitochondrial DNA as a molecular marker. *Molecular Biology and Evolution* 34: 2762–2772.
6. Andersen, K. & Wroughton, R.C. (1907). On the bats of the family Megadermatidae. *Annals and Magazine of Natural History* 19: 129–145.
7. Avise, J.C. (Szerk.) (2000). *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge, 464 p.
8. Baker, J.R. & Bradley, D.R. (2006). Speciation in Mammals and the Genetic Species Concept. *Journal of Mammalogy* 87, 643–662.
9. Barataud, M. (Szerk.) (2015). *Acoustic Ecology of European Bats. Species Identification and Studies of Their Habitats and Foraging Behaviour*. Biotope Editions, Mèze; National Museum of Natural History, Paris. 340 p.
10. Barclay, R.M., Fullard, J.H. & Jacobs, D.S. (1999). Variation in the echolocation calls of the hoary bat (*Lasiurus cinereus*): Influence of body size, habitat structure, and geographic location. *Canadian Journal of Zoology* 77, 530–534.
11. Barlow, K.E., Briggs, P., Haysom, K.A., Hutson, A.M., Lechiara, N.L., Racey, P.A., Walsh, A.L. & Langton, S.D. (2015). Citizen science reveals trends in bat populations: The national bat monitoring programme in Great Britain. *Biological Conservation* 182, 14–26.
12. Bates, P.J.J. & Harrison, D.L. (Szerk.) (1997). *Bats of the Indian Subcontinent*. Harrison Zoological Museum Publication, Sevenoaks, Kent, UK. 258 p.
13. Benda, P. & Gaisler, J. (2015). Bats (Mammalia: Chiroptera) of the Eastern Mediterranean and Middle East. Part 12. Bat fauna of Afghanistan: revision of distribution and taxonomy. *Acta Societatis Zoologicae Bohemicae* 79: 267–458.
14. Blaxter, M.L. (2004). The promise of a DNA taxonomy. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 359(1444), 669–679.

15. Blehert, D.S., Hicks, A.C., Behr, M., Meteyer, C.U., Berlowski-Zier, B.M., Buckles, E.L., Coleman, J.T., Darling, S.R., Gargas, A., Niver, R., Okoniewski, J.C., Rudd, R.J. & Stone, W.B. (2009). Bat white-nose syndrome: an emerging fungal pathogen? *Science* 323(5911):227.
16. Borissenko, A. V. & Kruskop, S.V. (Szerk.) (2003). *Bats of Vietnam and Adjacent Territories: An Identification Manual*. Russian Vietnamese Science and Technological Tropical Centre, and the Zoological Museum of Moscow. 300 p.
17. Bradley, R.D. & Baker, R.J. (2001). A test of the genetic species concept: Cytochrome-b Sequences and Mammals. *Journal of Mammalogy* 82(4): 960–973.
18. Brigham, R.M., Kalko, E.K.V., Jones, G., Parsons, S. & Limpens, H.J.G. (Szerk.) (2004). *A Bat Echolocation Research: Tools, Techniques and Analysis*. Bat Conservation International, Austin, Texas. 167 p.
19. Cannam, C., Landone, C. & Sandler, M. (2010). Sonic visualiser: An open source application for viewing, analysing, and annotating music audio files. In *Proceedings of the 18th ACM international conference on Multimedia* 1467–1468 (ACM, Firenze Italy).
20. Castella, V., Ruedi, M. & Excoffier, L. (2008). Contrasted patterns of mitochondrial and nuclear structure among nursery colonies of the bat *Myotis myotis*. *Journal of Evolutionary Biology* 14: 708–720.
21. Ceballos, G., Ehrlich, P., Barnosky, A., Garcia, A., Pringle, R., Palmer, T. (2015). Accelerated Modern Human-Induced Species Losses: Entering the Sixth Mass Extinction. *Science Advances* 1, e1400253.
22. Chakravarty, R., Ruedi, M. & Ishtiaq, F. (2020). A recent survey of bats with descriptions of echolocation calls and new records from the western Himalayan region of Uttarakhand India. *Acta Chiropterologica* 22, 197–224.
23. Clare, E.L., Lim, B.K., Engstrom, M.D., Eger, J.L. & Hebert, P.D.N. (2007). DNA barcoding of Neotropical bats: species identification and discovery within Guyana, *Molecular Ecology Notes* 7. 184-190.
24. Collen, A. (2012). *The evolution of echolocation in bats: a comparative approach*. Doctoral thesis. London:University College London.
25. Corbet, G.B. & Hill, J.E. (Szerk.) (1992). *The Mammals of the Indomalayan Region: A Systematic Review*. Oxford University Press, Oxford, UK. 496 p.
26. Csorba, G. (2011). A new species of *Glischropus* from the Indochinese subregion (Mammalia: Chiroptera: Vespertilionidae). *Zootaxa* 2925, 41–48.
27. Csorba, G., Chou, C.-H., Ruedi, M., Görföl, T., Motokawa, M., Wiantoro, S., Thong, V.D., Son, N.T., Lin, L.-K. & Furey, N. (2014). The reds and the yellows: a review of Asian Chrysopteron Jentink, 1910 (Chiroptera: Vespertilionidae: *Myotis*), *Journal of Mammalogy* 95. 663-678.
28. Csorba, G., Furey, N., & Görföl, T. (2020). *Murina walstoni*, The IUCN Red List of Threatened Species. e.T84562267A84562270. (Accessed 20 March 2025).

29. Csorba, G., Görföl, T., Wiantoro, S., Kingston, T., Bates, P.J.J. & Huang, J.C.-C. (2015). Thumb-pads up – a new species of thick-thumbed bat from Sumatra (Chiroptera: Vespertilionidae: *Glischropus*), *Zootaxa*, 3980. 267-278.
30. Csorba, G., Son, N.T., Ith, S. & Furey, N.M. (2011). Revealing cryptic bat diversity: three new *Murina* and redescription of *M. tubinaris* from Southeast Asia, *Journal of Mammalogy* 92. 891-904.
31. Csorba, G., Thong, V.D., Bates, P.J.J. & Furey, N.M. (2007). Description of a new species of *Murina* from Vietnam (Chiroptera: Vespertilionidae: Murininae). *Occasional Papers, Museum of Texas Tech University* 268, 1–10.
32. Csorba, G. & Topál, G. (1994). First record and taxonomic status of *Megaderma lyra* from Vietnam (Mammalia, Chiroptera). *Annales Historico-Naturales Musei Nationalis Hungarici* 86: 125–132.
33. Dahal, D.R., Thapa, S., Baral, S., Thapa, T.B., & Singh, N.B. (2022a). First record of East Asian tailless leaf-nosed bat (*Coelops frithii*) from Nepal and extension of its global range. *Mammalia* 86(5): 521–523.
34. Dahal, D.R., Thapa, S., Ghimire, R., Csorba, G., & Singh, N.B. (2022b). First records of the Hairy-winged bat (*Harpiocephalus harpia*) from Nepal. *Journal of Bat Research & Conservation* 15(1): 49-52.
35. Dahal, D.R., Thapa, S., & Singh, N.B. (2024a). Responses of insectivorous bats to climate change in Nepalese *Journal of Zoology* 323(1): 29–44.
36. Dahal, D.R., Thapa, S., & Singh, N.B. (2024b). Species diversity and elevational distribution of bats in Nepal. *Acta Chiropterologica* 26(1): 101–111.
37. Douangboubpha, B., Bumrungsri, S., Soisook, P., Satasook, C., Thomas, N.M. & Bates, P.J.J. (2010). A taxonomic review of the *Hipposideros bicolor* species complex and *H. pomona* (Chiroptera: Hipposideridae) in Thailand. *Acta Chiropterologica* 12(2): 415–438.
38. Eick, G.N., Jacobs, D.S. & Matthee, C.A. (2005). A nuclear DNA phylogenetic perspective on the evolution of echolocation and historical biogeography of extant bats (Chiroptera). *Molecular Biology and Evolution* 22(9): 1869–1886.
39. Flanders, J., Frick, W., Nziza, J., Nsengimana, O., Kaleme, P., Dusabe, M.C., Ndikubwimana, I., Twizeyimana, I., Kibiwot, S., Ntihemuka, P., Cheng, T., Muvunyi, R. & Webala, P. (2022). Rediscovery of the critically endangered Hill’s horseshoe bat (*Rhinolophus hilli*) and other new records of bat species in Rwanda. *Arpha Preprints*.
40. Francis, C.M. & Eger, J.L. (2012). A review of tube-nosed bats (*Murina*) from Laos with a description of two new species. *Acta Chiropterologica* 14, 15–38.
41. Francis, C.M., Borisenko, A.V., Ivanova, N.V., Eger, J.L., Lim, B.K., Guillen-Servent, A., Kruskop, S.V., Mackie, I. & Hebert, P.D. (2010). The role of DNA barcodes in understanding and conservation of mammal diversity in Southeast Asia, *PLoS ONE*, 5. e12575.
42. Frick, W.F. (2013). Acoustic monitoring of bats, considerations of options for long-term monitoring. *Therya* 4:6978.

43. Frick, W.F., Baerwald, E.F., Pollock, J.F., Barclay, R.M.R., Szymanski, J.A., Weller, T.J., Russell, A.L., Loeb, S.C., Medellin, R.A. & McGuire, L.P. (2017). Fatalities at wind turbines may threaten population viability of a migratory bat. *Biological Conservation* 209, 172–177.
44. Frick, W.F., Kingston, T., Flanders, J. (2020). A review of the major threats and challenges to global bat conservation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1469, 5–25.
45. Friley, C.E. (1947). Preparation and preservation of the baculum of mammals. *Journal of Mammalogy* 28(4): 395–397.
46. Fukui, D., Tu, V., Thanh, H., Arai, S., Harada, M., Csorba, G. & Son, N. (2020). First Record of the Genus *Plecotus* from Southeast Asia with Notes on the Taxonomy, Karyology and Echolocation Call of *P. homochrous* from Vietnam. *Acta Chiropterologica* 22, 57–74.
47. Fundel, F., Braun, D. & Gottwald, S. (2023). Automatic bat call classification using transformer networks. *Ecological Informatics* 78, 102288.
48. Funk, D.J. & Omland, K.E. (2003). Species-level paraphyly and polyphyly: Frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 34: 397–423.
49. Furey, N.M., Mackie, I.J. & Racey, P. (2009a). A. The role of ultrasonic bat detectors in improving inventory and monitoring surveys in Vietnamese karst bat assemblages. *Current Zoology* 55, 327–341.
50. Furey, N.M., Mackie, I.J. & Racey, P.A. (2010). Bat diversity in Vietnamese limestone karst areas and the implications of forest degradation. *Biodiversity and Conservation* 19, 1821–1838.
51. Furey, N.M., Thong, V.D., Bates, P.J.J. & Csorba, G. (2009b). Description of a new species belonging to the *Murina* ‘*suilla*’-group (Chiroptera: Vespertilionidae: Murinae) from North Vietnam. *Acta Chiropterologica* 11, 225–236.
52. Gibb, R., Browning, E., Glover-Kapfer, P. & Jones, K.E. (2019). Emerging opportunities and challenges for passive acoustics in ecological assessment and monitoring. *Methods in Ecology and Evolution* 10:169185.
53. Goerlitz, H.R. (2018). Weather conditions determine attenuation and speed of sound: environmental limitations for monitoring and analyzing bat echolocation. *Ecology and Evolution* 8:5090–5100.
54. Görföl, T., Csorba, G., Eger, J.L., Son, N.T. & Francis, C.M. (2014). Canines make the difference: a new species of *Hypsugo* (Chiroptera: Vespertilionidae) from Laos and Vietnam, *Zootaxa*, 3887. 239-250.
55. Görföl, T., Kruskop, S.V., Tu, V.T., Estók, P., Son, N.T. & Csorba, G. (2020). A new genus of vespertilionid bat: the end of a long journey for Joffre’s Pipistrelle (Chiroptera: Vespertilionidae). *Journal of Mammalogy* 101, 331–348.
56. Görföl, T., Huang, J.C.-C., Csorba, G., Győrössy, D., Estók, P., Kingston, T., Szabadi, K.L., McArthur, E., Senawi, J., Furey, N.M., Tu, V.T., Thong, V.D., Khan, F.A.A., Jinggong, E.R., Donnelly, M., Kumaran, J.V., Liu, J.-N., Chen, S.-F., Tuanmu, M.-N., Ho, Y.-Y., Chang, H.-C.,

- Elias, N.-A., Abdullah, N.-I., Lim, L.-S., Squire, C.D. & Zsebök, S. (2022). ChiroVox: a public library of bat calls. *PeerJ* 10, e12445.
57. Györössy, D., Csorba, G., Szabadi, K.L., Estók, P., Tu, V.T., Thong, V.D., Furey, N.M., Huang, J.C.-C., Tuanmu, M.-N., Fukui, D., Zsebök, S., Görföl, T. (2024). The calls of Vietnamese bats: a major step toward the acoustic characterization of Asian bats. *Scientific Reports* 14, 23335.
58. Hackett, T.D., Holderied, M.W. & Korine, C. (2017). Echolocation call description of 15 species of Middle-Eastern desert dwelling insectivorous bats. *Bioacoustics* 26:217–235.
59. Hassanin, A., Colombo, R., Tungaluna, G.-C., Merle, M., Tu, V., Görföl, T., Akawa, P., Csorba, G., Kearney, T., Monadjem, A., Ing, R. (2017). Multilocus phylogeny and species delimitation within the genus *Glauconycteris* (Chiroptera, Vespertilionidae), with the description of a new bat species from the Tshopo Province of the Democratic Republic of the Congo. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 56, 1–22.
60. Hauser, C.L. (2009). The debate about the biological species concept - a review. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 25 (4), 241-257.
61. Hebert, P.D.N. & Gregory, T.R. (2005). The Promise of DNA Barcoding for Taxonomy. *Systematic Biology*, 54(5), 852–859.
62. Hollander, J., Verzijden, M., Svensson, E. & Brönmark, C. (2014). Dispersal and phenotypic plasticity. In: Hansson, L.-A. & Åkesson, S. (Szerk.) *Animal Movement Across Scales*. Oxford University Press, Oxford, 110–125.
63. Hughes, A.C., Satasook, C., Bates, P.J.J., Soisook, P., Sritongchuay, T., Jones, G. & Bumrungsri, S. (2011). Using echolocation calls to identify Thai bat species: Vespertilionidae, Emballonuridae, Nycteridae and Megadermatidae. *Acta Chiropterologica* 13:447–455.
64. Ith, S., Bumrungsri, S., Furey, N.M., Bates, P.J., Wonglapsuwan, M., Khan, F.A.A., Thong, V.D., Soisook, P., Satasook, C. & Thomas, N.M. (2015). Taxonomic implications of geographical variation in *Rhinolophus affinis* (Chiroptera: Rhinolophidae) in mainland Southeast Asia. *Zoological Studies* 54:31.
65. Jones, G. & Holderied, M.W. (2007). Bat echolocation calls: Adaptation and convergent evolution. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 274, 905–912.
66. Jones, G., Parsons, S., Zhang, S.Y., Stadelmann, B., Benda, P. & Ruedi, M. (2006). Echolocation calls, wing shape, diet and phylogenetic diagnosis of the endemic Chinese bat *Myotis pequinus*. *Acta Chiropterologica* 8: 451–463.
67. Jones, G. & Teeling, E.C. (2006). The evolution of echolocation in bats. *Trends in Ecology & Evolution* 21, 149–156.
68. Jones, G., Vaughan, N. & Parsons, S. (2000). Acoustic identification of bats from directly sampled and time expanded recordings of vocalizations. *Acta Chiropterologica* 2, 155–170.
69. Kanuch, P., Aghova, T., Meheretu, Y., Šumbera, R. & Bryja, J. (2015). New discoveries on the ecology and echolocation of the heart-nosed bat *Cardioderma cor* with a contribution to the phylogeny of Megadermatidae. *African Zoology* 50(1): 1–5.

70. Karine, C. & Kalko, E.K.V. (2001). Toward a global bat-signal database. *IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine* 20:81–85.
71. Katoh, K. & Standley, D.M. (2013). MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* 30: 772–780.
72. Kawai, K., Nikaido, M., Harada, M., Matsumura, S., Lin, L.K., Wu, Y., Hasegawa, M. & Okada, N. (2003). The status of the Japanese and East Asian bats of the genus *Myotis* (Vespertilionidae) based on mitochondrial sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 28: 297–307.
73. Khajuria, H. (1980). Taxonomical and ecological studies on the bats of Jabalpur Dist. Madhya Pradesh, India (families Megadermatidae, Rhinolophidae and Vespertilionidae). *Records of the Zoological Survey of India, Occasional Paper* 19: 1–69.
74. Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequence. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111–120.
75. Kingston, T. (2010). Research priorities for bat conservation in Southeast Asia: A consensus approach. *Biodiversity Conservation* 19, 471–484.
76. Kingston, T. (2013). Response of bat diversity to forest disturbance in Southeast Asia: Insights from long-term research in Malaysia. In: Adams, R.A. & Pedersen, S.C. (Szerk.) *Bat Evolution, Ecology, and Conservation*. Springer, New York, 169–185.
77. Kingston, T., Jones, G., Akbar, Z. & Kunz, T. H. (1999). Echolocation signal design in Kerivoulinae and Murininae (Chiroptera: Vespertilionidae) from Malaysia. *Journal of Zoology* 249, 359–374.
78. Kingston, T., Jones, G., Akbar, Z. & Kunz, T.H. (2003). Alternation of echolocation calls in 5 Species of aerial-feeding insectivorous bats from Malaysia. *Journal of Mammalogy* 84:205215.
79. Kingston, T. & Rossiter, S.J. (2004). Harmonic-hopping in Wallacea's bats. *Nature* 429:654657.
80. Kolev, M., Acosta-Pankov, I., Toshkova, N. & Deleva, S. (2024). Acoustic study of urban bat diversity in Veliko Tarnovo, Bulgaria. *Historia Naturalis Bulgarica* 46, 273–284.
81. Kruskop, S.V. (2013). *Bats of Vietnam: Checklist and an identification manual*. Russian Academy of Sciences, Moscow. 316 p.
82. Kruskop, S., Artyushin, I. (2021). Chiropteran (Chiroptera; Mammalia) taxonomy in light of modern methods and approaches. *Russian Journal of Theriology* 20, 111–128.
83. Kruskop, S.V., Solovyeva, E.N., Dudorova, A.V. & Artyushin, I.V. (2023). Same but different: Towards taxonomic status of *Myotis ater* (Chiroptera:Vespertilionidae) from the mainland Asia. *Mammalia* 87: 527–538.
84. Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35: 1547–1549.
85. Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33(7): 1870–1874.
86. Kunz, T.H., Braun de Torrez, E., Bauer, D., Lobova, T. & Fleming, T. H. (2011). Ecosystem services provided by bats. *Annales of the New York Academy of Sciences* 1223: 1–38.

87. Kuo, H.-C., Soisook, P., Ho, Y.-Y., Csorba, G., Wang, C.-N. & Rossiter, S.J. (2017). A taxonomic revision of the *Kerivoula hardwickii* complex (Chiroptera: Vespertilionidae) with the description of a new species. *Acta Chiropterologica* 19: 19–39.
88. Kusuminda, T., Mannakkara, A., Ukuwela, K.D.B., Kruskop, S.V., Amarasinghe, C.J., Saikia, U., Venugopal, P., Karunarathna, M., Gamage, R., Ruedi, M., Csorba, G., Yapa, W.B., Patterson, B.D. (2022). DNA barcoding and morphological analyses reveal a cryptic species of *Miniopterus* from India and Sri Lanka. *Acta Chiropterologica* 24, 1–17.
89. Lack, J.B., Roehrs, Z.P., Stanley, C.E., Ruedi, M. & van den Bussche, R.A. (2010). Molecular phylogenetics of *Myotis* indicate familial-level divergence for the genus *Cistugo* (Chiroptera). *Journal of Mammalogy* 91: 976–992.
90. Lane, D.J.W., Kingston, T. & Lee, B.P.Y.H. (2006). Dramatic decline in bat species richness in Singapore, with implications for Southeast Asia. *Biological Conservation* 131, 584–593.
91. Latorre, D.V.D. (2023). Fossil bacula of five species of Borophaginae (Family: Canidae): Implications for their reproductive biology. *PLOS ONE* 18(1): e0280327.
92. Letunic, I. & Bork, P. (2016). Interactive tree of life (iTOL) v3: An online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Research* 44: 242–245.
93. Li, S., Mou, X., Li, M., Li, F., Li, M., Li, B., Li, M., Luo, X., Csorba, G. & Kuo, H. (2024). New records of *Harpiola isodon* (Chiroptera, Vespertilionidae) from the Chinese mainland. *Biodiversity Data Journal* 12: 1–13.
94. López-Bosch, D., Huang, J.C.-C., Wang, Y., Palmeirim, A., Gibson, L. & Lopez-Baucells, A., (2021). Bat echolocation in continental China: a systematic review and first acoustic identification key for the country. *Mammal Research* 66.
95. Mace, G.M. (2004). The role of taxonomy in species conservation. *Philosophical Transactions of the Royal Society London. Series B: Biological Sciences* 359, 711–719.
96. Mao, X., He, G., Hua, P., Jones, G., Zhang, S., Rossiter, S.J. (2013). Historical introgression and the persistence of ghost alleles in the intermediate horseshoe bat (*Rhinolophus affinis*). *Molecular Ecology* 22, 1035–1050.
97. Mayer, F., Dietz, C., Kiefer, A. (2007). Molecular species identification boosts bat diversity. *Frontiers in zoology* 4, 4.
98. McArthur, E. & Khan, F. A. A. (2021). Towards a regional call library: Classifying calls of a species-rich bat assemblage in a Bornean karst rainforest. *Barbastella* 14, 95–117.
99. Miller, B., Ochoa G., J., García, F. & O’Farrell, M. (2024). Distribution of Ghost Bats of the Genus *Diclidurus* Wied-Neuwied 1820 (Chiroptera: Emballonuridae) in Venezuela, with a Review of Their Vocal Signatures. *Acta Chiropterologica* 25.
100. Millon, L., Colin, C., Brescia, F. & Kerbiriou, C. (2018). Wind turbines impact bat activity, leading to high losses of habitat use in a biodiversity hotspot. *Ecological Engineering* 112, 51–54.
101. Minh, B.Q., Schmidt, H.A., Chernomor, O., Schrempf, D., Woodhams, M.D., von Haeseler, A. & Lanfear, R. (2020). IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. *Molecular Biology and Evolution* 37, 1530–1534.

102. Monadjem, A., Shapiro, J.T., Mtsetfwa, F., Reside, A.E. & McCleery, R.A. (2017). Acoustic call library and detection distances for bats of Swaziland. *Acta Chiropterologica* 19:175–187.
103. Mora, C., Tittensor, D.P., Adl, S., Simpson, A.G.B., Worm, B. (2011). How many species are there on Earth and in the Ocean? *PLOS Biology* 9, e1001127.
104. Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Da Fonseca, G.A.B. & Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403, 853–858.
105. Novaes, R.L.M., Cláudio, V.C., Díaz, M.M., Wilson, D.E., Weksler, M. & Moratelli, R. (2022). Argentinean *Myotis* (Chiroptera, Vespertilionidae), including the description of a new species from the Yungas. *Vertebrate Zoology* 72: 1187–1216.
106. Novaes, R.L.M., Cláudio, V.C., Moratelli, R. (2023). The (integrative) taxonomy driving conservation of cryptic species: an example of Neotropical *Myotis*. *Therya* 14, 313–317.
107. Nylander, J.A.A. (2004). MrModeltest v2. Program distributed by the author.
108. O’Farrell, M.J., Corben, C. & Gannon, W. (2000). Geographic variation in the echolocation calls of the hoary bat (*Lasiurus cinereus*). *Acta Chiropterologica* 2, 185–196.
109. Papadatou, E., Butlin, R.K. & Altringham, J.D. (2008). Identification of bat species in Greece from their echolocation calls. *Acta Chiropterologica* 10, 127–143.
110. Parsons, S. & Jones, G. (2000). Acoustic identification of twelve species of echolocating bat by discriminant function analysis and artificial neural networks. *Journal of Experimental Biology* 203, 2641–2656.
111. Pfalzer, G. & Kusch, J. (2003). Structure and variability of bat social calls: Implications for specificity and individual recognition. *Journal of Zoology* 261, 21–33.
112. Pham, L.K., Tran, B.V., Le, Q.T., Nguyen, T.T. & Voigt, C.C. (2021). Description of echolocation call parameters for urban bats in Vietnam as a step towards a more integrated acoustic monitoring of urban wildlife in Southeast Asia. *Diversity* 13, 18.
113. Phauk, S., Sarith, P. & Furey, N.M. (2013). Cambodian bat echolocation: A first description of assemblage call parameters and assessment of their utility for species identification. *Cambodian Journal of Natural History* 2013, 16–26.
114. Poma-Urey, J.L., Acosta, S.L.H., Rivero, K., Hidalgo-Cossio, M., Hingst-Zaher, E., Gualda-Barros, J., Natividade, B.D. da, Barboza-Marquez, K., Ramírez-Chaves, H.E., Salazar-Bravo, J., Ochoa, J.G. (2023). Taxonomic revision and additional comments of some bats (Mammalia, Chiroptera) reported from Bolivia, with an updated checklist based on voucher material with verified identities. *Check List* 19, 409–427.
115. Rai, V., Thapa, S., Chalise, P. & Shah, K. B. (2021). Record of bats and their echolocation calls from southern Dolakha, central Nepal. *Mammalia* 85, 557–567.
116. Rakotondramanana, C.F. & Goodman, S.M. (2017). A review of the bacular morphology of Malagasy bats. *Acta Chiropterologica* 19(1): 51–70.
117. Raman, S. & Hughes, A. C. Echobank for the bats of Western Ghats biodiversity hotspot. *Acta Chiropterologica* 22, 349–364 (2021).

118. R Core Team (2018) A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available at: <https://www.R-project.org/>.
119. R Core Team (2024). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available at: <https://www.R-project.org/>.
120. Rivers, N.M., Butlin, R.K. & Altringham, J.D. (2005). Genetic population structure of Natterer's bats explained by mating at swarming sites and philopatry. *Molecular Ecology* 14: 4299–4312.
121. Ronquist, F. & Huelsenbeck, J.P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572–1574.
122. Roux, C., Fraïsse, C., Romiguier, J., Anciaux, Y., Galtier, N. & Bierne, N. (2016). Shedding light on the grey zone of speciation along a continuum of genomic divergence. *PLoS Biology* 14: e2000234.
123. Ruedi, M., Biswas, J. & Csorba, G. (2012). Bats from the wet: Two new species of tube-nosed bats (Chiroptera: Vespertilionidae) from Meghalaya, India. *Revue Suisse de Zoologie* 119: 111–135.
124. Ruedi, M., Csorba, G., Lin, L.-K. & Chou, C.-H. (2015). Molecular phylogeny and morphological revision of *Myotis* bats (Chiroptera: Vespertilionidae) from Taiwan and adjacent China. *Zootaxa* 3920, 301–342.
125. Ruedi, M. & Mayer, F. (2001). Molecular systematics of bats of the genus *Myotis* (Vespertilionidae) suggests deterministic ecomorphological convergences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 21: 436–448.
126. Ruedi, M., Saikia, U., Thabah, A., Görföl, T., Thapa, S. & Csorba, G. (2021). Molecular and morphological revision of small Myotinae from the Himalayas shed new light on the poorly known genus *Submyotodon* (Chiroptera: Vespertilionidae). *Mammalian Biology* 101, 465–480.
127. Ruedi, M., Stadelmann, B., Gager, Y., Douzery, E.J.P., Francis, C.M., Lin, L.K., Guillén-Servent, A. & Cibois, A. (2013). Molecular phylogenetic reconstructions identify East Asia as the cradle for the evolution of the cosmopolitan genus *Myotis* (Mammalia, Chiroptera). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 69: 437–449.
128. Russ, J. (2012). *British bat calls: a guide to species identification*. Exeter: Pelagic Publishing.
129. Russo, D. & Ancillotto, L. (2015). Sensitivity of bats to urbanization: a review. – *Mammalian Biology* 80: 205–212.
130. Russo, D., Ancillotto, L. & Jones, G. (2018). Bats are still not birds in the digital era: echolocation call variation and why it matters for bat species identification. *Canadian Journal of Zoology* 96:63–78.
131. Russo, D. & Jones, G. (2002). Identification of twenty-two bat species (Mammalia: Chiroptera) from Italy by analysis of time-expanded recordings of echolocation calls. *Journal of Zoology* 258, 91–103.
132. Russo, D., Voigt, C.C. (2016). The use of automated identification of bat echolocation calls in acoustic monitoring: a cautionary note for a sound analysis. *Ecological Indicators* 66:598–602.

133. Rydell, J., Nyman, S., Eklöf, J., Jones, G. & Russo, D. (2017). Testing the performances of automated identification of bat echolocation calls: A request for prudence. *Ecological Indicators* 78:416–420.
134. Schnitzler, H.-U., Moss, C.F. & Denzinger, A. (2003). From spatial orientation to food acquisition in echolocating bats. *Trends in Ecology & Evolution* 18, 386–394.
135. Shahbaz, M., Ullah, H., Khan, W., Javid, A., Attaullah, Rasheed, S.B., Anwar, K., Ullah, A., Zeb, J., Khan, M.I., Ahmad, Q.A., Khan, B.T., Khan, M., Ullah, I., Farooq, Z. & Hussain, A. (2020). Morphometrics of the Indian false vampire bat (*Megaderma lyra*) from district Jhelum, Pakistan. *Brazilian Journal of Biology* 81(4): 934–939.
136. Sharma, B., Chakravarty, R. & Acharya, P.R. (2021). The first record of European free tailed bat, *Tadarida teniotis* Rafinesque, 1814, and note on probable elevational movement from Nepal. *Journal of Asia-Pacific Biodiversity* 14(2): 248–253.
137. Sharma, B., Subedi, A., Subedi, B., Panthee, S. & Acharya, P.R. (2019). First record of the Small Bamboo Bat *Tylonycteris fulvida* (Peters, 1872) (Mammalia: Chiroptera: Vespertilionidae) from Nepal. *Journal of Threatened Taxa* 11(9): 14216–14219.
138. Siemers, B.M. (2004). Bats in the field and in a flight cage: recording and analysis of their echolocation calls and behavior. In: *Bat Echolocation research*. Austin, Texas: Bat Conservation International, 107113.
139. Simmons, N.B. & Cirranello, A.L. (2020). *Bat Species of the World: A taxonomic and geographic database*. Version 1.7. Accessed on 04/27/2022.
140. Simmons, N.B. & Cirranello, A.L. (2024). *Bat Species of the world: A taxonomic and geographic database*. Version 1.5. Accessed on 03/28/2024.
141. Singh, D. & Sharma, D.K. (2023). New distribution record of the Greater False Vampire Bat (*Megaderma lyra*, Geoffroy 1810) from North-Western Himalaya. *Journal of Tropical Life Science* 13(2): 377–382.
142. Sinha, Y.P. (1980). The bats of Rajasthan: taxonomy and zoogeography. *Records of the Zoological Survey of India* 76: 7–63.
143. Slatkin, M. (1985). Rare alleles as indicators of gene flow. *Evolution* 39:53–65.
144. Sodhi, N.S., Koh, L.P., Brook, B.W. & Ng, P.K.L. (2004). Southeast Asian biodiversity: An impending disaster. *Trends in Ecology & Evolution* 19, 654–660.
145. Soisook, P., Karapan, S., Satasook, C. & Bates, P.J.J. (2013). A new species of *Murina* (Mammalia: Chiroptera: Vespertilionidae) from peninsular Thailand. *Zootaxa* 3746: 567–579.
146. Soisook, P., Prajakjitr, A., Karapan, S., Francis, C.M. & Bates, P.J.J. (2015). A new genus and species of false vampire (Chiroptera: Megadermatidae) from peninsular Thailand. *Zootaxa* 3931(4): 528–550.
147. Soisook, P., Thaw, W.N., Kyaw, M., Oo, S.S.L., Pimsai, A., Suarez-Rubio, M. & Renner, S.C. (2017). A new species of *Murina* (Chiroptera: Vespertilionidae) from sub-Himalayan forests of northern Myanmar. *Zootaxa* 4320: 159–172.

148. Solari, S., Sotero-Caio, C.G., Baker, R.J. (2019). Advances in systematics of bats: towards a consensus on species delimitation and classifications through integrative taxonomy. *Journal of Mammalogy* 100, 838–851.
149. Son, N.T., Csorba, G., Tu, V.T., Thong, V.D., Wu, Y., Harada, M., Oshida, T., Endo, H. & Motokawa, M. (2015). A new species of the genus *Murina* (Chiroptera: Vespertilionidae) from the Central Highlands of Vietnam with a review of the subfamily Murinae in Vietnam. *Acta Chiropterologica* 17: 201–232.
150. Son, N.T., Görföl, T., Francis, C.M., Motokawa, M., Estók, P., Endo, H., Thong, V.D., Dang, N.X., Oshida, T. & Csorba, G. (2013). Description of a new species of *Myotis* (Vespertilionidae) from Vietnam. *Acta Chiropterologica* 15: 473–483.
151. Son, N., O’Shea, T., Gore, J., Nguyen, K., Thanh, H., Motokawa, M., Dang, H., Le, M., Nguyen, T., Oshida, T., Endo, H., Tran, T., Tuan Hai, B., Tú, L., Duong, V., Chu, H., Tu, V., (2021). Bats (Chiroptera) of Bidoup Nui Ba National Park, Dalat Plateau, Vietnam. *Mammal Study* 46.
152. Srinivasulu, B., Kaur, H., Shah, T., Gundena, D., Asad, G., Raman, S. & Srinivasulu, C. (2020). A review of the bacular morphology of some Indian bats (Mammalia: Chiroptera). *Journal of Threatened Taxa* 12(9): 15985–16005.
153. Srinivasulu, B. & Srinivasulu, C. (2019). *Myotis sicarius*. The IUCN RedList of Threatened Species: e.T14202A22063965.
154. Srinivasulu, C., Srinivasulu, A., Srinivasulu, B., Jones, G. (2019). Integrated approaches to identifying cryptic bat species in areas of high endemism: The case of *Rhinolophus andamanensis* in the Andaman Islands. *PLOS ONE* 14, e0213562.
155. Srinivasulu, C. & Srinivasulu, B. (2012). *South Asian Mammals: Their Diversity, Distribution, and Status*. Springer, Berlin, Germany.
156. Stadelmann, B., Herrera, L.G., Arroyo-Cabrales, J., Flores-Martínez, J.J., May, B.P. & Ruedi, M. (2004a). Molecular systematics of the fishing bat *Myotis (Pizonyx) vivesi*. *Journal of Mammalogy* 85: 133–139.
157. Stadelmann, B., Jacobs, D.S., Schoeman, C. & Ruedi, M. (2004b). Phylogeny of African *Myotis* bats (Chiroptera, Vespertilionidae) inferred from cytochrome b sequences. *Acta Chiropterologica* 6: 177–192.
158. Stathopoulos, V., Zamora-Gutierrez, V., Jones, K.E. & Girolami, M. (2018). Bat echolocation call identification for biodiversity monitoring: A probabilistic approach. *Journal of the Royal Statistical Society: Series C (Applied Statistics)* 67, 165–183.
159. Stockley, P. (2012). The baculum. *Current Biology* 22(24): PR1032–R1033.
160. Sun, K., Luo, L., Kimball, R.T., Wei, X., Jin, L., Jiang, T., Li, G., Feng, J., (2013). Geographic variation in the acoustic traits of greater horseshoe bats: testing the importance of drift and ecological selection in evolutionary processes. *PLoS One* 8, e70368.
161. Tamura, K., Stecher, G. & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38: 3022–3027.

162. Tanshi, I., Obitte, B., Monadjem, A., Rossiter, S., Fisher-Phelps, M. & Kingston, T. (2022). Multiple dimensions of biodiversity in paleotropical hotspots reveal comparable bat diversity. *Biotropica* 54.
163. Teeling, E.C., Springer, M.S., Madsen, O., Bates, P., O'Brien, S.J. & Murphy, W.J. (2005). A molecular phylogeny for bats illuminates biogeography and the fossil record, *Science*, 307. 580-584.
164. Thapa, S. (2014). A checklist of mammals of Nepal. *Journal of Threatened Taxa* 6(8): 6061–6072.
165. Thapa, S., Baral, S., Hu, Y., Huang, Z., Yue, Y., Dhakal, M., Jnawali, S.R., Chettri, N., Racey, P.A., Yu, W., Wu, Y. (2021). Will climate change impact distribution of bats in Nepal Himalayas? A case study of five species. *Global Ecology and Conservation* 26, 1-14. e01483.
166. Thomas, O. (1915). The penis-bone, or baculum, as a guide to the classification of certain squirrels. *Annals and Magazine of Natural History* 8(15): 383–387.
167. Thong, V. D. (2019). New records of *Hipposideros griffini* from lava caves and the threats to its conservation in Vietnam. *Tap Chi Sinh Hoc Journal of Biology* 41, 31.
168. Thong, V. D. (2023a). Remarks on the diversity and echolocation calls of hipposiderid bats (Chiroptera: Hipposideridae) in Cuc Phuong National Park, northeastern Vietnam. *Academia Journal of Biology* 45, 1–9.
169. Thong, V. D. (2023b). New data on distribution, morphology and echolocation of *Hipposideros khaokhouayensis* Guillén-Servent & Francis, 2006 (Chiroptera: Hipposideridae). *Acta Zoologica Bulgarica* 75, 469–476.
170. Thong, V.D., Denzinger, A., Long, V., Sang, N.V., Huyen, N.T.T., Thien, N.H., Luong, N.K., Tuan, L.Q., Ha, N.M., Luong, N.T., Schnitzler, H.-U. (2022a). Importance of Mangroves for Bat Research and Conservation: A Case Study from Vietnam with Notes on Echolocation of *Myotis hasselti*. *Diversity* 14, 258.
171. Thong, V.D., Dietz, C., Denzinger, A., Bates, P.J.J., Furey, N.M., Csorba, G., Hoye, G., Thuy, L.D., Schnitzler, H.-U. (2011). Further records of *Murina tiensa* from Vietnam with first information on its echolocation calls. *Hystrix* 22, 129–138.
172. Thong, V.D., Limbert, H. & Limbert, D. (2022b). First records of bats (Mammalia: Chiroptera) from the world's largest cave in Vietnam. *Diversity* 14, 534.
173. Thong, V.D., Loi, D.N., Thanh, H.T., Nha, P.V., Nga, C.T.T., Sengmanichanh, P., Ha, N.M., Toan, V.D., Thai, D.V. & Viet, N.V. (2022c). Echolocation calls of *Myotis alticraniatus* (Chiroptera: Vespertilionidae) in Vietnam. *Hnue Journal of Science, Natural Sciences* 67, 133–140.
174. Thong, V., Puechmaille, S., Denzinger, A., Csorba, G., Dietz, C., Bates, P., Teeling, E., Schnitzler, H. (2012). A new species of *Hipposideros* (Chiroptera: Hipposideridae) from Vietnam. *Journal of Mammalogy* 93, 1–11.

175. Topál, G. (1970). On the systematic status of *Pipistrellus annectans* Dobson, 1871 and *Myotis primula* Thomas, 1920 (Mammalia). *Annales Historico-Naturales Musei Nationalis Hungarici* 62: 373–379.
176. Tu, V.T., Csorba, G., Görföl, T., Arai, S., Son, N.T., Thanh, H.T. & Hassanin, A. (2015). Description of a new species of the genus *Aselliscus* (Chiroptera, Hipposideridae) from Vietnam. *Acta Chiropterologica* 17:233–254.
177. Tu, V.T., Csorba, G., Ruedi, M., Furey, N.M., Son, N.T., Thong, V.D., Bonillo, C. & Hassanin, A. (2017b). Comparative phylogeography of bamboo bats of the genus *Tylonycteris* (Chiroptera, Vespertilionidae) in Southeast Asia. *European Journal of Taxonomy* 274: 1–38.
178. Tu, V.T., Görföl, T., Csorba, G., Arai, S., Kikuchi, F., Fukui, D., Koyabu, D., Furey, N.M., Bawm, S., Lin, K.S., Alviola, P., Hang, C.T., Son, N.T., Tuan, T.A. & Hassanin, A. (2021). Integrative taxonomy and biogeography of Asian yellow house bats (Vespertilionidae: Scotophilus) in the Indomalayan Region. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 59: 772–795.
179. Tu, V.T., Hassanin, A., Furey, N.M., Son, N.T. & Csorba, G. (2018). Four species in one: multigene analyses reveal phylogenetic patterns within Hardwicke's woolly bat, *Kerivoula hardwickii*-complex (Chiroptera, Vespertilionidae) in Asia. *Hystrix* 29, 111–121.
180. Tu, V.T., Hassanin, A., Görföl, T., Arai, S., Fukui, D., Thanh, H.T., Son, N.T., Furey, N.M. & Csorba, G. (2017a). Integrative taxonomy of the *Rhinolophus macrotis* complex (Chiroptera, Rhinolophidae) in Vietnam and nearby regions. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 55:177198.
181. Tsang, S.M., Cirranello, A.L., Bates, P.J.J. & Simmons, N.B. (2015). The Roles of Taxonomy and Systematics in Bat Conservation, In: Voigt, C.C. és Kingston, T. (Szerk.): *Bats in the anthropocene: Conservation of Bats in a Changing World*, Springer, New York, pp. 503-538.
182. Tuan, L.Q., Thong, V.D., Son, N.T., Tu, V.T., Tuan, T.A., Luong, N.T., Vy, N.T., Thanh, H.T., Huang, J.C.-C., Csorba, G., Görföl, T. & Tuanmu, M.-N. (2023). Potential individual and interactive effects of climate and land-cover changes on bats and implications for conservation planning: a case study in Vietnam. *Biodiversity Conservation* 32, 4481–4508.
183. Uhrin, M., Kaňuch, P., Křištofik, J. & Paule, L. (2010). Phenotypic plasticity in the greater mouse-eared bat in extremely different roost conditions. *Acta Theriologica* 55: 153–164.
184. Vercillo, F. & Ragni, B. (2011). Morphometric discrimination between *Martes martes* and *Martes foina* in Italy: The use of the baculum. *Hystrix* 22(2): 325–331.
185. Voigt, C.C., Bernard, E., Huang, J.C.-C., Frick, W.F., Kerbiriou, C., MacEwan, K., Mathews, F., Rodríguez-Durán, A., Scholz, C., Webala, P.W., Welbergen, J., Whitby, M., (2024). Toward solving the global green–green dilemma between wind energy production and bat conservation. *BioScience* 74, 240–252.
186. Voigt, C.C. & Kingston T. (Szerk.) (2016). *Bats in the Anthropocene: Conservation of Bats in a Changing World*. Springer, Cham. 606 p.

187. Wang, X., Guo, W., Yu, W., Csorba, G., Motokawa, M., Li, F., Zhang, Q., Zhang, C., Li, Y. & Wu, Y. (2017). First record and phylogenetic position of *Myotis indochinensis* (Chiroptera, Vespertilionidae) from China. *Mammalia* 81: 605–609.
188. Will, K.W., Mishler, B.D. & Wheeler, Q.D. (2005). The Perils of DNA Barcoding and the Need for Integrative Taxonomy. *Systematic Biology*, 54(5), 844–851.
189. Wilson, D.E. & Mittermeier, R.A. (Szerk.) (2019). Handbook of the Mammals of the World (Volume 9): Bats. Lynx Edicions, Barcelona, Spain. 1008 p.
190. Yu, W.H., Csorba, G. & Wu, Y. (2020). Tube-nosed variations – a new species of the genus *Murina* (Chiroptera: Vespertilionidae) from China. *Zoological Research*. 41: 70–77.
191. Zachos, F.E. (2018). Mammals and meaningful taxonomic units: The debate about species concepts and conservation. *Mammal Review* 48: 153–159.
192. Zamora-Gutierrez, V., Lopez-Gonzalez, C., Gonzalez, M.C. MacSwiney, Fenton, B., Jones, G., Kalko, E.K.V., Puechmaille, S.J., Stathopoulos, V. & Jones, K.E. (2016). Acoustic identification of Mexican bats based on taxonomic and ecological constraints on call design. *Methods in Ecology and Evolution* 7:1082–1091.
193. Zamora-Gutierrez, V., MacSwiney G.M.C., Balvanera, S.M. & Esquivelzeta, E.R. (2021). The evolution of acoustic methods for the study of bats. In: Lim, B.K., Fenton, M.B., Brigham, R.M., Mistry, S., Kurta, A., Gillam, E.H., Russell, A. & Ortega, J. (Szerk.) 50 years of bat research: Foundations and new frontiers. Springer International Publishing, Switzerland, 43-59.
194. Zamora-Gutierrez, V., Ortega, J., Avila-Flores, R., Aguilar-Rodríguez, P.A., Alarcón-Montano, M., Avila-Torresagatón, L.G., Ayala-Berdón, J., Bolívar-Cimé, B., Briones-Salas, M., Chan-Noh, M., Chávez-Cauich, M., Chávez, C., Cortés-Calva, P., Cruzado, J., Cuevas, J.C., Del Real-Monroy, M., Elizalde-Arellano, C., García-Luis, M., García-Morales, R., Guerrero, J.A., Guevara-Carrizales, A.A., Gutiérrez, E.G., Hernández-Mijangos, L.A., Ibarra-López, M.P., Iñiguez-Dávalos, L.I., León-Madrado, R., López-González, C., López-Téllez, M.C., López-Vidal, J.C., Martínez-Balvanera, S., Montiel-Reyes, F., Murrieta-Galindo, R., Orozco-Lugo, C.L., Pech-Canché, J.M., Pérez-Pérez, L., Ramírez-Martínez, M.M., Rizo-Aguilar, A., Robredo-Esquivelzeta, E., Rodas-Martínez, A.Z., Rojo-Cruz, M.A., Selem-Salas, C.I., Uribe-Bencomo, E., Vargas-Contreras, J.A. & MacSwiney G.M.C. (2020). The Sonozotz project: Assembling an echolocation call library for bats in a megadiverse country. *Ecology and Evolution* 10, 4928–4943.

8 AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN KÉSZÜLT PUBLIKÁCIÓK

8.1 Publikációk lektorált folyóiratokban

Görföl, T., Huang, J.C.-C., Csorba, G., **Győrössy, D.**, Estók, P., Kingston, T., Szabadi, K.L., McArthur, E., Senawi, J., Furey, N.M., Tu, V.T., Thong, V.D., Khan, F.A.A., Jinggong, E.R., Donnelly, M., Kumaran, J.V., Liu, J.-N., Chen, S.-F., Tuanmu, M.-N., Ho, Y.-Y., Chang, H.-C., Elias, N.-A., Abdullah, N.-I., Lim, L.-S., Squire, C.D., Zsebők, S., 2022. ChiroVox: a public library of bat calls. *PeerJ* 10, e12445. <https://doi.org/10.7717/peerj.12445>

Győrössy, D., Csorba, G., Szabadi, K.L., Estók, P., Tu, V.T., Thong, V.D., Furey, N.M., Huang, J.C.-C., Tuanmu, M.-N., Fukui, D., Zsebők, S., Görföl, T., 2024. The calls of Vietnamese bats: a major step toward the acoustic characterization of Asian bats. *Scientific Reports* 14, 23335. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-72436-6>

Feng, L., **Győrössy, D.**, Miguez, R.P., Kokkini, P., Görföl, T., Khan, S.A., Saikia, U., Talmale, S.S., Yu, W., Liu, S., Jiang, T., Csorba, G., 2024. A reassessment of the taxonomic status and distribution of the subspecies of *Lyroderma lyra* (Chiroptera: Megadermatidae). *Contributions to Zoology* 2024:1-21. <https://doi.org/10.1163/18759866-bja10073>

Győrössy, D., Tu, V.T., Csorba, G., Thapa, S., Estók, P., Földvári, G., Görföl, T., 2024. The grey zone of taxonomy—The case of the Sikkim *Myotis* (Chiroptera: Vespertilionidae: *Myotis sicarius*), first recorded from Southeast Asia. *Vertebrate Zoology* 74, 737–749. <https://doi.org/10.3897/vz.74.e127269>

Dahal, D., **Győrössy, D.**, Thapa, S., Csorba, G., Görföl, T., Pandey, K., Budha, P. and Singh, N. (2025) First record of *Murina walstoni* (Chiroptera: Vespertilionidae) outside Southeast Asia. *Mammalia* 0117 <https://doi.org/10.1515/mammalia-2024-0117>

8.2 Konferenciaközlemények, absztraktok és előadások

Győrössy, D., (2019). Csövesorrú denevérek (Murininae) mitokondriális diverzitása. In: XII. Magyar Denevérvédelmi Konferencia, Alsódobsza, Magyarország

Szabadi, K. L., **Győrössy, D.**, Estók, P., Zsebők, S., Csorba, G., Görföl, T. (2019). Délkelet-ázsiai denevérek bioakusztikai vizsgálata. In: XII. Magyar Denevérvédelmi Konferencia, Alsódobsza, Magyarország

Görföl, T., **Győrössy, D.**, Szabadi, K. L., Csorba, G. (2019). Bat Tissues in the HNHM Collection of Genetic Resources. In: XVIII. International Bat Research Conference, Phuket, Thaiföld - Book of Abstracts (p.335).

Görföl, T., Csorba, G., Győrössy, D., Estók, P., Szabadi, K. L., Zsebők, S. (2021). ChiroVox: a denevérhangos weboldal. In: XIII. Magyar Denevérvédelmi Konferencia, Lakitelek, Magyarország

Győrössy, D. (2021). Vietnámi denevérek bioakusztikai vizsgálata. In: Intézményi Új Nemzeti Kiválóság Program (ÚNKP) Konferencia, Gödöllő, Magyarország

Győrössy, D., Szabadi, K. L., Csorba, G., Zsebők, S., Estók, P., Görföl, T. (2022) Vietnámi denevérek bioakusztikai vizsgálata. In: XIII. Magyar Természetvédelmi Biológiai Konferencia, Pécs, Magyarország - Absztrakt kötet (p.59).

Győrössy, D. (2023). Referencia genetikai adatbázis létrehozása délkelet-ázsiai denevérek azonosítására. In: Intézményi Új Nemzeti Kiválóság Program (ÚNKP) Konferencia, Gödöllő, Magyarország

Győrössy, D., Csorba, G., Vuong, T. T., Sanjan, T., Estók, P., Görföl, T. (2024). A Himalájai kapcsolat – a *Myotis sicarius* denevérfaj váratlan előfordulása Délkelet-Ázsiában. In: III. Emlőskutatók Szakmai Napja, Eger, Magyarország

Görföl, T., Huang, J. C. C., Csorba, G., Győrössy, D., Estók, P., Kingston, T., Szabadi, K. L., Bán, M., Zsebők, S. (2024). ChiroVox: a public library of bat calls. In: XVI. European Bat Research Symposium, Tarragona, Spanyolország - Book of Abstracts (p.94).

Görföl, T., Huang, J. C. C., Csorba, G., Győrössy, D., Estók, P., Kingston, T., Szabadi, K. L., Bán, M., Zsebők, S. (2024). An update for ChiroVox: Current status and future plans. In: V. International Southeast Asian Bat Conference, Ho Chi Minh, Vietnám - Book of Abstracts

Győrössy, D., Zsebők, S., Bán, M., Csorba, G., Huang, J. C. C., Szabadi, K. L., Estók, P., Görföl, T. (2025). ChiroVox: the largest global bat call library, now enhanced with new features. In: IX. European Congress of Mammalogy, Patras, Görögország - Book of Abstracts (p.290).

Győrössy, D., Zsebők, S., Csorba, G., Szabadi, K. L., Vuong, T. T., Furey, N. M., Huang, J. C. C., Bán, Miklós, Estók, P., Thong, V. D., Görföl, T. (2025). ChiroVox and the acoustic characterization of Vietnamese bats: expanding global resources for bat research. In: XX. International Bat Research Conference, Cairns, Ausztrália - Book of Abstracts (pp.208-209).

9 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm témavezetőimnek, Görföl Tamásnak és Estók Péternek, hogy szakmai támogatásukkal, iránymutatásukkal és bizalmukkal végig kísérték a munkámat, valamint, hogy hozzájárultak ahhoz, hogy elindulhassak a kutatói pálya hosszú, de csodálatos útján.

Külön köszönettel tartozom Csorba Gábornak, aki nem csak szakmai fejlődésemet segítette, hanem lehetőséget biztosított a kutatások megvalósítására a Magyar Természettudományi Múzeum Emlősgyűjteményében és Molekuláris Taxonómiai Laboratóriumában.

Köszönöm Zsebők Sándornak és Bán Miklósnak, hogy biztosították az informatikai hátteret a ChiroVox denevérhang-adatbázis létrehozásához és folyamatos működéséhez, fejlesztéséhez.

Köszönöm Károlyi Henriknek, Vuong Tan Tu-nak és Görföl Tamásnak, hogy társaim voltak egy vietnámi expedíción, ahol rengeteget tanulhattam nemcsak a délkelet-ázsiai denevérekről, hanem a trópusi területeken való terepi munka gyakorlati oldaláról is.

Hálás vagyok minden külföldi partnernek, akik részt vettek expedíciók megszervezésében és lebonyolításában, valamint mindazoknak, akik olyan mintákat gyűjtöttek, amiket felhasználhattam ebben a munkában. Köszönöm továbbá, hogy hozzáférést biztosítottak a saját gyűjteményeikben található példányokhoz, mintákhoz és adatokhoz – ez a segítség nélkülözhetetlen volt a kutatások sikeres megvalósításához.

Köszönöm az opponenseknek, Farkas Jánosnak és Németh Attilának a disszertációval kapcsolatos javaslataikat és építő jellegű kritikáikat, amik hozzájárultak a dolgozat szakmai színvonalának emeléséhez.

Köszönöm Szabadi Kriszta Lillának a folyamatos támogatását, szakmai tanácsait és hogy bármikor fordulhattam hozzá kérdéseimmel.

Végül, de nem utolsósorban köszönöm családomnak, különösen nővéremnek, Győrössy Krisztinának, hogy támogatott ezen a hosszú úton és mindig emlékeztetett a motivációmra. Köszönöm páromnak, Tóth Gergőnek, hogy könnyebbé tette a mindennapjaimat és maximálisan támogatott ennek a munkának az elkészítésében.

10 MELLÉKLET



ChiroVox: a public library of bat calls

Tamás Görföls^{1,2,*}, Joe Chun-Chia Huang^{3,4,5,*}, Gábor Csorba¹, Dorottya Györössy^{1,6}, Péter Estók⁷, Tigga Kingston^{5,8}, Kriszta Lilla Szabadi^{1,6}, Ellen McArthur^{5,9}, Juliana Senawi⁴, Neil M. Furey^{5,10,11}, Vuong Tan Tu^{12,13}, Vu Dinh Thong^{5,12,13}, Faisal Ali Anwarali Khan⁹, Emy Ritta Jinggong⁹, Melissa Donnelly^{14,15}, Jayaraj Vijaya Kumaran^{5,16}, Jian-Nan Liu¹⁷, Shiang-Fan Chen^{5,18}, Mao-Ning Tuanmu³, Ying-Yi Ho³, Heng-Chia Chang¹⁹, Nurul-Ain Elias^{5,20}, Nur-Izzati Abdullah^{20,21}, Lee-Sim Lim^{5,21}, C Daniel Squire^{5,22} and Sándor Zsebök^{23,24}

¹ Department of Zoology, Hungarian Natural History Museum, Budapest, Hungary

² National Laboratory of Virology, Szentágotthai Research Centre, University of Pécs, Pécs, Hungary

³ Biodiversity Research Center, Academia Sinica, Taipei, Taiwan

⁴ Department of Biological Sciences and Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Universiti Kebangsaan Malaysia, Bangi, Selangor, Malaysia

⁵ Southeast Asian Bat Conservation Research Unit, Lubbock, TX, United States of America

⁶ Hungarian University of Agriculture and Life Sciences, Gödöllő, Hungary

⁷ Department of Zoology, Eszterházy Károly Catholic University, Eger, Hungary

⁸ Department of Biological Sciences, Texas Tech University, Lubbock, TX, United States of America

⁹ Faculty of Resource Science and Technology, Universiti Malaysia Sarawak, Kota Samarahan, Sarawak, Malaysia

¹⁰ Harrison Institute, Kent, United Kingdom

¹¹ Fauna & Flora International, Phnom Penh, Cambodia

¹² Institute of Ecology and Biological Resources, Vietnam Academy of Science and Technology, Hanoi, Vietnam

¹³ Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology, Hanoi, Vietnam

¹⁴ Operation Wallacea Ltd., Lincolnshire, United Kingdom

¹⁵ Proyecto CUBABAT, Matanzas, Cuba

¹⁶ Global Entrepreneurship Research & Innovation Center, Universiti Malaysia Kelantan, Pengkalan Chepa, Kota Bharu, Malaysia

¹⁷ Department of Forestry and Natural Resources, National Chiayi University, Chiayi, Taiwan

¹⁸ Center for General Education, National Taipei University, New Taipei City, Taiwan

¹⁹ Formosan Golden Bat's Home, Yunlin, Taiwan

²⁰ School of Biological Sciences, Universiti Sains Malaysia, Penang, Malaysia

²¹ School of Distance Education, Universiti Sains Malaysia, Penang, Malaysia

²² Department of Educational Psychology & Leadership, Texas Tech University, Lubbock, TX, United States of America

²³ Department of Systematic Zoology and Ecology, Eötvös Loránd University, Budapest, Hungary

²⁴ Institute of Ecology and Botany, Centre for Ecological Research, Vácrátót, Hungary

* These authors contributed equally to this work.

Submitted 18 August 2021
Accepted 15 October 2021
Published 13 January 2022

Corresponding author
Tamás Görföls, tamas@gorfol.eu

Academic editor
Madhava Meegaskumbura

Additional Information and
Declarations can be found on
page 10

DOI [10.7717/peerj.12445](https://doi.org/10.7717/peerj.12445)

© Copyright
2022 Görföls et al.

Distributed under
Creative Commons CC-BY 4.0

OPEN ACCESS

ABSTRACT

Recordings of bat echolocation and social calls are used for many research purposes from ecological studies to taxonomy. Effective use of these relies on identification of species from the recordings, but comparative recordings or detailed call descriptions to support identification are often lacking for areas with high biodiversity. The ChiroVox website (www.chirovox.org) was created to facilitate the sharing of bat sound recordings together with their metadata, including biodiversity data and recording circumstances. To date, more than 30 researchers have contributed over 3,900 recordings of nearly 200

species, making ChiroVox the largest open-access bat call library currently available. Each recording has a unique identifier that can be cited in publications; hence the acoustic analyses are repeatable. Most of the recordings available through the website are from bats whose species identities are confirmed, so they can be used to determine species in recordings where the bats were not captured or could not be identified. We hope that with the help of the bat researcher community, the website will grow rapidly and will serve as a solid source for bat acoustic research and monitoring.

Subjects Biodiversity, Bioinformatics, Ecology, Taxonomy, Zoology

Keywords Bats, Chiroptera, Database, Call library, Echolocation, Acoustics, Survey, Monitoring

INTRODUCTION

Bats are the second most specious group of mammals with more than 1400 known species (*Simmons & Cirranello, 2020*). They play crucial roles in ecosystems and provide important ecosystem services to humans through suppression of agricultural pests, seed dispersal and pollination (*Kunz et al., 2011*). More than one-third of bat species listed by the International Union for Conservation of Nature (IUCN) are considered threatened or data deficient and information on species' distributions, habitat use, and population trends are required to ensure appropriate conservation measures for these taxa (*Frick, Kingston & Flanders, 2020*).

Due to their elusive nature, bats are among the least known mammals. This is especially true for tropical bat species. Observation of bats is challenging because they are active at night and roost in crevices or inaccessible places during the day. There are several methods to determine species occurrence and abundance, for example by catching individuals with mist nets, harp traps, or visiting roosts. However, these methods cannot be used equally for various species and usually preclude observation of natural behaviors (e.g., *Larsen et al., 2007; MacSwiney, Clarke & Racey, 2008; Kingston, 2013; Marques et al., 2013; Tanshi & Kingston, 2021*). Approximately 86% of bat species use echolocation for navigation, and the calls of many species are sufficiently intense that they can be recorded while the bat is flying freely in the natural environment. This provides an opportunity for researchers to “eavesdrop” on bats in their natural habitats, such that acoustic methods have become a mainstay in bat research in recent decades (*Zamora-Gutierrez et al., 2021*).

Acoustic approaches have several advantages. They can be used without disturbing bats and automatic recorders can be deployed for several days or months. Multiple recording devices can also simultaneously be used across large areas for comparisons of land use (e.g., *Frick, 2013; Gibb et al. 2019*). However, acoustic methods also have disadvantages, the most critical being that it is generally challenging to identify all calls to species level, especially in areas with high bat diversity. Echolocation calls of many species, including co-distributed taxa, are similar and overlap in acoustic parameters, making it difficult to distinguish among species. This is compounded by within species and even within individual variations in call parameters, as species' calls vary geographically and bats commonly adjust calls in the course of a call sequence (*Russo & Voigt, 2016; Rydell et al.,*

Table 1 A list of bat sound libraries based on *Walters et al. (2013)* and *Zamora-Gutierrez et al. (2021)*.

Name	No. species	No. records	Country/Region	Reference	Download
EchoBank	297	3531	Worldwide	<i>Collen (2012)</i>	not online
Bat Conservation Trust Sound Library	15	27	Great Britain	http://www.bats.org.uk	only members
Cornell lab of ornithology –Macaulay library	29+	258+	Worldwide	http://www.macaulaylibrary.org	no
British library –British sound archive	139+	700+	Europe	https://sounds.bl.uk	no
Nepal Bat Call Library	15	15	Nepal	http://smcrf.org/resource/nepalbatcall	no
BioSounds –Sumatran Chiroptera	16	16	Sumatra, Indonesia	https://soundefforts.uni-goettingen.de/biosounds/collection/show/19	no
Bat Calls of New South Wales	31	1200+	New South Wales, Australia	https://www.environment.nsw.gov.au/surveys/Batcalls.htm	yes
Avisoft Bioacoustics	26	62	Europe	http://www.batcalls.com	yes
Morcegoteca	17	27	Brazil	https://ppbio.inpa.gov.br/en/Bat_Library	yes
Sonozotz	69	1960	Mexico	Soon through the CONABIO portal	not yet
ChiroVox	192	3902	Worldwide	http://www.chirovox.org	yes

2017; *Russo, Ancillotto & Jones, 2018; Goerlitz, 2018*). For accurate identification of species from recordings, there is an urgent need for large databases that provide greater information on within- and between-species variation in echolocation calls, especially in tropical areas.

In the last decade, the number of studies detailing the acoustic parameters of tropical bat calls has increased (e.g., *Hughes et al., 2011; Phauk, Sarith & Furey, 2013; Zamora-Gutierrez et al., 2016; Hackett, Holderied & Korine, 2017; Monadjem et al., 2017; Raman & Hughes, 2021; López-Bosch et al., 2021; McArthur & Khan, 2021*). These publications primarily focus on describing acoustic parameters that can be helpful for identifying bats in many cases, but definitions and terminology often differ between studies, which hinders comparisons. Moreover, call parameters are commonly reported as mean values and standard deviations/standard errors, which can be difficult to use for species identification. In contrast, access to verified reference recordings for species that can then be compared to assess anonymous calls in the same software environment is much more efficient and reliable.

The need for echolocation call libraries has long been suggested (*Karine & Kalko, 2001*). A number of bat call collections have been published in the last two decades, but only a few are still maintained and even fewer cover large geographic areas (*Table 1*).

One of the most significant databases is EchoBank, which contains thousands of bat recordings, although unfortunately the sound files themselves are not available online (*Collen, 2012*). The most recent project is Sonozotz, which is based on a thorough survey in a megadiverse country, Mexico, and will hopefully be available online soon (*Zamora-Gutierrez et al., 2020*). Online libraries are currently available only for regional levels and are not continuously updated with new recordings.

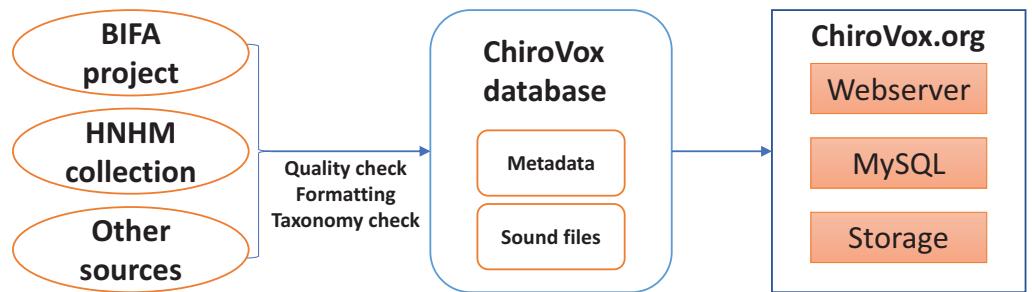


Figure 1 Schematic figure of the ChiroVox system.

Full-size  DOI: [10.7717/peerj.12445/fig-1](https://doi.org/10.7717/peerj.12445/fig-1)

Recognizing the need for a large and curated call library, we created the ChiroVox website (www.chirovox.org) whose purpose is to act as a freely available collection of reference bat calls without geographic or taxonomic restrictions. Our paper introduces the structure and features of ChiroVox and highlights the importance of further contributions to build an even larger and more comprehensive bat call library.

DATA INTEGRATION PIPELINE

Three main sources of sound recordings were available at the start of the project (Fig. 1). A considerable part of the information and sound files came from participants of a Data Mobilization Project awarded to the Southeast Asian Bat Conservation Research Unit (SEABCRU) by the Biodiversity Information Fund for Asia (BIFA) and from the collection of the Hungarian Natural History Museum (HNHM). Other sources were individual researchers who wanted to contribute to the project. The quality of the recordings and the metadata (including biodiversity data and recording circumstances) were reviewed by the site administrators and corrected if necessary. The taxonomy of species was checked by experts in the field based on the backbone suggested by *Wilson & Mittermeier (2019)*, and current names were attached to the recordings. Checks were made to confirm that the species is known to occur in the area specified by the contributor. Following corrections, the recordings were integrated into the ChiroVox database. The sound files and the connected metadata were transferred into the storage and the MySQL database server of the ChiroVox website, respectively. The website was coded with the use of HTML, CSS, and PHP languages. Currently, new sound recordings can be submitted by contacting the site administrators.

METADATA DESCRIPTION

ChiroVox is an archive of bat echolocation and social call recordings, hence every uploaded file has a unique identifier (ChiroVoxUID), that can be cited in publications. This permits re-analysis of results in subsequent studies using the same recordings.

ChiroVox mostly provides reference calls that were recorded from bats identified with high certainty to family, genus and species. Taxonomic remarks can be added in cases where identifications are ambiguous. A taxonomic certainty score is required of all submissions.

A score goes from 1–5, where 1 indicates greatest uncertainty about the taxonomic identity of the recorded bat. A 1 might be scored if the provider is not an expert, the bat was not identified in the hand, and comes from an area of high bat diversity and several similar species. A 5 would be selected if the identification was made by an expert and the animal was studied in the hand and/or there is voucher/genetic data, or the species' calls are unique (like in many cases in temperate zones). The basis for each species identification (*e.g.*, voucher specimen, morphological measurement, photograph, genetic analysis) can also be added to the record.

The recordings can be connected to a voucher or to other databases like Global Biodiversity Information Facility (GBIF), National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank, European Nucleotide Archive (ENA), Barcode of Life Data System (BOLD), *etc.* to facilitate interdisciplinary research. Majority of the metadata is in Darwin Core format to be compatible with several other important databases and services.

The most important biodiversity data can be also provided for a recording. This includes locality information (*e.g.*, country, territory, settlement, coordinates, *etc.*) as well as the date of recording (capture of bat). Other important factors that can also be given include the recording habitat, microhabitat structure, recording devices, recording method, and call type.

Recording bat sounds often requires significant efforts by researchers. Commercial use of recordings is generally prohibited in ChiroVox, although interested parties may contact the individual data providers to request permission. ChiroVox recordings can be accessed in two ways: (a) Open-access, whereby recordings and their metadata are freely available to the public for viewing and downloading under different Creative Common licenses; (b) Consensual-access, whereby associated metadata are available to the public and individual recordings can be requested from the contributor(s) on a case-by-case basis.

The complete list of the metadata variables and their explanations can be found in [Table 2](#).

WEBSITE CAPABILITIES

The website provides a summary of data holdings, including the total number of recordings, taxonomic and geographic coverage. A list of bat species and number of recordings for each taxon is also provided. The database can be browsed by species name, country, contributor or ChiroVoxUID. Every recording has a separate page where the metadata can be viewed and the sound file can be downloaded.

As we wish to encourage interest in the world of bat acoustics, the ChiroVox website provides links for further information on different equipment and software used to record and analyze bat sounds. Links to other bat call libraries can be found which may be helpful to find recordings of taxa not yet available on ChiroVox. Lists of the most important publications (*e.g.*, identification keys) and papers citing either ChiroVox or calls that are accessible through the website are available.

Table 2 Record variables used in the ChiroVox database. Variable groups are indicated by alternating colors.

Variable Name	Explanation
ChiroVoxUID	unique ID for recording (e.g., A000001)
Family	bat family
Genus	bat genus
Species	bat species
Subspecies	bat subspecies
Taxonomic remarks	remarks on the taxonomy of the bat
Taxonomic certainty	certainty of the taxonomic identification (on a 1 to 5 scale, higher the better)
Identified by	person(s) who identified the bat
ID evidence	evidence(s) the identification is based on (e.g., voucher, measurements, photo, etc.)
Gender	gender of the bat
Age	age of the bat
Individual #	individual number (any ID, e.g., field number) of the bat
Voucher #	voucher number of the bat
Accession #	collection accession number of the bat
GBIF UID	GBIF unique identifier of the bat
Genetic #	accession number(s) belonging to the bat (in NCBI GenBank, ENA, BOLD, etc.)
Date	date of recording
Time	time of recording
Latitude	latitude in decimal degrees format
Longitude	longitude in decimal degrees format
Location accuracy	approx. accuracy of coordinates
Altitude	meters a.s.l. of the locality
Locality	the most exact place name where the bat was caught/recording took place
Settlement	settlement where the bat was caught/recording took place
Territory	province/county where the bat was caught/recording took place
Country	country where the bat was caught/recording took place
Habitat	habitat of the recording where applicable (e.g., primary forest, river, tea plantation, etc.)
Microhabitat	structure of habitat, when applicable (e.g., open, semi-cluttered, cluttered, etc.)
Method	recording method (e.g., free-flying, hand held, hand release, enclosure, emergence, etc.)
Call type	type of the bat call (e.g., search, feeding, social, distress, etc.)
Recording quality	quality of the recording (on a 1 to 5 scale, higher the better)
Device manufacturer	manufacturer of the recording device
Device model	model of the recording device
Sampling rate	sampling rate of the recording for real time and time expansion systems, in kHz

(continued on next page)

Table 2 (continued)

Variable Name	Explanation
Recording type	type of recording (e.g., real time, time expansion, etc.)
TE factor	time expansion factor
FD factor	frequency division factor
Access type	access type (e.g., CC BY-NC 4.0, restricted, etc.)
Recordist name	name of the person(s) who recorded the call
Contact	name of the person(s) who must be contacted regarding the record
Contact e-mail	e-mail of the person(s) who must be contacted regarding the record
Reference	citation(s) of the publication(s) in which the species record or/and call description has been published
Remarks	additional information which does not fit in other categories

Table 3 Families and number of genera and species currently represented in ChiroVox.

Family	Genera	Species
Emballonuridae	3	6
Hipposideridae	4	28
Megadermatidae	2	2
Miniopteridae	1	6
Molossidae	3	3
Nycteridae	1	2
Pteropodidae	4	5
Rhinolophidae	1	36
Rhinopomatidae	1	1
Vespertilionidae	26	103
Total	46	192

CURRENT HOLDINGS

At the time of submission, 3,902 bat calls are available through the website, representing 11 bat families, 46 genera, and 192 species (Table 3). To the best of our knowledge, more than 150 of these species are not represented in other online sources.

Altogether more than 30 researchers contributed to the ChiroVox dataset which includes recordings from nine countries (Cambodia, China, Hungary, Indonesia, Liberia, Malaysia, Taiwan, United Arab Emirates and Vietnam) (Fig. 2).

DISCUSSION

To the best of our knowledge, ChiroVox is the largest library of bat recordings that are freely available through the internet. With almost 200 bat species represented in over 3,900 recordings, it is an important resource for bat acoustic studies.

Most of the recordings available through the website are from bats identified with high certainty, hence they can be used to determine the identity of anonymous bats in

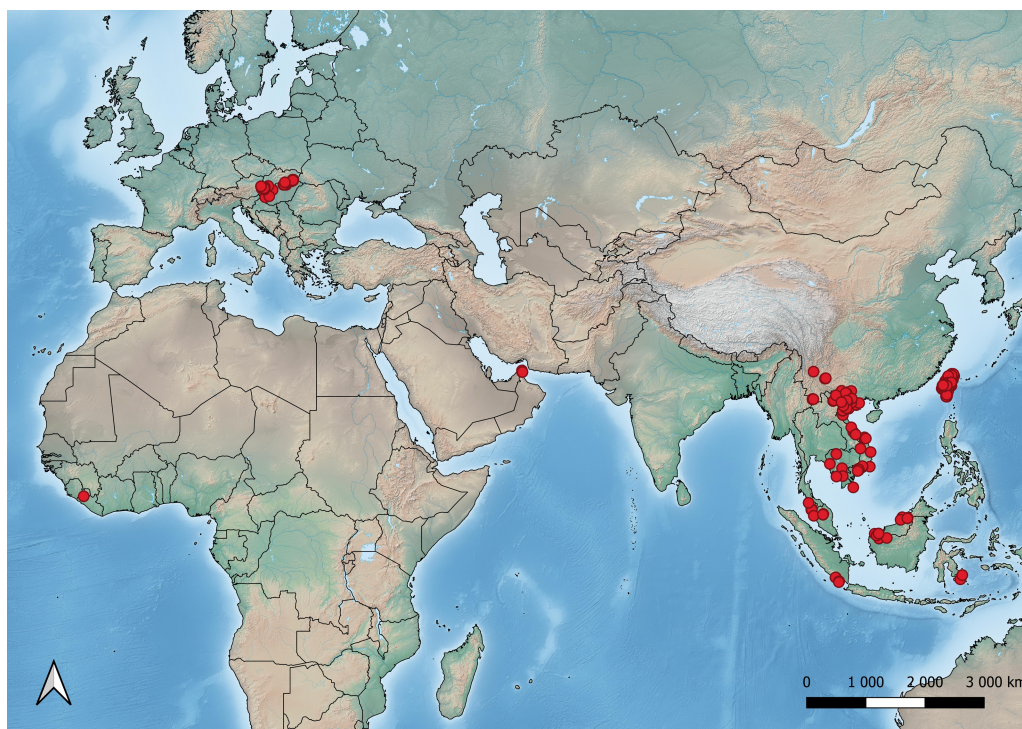


Figure 2 Geographic coverage of recordings available through ChiroVox. Red solid circles indicate locations of recordings currently available in the database.

Full-size  DOI: [10.7717/peerj.12445/fig-2](https://doi.org/10.7717/peerj.12445/fig-2)

new recordings. This is especially important in regions where bat diversity is high and species identification often requires special taxonomic knowledge. We applied the most recent taxonomic backbone ([Wilson & Mittermeier, 2019](#)) to our database and our experts checked every submission to ensure its taxonomic integrity. Recognizing that [Wilson & Mittermeier \(2019\)](#) will be not updated, in the future we will use [Simmons & Cirranello \(2020\)](#) as a complementary taxonomic reference.

The species identification of free flying bats may largely depend on the circumstances of the reference recordings. At present, nearly 75% of the recordings in the ChiroVox library were made in closed spaces or from hand-held bats as specimens were often taken to identify them to species level. The majority of these recordings are of rhinolophids and hipposiderids (~1,600 recordings) which can be used for identification of free flying bats because the echolocation call frequency (*i.e.*, frequency of the constant frequency component) of these species are similar in different environments. However, several hundred recordings are of species whose call characteristics show large context-dependent plasticity. For example, call frequency and structure are known to be affected by recording methods ([Siemers, 2004](#)) and the (micro-) habitat of the recording site ([Kingston et al., 2003](#); [Russ, 2012](#)). Therefore, these reference recordings should be used for identification of free-flying bats with consideration of the recording conditions. For the future, as faunas become better-known, and vouchered genetic material becomes available, people should be encouraged to record more of their catch on release and use tissue samples to voucher

identity. This will result in recordings that are more useful in the identification of free-flying bats.

The taxonomic coverage of the library at the time of launch includes nearly half of the ~300 echolocating species that occur in Southeast Asia. Most of these recordings are from bat species that lacked a publicly available recording to date. These include several species recently described such as *Aselliscus dongbacanus*, *Glischropus aquilus*, *Hipposideros kunzi*, *Kerivoula dongduongana*, several *Murina* species, *Tylonycteris tonkinensis* and for example *Mirostrellus joffrei*, currently the sole representative of a new genus split from *Hypsugo* (Görföl et al., 2020). Several recordings are also available from bats that are yet to be formally described, such as *Phoniscus* sp., *Submyotodon* sp. etc. The library may facilitate the identification of less known species resulting in more occurrence records and more complete faunal inventories. It may also lead to the exploration of geographic variations (e.g., Ith et al., 2015), help to solve complex taxonomic problems (e.g., Tu et al., 2017) and provide insights into the role of echolocation in bat speciation (e.g., Kingston & Rossiter, 2004).

The website has many recordings that were published in papers describing the echolocation call parameters of different species (Furey, Mackie & Racey, 2009; Phauk, Sarith & Furey, 2013; Huang et al., 2014; Huang et al., 2019; Shazali et al., 2016; Görföl et al., 2020; Kao et al., 2020; Donnelly et al., 2021; McArthur & Khan, 2021). Although the ChiroVoxUID was not available when these papers were published, it is now possible to cite calls with their UIDs in new publications, ensuring that studies based on call analyses will be replicable. Integration of other associated identifiers (e.g., GBIF UID, voucher and sequence accession numbers) allows future publications to link the calls to published records, which are extremely important as the taxonomy of bats for some regions, e.g., SE Asia, has changed rapidly in the past few decades.

The development of ChiroVox is continuous, hence more features will become available in the future. We would like to apply a user management system, whereby anybody can register and upload their recordings into the database. This will be a huge step forward, because the sharing of the recordings will be much easier and require less contributions from the maintainers of the website. The user management system will also allow easier sharing of “restricted” calls because a contributor can grant access to specific users to download specific recordings. The batch upload function for importing metadata will allow the sharing of larger datasets, whereas an option to batch download files will make it easier to download several recordings simultaneously. Long-term sustainability of ChiroVox is secured by the support of the Hungarian Natural History Museum.

The website is community based; hence every contribution is highly welcome as this is the only way it can grow. We are particularly interested in recordings from, and curators of other regions, especially from other least-known areas like Africa, and the tropics of America and South Asia.

CONCLUSIONS

We built the ChiroVox website to facilitate the sharing of bat sound recordings from all over the world. More than 3,900 recordings of nearly 200 species are already deposited,

making ChiroVox the largest open-access bat call library currently available. To the best of our knowledge, more than 150 of these species are not represented in other online sources. Each recording has a unique identifier which allows its citation in publications. Most of the recordings are from bats whose species identities are confirmed, so they can be used as a reference for determination of unknown recordings. We hope that with the help of the bat researcher community, the website will grow rapidly and will serve as a solid source for a wide variety of bat acoustic research and monitoring.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to express our sincere thanks to all the collaborators who provided help in recording and processing echolocation calls. Faisal Ali Anwarali Khan and Emy Ritta Jinggong thank the Sarawak Forest Department and Sarawak Forestry Corporation for research permit (17)JHS/NCCD/600-7/2/107(Jld2) and allowing us to conduct bat research in Sarawak. Jayaraj Vijaya Kumaran would like to acknowledge the PERHILITAN research permit D-01052-16-1 for bat sampling. Lee-Sim Lim and Nur-Izzati Abdullah conducted their research under the permission of the Department of Wildlife & National Parks and the Forestry Department of Peninsular Malaysia. Lee-Sim Lim and Nur-Izzati Abdullah would like to thank Idea Wild for sponsoring a bat detector. The Eötvös Loránd University, Budapest provides computation and storage capacity for ChiroVox.

ADDITIONAL INFORMATION AND DECLARATIONS

Funding

This research was funded by the Hungarian Scientific Research Fund, grant number OTKA K112440 and the National Research, Development and Innovation Fund of Hungary, grant numbers NKFIH KH130360 and NKFIH K139992 which supported Gábor Csorba, Tamás Görföl, and Sándor Zsebók and by the Biodiversity Information Fund for Asia, Data Mobilization Project Grant, number BIFA04-24 awarded to Joe Chun-Chia Huang. Tamás Görföl was supported by the János Bolyai Research Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences (BO/00825/21) and by the ÚNKP-21-5 New National Excellence Program of the Ministry for Innovation and Technology from source of the National Research, Development and Innovation Fund (ÚNKP-21-5-PTE-1352). Faisal Ali Anwarali Khan and Emy Ritta Jinggong were supported by the funding of Malaysian Ministry of Education, Fundamental Research Grant (FRGS/1/2019/WAB13/UNIMAS/03/2). Vu Dinh Thong was supported by the Vietnam Academy of Science and Technology under grant number UQĐTCB 01/20-21. Field sampling of Jayaraj Vijaya Kumaran was funded by the Malaysian Ministry of Education Fundamental Research Grant (R/FRGS/A0800/00481A/011/2019/00704). The work of Dorottya Győrössi and Kriszta Lilla Szabadi was supported by the New National Excellence Program of the Ministry for Innovation and Technology from the source of the National Research, Development and Innovation Fund (grant numbers ÚNKP 20-3-I and ÚNKP-19-2-1, respectively). Lee-Sim Lim and Nur-Izzati Abdullah were funded by the Universiti Sains Malaysia short

term grant (304/PJJAUH/6313060). The Southeast Asian Bat Conservation Research Unit was supported by the US National Science Foundation Award Number 1051363 to Tigga Kingston. Jian-Nan Liu was supported by the Ministry of Science and Technology, Taiwan, under grant number MOST1072311B415003. Mao-Ning Tuanmu was supported by the internal funding of Academia Sinica, Taiwan. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Grant Disclosures

The following grant information was disclosed by the authors:

The Hungarian Scientific Research Fund: OTKA K112440.

The National Research, Development and Innovation Fund of Hungary: NKFIH KH130360, NKFIH K139992.

The Biodiversity Information Fund for Asia, Data Mobilization Project Grant: BIFA04-24.

The Hungarian Academy of Sciences: BO/00825/21.

The ÚNKP-21-5 New National Excellence Program of the Ministry for Innovation and Technology from source of the National Research, Development and Innovation Fund: ÚNKP-21-5-PTE-1352.

The funding of Malaysian Ministry of Education, Fundamental Research: FRGS/1/2019/WAB13/UNIMAS/03/2.

The funding of the Vietnam Academy of Science and Technology: UQĐTCB 01/20-21.

The Malaysian Ministry of Education Fundamental Research Grant: R/FRGS/A0800/00481A/011/2019/00704.

The New National Excellence Program of the Ministry for Innovation and Technology from the source of the National Research, Development and Innovation Fund: ÚNKP 20-3-I, ÚNKP-19-2-1.

The Universiti Sains Malaysia: 304/PJJAUH/6313060.

The Southeast Asian Bat Conservation Research Unit was supported by the US National Science Foundation: 1051363.

The Ministry of Science and Technology, Taiwan: MOST1072311B415003: MOST1072311B415003.

Competing Interests

Melissa Donnelly was a volunteer of Operation Wallacea Ltd. The study design was not influenced by this company.

Author Contributions

- Tamás Görföl conceived and designed the experiments, performed the experiments, analyzed the data, prepared figures and/or tables, authored or reviewed drafts of the paper, and approved the final draft.
- Joe Chun-Chia Huang conceived and designed the experiments, performed the experiments, analyzed the data, authored or reviewed drafts of the paper, and approved the final draft.
- Gábor Csorba conceived and designed the experiments, performed the experiments, authored or reviewed drafts of the paper, and approved the final draft.

- Dorottya Győrüssy, Péter Estók, Tigga Kingston, Kriszta Lilla Szabadi, Ellen McArthur, Juliana Senawi, Neil M Furey, Vuong Tan Tu, Vu Dinh Thong, Faisal Ali Anwarali Khan, Emy Ritta Jinggong, Melissa Donnelly, Jayaraj Vijaya Kumaran, Jian-Nan Liu, Shiang-Fan Chen, Mao-Ning Tuanmu, Ying-Yi Ho, Heng-Chia Chang, Nurul-Ain Elias, Nur-Izzati Abdullah, Lee-Sim Lim, and C Daniel Squire performed the experiments, authored or reviewed drafts of the paper, and approved the final draft.
- Sándor Zsebők conceived and designed the experiments, performed the experiments, analyzed the data, authored or reviewed drafts of the paper, and approved the final draft.

Data Availability

The following information was supplied regarding data availability:

The data is available at <https://www.chirovox.org>.

REFERENCES

- Collen A. 2012.** *The evolution of echolocation in bats: a comparative approach*. London: University College London.
- Donnelly M, Martin TE, Cropper O, Yusti E, Arfian A, Smethurst R, Fox C, Pryde M, Hafirun, Phangurha J, Van der Aar RN, Hutchison A, Karya A, Analuddin K, Samsudin, Jones SKC. 2021.** New species records from Buton Island, South East Sulawesi, including regional range extensions. *Journal of Bat Research and Conservation* **14**:14–32 DOI [10.14709/BarbJ.14.1.2021.03](https://doi.org/10.14709/BarbJ.14.1.2021.03).
- Frick WF. 2013.** Acoustic monitoring of bats, considerations of options for long-term monitoring. *Therya* **4**:69–78 DOI [10.12933/therya-13-109](https://doi.org/10.12933/therya-13-109).
- Frick WF, Kingston T, Flanders J. 2020.** A review of the major threats and challenges to global bat conservation. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1469**:5–25 DOI [10.1111/nyas.14045](https://doi.org/10.1111/nyas.14045).
- Furey NM, Mackie IJ, Racey PA. 2009.** The role of ultrasonic bat detectors in improving inventory and monitoring surveys in Vietnamese karst bat assemblages. *Current Zoology* **55**:327–341 DOI [10.1093/czoolo/55.5.327](https://doi.org/10.1093/czoolo/55.5.327).
- Gibb R, Browning E, Glover-Kapfer P, Jones KE. 2019.** Emerging opportunities and challenges for passive acoustics in ecological assessment and monitoring. *Methods in Ecology and Evolution* **10**:169–185 DOI [10.1111/2041-210X.13101](https://doi.org/10.1111/2041-210X.13101).
- Goerlitz HR. 2018.** Weather conditions determine attenuation and speed of sound: environmental limitations for monitoring and analyzing bat echolocation. *Ecology and Evolution* **8**:5090–5100 DOI [10.1002/ece3.4088](https://doi.org/10.1002/ece3.4088).
- Görföl T, Kruskop SV, Tu VT, Estók P, Son NT, Csorba G. 2020.** A new genus of vespertilionid bat: the end of a long journey for Joffre’s Pipistrelle (Chiroptera: Vespertilionidae). *Journal of Mammalogy* **101**:331–348 DOI [10.1093/jmammal/gyz202](https://doi.org/10.1093/jmammal/gyz202).
- Hackett TD, Holderied MW, Korine C. 2017.** Echolocation call description of 15 species of Middle-Eastern desert dwelling insectivorous bats. *Bioacoustics* **26**:217–235 DOI [10.1080/09524622.2016.1247386](https://doi.org/10.1080/09524622.2016.1247386).

- Huang JCC, Jazdyk EL, Nusalawo M, Maryanto I, Maharadatunkamsi, Wiantoro S, Kingston T. 2014. A recent bat survey reveals Bukit Barisan Selatan landscape as a chiropteran diversity hotspot in Sumatra. *Acta Chiropterologica* 16:413–449 DOI 10.3161/150811014X687369.
- Huang JCC, Rustiati EL, Nusalawo M, Kingston T. 2019. Echolocation and roosting ecology determine sensitivity of forest-dependent bats to coffee agriculture. *Biotropica* 51:757–768 DOI 10.1111/btp.12694.
- Hughes AC, Satasook C, Bates PJJ, Soisook P, Sritongchuay T, Jones G, Bumrungsri S. 2011. Using echolocation calls to identify Thai bat species: Vespertilionidae, Emballonuridae, Nycteridae and Megadermatidae. *Acta Chiropterologica* 13:447–455 DOI 10.3161/150811011X624938.
- Ith S, Bumrungsri S, Furey NM, Bates PJ, Wonglapsuwan M, Khan FAA, Thong VD, Soisook P, Satasook C, Thomas NM. 2015. Taxonomic implications of geographical variation in *Rhinolophus affinis* (Chiroptera: Rhinolophidae) in mainland Southeast Asia. *Zoological Studies* 54:31 DOI 10.1186/s40555-015-0109-8.
- Kao M-T, Liu J-N, Cheng H-C, Nakazawa T. 2020. Social signatures in echolocation calls of a leaf-roosting bat, *Kerivoula Furva*. *Bioacoustics* 29:461–480 DOI 10.1080/09524622.2019.1616617.
- Karine C, Kalko EKV. 2001. Toward a global bat-signal database. *IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine* 20:81–85 DOI 10.1109/51.932730.
- Kingston T. 2013. Response of bat diversity to forest disturbance in Southeast Asia: insights from long-term research in Malaysia. In: Adams R, Pedersen S, eds. *Bat evolution, ecology, and conservation*. New York: Springer New York, 169–185 DOI 10.1007/978-1-4614-7397-8_9.
- Kingston T, Jones G, Akbar Z, Kunz TH. 2003. Alternation of echolocation calls in 5 Species of aerial-feeding insectivorous bats from Malaysia. *Journal of Mammalogy* 84:205–215 DOI 10.1644/1545-1542(2003)084<0205:AOECIS>2.0.CO;2.
- Kingston T, Rossiter SJ. 2004. Harmonic-hopping in Wallacea's bats. *Nature* 429:654–657 DOI 10.1038/nature02487.
- Kunz TH, Braun de Torrez E, Bauer D, Lobova T, Fleming TH. 2011. Ecosystem services provided by bats. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1223:1–38 DOI 10.1111/j.1749-6632.2011.06004.x.
- Larsen RJ, Boegler KA, Genoways HH, Masefield WP, Kirsch RA, Pedersen SC. 2007. Mist netting bias, species accumulation curves, and the rediscovery of two bats on Montserrat (Lesser Antilles). *Acta Chiropterologica* 9:423–435 DOI 10.3161/1733-5329(2007)9[423:MNBSAC]2.0.CO;2.
- López-Bosch D, Huang JC-C, Wang Y, Palmeirim AF, Gibson L, López-Baucells A. 2021. Bat echolocation in continental China: a systematic review and first acoustic identification key for the country. *Mammal Research* 66:405–416 DOI 10.1007/s13364-021-00570-x.
- MacSwiney GMC, Clarke FM, Racey PA. 2008. What you see is not what you get: the role of ultrasonic detectors in increasing inventory completeness

- in Neotropical bat assemblages. *Journal of Applied Ecology* **45**:1364–1371
DOI [10.1111/j.1365-2664.2008.01531.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2008.01531.x).
- Marques JT, Pereira MJR, Marques TA, Santos CD, Santana J, Beja P, Palmeirim JM. 2013.** Optimizing sampling design to deal with mist-net avoidance in Amazonian birds and bats. *PLOS ONE* **8**:e74505 DOI [10.1371/journal.pone.0074505](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074505).
- McArthur E, Khan FAA. 2021.** Towards a regional call library: classifying calls of a species-rich bat assemblage in a Bornean karst rainforest. *Journal of Bat Research & Conservation* **14**:95–117 DOI [10.14709/BarbJ.14.1.2021.11](https://doi.org/10.14709/BarbJ.14.1.2021.11).
- Monadjem A, Shapiro JT, Mtsetfwa F, Reside AE, McCleery RA. 2017.** Acoustic call library and detection distances for bats of Swaziland. *Acta Chiropterologica* **19**:175–187 DOI [10.3161/15081109ACC2017.19.1.014](https://doi.org/10.3161/15081109ACC2017.19.1.014).
- Phauk S, Sarith P, Furey NM. 2013.** Cambodian bat echolocation: a first description of assemblage call parameters and assessment of their utility for species identification. *Cambodian Journal of Natural History* **2013**:16–26.
- Raman S, Hughes AC. 2021.** Echobank for the bats of western ghats biodiversity hotspot, India. *Acta Chiropterologica* **22**:349–364
DOI [10.3161/15081109ACC2020.22.2.010](https://doi.org/10.3161/15081109ACC2020.22.2.010).
- Russ J. 2012.** *British bat calls: a guide to species identification*. Exeter: Pelagic Publishing.
- Russo D, Ancillotto L, Jones G. 2018.** Bats are still not birds in the digital era: echolocation call variation and why it matters for bat species identification. *Canadian Journal of Zoology* **96**:63–78 DOI [10.1139/cjz-2017-0089](https://doi.org/10.1139/cjz-2017-0089).
- Russo D, Voigt CC. 2016.** The use of automated identification of bat echolocation calls in acoustic monitoring: a cautionary note for a sound analysis. *Ecological Indicators* **66**:598–602 DOI [10.1016/j.ecolind.2016.02.036](https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.02.036).
- Rydell J, Nyman S, Eklöf J, Jones G, Russo D. 2017.** Testing the performances of automated identification of bat echolocation calls: A request for prudence. *Ecological Indicators* **78**:416–420 DOI [10.1016/j.ecolind.2017.03.023](https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.03.023).
- Shazali N, Rahman SPH, Tahir NFDA, Murni R, Latip NA, Naharuddin NM, Azhar I, McArthur E, Khalik MZ, Rahman M-R, Khan FAA, Tingga RCT. 2016.** Small mammals from Miri, northeastern region of Sarawak, Malaysian Borneo: note on new locality records. *Check List* **12**:1–10 DOI [10.15560/12.2.1863](https://doi.org/10.15560/12.2.1863).
- Siemers BM. 2004.** Bats in the field and in a flight cage: recording and analysis of their echolocation calls and behavior. In: *Bat Echolocation research*. Austin, Texas: Bat Conservation International, 107–113.
- Simmons NB, Cirranello AL. 2020.** Bat of the world: a taxonomic and geographic database..
- Tanshi I, Kingston T. 2021.** Introduction and implementation of harp traps signal a new era in bat research. In: *50 Years of Bat Research: foundations and New Frontiers. Fascinating Life Sciences*. Switzerland: Springer International Publishing, 43–59
DOI [10.1007/978-3-030-54727-1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-54727-1).
- Tu VT, Hassanin A, Görföl T, Arai S, Fukui D, Thanh HT, Son NT, Furey NM, Csorba G. 2017.** Integrative taxonomy of the *Rhinolophus macrotis* complex (Chiroptera,

- Rhinolophidae) in Vietnam and nearby regions. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 55:177–198 DOI 10.1111/jzs.12169.
- Walters CL, Collen A, Lucas T, Mroz K, Sayer CA, Jones KE. 2013.** Challenges of using bioacoustics to globally monitor bats. In: Adams RA, Pedersen SC, eds. *Bat evolution, ecology, and conservation*. New York: Springer New York, 479–499 DOI 10.1007/978-1-4614-7397-8_23.
- Wilson DE, Mittermeier RA. 2019.** *Handbook of the mammals of the world*. Barcelona: Lynx Edicions.
- Zamora-Gutierrez V, Lopez-Gonzalez C, Gonzalez MCMacSwiney, Fenton B, Jones G, Kalko EKV, Puechmaille SJ, Stathopoulos V, Jones KE. 2016.** Acoustic identification of Mexican bats based on taxonomic and ecological constraints on call design. *Methods in ecology and evolution* 7:1082–1091 DOI 10.1111/2041-210X.12556.
- Zamora-Gutierrez V, MacSwiney GMC, Balvanera SM, Esquivelzeta ER. 2021.** The evolution of acoustic methods for the study of bats. In: *50 years of bat research: foundations and new frontiers. Fascinating life Sciences*. Switzerland: Springer International Publishing, 43–59 DOI 10.1007/978-3-030-54727-1.
- Zamora-Gutierrez V, Ortega J, Avila-Flores R, Aguilar-Rodríguez PA, Alarcón-Montano M, Avila-Torresagatón LG, Ayala-Berdón J, Bolívar-Cimé B, Briones-Salas M, Chan-Noh M, Chávez-Cauich M, Chávez C, Cortés-Calva P, Cruzado J, Cuevas JC, Real-Monroy MDel, Elizalde-Arellano C, García-Luis M, García-Morales R, Guerrero JA, Guevara-Carrizales AA, Gutiérrez EG, Hernández-Mijangos LA, Ibarra-López MP, Iñiguez Dávalos LI, León-Madrado R, López-González C, López-Téllez MC, López-Vidal JC, Martínez-Balvanera S, Montiel-Reyes F, Murrieta-Galindo R, Orozco-Lugo CL, Pech-Canché JM, Pérez-Pérez L, Ramírez-Martínez MM, Rizo-Aguilar A, Robredo-Esquivelzeta E, Rodas-Martínez AZ, Rojo-Cruz MA, Selem-Salas CI, Uribe-Bencomo E, Vargas-Contreras JA, MacSwiney GMC. 2020.** The Sonozotz project: assembling an echolocation call library for bats in a megadiverse country. *Ecology and Evolution* 10:4928–4943 DOI 10.1002/ece3.6245.



OPEN The calls of Vietnamese bats: a major step toward the acoustic characterization of Asian bats

Dorottya Győrössi^{1,2}, Gábor Csorba¹, Kriszta Lilla Szabadi^{2,3}, Péter Estók⁴, Vuong Tan Tu^{5,6}, Vu Dinh Thong^{5,6}, Neil M. Furey^{7,8}, Joe Chun-Chia Huang⁹, Mao-Ning Tuanmu¹⁰, Dai Fukui¹¹, Sándor Zsebők³ & Tamás Görföl^{1,12}✉

Southeast Asia includes several global biodiversity hotspots and bats account for nearly one-third of mammal species currently known in the region. While acoustic methods have become widespread in bat research, basic information is often lacking on the echolocation calls produced by Asian bat species. Since such information can aid a wide variety of research and conservation initiatives, descriptions of the calls emitted by Asian bats are fundamental. The aim of our study was to provide a standardized analysis and description of the Vietnamese bat echolocation calls. We analyzed call recordings of 87 species arranged in eight families. This constitutes 74% of the echolocating bats presently known in Vietnam and includes the first call descriptions for five taxa. Our use of an open-source software and the deposition of recordings in the ChiroVox repository will facilitate comparative studies in Asia and the information we provide represents one of the most comprehensive bioacoustic databases for Asian bats to date.

Keywords Chiroptera, Acoustics, Echolocation, Species identification, Classification, Acoustic monitoring

Exploring the wildlife of tropical areas, heavily affected by the biodiversity crisis, is one of the most urgent and important research fields today. The rainforests of Southeast Asia encompass four of the 25 biodiversity hotspots globally and are among the most endangered habitats worldwide^{1–3}. Bats are an important component of this diversity, accounting for nearly one-third of mammal species in Southeast Asia^{4–6}, but are also among the least known vertebrates in the region⁴. Unfortunately, it has been estimated that ≈40% of regional bat species could become extinct by the end of the twenty-first century if current rates of deforestation continue^{4,7,8}. In response to this, more comprehensive conservation studies are urgently needed to improve knowledge regarding patterns of diversity and distribution as well as the natural history of bats in Southeast Asia^{4,5,9}.

Bats are elusive animals, being primarily active during the night and often roosting in hidden places. Traditional capture methods (mist-nets & harp-traps) are usually suitable for catching bats up to a few meters above ground level, with the result that species flying within or above the forest canopy are typically under-represented in ground-based surveys. However, with the exception of most of the Old World fruit bats (Pteropodidae), bats use an echolocation system which allows us to study their sounds without trapping and stressing them unnecessarily. These acoustic signals play an important role in the life of bats, are used to orient and hunt in the dark^{10,11} and are adapted to different environments and resources, as their primary goal is to provide adequate sensitivity at a given foraging site^{11–16}. The use of bat detectors is widespread and has a long history in temperate areas¹⁷ and is gradually increasing in Asian countries^{18–27}.

The main advantage of acoustic surveys over traditional capture methods is that a lot of data can be collected during a short period of time without disturbing the bats²⁸. Passive acoustic monitoring can be used to sample

¹Department of Zoology, Hungarian Natural History Museum, Budapest, Hungary. ²Hungarian University of Agriculture and Life Sciences, Gödöllő, Hungary. ³Institute of Ecology and Botany, HUN-REN Centre for Ecological Research, Vácrátót, Hungary. ⁴Department of Zoology, Eszterházy Károly Catholic University, Eger, Hungary. ⁵Institute of Ecology and Biological Resources, Vietnam Academy of Science and Technology, Hanoi, Vietnam. ⁶Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology, Hanoi, Vietnam. ⁷Harrison Institute, Kent, UK. ⁸Fauna & Flora, Phnom Penh, Cambodia. ⁹Department of Life Science, National Taiwan Normal University, Taipei, Taiwan. ¹⁰Biodiversity Research Center, Academia Sinica, Taipei, Taiwan. ¹¹Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Tokyo, Japan. ¹²Szentágothai Research Centre, National Laboratory of Virology, University of Pécs, Ifjúság Útja 20, Pécs 7624, Hungary. ✉email: tamas@gorfol.eu

multiple locations simultaneously, to reveal trends in population size and to examine their behavior and habitat preferences²⁹. As a consequence, the description of bat echolocation calls is of great importance for acoustic research and certain ecological studies^{14,30,31}. However, acoustic sampling methods also have limitations. The directionality of high frequency calls and the intensity of calls may differ between species, hence certain taxa (e.g., “whispering” bats) can be underrepresented in surveys. In many cases, bats can only be determined at the species-group level, and accurate information about the sex, age, reproductive status and other aspects of individuals cannot be obtained. The echolocation signals emitted by bats can vary greatly depending on geographical location, habitat structure, flight altitude, and other environmental factors^{12,14,15,32}. Moreover, differences in body size, sex and age can also cause interspecific variation in calls and individual variation can occur as bats traverse different habitats^{33,34}. These variations may hinder exact species identification and must be considered in analyses. They underline the necessity for open-access call repositories with multiple recordings of the same taxon in different conditions.

With 129 bat species currently known (unpublished data of the authors), the bat fauna of Vietnam is highly diverse³⁵. Nearly 40 species were described as new for science or new for the country in recent decades (e.g., *Kerivoula titania*, *Murina eleryi*, *Mu. beelzebub*, *Mu. walstoni*, *Mu. annamitica*, *Myotis ancricola*, *My. annamitica*, *My. annatessae*, *My. indochinensis*, *My. phanluongi*, *Hipposideros griffini*)^{36–41}. The first publication containing information on Vietnamese bat echolocation was Borissenko and Kruskop (2003)⁴², whereas the first research was published by Furey et al. (2009)¹⁹, who described the calls of 31 bat species occurring in Kim Hy Nature Reserve, northern Vietnam and concluded that acoustic identification of local bat species was feasible. Since then, several studies in other locations in Vietnam have provided information on the call characteristics of additional Vietnamese bat species^{22,26,43–50}.

Acoustic monitoring has appeared as a reliable and standardized method for rapid surveys, but it has to be based on localized (country or province level) acoustic libraries. Therefore, there is an urgent need for bat acoustic studies from many regions of the world. Although several papers have included echolocation parameters of Southeast Asian bat species, comprehensive studies are scarce. Elusive or rare species are often missing from these studies and the call analyses are rarely repeatable as the recordings are not available for further studies. The goal of our study was to describe and characterize echolocation calls of Vietnamese bats to facilitate research and conservation activities in the wider Southeast Asian region. We ensure repeatability by using open-source software and providing all recordings in the ChiroVox sound database⁵¹, so as to allow comparative analyses and identification of anonymous bat calls.

Results

We analyzed a total of 3,438 echolocation pulses in 1,042 recordings manually (in some cases, multiple harmonics were measured). These recordings stemmed from 87 species caught and identified in the field or later through DNA analyses and two species/species groups for whom identification was uncertain (e.g., *Hipposideros grandis/poutensis* and *Kerivoula cf. hardwickii*). The bats belong to 28 genera arranged in eight families: Pteropodidae, Megadermatidae, Emballonuridae, Hipposideridae, Rhinolophidae, Molossidae, Miniopteridae and Vespertilionidae (Table S1) and account for 74% of echolocating bat species in Vietnam. We provide an overview for each family, including the basic characteristics of the calls and species analyzed.

Pteropodidae

Within the family Pteropodidae we analyzed the calls of one species from the genus *Rousettus*. Members of this genus are well known for producing echolocation sounds by making clicks with their tongue. We were able to measure echolocation clicks of *R. leschenaultii*. These were atonal calls with single dominant, low frequency FM structure (Fig. 1, Table 1).

Megadermatidae

Recordings of two species in two genera were analyzed from the Megadermatidae: *Lyroderma lyra* and *Megaderma spasma*. Both species emitted short duration narrowband FM calls with multi-harmonic signals (Fig. 1, Table 1). Among the multi-harmonic signals, the second and the third harmonics were measured in most cases.

Emballonuridae

We were able to study three species within the Emballonuridae, all belonging to the genus *Taphozous*: *T. longimanus*, *T. melanopogon* and *T. theobaldi*. All three species emit long multi-harmonic QCF or FM signals, out of which the second harmonic is the most dominant, although the other harmonics were also relatively strong (Fig. 1, Table 1). We consequently measured the second harmonic in all cases and the third and fourth harmonics in many cases.

Hipposideridae

The calls of 15 species arranged in three hipposiderid genera were measured (Fig. 2, Table 2). All but one (*Coelops frithii*) of these emitted calls with a typical CF-FM structure. The second harmonic of each call was measured because it contained the maximum energy. *Coelops frithii* emitted calls with a special CF-FM structure; these usually contained an initial and very short narrowband component, but the dominant energy was always contained in the FM sweep.

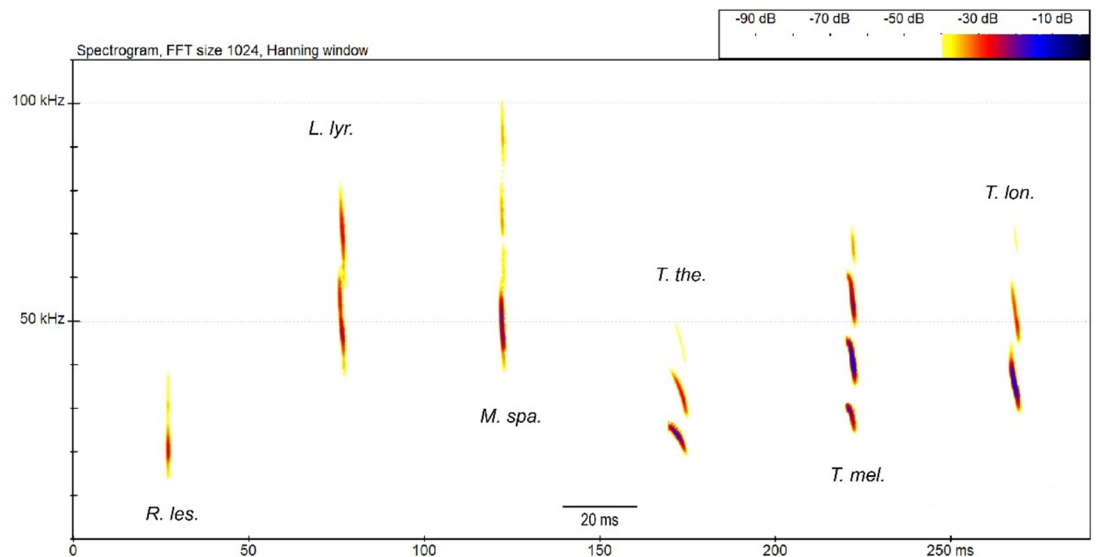


Fig. 1. Echolocation call characteristics of bats belonging to the Pteropodidae, Megadermatidae and Emballonuridae families. Multiple harmonics are shown for the megadermatids and emballonurids. Abbreviations: *R. les.*—*Rousettus leschenaultii*, *L. lyr.*—*Lyroderma lyra*, *M. spa.*—*Megaderma spasma*, *T. the.*—*Taphozous theobaldi*, *T. mel.*—*T. melanopogon*, *T. lon.*—*T. longimanus*.

Species	HM	D (ms)	IPI (ms)	FmaxE (kHz)	SF (kHz)	EF (kHz)	HF (kHz)	LF (kHz)	BW (kHz)
<i>Rousettus leschenaultii</i>	1	1.39 ± 0.59 1–2.3 (3)	53 ± 32.64 21–98 (3)	22.73 ± 2.27 18.49–26.27 (3)	51.81 ± 11.94 35.42–63.95 (3)	10.84 ± 5.66 6.29–19.02 (3)	51.81 ± 11.94 35.42–63.95 (3)	10.84 ± 5.66 6.29–19.02 (3)	40.97 ± 17.5 17.17–57.67 (3)
<i>Lyroderma lyra</i>	2	6.3 ± 0.98 5–8 (11)	23.52 ± 6.32 12–35 (11)	50.25 ± 6.81 42.04–65.5 (16)	63.17 ± 5.95 53.09–77.45 (16)	38.71 ± 7.16 31.57–58.92 (16)	63.17 ± 5.95 53.09–77.45 (16)	38.71 ± 7.16 31.57–58.92 (16)	24.46 ± 3.67 17.4–31.79 (16)
<i>Lyroderma lyra</i>	3	10.25 ± 1.36 8–12 (4)	34.75 ± 8.98 22–45 (4)	69.97 ± 8.96 59.63–93.81 (16)	86.75 ± 6.99 71.9–100.81 (16)	56.89 ± 8.71 43.33–80.67 (16)	86.75 ± 6.99 71.9–100.81 (16)	56.89 ± 8.71 43.33–80.67 (16)	29.86 ± 5.32 18.13–42.16 (16)
<i>Megaderma spasma</i>	2	6.33 ± 0.52 6–7 (2)	22.17 ± 9.15 15–40 (2)	47.27 ± 2.29 44.83–50.59 (4)	62.31 ± 1.76 59.04–64.74 (4)	38.24 ± 1.46 36.2–40.71 (4)	62.31 ± 1.76 59.04–64.74 (4)	38.24 ± 1.46 36.2–40.71 (4)	24.08 ± 2.25 19.03–26.74 (4)
<i>Megaderma spasma</i>	3	6.33 ± 0.52 6–7 (2)	22.17 ± 9.15 15–40 (2)	69.66 ± 5.51 60.96–75.8 (4)	87.91 ± 4.15 80.23–92.75 (4)	56.53 ± 1.15 54.94–58.56 (4)	87.91 ± 4.15 80.23–92.75 (4)	56.53 ± 1.15 54.94–58.56 (4)	31.39 ± 3.33 25.29–35.67 (4)
<i>Taphozous longimanus</i>	2	4.89 ± 0.93 4–6 (3)	156.33 ± 61.57 100–274 (9)	28.13 ± 29.01 27.52–29.01 (3)	38.77 ± 1.64 36.28–40.68 (3)	24.97 ± 0.75 23.91–25.78 (3)	38.77 ± 1.64 36.28–40.68 (3)	24.97 ± 0.75 23.91–25.78 (3)	13.8 ± 2.11 11.22–16.67 (3)
<i>Taphozous longimanus</i>	3	4.67 ± 1 4–6 (9)	156.33 ± 61.89 100–275 (9)	41.51 ± 0.67 40.47–42.71 (9)	52.03 ± 1.89 48.54–54.67 (9)	38.17 ± 1.16 36.54–39.9 (9)	52.03 ± 1.89 48.54–54.67 (9)	38.17 ± 1.16 36.54–39.9 (9)	13.87 ± 2.5 10.39–18.13 (9)
<i>Taphozous longimanus</i>	4	4.11 ± 0.93 3–6 (9)	156.56 ± 61.89 99–275 (9)	55.59 ± 1.59 53.79–58.4 (9)	65.12 ± 1 63.91–66.61 (9)	51.97 ± 1.44 49.91–54.02 (9)	65.12 ± 1 63.91–66.61 (9)	51.97 ± 1.44 49.91–54.02 (9)	13.15 ± 1.96 9.91–16.19 (9)
<i>Taphozous melanopogon</i>	2	3.83 ± 0.98 3–5 (2)	43.17 ± 27.82 13–89 (6)	27.09 ± 28.8 26.29–28.8 (2)	33.77 ± 3.88 30.27–38.23 (2)	21.97 ± 1.64 19.79–23.8 (2)	33.77 ± 3.88 30.27–38.23 (2)	21.97 ± 1.64 19.79–23.8 (2)	11.79 ± 2.46 8.98–15.26 (2)
<i>Taphozous melanopogon</i>	3	3.33 ± 1.53 2–5 (3)	46.33 ± 10.02 35–54 (3)	40.06 ± 1.01 39.07–41.09 (3)	52.46 ± 0.65 51.8–53.09 (3)	34.24 ± 0.61 33.53–34.62 (3)	52.46 ± 0.65 51.8–53.09 (3)	34.24 ± 0.61 33.53–34.62 (3)	18.22 ± 1.22 17.19–19.56 (3)
<i>Taphozous melanopogon</i>	4	3.33 ± 1.53 2–5 (3)	46.33 ± 10.02 35–54 (3)	53.54 ± 1.43 52.3–55.1 (3)	64.83 ± 1.28 64.05–66.31 (3)	47.82 ± 0.54 47.23–48.27 (3)	64.83 ± 1.28 64.05–66.31 (3)	47.82 ± 0.54 47.23–48.27 (3)	17.02 ± 0.94 16.19–18.04 (3)
<i>Taphozous theobaldi</i>	2	4.6 ± 1.67 3–9 (10)	56.53 ± 54.08 14–176 (30)	24.17 ± 26.27 22.22–26.27 (10)	30.51 ± 1.91 27.9–36.05 (10)	19.11 ± 0.97 17.81–21.46 (10)	30.51 ± 1.91 27.9–36.05 (10)	19.11 ± 0.97 17.81–21.46 (10)	11.4 ± 2.06 8.69–17.31 (10)
<i>Taphozous theobaldi</i>	3	4.33 ± 1.44 3–7 (12)	59.75 ± 59.73 14–176 (12)	34.56 ± 1.44 31.94–37.36 (12)	43.91 ± 3.51 40.16–49.76 (12)	28.79 ± 1.15 26.78–31.33 (12)	43.91 ± 3.51 40.16–49.76 (12)	28.79 ± 1.15 26.78–31.33 (12)	15.12 ± 4.38 10.57–22.03 (12)
<i>Taphozous theobaldi</i>	4	4.08 ± 1.62 2–7 (12)	59.83 ± 59.67 14–176 (12)	46.77 ± 1.93 43.78–50.59 (12)	55.62 ± 2.88 52.12–60.22 (12)	40.1 ± 1.87 38.07–44.82 (12)	55.62 ± 2.88 52.12–60.22 (12)	40.1 ± 1.87 38.07–44.82 (12)	15.52 ± 3.48 9.89–20.46 (12)

Table 1. Mean ± standard deviation, minimum–maximum values and number of measured bat call sequences (in brackets) from species in the Pteropodidae, Megadermatidae and Emballonuridae families. HM—harmonic measured, D—duration of a single pulse, IPI—interpulse interval, FmaxE—frequency of maximum energy, SF—start frequency, EF—end frequency, HF—highest frequency, LF—lowest frequency, BW—bandwidth.

Rhinolophidae

Seventeen species were included in our dataset for the Rhinolophidae: *Rhinolophus acuminatus*, *R. affinis*, *R. chaseni*, *R. episcopus*, *R. lepidus*, *R. perniger*, *R. malayanus*, *R. marshalli*, *R. microglobosus*, *R. pearsonii*, *R. pusillus*, *R. rex*, *R. shameli*, *R. siamensis*, *R. sinicus*, *R. steno* and *R. thomasi*. All of these species emitted the characteristic FM-CF-FM calls of horseshoe bats with the maximum energy in the second harmonic (Fig. 3, Table 3).

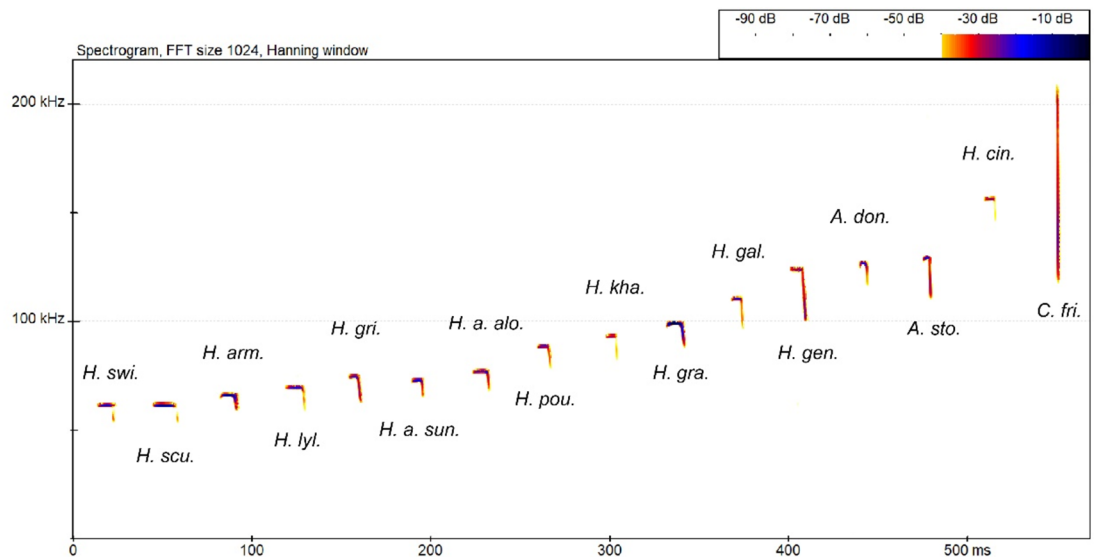


Fig. 2. Echolocation call characteristics of Hipposideridae (only the second harmonics shown). Abbreviations: *H. swi.*–*Hipposideros swinhoei*, *H. scu.*–*H. scutinares*, *H. arm.*–*H. armiger*, *H. lyl.*–*H. lylei*, *H. gri.*–*H. griffini*, *H. a. sun.*–*H. alongensis sungi*, *H. a. alo.*–*H. alongensis alongensis*, *H. pou.*–*H. poutensis*, *H. kha.*–*H. khaokhouayensis*, *H. gra.*–*H. grandis*, *H. gal.*–*H. galeritus*, *H. gen.*–*H. gentilis*, *A. don.*–*Aselliscus dongbacanus*, *A. sto.*–*A. stoliczkanus*, *H. cin.*–*H. cineraceus*, *C. fri.*–*Coelops frithii*.

Molossidae

Recordings for one molossid species were measured: *Mops plicatus*. This species emitted multi-harmonic narrowband FM calls with relatively low peak frequencies from which the first harmonic was measured (Fig. 4, Table 4). A partial echo of the first harmonic is included in the exemplar signal provided in Fig. 4, which includes a small hook at the beginning of the call.

Miniopteridae

Three miniopterid species were analyzed: *Miniopterus fuliginosus*, *M. magnater* and *M. pusillus* (Fig. 4, Table 4). These species all emitted FM-QCF signals (FM calls with narrowband tails) and the first harmonic was measured in all cases since it contained the maximum energy. In some cases, a second harmonic was apparent in higher intensity signals.

Vespertilionidae

Recordings from 46 species belonging to 18 vespertilionid genera were analyzed (Figs. 4, 5, 6, 7) (Tables 4, 5, 6). These revealed the remarkable diversity of signal types within the family, with three major types identified: FM, FM-QCF and cDFM (checked downward FM).

Of the Pipistrellini tribe we measured the calls of six species from three genera: *Nyctalus plancyi*, *Glischropus bucephalus*, *Pipistrellus coromandra*, *P. javanicus*, *P. abramus* and *P. tenuis*. Half of the species emitted both FM and FM-QCF calls, but in the case of *P. abramus* we found only FM-QCF type calls and in the case of *P. coromandra* and *P. tenuis* we only found FM type calls (Fig. 4, Table 4).

Within the subfamily Myotinae we measured the calls of 12 *Myotis* species: *M. altarium*, *M. alticraniatus*, *M. annectans*, *M. ater*, *M. chinensis*, *M. formosus*, *M. horsfieldii*, *M. laniger*, *M. montivagus*, *M. muricola*, *M. pilosus*, *M. sicarius* and *Eudiscopus denticulus* (Fig. 5). Aside from *M. alticraniatus* and *M. muricola*, *Myotis* species emitted only short-duration, broadband FM calls; whereas *Eudiscopus denticulus* uses FM-QCF signals, *Myotis alticraniatus* and *M. muricola* also emitted FM-QCF as well as cDFM-QCF calls. In the case of *E. denticulus*, we also observed the “unique” call type described by Zsebök et al. (2010)⁵². In contrast to the above species, *Plecotus homochrous* (Vespertilioninae: Plecotini) emitted short, low intensity, narrowband FM type signals with multiple harmonics.

Within the Murinae subfamily, we studied the calls of nine species from two genera: *Harpiocephalus harpia* and *Murina annamitica*, *M. beelzebub*, *M. cyclotis*, *M. eleryi*, *M. feae*, *M. fionae*, *M. harrisoni* and *M. huttoni*. Almost all of these species emitted calls of typical cDFM structure (Fig. 6), which begins with an upward modulated component followed by a downward phase. *Harpiocephalus harpia* also emitted FM and FM-QCF calls, while *Murina* species FM type beside cDFM. From *M. beelzebub* we could only examine FM type sounds, although this may be due to the fact that, in many cases, the initial stage of this type of call had only a low decibel value, so in these cases only the values of the FM structure could be measured accurately.

Of the Kerivoulinae subfamily, we were able to study the calls of seven species: *Phoniscus jagorii*, *Kerivoula depressa*, *K. dongduongana*, *K. furva*, *K. cf. hardwickii*, *K. kachinensis* and *K. titania*. All of these species emitted broadband FM calls with relatively low intensities and short durations (Fig. 6) and we found also cDFM types in case of *Kerivoula kachinensis* and *K. titania*.

Species	HM	D (ms)	IPI (ms)	FCF (kHz)	DCF (ms)	FmaxE (kHz)	SF (kHz)	EF (kHz)	HF (kHz)	LF (kHz)	BW (kHz)
<i>Aselliscus dongbacanus</i>	2	4.51±0.61 3.4–6 (10)	29.06±19.17 15–115.3 (10)	126.38±1.46 123.99–129.86 (10)	2.87±0.52 2–3.7 (10)	125.76±1.58 123.97–129.53 (10)	125.6±1.43 123–128.55 (10)	112.95±3.05 105.93–119.48 (10)	128.31±1.6 125.67–131.88 (10)	112.95±3.05 105.93–119.48 (10)	15.36±2.48 10.46–22.86 (10)
<i>Aselliscus stolliscanus</i>	2	4.99±1.59 3–7.7 (7)	36.97±19.21 18–94.6 (7)	125.14±5.59 117.83–132.03 (7)	3.5±1.45 2–6.2 (7)	124.7±5.53 117.42–131.26 (7)	123.44±6.39 114.55–131.27 (7)	112.44±3.19 108.33–120.06 (7)	127.17±5.93 119.4–134.61 (7)	112.44±3.19 108.33–120.06 (7)	14.73±4.57 9.26–25.34 (7)
<i>Coelops frithii</i>	2	1.67±0.58 1–2 (1)	12±1 11–13 (1)	133.6±0.88 132.61–134.32 (1)		133.6±0.88 132.61–134.32 (1)	210.43±2.06 208.27–212.38 (1)	113.9±3.11 111.89–117.48 (1)	210.43±2.06 208.27–212.38 (1)	113.9±3.11 111.89–117.48 (1)	96.53±5.01 90.79–100.06 (1)
<i>Hipposideros alongensis</i>	2	7.83±1.21 5.1–10 (11)	37.65±21.76 21.5–138.1 (11)	78.24±0.7 76.88–79.19 (11)	5.71±0.84 3.8–7 (11)	77.7±0.82 76.19–78.61 (11)	77.66±0.79 75.92–78.93 (11)	68.01±1.84 64.73–72.12 (11)	79.86±0.84 78.09–81.24 (11)	68.01±1.84 64.73–72.12 (11)	11.86±1.97 7.34–15.77 (11)
<i>Hipposideros alongensis</i>	2	6.92±1.31 4.7–9 (13)	29.38±8.46 16–52.9 (13)	72.29±1.17 69.64–73.82 (13)	5.04±1.34 3–7.1 (13)	71.76±1.31 69.12–73.81 (13)	71.81±1.13 69.38–73.14 (13)	62.18±2.43 57.78–67.81 (13)	74.05±1.21 71.69–75.98 (13)	62.24±2.35 58.5–67.81 (13)	11.82±2.06 6.75–15.13 (13)
<i>Hipposideros armiger</i>	2	9.25±1.71 6.4–14 (34)	40.42±23.45 15.7–197.4 (34)	66.98±2.95 62.8–77.46 (34)	7.23±1.66 4.8–12 (34)	66.52±2.92 62.36–76.89 (34)	66.04±3.38 59.59–77.26 (34)	57.11±3.22 46.81–67.61 (34)	68.86±3.06 62.27–79.72 (34)	57.21±3.05 52.74–67.61 (34)	11.65±1.36 7.68–14.93 (34)
<i>Hipposideros cinereus</i>	2	5.57±1.37 1–7.7 (18)	13.92±6.8 21–54.2 (18)	153.07±21.43 68.2–165.3 (18)	3.9±1.02 1–6 (18)	152.42±21.43 67.36–164.05 (18)	152.43±21.6 66.45–164.66 (18)	129.43±19.4 353.84–142.03 (18)	154.86±21.59 69.02–167.48 (18)	129.43±19.43 53.84–142.03 (18)	25.43±4.37 14.15–31.5 (18)
<i>Hipposideros galeritus</i>	2	5.95±2.15 1–10 (35)	21.58±9.54 1–49 (35)	110.82±3.48 99.89–114.64 (35)	3.74±1.3 21–6 (35)	110.31±3.42 99.36–115.54 (35)	109.86±3.64 99.75–114 (35)	94.35±3.47 82.12–99.95 (35)	112.43±3.81 101.26–116.66 (35)	94.35±3.47 82.12–99.95 (35)	18.07±2.91 11.61–25.62 (35)
<i>Hipposideros gentilis</i>	2	6.77±1.72 1–11.1 (43)	21.33±14.49 2–127.9 (43)	126.62±6.09 113.02–141.34 (43)	4.73±1.39 1–8.9 (43)	126.11±6.06 112.66–140.32 (43)	125.95±6.06 112.98–140.77 (43)	105.71±4.9 96.37–118.62 (43)	128.39±6.32 114.8–143.81 (43)	105.71±4.9 96.37–118.62 (43)	22.68±4.01 14.36–37.56 (43)
<i>Hipposideros grandis</i>	2	7.43±2.23 1–11 (18)	26.52±10 2–45 (18)	96.12±3.57 85.09–102.68 (18)	5.19±1.93 1–8 (18)	95.63±3.61 84.65–101.91 (18)	95.18±3.47 85.09–102.68 (18)	83.36±5.16 67.34–91.5 (18)	97.89±3.94 86.76–104.95 (18)	83.36±5.16 67.34–91.5 (18)	14.53±3.58 8.18–22.03 (18)
<i>Hipposideros grandis/ houay-poutensis</i>	2	6.33±0.98 5–8 (11)	23.52±6.32 12–35 (11)	98.35±4.54 94.07–112.1 (11)	3.64±0.82 2–5 (11)	97.63±4.64 93.57–111.55 (11)	97.78±4.36 93.62–111.03 (11)	81.9±5.43 73.95–95.95 (11)	100.44±4.54 96.1–114.37 (11)	81.6±5.11 73.95–95.95 (11)	18.84±2.16 14.7–23.14 (11)
<i>Hipposideros griffithi</i>	2	10.25±1.36 8–12 (4)	34.75±8.98 22–45 (4)	75.99±0.71 74.84–76.87 (4)	7.17±1.7 5–10 (4)	75.37±0.75 74.3–76.02 (4)	75.39±0.57 74.46–76.09 (4)	64.34±2.83 61.34–69.04 (4)	77.95±0.38 77.29–78.34 (4)	64.34±2.83 61.34–69.04 (4)	13.61±2.52 9.23–16.15 (4)
<i>Hipposideros khaokhouay-ensis</i>	2	6.33±0.52 6–7 (2)	22.17±9.15 15–40 (2)	94.53±0.18 94.26–94.73 (2)	4.83±0.41 4–5 (2)	94.15±0 94.15–94.15 (2)	94.19±0.11 94.03–94.33 (2)	80.41±1.77 78.49–82.46 (2)	96.37±0.2 96.04–96.62 (2)	80.41±1.77 78.49–82.46 (2)	15.96±1.83 13.95–17.75 (2)
<i>Hipposideros lyetii</i>	2	9.52±1.9 5.5–12.2 (12)	38.59±17.1 19–97.3 (12)	69.2±3.36 58.28–71.69 (12)	7.81±1.97 3.9–10.6 (12)	68.65±3.42 57.61–70.84 (12)	69.02±3.27 58.47–71.5 (12)	56.62±4.66 45.85–65.46 (12)	70.91±3.16 60.84–73.69 (12)	56.61±4.66 45.85–65.46 (12)	14.29±3.85 6.24–21.04 (12)
<i>Hipposideros poutensis</i>	2	6.81±1.43 3.9–9.5 (29)	30.31±13.69 16.8–127.5 (29)	88.61±2.8 84.35–96.53 (29)	4.73±1.11 2.6–7.3 (29)	88.15±2.77 83.79–95.87 (29)	87.99±2.91 83.42–96.07 (29)	75.33±4.39 65.39–86.76 (29)	90.54±2.92 85.75–98.55 (29)	75.33±4.39 65.39–86.76 (29)	15.2±3.41 7.05–24.67 (29)
<i>Hipposideros pratti</i>	2	9.43±0.32 9.2–9.8 (1)	29.63±2.24 27.2–31.6 (1)	62.33±0.24 62.19–62.61 (1)	7.8±0.26 7.6–8.1 (1)	61.92±0 61.92–61.92 (1)	61.91±0.05 61.85–61.94 (1)	52.09±0.68 51.31–52.49 (1)	63.3±0.05 63.28–63.36 (1)	52.09±0.68 51.31–52.49 (1)	11.21±0.65 10.79–11.96 (1)
<i>Hipposideros scutinaris</i>	2	10.68±2.14 7.5–14 (6)	27.16±5.59 17.9–37 (6)	62.73±0.5 62.16–63.55 (6)	8.63±1.99 6–12 (6)	62.3±0.62 61.35–63.08 (6)	62.48±0.49 61.84–63.23 (6)	50.06±1.03 48.66–52.09 (6)	64.56±0.54 64.09–65.71 (6)	50.06±1.03 48.66–52.09 (6)	14.5±1.3 12.57–16.94 (6)

Table 2. Mean ± standard deviation, minimum–maximum values and number of measured bat call sequences (in brackets) from species in the Hipposideridae family (HM – harmonic measured, D—duration of a single pulse, IPI—interpulse interval, FCF—frequency of constant frequency part, DCF—duration of constant frequency part, FmaxE—frequency of maximum energy, SF—start frequency, EF—end frequency, HF—highest frequency, LF—lowest frequency, BW—bandwidth).

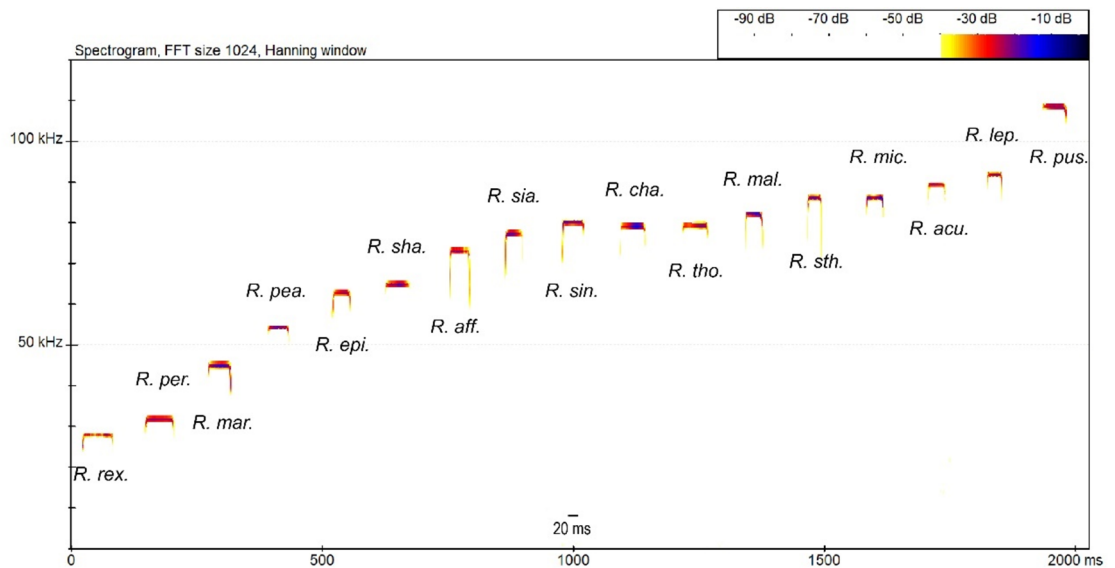


Fig. 3. Echolocation call characteristics of Rhinolophidae (only the second harmonics shown). Abbreviations: *R. rex.*—*Rhinolophus rex*, *R. per.*—*R. perniger*, *R. mar.*—*R. marshalli*, *R. pea.*—*R. pearsonii*, *R. epi.*—*R. episcopus*, *R. sha.*—*R. shameli*, *R. aff.*—*R. affinis*, *R. sia.*—*R. siamensis*, *R. sin.*—*R. sinicus*, *R. cha.*—*R. chaseni*, *R. tho.*—*R. thomasi*, *R. mal.*—*R. malayanus*, *R. sth.*—*R. stheno*, *R. mic.*—*R. microglobosus*, *R. acu.*—*R. acuminatus*, *R. lep.*—*R. lepidus*, *R. pus.*—*R. pusillus*.

The subfamily Vespertilioninae (with the exception of Pipistrellini and Plecotini shown above) is represented by the following 10 species: *Arielulus circumdatus* with FM signals, *Hypsugo cadornae* and *H. pulveratus* with both FM and FM-QCF signals, *Ia io* with only FM signals, *Mirostrellus joffrei* with both FM and FM-QCF signals, *Scotophilus heathii* and *S. kuhlii* with both FM and FM-QCF signals, *Scotomanes ornatus* with only FM signals, *Thainycteris aureocollaris* with only FM signals, and *Tylonycteris fulvida* with both FM and FM-QCF signals (Figs. 5 and 7).

New call descriptions

The echolocation calls of the following species are described in detail as their characteristics become available for the first time.

Glischropus bucephalus

Based on recordings of three males flying in a flight tent, this species emits broadband FM calls without strong harmonics (Figs. 4 and 8, Table 4). The maximum start frequency of these calls was 112.6 kHz and the minimum end frequency was 48.3 kHz. The peak energy occurred at an average frequency of 56.7 ± 1.8 (mean \pm SD) kHz. The mean call duration was 2.6 ± 0.5 ms with the longest call lasting 3.0 ms. Regarding interpulse intervals, most calls followed each other at intervals between 23 and 68 ms (44.9 ± 18.2 ms).

Kerivoula depressa

Based on signals emitted by a male and a female released within a flight tent, this species emits characteristic broadband FM type calls (Figs. 6 and 8, Table 6). The maximum start frequency measured was 215.4 kHz and the minimum end frequency was 77.3 kHz. Peak energy was at a frequency of 129.0 ± 15.8 kHz. The mean call duration was 2.3 ± 0.7 ms and the longest call was 3.6 ms. Most calls followed each other at intervals between 12 and 23 ms (15.5 ± 3.8 ms).

Kerivoula dongduongana

Based on four males and one female flying in a flight tent, this species emits a characteristic broadband FM call (Figs. 6 and 8, Table 6). The maximum start frequency was at 237.5 kHz and the minimum end frequency was 72.6 kHz. The peak energy was at 127.8 ± 13.1 kHz, whereas the mean call duration was 2.9 ± 0.8 ms and the longest call was 5 ms. Regarding interpulse intervals, most calls followed each other at intervals between 11 and 69 ms (21.3 ± 15.3 ms).

Myotis laniger

Based on one female flying in a flight tent, this species emits typical broadband FM calls (Figs. 5 and 8, Table 7). The maximum start frequency was found to be 96.0 kHz and the minimum end frequency was 30.3 kHz. The peak energy was at 54.7 ± 2.6 kHz on average. The mean call duration was around 3.4 ± 0.5 ms and the longest call was 4.3 ms. As for the interpulse interval, most of the calls followed each other at intervals between 40 and 55 ms (46 ± 5.3 ms).

Species	HM	D (ms)	IPI (ms)	FCF (kHz)	DCF (ms)	FmaxE (kHz)	SF (kHz)	EF (kHz)	HF (kHz)	LF (kHz)	BW (kHz)
<i>Rhinolophus acuminatus</i>	2	37.84 ± 8.91 23.4–56 (7)	81.27 ± 47.3 30–175.3 (7)	90.19 ± 2.01 87.11–93.39 (7)	32.64 ± 8.07 20.3–49.7 (7)	89.74 ± 1.87 86.5–92.84 (7)	79.88 ± 6.39 67.15–90.08 (7)	78.08 ± 5.8 69.15–90.37 (7)	91.55 ± 1.99 88.44–94.96 (7)	77.36 ± 5.83 67.15–89.21 (7)	14.19 ± 5.18 3.93–24.26 (7)
<i>Rhinolophus affinis</i>	2	32.78 ± 8.76 16.5–60 (82)	74.33 ± 34.36 20–220.5 (82)	75.75 ± 4.66 70.63–87.95 (82)	28.36 ± 8.25 12.2–53 (82)	75.43 ± 4.6 70.01–87.28 (82)	64.17 ± 6.81 49.72–82.49 (82)	56.67 ± 4.6 44.65–72.56 (82)	77.98 ± 4.56 72.96–91.19 (82)	56.32 ± 4.4 44.65–69.21 (82)	21.65 ± 4.25 9.81–34.44 (82)
<i>Rhinolophus chuseni</i>	2	41.06 ± 12.95 15–60 (14)	81.58 ± 31.28 18–130 (14)	79.66 ± 3.26 76.44–87.64 (14)	34.84 ± 11.9 10–54 (14)	79.16 ± 3.13 76.02–86.38 (14)	66.34 ± 3.85 60.57–78.76 (14)	63.67 ± 5.19 50.26–73.94 (14)	81.31 ± 3.79 77.69–90.77 (14)	62.56 ± 4.06 50.26–69.93 (14)	18.75 ± 7.1 9.82–39.59 (14)
<i>Rhinolophus episcopus</i>	2	27.17 ± 9.17 15–46 (8)	55.29 ± 24.87 19–100 (8)	59.61 ± 7.15 44.44–63.83 (8)	20.46 ± 10.55 10–44 (8)	59.19 ± 7.1 43.77–63.56 (8)	53.29 ± 7.54 39.93–62.98 (8)	50.39 ± 6.44 36.72–56.14 (8)	60.74 ± 7.04 45.4–64.93 (8)	50.3 ± 6.48 36.72–56.14 (8)	10.45 ± 2.03 6.77–15.64 (8)
<i>Rhinolophus leptus</i>	2	30.4 ± 12.92 12–48 (5)	74.67 ± 49.3 21–153 (5)	91.2 ± 1.34 89.49–93.79 (5)	26 ± 11.57 10–43 (5)	90.47 ± 1.35 88.97–93.57 (5)	81.88 ± 4.96 74.32–90.59 (5)	76.22 ± 6.14 70.6–87.2 (5)	93.07 ± 1.53 91.36–96.12 (5)	76.22 ± 6.14 70.6–87.2 (5)	16.86 ± 7.18 4.79–25.18 (5)
<i>Rhinolophus malayanus</i>	2	31.45 ± 13.22 13.7–65.4 (23)	77.38 ± 43.36 18–164.9 (23)	85.95 ± 5.46 80.51–96.28 (23)	26.5 ± 12.23 10.1–57 (23)	85.48 ± 5.56 80.15–96.24 (23)	75.98 ± 7.83 65.12–91.51 (23)	70.02 ± 5.7 58.65–81.05 (23)	87.34 ± 5.29 82.08–97.25 (23)	69.04 ± 5.68 58.65–81.05 (23)	18.3 ± 4.32 4.49–25.93 (23)
<i>Rhinolophus marshalli</i>	2	42.14 ± 10.28 26–62.5 (13)	88.35 ± 29.2 35–154 (13)	44.76 ± 1.26 42.62–46.33 (13)	36.16 ± 10.19 20–57.3 (13)	44.33 ± 1.31 42.36–46.07 (13)	39.34 ± 2.42 35.62–44.37 (13)	36.41 ± 1.89 32.12–40.85 (13)	46.41 ± 0.9 44.47–47.42 (13)	36.41 ± 1.89 32.12–40.85 (13)	10 ± 1.63 6.37–13.6 (13)
<i>Rhinolophus microglobosus</i>	2	31.75 ± 9.13 14.4–55.6 (22)	71.08 ± 45.37 18.4–251.8 (22)	89.02 ± 3.98 78.87–94.39 (22)	26.39 ± 8.94 10.7–50.6 (22)	88.47 ± 3.9 78.61–94.15 (22)	74.9 ± 8.01 62.79–90.19 (22)	68.97 ± 6.81 51.34–81.36 (22)	90.75 ± 4.12 80.93–96.76 (22)	68.3 ± 6.44 51.34–81.36 (22)	22.44 ± 5.11 12.83–38.7 (22)
<i>Rhinolophus pearsonii</i>	2	40.4 ± 10.23 12–79 (58)	95.7 ± 39.47 17–250 (58)	56.21 ± 3.34 51.27–66.17 (58)	35.34 ± 9.78 8–71 (58)	55.87 ± 3.34 50.82–65.86 (58)	47.06 ± 3.92 38.11–61.14 (58)	43.74 ± 4.05 35.37–56.59 (58)	58 ± 3.12 52.89–67.34 (58)	43.31 ± 3.5 35.37–52.49 (58)	14.69 ± 3.12 7.79–21.58 (58)
<i>Rhinolophus peringer</i>	2	48.32 ± 16.55 17–73 (5)	151.03 ± 81.26 48–305 (5)	32.63 ± 1.21 31.94–35.06 (5)	43.85 ± 16.27 13–66 (5)	32.38 ± 1.21 31.8–34.96 (5)	29.78 ± 1.65 26.45–32.42 (5)	28.38 ± 2.57 25.38–32.21 (5)	33.92 ± 1.4 32.81–36.63 (5)	28.19 ± 2.38 25.38–31.57 (5)	5.73 ± 1.75 2.89–8 (5)
<i>Rhinolophus pusillus</i>	2	31.05 ± 10.02 11–51 (55)	70.5 ± 43.14 14.7–290 (55)	106.63 ± 7.48 73.05–119.5 (55)	25.86 ± 9.5 38–47 (55)	106.12 ± 7.48 72.57–119.17 (55)	91.71 ± 7.28 61.39–113.74 (55)	85.38 ± 6.9 56.14–99.53 (55)	108.62 ± 7.62 74.59–121.84 (55)	85.16 ± 6.75 56.14–98.54 (55)	23.45 ± 4.15 7.53–34.9 (55)
<i>Rhinolophus rex</i>	2	46.4 ± 15.26 15–74.5 (33)	103.61 ± 45.64 10–296 (33)	29.89 ± 2.14 24.05–34.06 (33)	41.63 ± 14.82 12–70.4 (33)	29.55 ± 2.2 25.1–34.19 (33)	25.37 ± 2.33 20.06–32.36 (33)	23.29 ± 2.01 18.98–28.59 (33)	31.66 ± 2.39 27.48–38.55 (33)	23.26 ± 2 18.98–28.59 (33)	8.41 ± 1.82 4.2–12.94 (33)
<i>Rhinolophus shanhai</i>	2	45.05 ± 8.52 30.7–63.6 (11)	92.57 ± 14.84 60.7–128 (11)	67.67 ± 2.77 63.59–71.48 (11)	39.13 ± 8.33 25.2–56.5 (11)	67.33 ± 2.72 63.56–71.38 (11)	58.1 ± 3.99 52.43–67.15 (11)	57.48 ± 2.46 50.53–62.02 (11)	69.13 ± 2.64 65.01–72.74 (11)	56.18 ± 2.7 50.53–62.02 (11)	12.92 ± 2.94 6.54–19.42 (11)
<i>Rhinolophus stamensis</i>	2	37.86 ± 12.72 11–58 (18)	82.58 ± 36.8 13–135.9 (18)	74.12 ± 3.57 68.78–78.47 (18)	33.81 ± 12.48 8–54 (18)	73.63 ± 3.57 68.26–77.75 (18)	64.83 ± 4 58.46–74.63 (18)	61.59 ± 3 54.91–68.56 (18)	75.91 ± 3.6 69.91–80.38 (18)	61.27 ± 2.81 54.91–68.56 (18)	14.64 ± 3.75 7.23–22.34 (18)
<i>Rhinolophus sinicus</i>	2	36.3 ± 10.47 11.8–72 (27)	75.11 ± 26 15.2–175 (27)	77.86 ± 3.1 68.88–84.36 (27)	31.14 ± 9.35 8.8–48 (27)	77.54 ± 3.1 69.22–84.12 (27)	63.95 ± 4.29 56.62–76.66 (27)	60.73 ± 3.6 53.63–68.97 (27)	79.99 ± 3.0 77.15–85.93 (27)	60.43 ± 3.47 53.63–68.97 (27)	19.56 ± 2.511 1.42–26.63 (27)
<i>Rhinolophus sitheno</i>	2	19.47 ± 4.32 14–29 (5)	43.47 ± 39.23 16–116 (5)	87.22 ± 0.39 86.65–87.9 (5)	14.87 ± 3.54 10–22 (5)	86.72 ± 0.44 86.38–87.24 (5)	76.78 ± 4.95 70.64–87.07 (5)	63.89 ± 2.7 61.26–69.6 (5)	89.14 ± 0.41 88.39–89.6 (5)	63.89 ± 2.77 61.26–69.6 (5)	25.25 ± 2.83 19.09–27.47 (5)
<i>Rhinolophus thomasi</i>	2	39.93 ± 9.97 15–59.1 (29)	78.93 ± 25.37 18–147 (29)	82.19 ± 4.85 74.12–90.4 (29)	34.67 ± 9.73 10–54.9 (29)	81.88 ± 4.81 74.11–89.8 (29)	69.93 ± 6.18 60.34–87.8 (29)	65.68 ± 4.06 58.51–75.17 (29)	83.99 ± 4.46 76.03–91.4 (29)	65.46 ± 4.06 58.51–74.48 (29)	18.52 ± 3.7 9.83–27.36 (29)

Table 3. Mean ± standard deviation, minimum–maximum values and number of measured bat call sequences (in brackets) from species in the Rhinolophidae family. HM—harmonic measured, D—duration of a single pulse, IPI—interpulse interval, FCF—frequency of constant frequency part, DCF—duration of constant frequency part, FmaxE—frequency of maximum energy, SF—start frequency, EF—end frequency, HF—highest frequency, LF—lowest frequency, BW—bandwidth.

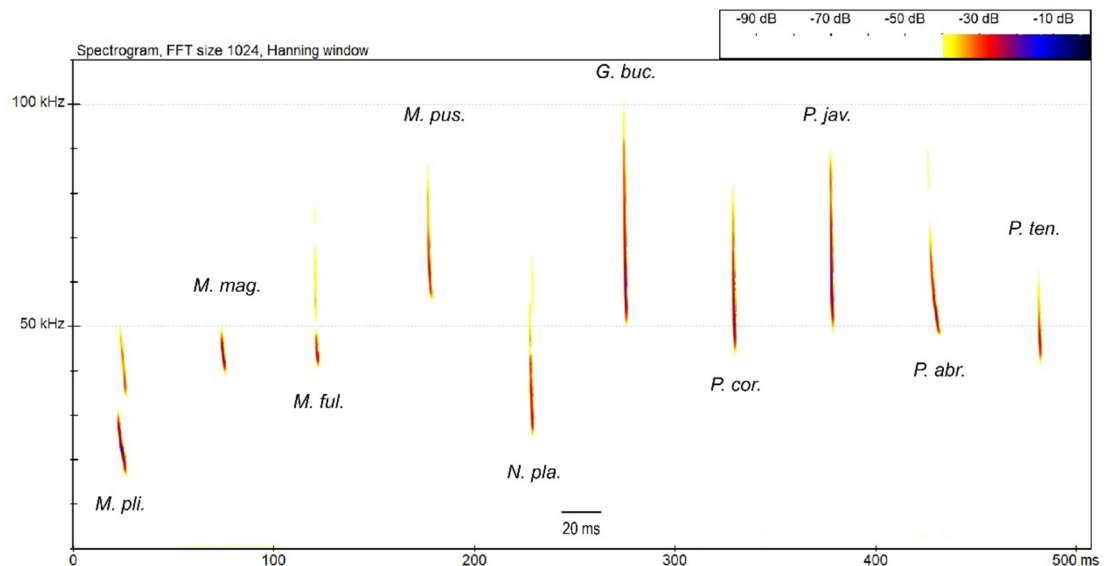


Fig. 4. Echolocation call characteristics of Molossidae, Miniopteridae and Pipistrellini (Vespertilionidae: Vespertilioninae). Abbreviations: *M. pli.*–*Mops plicatus*, *M. mag.*–*Miniopterus magnater*, *M. ful.*–*M. fuliginosus*, *M. pus.*–*M. pusillus*, *N. pla.*–*Nyctalus plancyi*, *G. buc.*–*Glischropus bucephalus*, *P. cor.*–*Pipistrellus coromandra*, *P. jav.*–*P. javanicus*, *P. abr.*–*P. abramus*, *P. ten.*–*P. tenuis*.

Myotis sicarius

The calls of *M. sicarius* were characterized by Csorba et al. (1999) as relatively high intensity FM echolocation calls, but their frequency range was not determined⁵³. Based on one male flying in a flight tent (the first record of this species from Vietnam⁵⁴), *M. sicarius* emits FM type calls with strong upper harmonics (Figs. 5 and 8, Table 7). The maximum start frequency was 80.2 kHz and the minimum end frequency was 36.0 kHz. The peak energy was at 36.6 ± 0.6 kHz on average. The mean call duration was 2 ms. Most of the calls followed each other at interpulse intervals between 117 and 165 ms (137.3 ± 24.8 kHz).

Discussion

Acoustic identification of bats typically begins with compilation of a library of reference calls from known species within a region, considering potential intraspecific geographic variation. Although some baseline acoustic data are available for Vietnam (e.g., Furey et al. 2009), a comprehensive call library covering such a large number of distinct (morphologically and/or genetically) species, as included in this study, did not exist for any single country in mainland Asia.

We analyzed reference echolocation calls produced by 88 of the 118 echolocating bat species presently known to occur in Vietnam, making this study one of the most comprehensive bioacoustic studies involving Asian bats to date. For several species, we were also able to analyze large datasets of echolocation calls, some of which were very poorly known e.g., *Aselliscus dongbacanus*, *Hypsugo cadornae*, *Kerivoula titania*, *Murina feae*, *Myotis alticraniatus*, *Myotis ater*, however in some cases (e.g., *Hipposideros pratti*, *Miniopterus magnater*, *Miniopterus pusillus*, *Myotis altarium* etc.), the number of investigated calls was limited and the variation in calls recorded for these species may not be sufficiently representative and should be interpreted with caution. We also provide the first description of echolocation calls produced by five species. Every sound recording analyzed can be found in the ChiroVox public sound database⁵¹, hence the calls can be reanalyzed and new parameters can be measured or even studied with a novel identification method.

Descriptions of bat echolocation calls are very useful for faunistic surveys, ecological studies, taxonomic research and also in the planning of developments affecting natural habitats^{19,55,56}. For example, an increasing number of wind farms are being established in Southeast Asia, and according to the good practices for environmental impact assessment during the construction and operation phases of these projects, it is recommended to carry out surveys to gather baseline information of local bat populations^{57,58}. As wind farms are often sited in open areas where the effectiveness of capture-based methods are inherently limited, acoustic surveys can play an important role in ensuring accurate baselines to be created for subsequent monitoring the health of local bat assemblages⁵⁹.

In recent years, several software applications, e.g., SonoChiro, Kaleidoscope, and BatClassify, have been developed to automatically detect and identify bats from recordings based on large datasets on bat echolocation calls. Although such tools greatly facilitate the processing of bat acoustic data, users have to be cautious when interpreting the results made by the identifiers even in the temperate zone⁶⁰, while the tools may be even more imprecise in identifying bat species in regions with high biodiversity. The information presented in our study can aid efforts to overcome this shortcoming and also help to validate the outputs of such software.

Species	HM	D (ms)	FQCF (kHz)	DQCF (ms)	IPI (ms)	FmaxE (kHz)	SF (kHz)	EF (kHz)	HF (kHz)	LF (kHz)	BW (kHz)
<i>Glischropus bucephalus</i>	1	2.56±0.53 2-3 (3)			44.89±18.21 23-68 (3)	56.66±1.8 54.15-58.53 (3)	93.61±19.53 65.03-112.62 (3)	49.64±0.94 48.32-50.96 (3)	93.61±19.53 65.03-112.62 (3)	49.64±0.94 48.32-50.96 (3)	43.98±20.06 15.02-64.3 (3)
<i>Miniopterus fuliginosus</i>	1	4±1 3-6 (5)	45.97±2.18 42.77-48.87 (5)	1±0 1-1 (6)	53.4±19.46 34-85 (5)	49.24±4.12 43.89-60.61 (5)	100.08±6.83 90.63-111.79 (5)	43.88±2.38 41.01-46.99 (5)	100.08±6.83 90.63-111.79 (5)	43.87±2.36 41.01-46.99 (5)	56.22±6 48.51-65.64 (5)
<i>Miniopterus magnater</i>	1	2.7±0.2 2.5-2.9 (1)	42.09±0 42.09-42.09 (1)	1±0.1 0.9-1.1 (1)	28.9±1.3 27.6-30.2 (1)	44.67±0.08 44.62-44.76 (1)	96.23±0.7 95.68-97.01 (1)	40.13±0.89 39.13-40.8 (1)	96.23±0.7 95.68-97.01 (1)	40.13±0.89 39.13-40.8 (1)	56.1±1.58 54.88-57.89 (1)
<i>Miniopterus pusillus</i>	1	3±0.3-3 (1)	56.7±0.87 55.83-57.57 (1)		45±4.58 40-49 (1)	62.1±2.81 60.37-65.33 (1)	121.82±1.12 120.88-123.06 (1)	53.53±0.54 53.22-54.15 (1)	121.82±1.12 120.88-123.06 (1)	53.53±0.54 53.22-54.15 (1)	68.29±1.36 67.36-69.85 (1)
<i>Mops plicatus</i>	1	8.67±5.29 4-26 (8)	21.08±1.8 19.06-22.51 (1)	17.67±2.08 16-20 (1)	89.75±33.67 45-158 (8)	24.14±2.35 20.39-28.8 (8)	37.97±4.77 28.56-48.31 (8)	16.18±2.59 11.76-20.81 (8)	37.97±4.77 28.56-48.31 (8)	16.18±2.59 11.76-20.81 (8)	21.78±5.5 8.38-32.46 (8)
<i>Nyctalus plancyi</i>	1	2±0.43 1-3 (4)	25.21±2.55 21.87-27.96 (2)		65.58±32.26 18-109 (4)	35.31±7.57 26.29-49.71 (4)	58.08±3.99 53.01-65.51 (4)	23.41±2.22 20.62-26.76 (4)	58.08±3.99 53.01-65.51 (4)	23.41±2.22 20.62-26.76 (4)	34.67±4.98 26.88-42.69 (4)
<i>Pipistrellus abramus</i>	1	5.89±1.04 4-8 (12)	50.51±1.92 44.69-54.02 (12)	3.23±1.13 2-6 (12)	100.76±53.71 41-326 (12)	52.93±2.88 46.99-58.84 (12)	88.78±16 59.2-110.87 (12)	48.83±2.01 43.42-52.32 (12)	88.78±16 59.2-110.87 (12)	48.55±1.91 43.42-52.32 (12)	40.23±16.45 10.93-61.64 (12)
<i>Pipistrellus coromandra</i>	1	1.89±0.47 1-3 (6)	44.56±3.07 40.16-48.87 (6)		37.94±11.77 19-57 (6)	49.13±2.92 45.76-57.2 (6)	93.8±6.73 85.41-108.86 (6)	40.61±2.7 34.57-44.66 (6)	93.8±6.73 85.41-108.86 (6)	40.61±2.7 34.57-44.66 (6)	53.19±6.64 42.23-66.82 (6)
<i>Pipistrellus javanicus</i>	1	1.88±0.29 1-2.1 (8)	49.86±2.23 44.51-53.12 (7)	0.66±0.37 0.2-1 (3)	46.4±26.82 14.5-123 (8)	53.13±3.04 49.89-60.2 (8)	99.46±9.04 82.49-115.7 (8)	45.65±2.38 40.3-48.74 (8)	99.46±9.04 82.49-115.7 (8)	45.65±2.38 40.3-48.74 (8)	53.81±9.56 36.97-69.08 (8)
<i>Pipistrellus tenuis</i>	1	1.83±0.41 1-2 (2)	45.65±1.38 43.64-47.88 (2)		30±9.06 21-40 (2)	47.9±0.91 46.76-48.82 (2)	94.82±4.82 85.83-99.92 (2)	42.42±7.02 37.67-56.57 (2)	94.82±4.82 85.83-99.92 (2)	39.79±1.23 37.67-41.17 (2)	55.03±3.89 48.16-60.09 (2)

Table 4. Mean ± standard deviation, minimum–maximum values and number of measured bat call sequences (in brackets) from species of Molossidae, Miniopteriidae and Pipistrellini (Vespertilionidae: Vespertilioninae). HM—harmonic measured, D—duration of a single pulse, FQCF—frequency of quasi-constant frequency part, DQCF—duration of quasi-constant frequency part, IPI—interpulse interval, FmaxE—frequency of maximum energy, SF—start frequency, EF—end frequency, HF—highest frequency, LF—lowest frequency, BW—bandwidth.

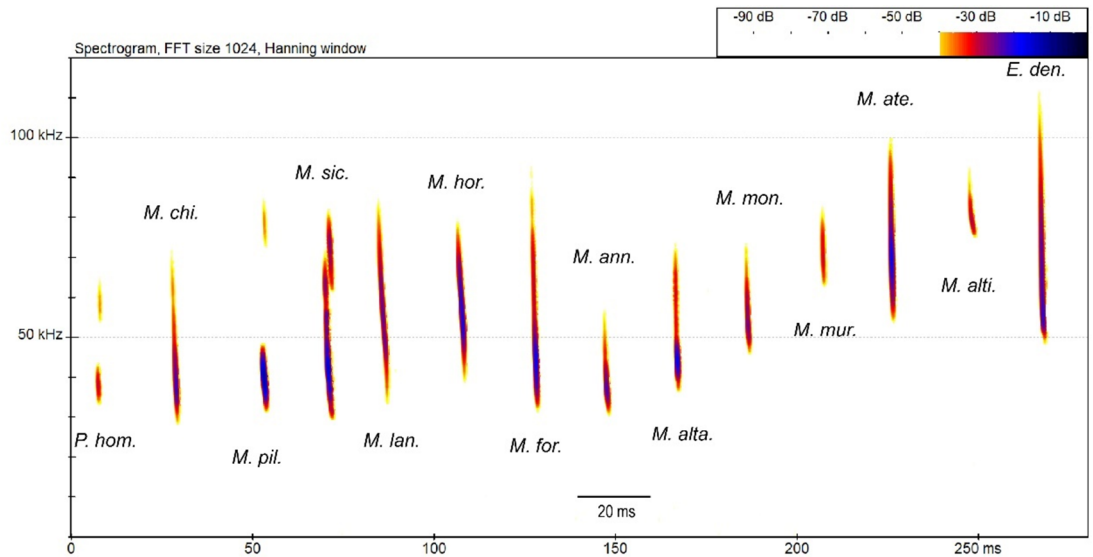


Fig. 5. Echolocation call characteristics of Plecotini (Vespertilioninae) and Myotinae. Abbreviations: *P. hom.*–*Plecotus homochrous*, *M. chi.*–*Myotis chinensis*, *M. pil.*–*M. pilosus*, *M. sic.*–*M. sicarius*, *M. lan.*–*M. laniger*, *M. hor.*–*M. horsfieldii*, *M. for.*–*M. formosus*, *M. ann.*–*M. annectans*, *M. alta.*–*M. altarium*, *M. mon.*–*M. montivagus*, *M. mur.*–*M. muricola*, *M. ate.*–*M. ater*, *M. alti.*–*M. alticraniatus*, *E. den.*–*Eudiscopus denticulus*.

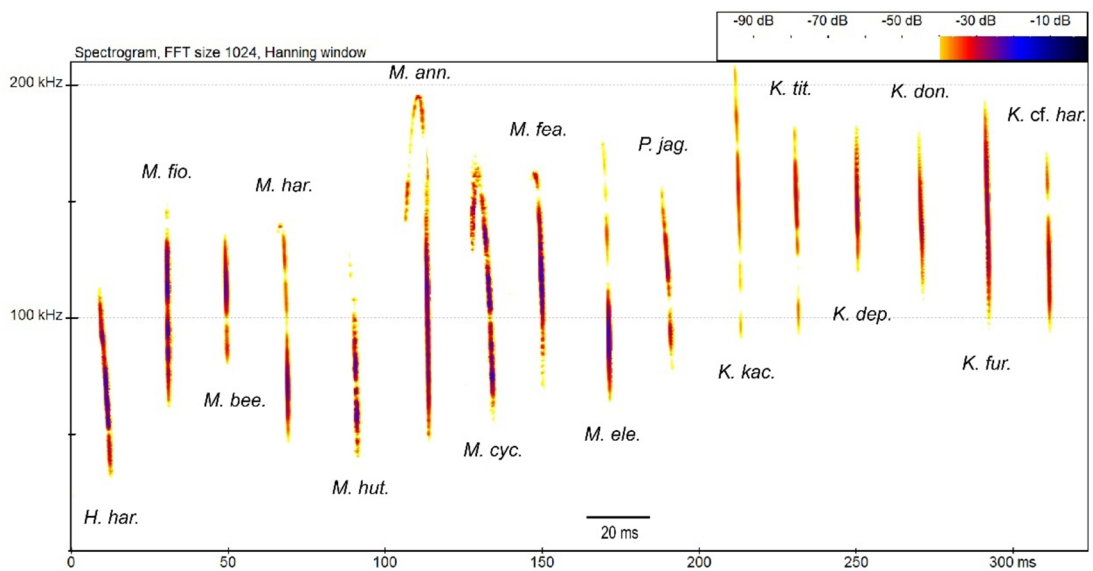


Fig. 6. Echolocation call characteristics of Murininae and Kerivoulinae species. Abbreviations: *H. har.*–*Harpiocephalus harpia*, *M. fio.*–*Murina fionae*, *M. bee.*–*M. beelzebub*, *M. har.*–*M. harrisoni*, *M. hut.*–*M. huttoni*, *M. ann.*–*M. annamitica*, *M. cyc.*–*M. cyclotis*, *M. fea.*–*M. feae*, *M. ele.*–*M. eleryi*, *P. jag.*–*P. jagorii*, *K. kac.*–*Kerivoula kachinensis*, *K. tit.*–*K. titania*, *K. dep.*–*K. depressa*, *K. don.*–*K. dongduongana*, *K. fur.*–*K. furva*, *K. cf. har.*–*K. cf. hardwickii*.

Materials and methods

Study sites and sound recordings

Bat calls were recorded between 2006 and 2023 from nearly all regions of Vietnam (specifically from 30 provinces and three municipalities) (Fig. 9). Bats were captured using mist-nets or harp-traps and kept in cloth bags until further processing. The data providers tried to ensure that—if the circumstances allowed—netting was carried out also at canopy height. They were provisionally identified based on morphology in the field based on recent literature. In cases where species identity could not be confirmed, DNA barcoding and/or morphological investigation of voucher specimens were employed. Sex and age were determined, and forearm length and weight were measured using a digital caliper and a scale, respectively. All experimental protocols and samplings were approved by local authorities and the Forest Protection Department of the Ministry of Agriculture and Rural Development, Hanoi, Vietnam (permit numbers: 1206/TCLN-BTTN, 2064/TCLN-BTTN, 326/TCLN-BTTN, 2833/UBND-NC, 299/CV-BQL, 1508/UBND-NC, 7281/VPUBND-THNV, 317/UBND-NV, 631/UBND-NV).

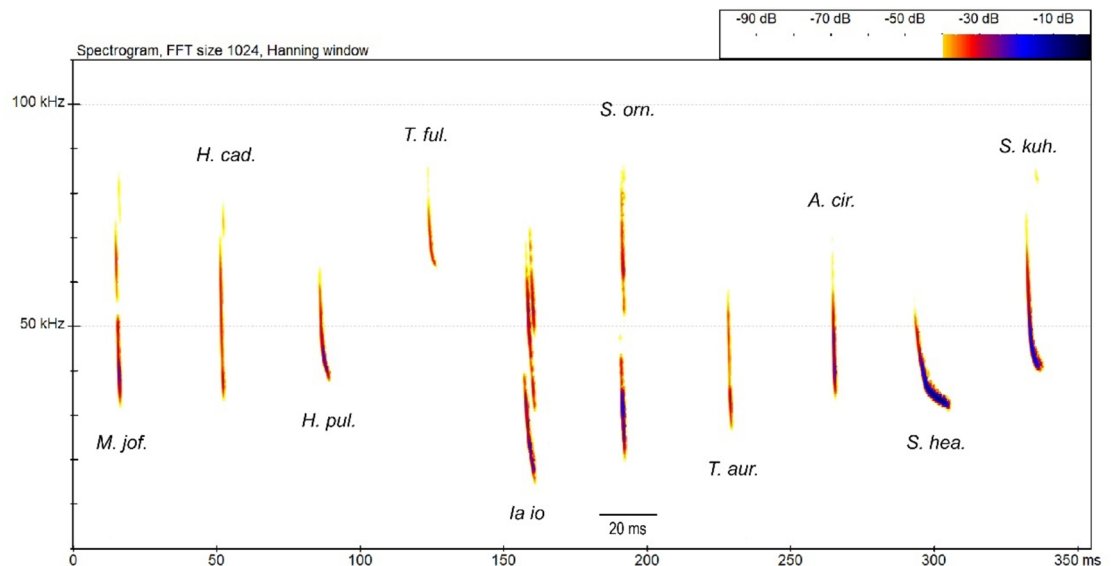


Fig. 7. Echolocation call characteristics of Vespertilioninae (excl. Pipistrellini and Plecotini) bats. Abbreviations: *M. jof.*—*Mirostrellus joffrei*, *H. cad.*—*Hypsugo cadornae*, *H. pul.*—*H. pulveratus*, *T. ful.*—*Tylonycteris fulvida*, *S. orn.*—*Scotomanes ornatus*, *T. aur.*—*Thainycteris aureocollaris*, *A. cir.*—*Arielulus circumdatus*, *S. hea.*—*Scotophilus heathii*, *S. kuh.*—*S. kuhlii*.

All methods were carried out in accordance with the guidelines of Sikes and the Animal Care and Use Committee of the American Society of Mammalogists⁶¹. The study is reported in accordance with ARRIVE guidelines (<https://arriveguidelines.org>).

Whenever possible, free-flying recordings or flying sequences inside a flight tent were used for call descriptions. However, hand-held, resting, and hand-release sequences were also included in statistical measures when only those calls were available. For flight tent recordings (tent dimensions were at least 3 m long, 2 m wide and 2 m high), we distinguished between calls emitted when the bats were resting and calls produced during flight. Resting sequences were identified when a bat landed on the tent, whereas flying sequences were registered when it was flying in the tent. A small number of our older recordings were made with a D240x (Pettersson Elektronik AB) bat detector in time expansion mode and also with an Echo Meter Touch 1 (Wildlife Acoustics) with a 256 kHz sampling frequency (capable of recording calls up to 128 kHz); hence recordings taken by these devices from bats emitting high frequency calls (e.g., Kerivoulinae) were not used in our analysis. However, most of the sounds were recorded with D1000x, D980, M500 (Pettersson Elektronik AB), SM4BAT-FS (Wildlife Acoustics) detectors and the PCTape System (University of Tübingen). The sampling frequencies were set to the highest available for each specific recording device or system (up to 500 kHz). In some cases, multiple recordings were gathered from the same individual to achieve the best quality.

Sound analysis

The free, open-source Sonic Visualiser software (version 4.5.2)⁶² was used to measure various call parameters. Standardization was important for our analysis, so we worked with well-defined methods to ensure the data obtained was comparable. Spectrograms were generated using the following settings: FFT (Fast Fourier Transformation) size at 512, 93.75% overlapping, and Hann window. Three consecutive pulses were measured from each individual recording. These “triplets” were selected from the section with the highest signal-to-noise ratio (at least 20 dB over background noise). The parameters we measured were chosen from those most frequently used in the literature and suited for species identification^{12,20,22,23,31,63–68}. Thus in general, eight parameters were manually measured from selected pulses depending on their call structure: frequency of maximum energy (FmaxE, the frequency containing the maximum energy on a power spectrum, kHz), start frequency (SF, frequency value at the start of the call, kHz), end frequency (EF, frequency value at the end of the call, kHz), highest frequency (HF, the highest frequency value of the call, kHz), lowest frequency (LF, the lowest frequency value of the call, kHz), bandwidth (BW, the difference between the highest and the lowest frequency value, kHz), call duration (D, duration of a single call, ms) and inter-pulse interval (IPI, time from the start of one call to the start of the next call, ms). SF and EF values were determined visually. The time parameters (D and IPI) were obtained from oscillograms, SF, EF, HF and LF from sonograms, and BW and FmaxE from power spectra.

Depending on the different structures of the calls, some characteristic parameters were also measured. For example, in the case of the FM-CF-FM (frequency modulated-constant frequency-frequency modulated) and FM-QCF (frequency modulated-quasi-constant frequency) calls, we measured the durations (ms) of the CF and QCF components (DCF & DQCF, respectively) and their frequency values (kF & FQCF, respectively). The number of harmonics and the measured harmonic(s) were also recorded. Where multiple call harmonics exhibited sufficient amplitude for measurement, we assessed the same parameters for these additional harmonics alongside the dominant or fundamental (first) harmonic, with the exception of rhinolophid, hipposiderid, emballonurid, and megadermatid bats, where the second harmonic always contained the maximum energy. For

Species	HM	D (ms)	FQCF (kHz)	DQCF (ms)	IPI (ms)	FmaxE (kHz)	SF (kHz)	EF (kHz)	HF (kHz)	LF (kHz)	BW (kHz)
<i>Eudiscopeus dentifaculus</i>	1	2.75±0.68 2-4 (8)	54.47±1.05 53.12-56.71 (4)	1±0 1-1 (4)	106.29±87.44 30-363 (8)	56±0.96 54.48-58.05 (8)	109.44±6.57 91.03-118.24 (8)	51.01±1.4 46.92-53.27 (8)	109.44±6.57 91.03-118.24 (8)	51.01±1.4 46.92-53.27 (8)	58.44±7.12 39.32-69.43 (8)
<i>Myotis altarium</i>	1	1.67±0.58 1-2 (1)			55±3.61 51-58 (1)	44.31±0.59 43.89-44.98 (1)	74.74±3.28 71.87-78.32 (1)	35.56±0.71 34.74-35.97 (1)	74.74±3.28 71.87-78.32 (1)	35.56±0.71 34.74-35.97 (1)	39.18±3.96 35.9-43.58 (1)
<i>Myotis alticrinitatus</i>	1	3.79±1.03 2-6.1 (23)	74.92±2.77 69.85-79.36 (22)	1.3±0.59 0.5-2.8 (19)	60.15±15.9 26-97.8 (23)	78.41±7.06 53.63-94.67 (23)	131.96±14.95 86.73-150.93 (23)	70.7±9.03 28.03-77.98 (23)	132.44±14.89 88.71-150.93 (23)	70.65±9 28.03-77.4 (23)	61.8±10.99 20.08-77.23 (23)
<i>Myotis amnecians</i>	1	2.08±0.51 1-3 (4)			55.25±14.23 30-75 (4)	53.75±17.28 36.09-75.8 (4)	95.99±28.75 65.51-124.13 (4)	42.52±14.64 25.97-57.65 (4)	95.99±28.75 65.51-124.13 (4)	42.52±14.64 25.97-57.65 (4)	53.46±14.51 34.95-70.66 (4)
<i>Myotis ater</i>	1	2.25±0.57 1-4 (17)			50.24±9.68 28-68 (17)	68.92±5.68 58.86-83.99 (17)	126.12±10.85 99.69-146.87 (17)	55.09±3.44 48.77-62.26 (17)	126.62±9.92 102.25-146.87 (17)	55.09±3.44 48.77-62.26 (17)	71.53±9.78 49.55-92.93 (17)
<i>Myotis chinensis</i>	1	3.63±0.54 3-4.3 (5)			81.61±38.62 37-185 (5)	37.8±1.02 35.8-39.23 (5)	97.76±13.6 74.59-110.96 (5)	27.89±2.52 24.21-32.31 (5)	97.76±13.6 74.59-110.96 (5)	27.89±2.52 24.21-32.31 (5)	69.87±14.17 44.19-84.86 (5)
<i>Myotis formosus</i>	1	3.33±0.52 3-4 (2)			96.83±7.65 88-110 (2)	45.49±0.65 44.49-46.16 (2)	115.35±7.65 107.82-123.39 (2)	29.58±1.13 27.56-30.36 (2)	115.35±7.65 107.82-123.39 (2)	29.58±1.13 27.56-30.36 (2)	85.78±7.02 78.43-93.03 (2)
<i>Myotis horsfieldii</i>	1	3.93±0.53 3.2-4.4 (3)			81.79±58.88 44.2-189.2 (3)	53.93±4.76 48.98-63.84 (3)	112.69±10.13 96.17-123.6 (3)	37.11±1.76 35.08-39.73 (3)	112.69±10.13 96.17-123.6 (3)	37.11±1.76 35.08-39.73 (3)	75.58±11.27 58.29-86.15 (3)
<i>Myotis laniger</i>	1	3.4±0.45 3.1-4.3 (2)			46.2±5.25 40.4-55.2 (2)	54.7±2.57 51.9-58.24 (2)	93.17±2.39 90.25-95.97 (2)	31.69±0.88 30.32-32.62 (2)	93.17±2.39 90.25-95.97 (2)	31.27±1.28 29.19-32.62 (2)	61.9±3.18 57.66-65.58 (2)
<i>Myotis montivagus</i>	1	2.11±0.33 2-3 (3)			20-86 (3)	55.79±2.08 52.47-58.24 (3)	97.61±8.62 82.79-109.5 (3)	44.68±1.29 43.19-46.62 (3)	97.61±8.62 82.79-109.5 (3)	44.68±1.29 43.19-46.62 (3)	52.93±8.73 39.6-64.53 (3)
<i>Myotis muricola</i>	1	2.33±0.74 1.6-3.5 (3)	60.59±1.65 58.74-61.92 (3)	1.07±0.12 1-1.2 (1)	51.49±18.14 23-77 (3)	66.36±3.3 60.2-70.07 (3)	120.7±5.63 111.94-128.58 (3)	56.07±5.9 47.03-63.01 (3)	120.7±5.63 111.94-128.58 (3)	56.07±5.9 47.03-63.01 (3)	64.66±4.48 57.93-70.17 (3)
<i>Myotis pilosus</i>	1	3.71±0.96 2-5 (7)			72.8±25.44 34-117.2 (7)	37.43±1.7 34.18-40.31 (7)	67.45±9 52.78-84.29 (7)	28.31±2.09 23.45-32.6 (7)	67.45±9 52.78-84.29 (7)	28.31±2.09 23.45-32.6 (7)	39.14±10.29 24.73-57.86 (7)
<i>Myotis sicarius</i>	1	2±0 2-2 (1)			137.33±24.83 117-165 (1)	36.61±0.57 35.96-37.01 (1)	79.13±1.02 78.13-80.17 (1)	36.61±0.57 35.96-37.01 (1)	79.13±1.02 78.13-80.17 (1)	36.61±0.57 35.96-37.01 (1)	42.52±1.57 41.12-44.21 (1)
<i>Plecotus homochrous</i>	1	0.93±0.16 0.6-1.2 (7)			31.45±19.01 15.5-75.2 (7)	37.18±2.2 33.04-42.9 (7)	43.31±2.68 37.99-48.58 (7)	31.22±3.17 23.5-35.18 (7)	43.31±2.68 37.99-48.58 (7)	31.22±3.17 23.5-35.18 (7)	12.09±4.0 14.18-17.24 (7)
<i>Plecotus homochrous</i>	2	0.8±0.14 0.5-1.1 (7)			31.45±19.04 15.5-75.3 (7)	60.81±3.94 55.06-67.5 (7)	71.44±3.3 65.2-76.58 (7)	54.68±3.04 49.77-60.37 (7)	71.44±3.3 65.2-76.58 (7)	54.68±3.04 49.77-60.37 (7)	16.76±4.1 87.88-23.56 (7)

Table 5. Mean ± standard deviation, minimum–maximum values and number of measured bat call sequences (in brackets) from species in the Vespertilionidae family. HM—harmonic measured, D—duration of a single pulse, FCF—frequency of quasi-constant frequency part, DCF—duration of quasi-constant frequency part, IPI—interpulse interval, FmaxE—frequency of maximum energy, SF—start frequency, EF—end frequency, HF—highest frequency, LF—lowest frequency, BW—bandwidth.

Species	HIM	D (ms)	IPI (ms)	FmaxE (kHz)	SF (kHz)	EF (kHz)	HF (kHz)	LF (kHz)	BW (kHz)
<i>Harpiocephalus harpia</i>	1	2.74 ± 1.45 1.5–7 (11)	51.41 ± 23.13 24–106.9 (11)	56.6 ± 9.53 44.3–82.51 (11)	113.3 ± 15.44 79.13–133.97 (11)	30.47 ± 5.58 14.35–39.37 (11)	113.73 ± 15.58 79.13–133.97 (11)	30.47 ± 5.58 14.35–39.37 (11)	83.25 ± 15.25 40.99–101.71 (11)
<i>Kerivoula depressa</i>	1	2.26 ± 0.73 1.2–3.6 (4)	15.5 ± 3.75 12.3–22.9 (4)	129 ± 15.78 108.19–145.23 (4)	179.18 ± 12.91 68.75–215.4 (4)	98.63 ± 11.23 77.34–109.68 (4)	179.18 ± 12.91 68.75–215.4 (4)	98.63 ± 11.23 77.34–109.68 (4)	80.55 ± 15.41 62.76–115.34 (4)
<i>Kerivoula dongluotungana</i>	1	2.93 ± 0.78 2–5 (10)	21.27 ± 15.3 11–69 (10)	127.78 ± 13.13 100.2–155.97 (10)	219.32 ± 14.631 94.46–237.46 (10)	87.52 ± 7.95 72.64–100.46 (10)	219.32 ± 14.63 94.46–237.46 (10)	87.52 ± 7.95 72.64–100.46 (10)	131.8 ± 15.44 104.96–162.13 (10)
<i>Kerivoula furva</i>	1	2.27 ± 0.49 1–3 (17)	24.49 ± 18.72 11–69 (17)	133.74 ± 18.9 90.46–181.91 (17)	224.58 ± 15.39 193.12–249.1 (17)	97.93 ± 10.04 80.7–126.92 (17)	224.58 ± 15.39 193.12–249.1 (17)	97.93 ± 10.04 80.7–126.92 (17)	126.64 ± 19.96 76.03–154.07 (17)
<i>Kerivoula cf. handwickii</i>	1	3 ± 0.3–3 (1)	26.67 ± 19.35 15–49 (1)	128.46 ± 0.98 127.44–129.38 (1)	215.66 ± 2.88 212.38–217.75 (1)	81.89 ± 4.14 77.12–84.28 (1)	215.66 ± 2.88 212.38–217.75 (1)	81.89 ± 4.14 77.12–84.28 (1)	133.77 ± 1.371 32.57–135.26 (1)
<i>Kerivoula kachinensis</i>	1	3.07 ± 0.26 3–4 (5)	24.2 ± 21.35 11–81 (5)	140.8 ± 26.36 114.13–188.2 (5)	213.46 ± 10.93 194.49–228.07 (5)	87.67 ± 9.62 76.65–108.48 (5)	214.59 ± 10.9 194.49–228.07 (5)	87.67 ± 9.62 76.65–108.48 (5)	126.92 ± 8.11 114.95–140.21 (5)
<i>Kerivoula titania</i>	1	2.86 ± 1.07 1.2–5 (9)	20.34 ± 16.48 8.4–74 (9)	137.5 ± 21.91 103.93–184.67 (9)	199.53 ± 26.88 149.68–229.61 (9)	93.59 ± 5.59 84.6–108.47 (9)	207.05 ± 22.08 149.68–229.61 (9)	93.59 ± 5.59 84.6–108.47 (9)	113.47 ± 21.57 60.12–140.48 (9)
<i>Murina annamitica</i>	1	4.12 ± 1.83 1–8 (7)	32.1 ± 13.02 15–64 (7)	91.23 ± 17.75 62.36–125.33 (7)	162.12 ± 25.14 111.98–197.11 (7)	54 ± 11.86 39.09–80.78 (7)	166.88 ± 27.06 111.98–197.11 (7)	54 ± 11.86 39.09–80.78 (7)	112.89 ± 28.13 63.5–153.59 (7)
<i>Murina beelzebub</i>	1	1.25 ± 0.19 1–1.6 (4)	39.38 ± 17.45 18.4–63 (4)	110.85 ± 8.1 92.95–116.55 (4)	137.18 ± 6.69 131.14–148.42 (4)	79.33 ± 8.21 66.07–88.66 (4)	137.18 ± 6.69 131.14–148.42 (4)	79.33 ± 8.21 66.07–88.66 (4)	57.84 ± 14.13 46.43–81.45 (4)
<i>Murina cyclofis</i>	1	3.76 ± 1.51 1–8 (36)	42.47 ± 18.62 15–124 (37)	104.88 ± 18.96 72.27–158.08 (37)	165.16 ± 12.75 118.93–198.04 (37)	61.95 ± 7.49 43.76–77.98 (37)	170.3 ± 11.37 144.6–203.78 (37)	61.95 ± 7.49 43.76–77.98 (37)	108.35 ± 12.7 77.73–144.25 (37)
<i>Murina eleryi</i>	1	2.18 ± 0.86 1.2–4 (8)	35.75 ± 13.85 13.5–64.3 (8)	93.5 ± 13.02 76.83–114.96 (8)	158.8 ± 9.42 141.24–177.21 (8)	65.73 ± 7.47 49.78–74.69 (8)	159.39 ± 10.02 141.24–178.73 (8)	65.73 ± 7.47 49.78–74.69 (8)	93.66 ± 15.09 69.23–120.28 (8)
<i>Murina feae</i>	1	2.78 ± 1.24 1.3–6 (11)	46.32 ± 18.96 18.5–89 (11)	102.14 ± 10.38 87.37–120.98 (11)	154.54 ± 6.42 144.43–169.17 (11)	71.34 ± 8.41 57.57–93.31 (11)	154.8 ± 9.71 114.23–169.17 (11)	71.35 ± 8.39 57.57–93.31 (11)	83.44 ± 10.59 53.01–100.94 (11)
<i>Murina fonae</i>	1	1.73 ± 0.2 1.4–1.9 (2)	30.18 ± 6.98 21.1–39.6 (2)	108.92 ± 10.18 96.38–121.69 (2)	148.14 ± 8.05 134.21–154.92 (2)	69.31 ± 13.84 61.05–97.39 (2)	180.13 ± 42.12 134.21–218.92 (2)	63.26 ± 1.91 61.05–65.65 (2)	116.88 ± 40.78 70.55–154.85 (2)
<i>Murina har-risoni</i>	1	2.74 ± 0.65 2–4.3 (6)	40.53 ± 17.15 14–66 (6)	72.06 ± 10.24 54.58–95 (6)	138.81 ± 10.47 124.03–151.42 (6)	44.34 ± 4.92 37.12–49.91 (6)	140.42 ± 10.07 124.03–154.78 (6)	44.34 ± 4.92 37.12–49.91 (6)	96.08 ± 10.06 75.35–109.55 (6)
<i>Murina hut-toni</i>	1	4.43 ± 1.63 3–6.2 (1)	110.3 ± 11.35 98.9–121.6 (1)	69.26 ± 9.27 62.35–79.8 (1)	123.41 ± 3.25 120.64–126.98 (1)	45.15 ± 1.6 43.7–46.87 (1)	123.41 ± 3.25 120.64–126.98 (1)	45.15 ± 1.6 43.7–46.87 (1)	78.26 ± 4.35 75.75–83.28 (1)
<i>Phoniscus jagorii</i>	1	4 ± 0 4–4 (1)	52.33 ± 24.58 24–68 (1)	100.42 ± 3.25 96.72–102.83 (1)	181.02 ± 3.86 176.57–183.27 (1)	78.74 ± 0.95 77.75–79.63 (1)	181.02 ± 3.86 176.57–183.27 (1)	78.74 ± 0.95 77.75–79.63 (1)	102.28 ± 3.02 98.82–104.39 (1)

Table 6. Mean ± standard deviation, minimum–maximum values and number of measured bat call sequences (in brackets) from species in the Vespertilionidae family. HIM—harmonic measured, D—duration of a single pulse, IPI—interpulse interval, FmaxE—frequency of maximum energy, SF—start frequency, EF—end frequency, HF—highest frequency, LF—lowest frequency, BW—bandwidth.

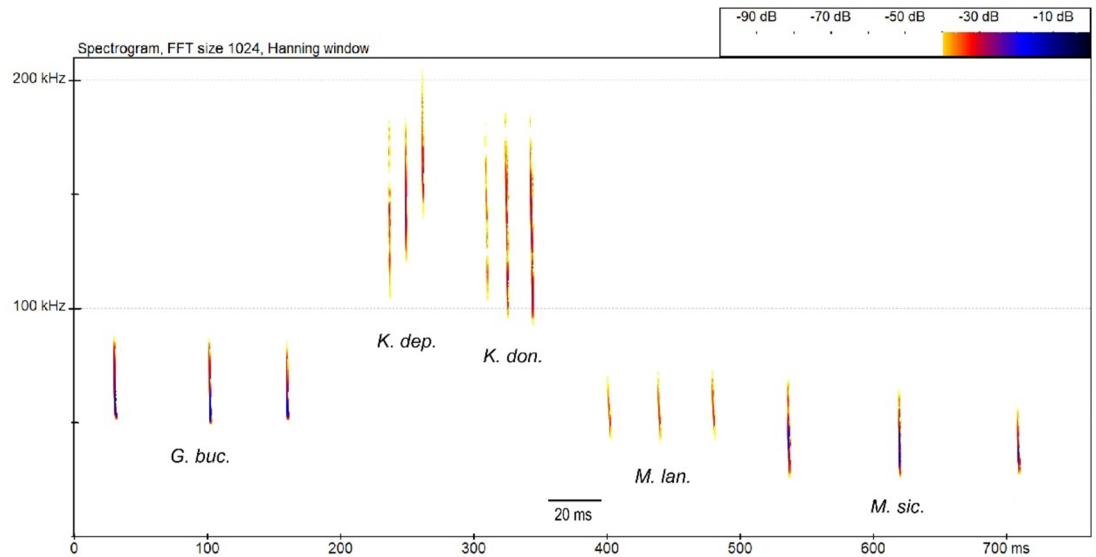


Fig. 8. Echolocation call characteristics of selected bats whose echolocation calls were newly described. Abbreviations: *G. buc.*—*Glischropus bucephalus*, *K. dep.*—*Kerivoula depressa*, *K. don.*—*K. dongduongana*, *M. lan.*—*Myotis laniger*, *M. sic.*—*M. sicarius*.

bats producing broadband calls (such as *Myotis* species), the cursor was positioned at the middle of the spectrum when F_{maxE} was not clearly defined. We calculated mean values and standard deviations of each parameter for each species as well as the specific parameters (in the case of FM-CF-FM and FM-QCF bats) mentioned. Descriptive statistics were calculated in Microsoft Excel. Spectrograms of typical call types emitted by each species were exported from BatSound Pro 4.7 (Pettersson Elektronik AB, Uppsala). All of the recordings and associated metadata (collection locality, date, type of recording device etc.) are available via ChiroVox (www.chirovox.org) (Table 8). Further details are provided in Supplementary Table S1.

Species	HM	D (ms)	FQCF (kHz)	DQCF (ms)	IPI (ms)	FmaxE (kHz)	SF (kHz)	EF (kHz)	HF (kHz)	LF (kHz)	BW (kHz)
<i>Ariellus circumdatus</i>	1	2.25 ± 0.75 1–4 (4)			87.92 ± 37.98 31–176 (4)	45 ± 5.8 40.06–54.58 (4)	82.05 ± 5.24 73.5–90.04 (4)	32.67 ± 2.03 26.88–34.91 (4)	82.05 ± 5.24 73.5–90.04 (4)	32.67 ± 2.03 26.88–34.91 (4)	49.38 ± 5.53 40.91–58.59 (4)
<i>Hypsugo cadornae</i>	1	1.92 ± 0.3 91–3 (8)	34.44 ± 3.15 27.97–39.29 (8)	0.4 ± 0.12 0.3–0.6 (12)	45.69 ± 15.91 24.8–70 (8)	42.37 ± 10.82 30.25–70.78 (8)	73.35 ± 8.5 54.05–83.43 (8)	29.08 ± 2.45 22.82–33.1 (8)	75.56 ± 7.48 81.31 ± 3.73	29.08 ± 2.45 22.82–33.1 (8)	46.48 ± 6.47 31.23–55.39 (8)
<i>Hypsugo pulveratus</i>	1	2.64 ± 0.85 1.4–5 (9)	38.71 ± 1.85 34.06–41.9 (8)	0.89 ± 0.63 0.2–2 (15)	68.33 ± 38.4 26.4–180 (9)	46.4 ± 7.82 37.95–66.07 (9)	81.31 ± 3.73 74.64–86.73 (9)	34.98 ± 1.84 31.2–38.17 (9)	81.31 ± 3.73 74.64–86.73 (9)	34.75 ± 2.3 27.79–38.17 (9)	46.57 ± 3.6 39.6–52.2 (9)
<i>Ia io</i>	1	4.27 ± 1.24 2–6 (8)			121.45 ± 88.8 31.9–449 (8)	24.91 ± 3.69 17.88–31.6 (8)	40.48 ± 5.54 30.33–48.07 (8)	15.69 ± 2.41 12.68–20.69 (8)	40.48 ± 5.54 30.33–48.07 (8)	15.69 ± 2.41 12.68–20.69 (8)	24.79 ± 7.7 12.22–35.13 (8)
<i>Ia io</i>	2	3.86 ± 1.05 2–5.2 (8)			121.48 ± 88.83 31.7–449 (8)	43.34 ± 4.41 35.9–50.12 (8)	71.34 ± 7.3 54.77–83.11 (8)	31.87 ± 5.71 20.06–41.82 (8)	71.34 ± 7.3 54.77–83.11 (8)	31.87 ± 5.71 20.06–41.82 (8)	39.47 ± 10.56 17.25–53.2 (8)
<i>Ia io</i>	3	3.12 ± 0.98 1.7–5 (7)			126.75 ± 93.46 31.4–449 (7)	65.11 ± 6.14 55.57–73.93 (7)	95.41 ± 10.29 80.29–120.25 (7)	51.66 ± 8.22 41.91–69.47 (7)	95.41 ± 10.29 80.29–120.25 (7)	51.66 ± 8.22 41.91–69.47 (7)	43.76 ± 16.15 20.84–77.8 (7)
<i>Ia io</i>	4	3.2 ± 1.04 1.7–4.3 (2)			133.13 ± 7.961 22.9–143 (2)	93.24 ± 8.66 86.09–104.96 (2)	132.75 ± 18.28 107.31–152.32 (2)	73.74 ± 14.16 60.03–89.28 (2)	132.75 ± 18.28 107.31–152.32 (2)	73.74 ± 14.16 60.03–89.28 (2)	59.01 ± 31.4 25.07–90.86 (2)
<i>Mirosrellus joffrei</i>	1	5.08 ± 3.58 1–13 (25)	33.6 ± 10.24 27.7–77.78 (18)		87.47 ± 43.17 19–201 (25)	36.25 ± 4.15 27.26–50.79 (25)	66.41 ± 12.19 34.94–86.94 (25)	29.47 ± 1.77 25.04–35.05 (25)	66.41 ± 12.19 34.94–86.94 (25)	29.47 ± 1.77 25.04–35.05 (25)	36.94 ± 11.8 19.9–58.4 (25)
<i>Scotomanes ornatus</i>	1	4.2 ± 1.81 2–8 (7)	21.2 ± 3.01 16.65–26.23 (3)		81.27 ± 42.44 33–203 (7)	27.78 ± 1.44 25.36–32.46 (7)	55.72 ± 6.3 45.27–67.83 (7)	21.55 ± 4.73 17.8–40.82 (7)	55.72 ± 6.3 45.27–67.83 (7)	21.55 ± 4.73 17.8–40.82 (7)	34.17 ± 6.18 18.8–44.45 (7)
<i>Scotomanes ornatus</i>	2	2.6 ± 0.71 2–3.4 (1)			65.05 ± 20.25 47–93 (1)	54.34 ± 6.78 44.19–58.21 (1)	74.33 ± 10.24 59.41–82.78 (1)	33.64 ± 9.86 18.86–38.74 (1)	74.33 ± 10.24 59.41–82.78 (1)	33.64 ± 9.86 18.86–38.74 (1)	40.69 ± 2.34 38.91–44.04 (1)
<i>Scotomanes ornatus</i>	3	2.13 ± 1.03 1–3.5 (1)			72 ± 24.47 47–93 (1)	59.54 ± 10.54 43.76–65.67 (1)	83.26 ± 14.9 61.12–93.47 (1)	47.09 ± 19.96 17.15–57.34 (1)	83.26 ± 14.9 61.12–93.47 (1)	47.09 ± 19.96 17.15–57.34 (1)	36.17 ± 5.7 31.43–43.96 (1)
<i>Scotophilus heathii</i>	1	1.22 ± 0.21 1–1.6 (3)	31.54 ± 2.7 28.12–34.56 (3)	0.76 ± 0.17 0.6–1.1 (3)	13.51 ± 2.29 11.1–18.37 (3)	34.25 ± 3.91 29.04–39.16 (3)	58.67 ± 5.36 53.26–66.92 (3)	30.38 ± 2.8 26.91–33.53 (3)	58.67 ± 5.36 53.26–66.92 (3)	30.38 ± 2.8 26.91–33.53 (3)	28.29 ± 7.82 20.34–40.01 (3)
<i>Scotophilus kuhlii</i>	1	8.84 ± 2.78 3–16.8 (21)	40.85 ± 2.33 35.48–44.94 (21)	4.84 ± 2.22 1–12.3 (21)	119.62 ± 61.51 26–298.2 (21)	42.66 ± 1.94 38.1–45.7 (21)	77.41 ± 11.3 51.21–95.83 (21)	39.7 ± 2.32 34.03–43.68 (21)	77.41 ± 11.3 51.21–95.83 (21)	39.7 ± 2.32 34.03–43.68 (21)	37.71 ± 9.81 16.76–52.14 (21)
<i>Thalinycteris aureocollaris</i>	1	2.67 ± 0.58 2–3 (1)			87.67 ± 2.08 86–90 (1)	30.81 ± 0.44 30.36–31.25 (1)	67.66 ± 0.25 67.52–67.95 (1)	22.94 ± 0.45 22.67–23.46 (1)	67.66 ± 0.25 67.52–67.95 (1)	22.94 ± 0.45 22.67–23.46 (1)	44.72 ± 0.6 44.06–45.24 (1)
<i>Tylonycteris fulvula</i>	1	2.33 ± 0.58 2–3 (1)			53 ± 21.79 38–78 (1)	71.11 ± 0.47 70.73–71.64 (1)	104.46 ± 14.76 87.45–114 (1)	63.62 ± 2.26 61.67–66.09 (1)	104.46 ± 14.76 87.45–114 (1)	63.62 ± 2.26 61.67–66.09 (1)	40.84 ± 16.87 21.36–50.91 (1)

Table 7. Mean ± standard deviation, minimum–maximum values and number of measured bat call sequences (in brackets) from species in the Vespertilionidae family. HM—harmonic measured, D—duration of a single pulse, FCF—frequency of quasi-constant frequency part, DCF—duration of quasi-constant frequency part, IPI—interpulse interval, FmaxE—frequency of maximum energy, SF—start frequency, EF—end frequency, HF—highest frequency, LF—lowest frequency, BW—bandwidth.



Fig. 9. Recording localities. Basemap from Natural Earth.

Recorder	Year	Detector	ChiroVox UID
Neil M. Furey	2006, 2007, 2018, 2019	Pettersson D240x, D980, M500	A000001-A000200, A004248-A004331
Gábor Csorba	2007, 2008	Pettersson D240x	A001941-A002060
Vu Dinh Thong	2007–2015	PC Tape system	A002927-A003135, A004332-A004363
Vuong Tan Tu	2010–2019	Pettersson D240x, Wildlife Acoustics Echo Meter Touch 1, SM4Bat-FS	A002504-A002703
Dai Fukui	2012–2014	Pettersson D240x	A004420-A004463
Péter Estók, Tamás Görföl, Vuong Tan Tu	2014, 2016	Pettersson D1000x	A002062-A002168, A002315-A002456, A003436-A003551
Joe Chun-Chia Huang, Mao-Ning Tuanmu	2016, 2017	Pettersson M500	A001346-A001512
Dorottya Györössy, Tamás Görföl, Henrik Károlyi, Vuong Tan Tu	2023	Pettersson D1000x	A004870, A004973-A004975, A004951-A004955

Table 8. Summary of the selected and analyzed recordings. Note that not all calls of the ChiroVox UID ranges were included in our study.

Data availability

Data is provided within the manuscript or supplementary information files. The analyzed calls can be freely accessed through the ChiroVox bat call repository: <https://www.chirovox.org>.

Received: 21 June 2024; Accepted: 6 September 2024

Published online: 07 October 2024

References

1. Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., Da Fonseca, G. A. B. & Kent, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* **403**, 853–858 (2000).
2. Sodhi, N. S., Koh, L. P., Brook, B. W. & Ng, P. K. L. Southeast Asian biodiversity: An impending disaster. *Trends Ecol. Evol.* **19**, 654–660 (2004).

3. Furey, N. M., Mackie, I. J. & Racey, P. A. Bat diversity in Vietnamese limestone karst areas and the implications of forest degradation. *Biodivers. Conserv.* **19**, 1821–1838 (2010).
4. Kingston, T. Research priorities for bat conservation in Southeast Asia: A consensus approach. *Biodivers. Conserv.* **19**, 471–484 (2010).
5. Kingston, T. Response of bat diversity to forest disturbance in Southeast Asia: Insights from long-term research in Malaysia. In *Bat Evolution, Ecology, and Conservation* (eds Adams, R. A. & Pedersen, S. C.) 169–185 (Springer, New York, 2013).
6. Simmons, N. B. & Cirranello, A. L. Bat Species of the world: A taxonomic and geographic database. Version 1.5. Accessed on 03/28/2024. (2024).
7. Lane, D. J. W., Kingston, T. & Lee, B. P. Y. H. Dramatic decline in bat species richness in Singapore, with implications for Southeast Asia. *Biol. Conserv.* **131**, 584–593 (2006).
8. Tuan, L. Q. *et al.* Potential individual and interactive effects of climate and land-cover changes on bats and implications for conservation planning: A case study in Vietnam. *Biodivers. Conserv.* **32**, 4481–4508 (2023).
9. Francis, C. M. *et al.* The role of DNA barcodes in understanding and conservation of mammal diversity in Southeast Asia. *PLoS ONE* **5**, e12575 (2010).
10. Jones, G. & Teeling, E. C. The evolution of echolocation in bats. *Trends Ecol. Evol.* **21**, 149–156 (2006).
11. Jones, G. & Holderied, M. W. Bat echolocation calls: Adaptation and convergent evolution. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **274**, 905–912 (2007).
12. Jones, G., Vaughan, N. & Parsons, S. Acoustic identification of bats from directly sampled and time expanded recordings of vocalizations. *Acta Chiropterologica* **2**, 155–170 (2000).
13. Parsons, S. & Jones, G. Acoustic identification of twelve species of echolocating bat by discriminant function analysis and artificial neural networks. *J. Exp. Biol.* **203**, 2641–2656 (2000).
14. Russo, D. & Jones, G. Identification of twenty-two bat species (Mammalia: Chiroptera) from Italy by analysis of time-expanded recordings of echolocation calls. *J. Zool.* **258**, 91–103 (2002).
15. Schnitzler, H.-U., Moss, C. F. & Denzinger, A. From spatial orientation to food acquisition in echolocating bats. *Trends Ecol. Evol.* **18**, 386–394 (2003).
16. Pfalzer, G. & Kusch, J. Structure and variability of bat social calls: Implications for specificity and individual recognition. *J. Zool.* **261**, 21–33 (2003).
17. Brigham, R. M., Kalko, E. K. V., Jones, G., Parsons, S. & Lempens, H. J. G. A. *Bat Echolocation Research: Tools, Techniques and Analysis*. (Bat Conservation International, Austin, Texas, 2004).
18. Chakravarty, R., Ruedi, M. & Ishtiaq, F. A recent survey of bats with descriptions of echolocation calls and new records from the western Himalayan region of Uttarakhand India. *Acta Chiropterologica* **22**, 197–224 (2020).
19. Furey, N. M., Mackie, I. J. & Racey, P. A. The role of ultrasonic bat detectors in improving inventory and monitoring surveys in Vietnamese karst bat assemblages. *Curr. Zool.* **55**, 327–341 (2009).
20. López-Bosch, D. *et al.* Bat echolocation in continental China: A systematic review and first acoustic identification key for the country. *Mammal Res.* **66**, 405–416 (2021).
21. McArthur, E. & Ali Anwarali Khan, F. Towards a regional call library: Classifying calls of a species-rich bat assemblage in a Bornean karst rainforest. *Barbastella* **14**, 95–117 (2021).
22. Pham, L. K., Tran, B. V., Le, Q. T., Nguyen, T. T. & Voigt, C. C. Description of echolocation call parameters for urban bats in Vietnam as a step towards a more integrated acoustic monitoring of urban wildlife in Southeast Asia. *Diversity* **13**, 18 (2021).
23. Phauk, S., Sarith, P. & Furey, N. M. Cambodian bat echolocation: A first description of assemblage call parameters and assessment of their utility for species identification. *Cambodian J. Nat. Hist.* **2013**, 16–26 (2013).
24. Rai, V., Thapa, S., Chalise, P. & Shah, K. B. Record of bats and their echolocation calls from southern Dolakha, central Nepal. *Mammalia* **85**, 557–567 (2021).
25. Raman, S. & Hughes, A. C. Echobank for the bats of Western Ghats biodiversity hotspot. *Acta Chiropterologica* **22**, 349–364 (2021).
26. Thong, V. D., Limbert, H. & Limbert, D. First records of bats (Mammalia: Chiroptera) from the world's largest cave in Vietnam. *Diversity* **14**, 534 (2022).
27. Voigt, C. C. & Kingston T. (eds.) *Bats in the Anthropocene: Conservation of Bats in a Changing World*. 1–606 (Springer, Cham, 2016).
28. Flaquer, C., Torre, I. & Arrizabalaga, A. Comparison of sampling methods for inventory of bat communities. *J. Mammal.* **88**, 526–533 (2007).
29. Russo, D. & Voigt, C. C. The use of automated identification of bat echolocation calls in acoustic monitoring: A cautionary note for a sound analysis. *Ecol. Indic.* **66**, 598–602 (2016).
30. Russo, D. & Jones, G. Use of foraging habitats by bats in a Mediterranean area determined by acoustic surveys: Conservation implications. *Ecography* **26**, 197–209 (2003).
31. Hughes, A. C. *et al.* Using echolocation calls to identify Thai bat species: Vespertilionidae, Emballonuridae Nycteridae and Megadermatidae. *Acta Chiropterologica* **13**, 447–455 (2011).
32. O'Farrell, M. J., Corben, C. & Gannon, W. Geographic variation in the echolocation calls of the hoary bat (*Lasiurus cinereus*). *Acta Chiropterologica* **2**, 185–196 (2000).
33. Barclay, R. M., Fullard, J. H. & Jacobs, D. S. Variation in the echolocation calls of the hoary bat (*Lasiurus cinereus*): Influence of body size, habitat structure, and geographic location. *Can. J. Zool.* **77**, 530–534 (1999).
34. Sun, K. *et al.* Geographic variation in the acoustic traits of greater horseshoe bats: Testing the importance of drift and ecological selection in evolutionary processes. *PLoS ONE* **8**, e70368 (2013).
35. Kruskop, S. V. *Bats of Vietnam* (Russian Academy of Sciences, 2013).
36. Csorba, G. A new species of *Glischropus* from the Indochinese subregion (Mammalia: Chiroptera: Vespertilionidae). *Zootaxa* **2925**, 41–48 (2011).
37. Csorba, G., Thong, V. D., Bates, P. J. J. & Furey, N. M. Description of a new species of *Murina* from Vietnam (Chiroptera: Vespertilionidae: Murininae). *Occas. Pap. Mus. Tex. Tech Univ.* **268**, 1–10 (2007).
38. Francis, C. M. & Eger, J. L. A review of tube-nosed bats (*Murina*) from Laos with a description of two new species. *Acta Chiropterologica* **14**, 15–38 (2012).
39. Furey, N. M., Thong, V. D., Bates, P. J. J. & Csorba, G. Description of a new species belonging to the *Murina* 'suilla' -group' (Chiroptera: Vespertilionidae: Murininae) from North Vietnam. *Acta Chiropterologica* **11**, 225–236 (2009).
40. Thong, V. D. *et al.* A new species of *Hipposideros* (Chiroptera: Hipposideridae) from Vietnam. *J. Mammal.* **93**, 1–11 (2012).
41. Tu, V. T., Hassani, A., Furey, N. M., Son, N. T. & Csorba, G. Four species in one: multigene analyses reveal phylogenetic patterns within Hardwicke's woolly bat, *Kerivoula hardwickii*-complex (Chiroptera, Vespertilionidae) in Asia. *Hystrix Ital. J. Mammal.* **29**, 111–121 (2018).
42. Borissenko, A. V. & Kruskop, S. V. *Bats of Vietnam and Adjacent Territories: An Identification Manual*. 1–300 (Russian Vietnamese Science and Technological Tropical Centre, and the Zoological Museum of Moscow, M.V. Lomonosov State University, 2003).
43. Fukui, D. *et al.* First record of the genus *Plecotus* from Southeast Asia with notes on the taxonomy, karyology and echolocation call of *P. homochrous* from Vietnam. *Acta Chiropterologica* **22**, 57–74 (2020).
44. Son, N. T. *et al.* Bats (Chiroptera) of Bidoup Nui Ba National Park, Dalat Plateau Vietnam. *Mammal Study* **46**, 53–68 (2021).
45. Thong, V. D. Remarks on the diversity and echolocation calls of hipposiderid bats (Chiroptera: Hipposideridae) in Cuc Phuong National Park, northeastern Vietnam. *Acad. J. Biol.* **45**, 1–9 (2023).

46. Thong, V. D. New data on distribution, morphology and echolocation of *Hipposideros khaokhouayensis* Guillén-Servent & Francis, 2006 (Chiroptera: Hipposideridae). *Acta Zool. Bulg.* **75**, 469–476 (2023).
47. Thong, V. D. New records of *Hipposideros griffini* from lava caves and the threats to its conservation in Vietnam. *Tap Chi Sinh Hoc J. Biol.* **41**, 31 (2019).
48. Thong, V. D. *et al.* Importance of mangroves for bat research and conservation: A case study from Vietnam with notes on echolocation of *Myotis hasselti*. *Diversity* **14**, 258 (2022).
49. Thong, V. D. *et al.* Echolocation calls of *Myotis alticraniatus* (Chiroptera: Vespertilionidae) in Vietnam. *J. Sci. Nat. Sci.* **67**, 133–140 (2022).
50. Thong, V. D. *et al.* Further records of *Murina tiensa* from Vietnam with first information on its echolocation calls. *Hystrix* **22**, 129–138 (2011).
51. Görfö, T. *et al.* ChiroVox: A public library of bat calls. *PeerJ* **10**, e12445 (2022).
52. Zsebök, S., Son, N. T. & Csorba, G. Acoustic characteristics of the echolocation call of the disc-footed bat, *Eudiscopus denticulus* (Osgood, 1932) (Chiroptera, Vespertilionidae). *Acta Acust. United Acust.* **100**, 767–771 (2014).
53. Csorba, G., Kruskop, S. V. & Borissenko, A. V. Recent records of bats (Chiroptera) from Nepal, with remarks on their natural history. *Mammalia* **63**, 61–78 (1999).
54. Györösy, D. *et al.* The grey zone of taxonomy—the case of the Sikkim *Myotis* (*Myotis sicarius*) (Chiroptera: Vespertilionidae), first recorded from Southeast Asia. (in prep).
55. Barlow, K. E. *et al.* Citizen science reveals trends in bat populations: The national bat monitoring programme in Great Britain. *Biol. Conserv.* **182**, 14–26 (2015).
56. Stathopoulos, V., Zamora-Gutierrez, V., Jones, K. E. & Girolami, M. Bat echolocation call identification for biodiversity monitoring: A probabilistic approach. *J. R. Stat. Soc. Ser. C Appl. Stat.* **67**, 165–183 (2018).
57. Frick, W. F. *et al.* Fatalities at wind turbines may threaten population viability of a migratory bat. *Biol. Conserv.* **209**, 172–177 (2017).
58. Millon, L., Colin, C., Brescia, F. & Kerbirou, C. Wind turbines impact bat activity, leading to high losses of habitat use in a biodiversity hotspot. *Ecol. Eng.* **112**, 51–54 (2018).
59. Voigt, C. C. *et al.* Toward solving the global green–green dilemma between wind energy production and bat conservation. *BioScience* **74**, 240–252 (2024).
60. Rydell, J., Nyman, S., Eklöf, J., Jones, G. & Russo, D. Testing the performances of automated identification of bat echolocation calls: A request for prudence. *Ecol. Indic.* **78**, 416–420 (2017).
61. Sikes, R. S. Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research and education. *J. Mammal.* **97**, 663–688 (2016).
62. Cannam, C., Landone, C. & Sandler, M. Sonic visualiser: An open source application for viewing, analysing, and annotating music audio files. In *Proceedings of the 18th ACM international conference on Multimedia* 1467–1468 (ACM, Firenze Italy, 2010). <https://doi.org/10.1145/1873951.1874248>.
63. Kingston, T., Jones, G., Akbar, Z. & Kunz, T. H. Echolocation signal design in Kerivoulinae and Murininae (Chiroptera: Vespertilionidae) from Malaysia. *J. Zool.* **249**, 359–374 (1999).
64. Papadatou, E., Butlin, R. K. & Altringham, J. D. Identification of bat species in Greece from their echolocation calls. *Acta Chiropterologica* **10**, 127–143 (2008).
65. Barataud, M. *Acoustic Ecology of European Bats. Species Identification and Studies of Their Habitats and Foraging Behaviour*. (Biotope Editions, Méze; National Museum of Natural History, Paris, 2015).
66. Hackett, T. D., Holderied, M. W. & Korine, C. Echolocation call description of 15 species of Middle-Eastern desert dwelling insectivorous bats. *Bioacoustics* **26**, 217–235 (2017).
67. Görfö, T. *et al.* A new genus of vespertilionid bat: The end of a long journey for Joffre's Pipistrelle (Chiroptera: Vespertilionidae). *J. Mammal.* **101**, 331–348 (2020).
68. Zamora-Gutierrez, V., MacSwiney, G., M. C., Balvanera, S. M. & Esquivelzeta, E. R. The evolution of acoustic methods for the study of bats. In *50 years of bat research: Foundations and new frontiers* 43–59 (Springer International Publishing, Switzerland, 2021). <https://doi.org/10.1007/978-3-030-54727-1>.

Acknowledgements

The authors would like to express their sincere thanks for all the people who helped in the field. This research received support from the National Research, Development, and Innovation Fund of Hungary (NKFIH FK137778, FK146466, RRF-2.3.1-21-2022-00010), the János Bolyai Research Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences (BO/00825/21) to T.G., the Hungarian–Vietnamese bilateral mobility grant (NKM-2021-39) to T.G. and V.T.T., the Vietnam Academy of Science and Technology to V.T.T. (Project No: QTHU01.01/22–23) and to V.D.T. (Projects “UQDTCB.07/23–25” and “KHCBSS.01/24–25”), Academia Sinica Postdoctoral Scholarship to J.C.C.H., Biodiversity Research Center at Academia Sinica to M.N.T. and JSPS KAKENHI (Grant Nos: JP24405045 and T16K00568) to D.F. The work of D.G. and K.L.S. was supported by the New National Excellence Program of the Ministry for Innovation and Technology from the source of the National Research, Development and Innovation Fund (grant numbers ÚNKP-20-3-1 and ÚNKP-19-2-1, respectively).

Author contributions

Conceptualization, T.G. and G.C.; methodology, T.G.; validation, T.G. and G.C.; formal analysis, D.G. and K.L.S.; investigation, D.G., T.G. and G.C.; resources, T.G., G.C., P.E., V.T.T., V.D.T., J.C.-C.H., M.N.T., N.M.F., and D.F.; data curation, T.G., J.C.-C.H. and D.G.; writing—original draft preparation, D.G., T.G., G.C., and K.L.S.; writing—review and editing, T.G., G.C., N.M.F., V.D.T. and S.Z.; visualization, D.G. and T.G.; supervision, G.C. and T.G.; project administration, G.C. and T.G.; funding acquisition, T.G. and G.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-024-72436-6>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to T.G.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License, which permits any non-commercial use, sharing, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if you modified the licensed material. You do not have permission under this licence to share adapted material derived from this article or parts of it. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.

© The Author(s) 2024

Original Study

Dibya Raj Dahal*, Dorottya Győrössi, Sanjan Thapa, Gábor Csorba, Tamás Görfölg, Kishor Pandey, Prem Bahadur Budha and Nanda Bahadur Singh

First record of *Murina walstoni* (Chiroptera: Vespertilionidae) outside Southeast Asia

<https://doi.org/10.1515/mammalia-2024-0117>

Received August 11, 2024; accepted February 28, 2025;
published online April 4, 2025

Abstract: *Murina walstoni* Csorba et al. 2011, was described from Cambodia, and since then has been recorded from lowland areas of Thailand, Vietnam and Laos. However, a single male individual of a tube-nosed bat caught in Tanahun District, Central Nepal on 13 April 2020, was subsequently identified as *M. walstoni* on the bases of external and craniodontal characters, and mitochondrial gene sequencing. This is the first record of the species from South Asia and represents a significant northwest expansion of its global distribution range. Genetic analysis reveals ~5 % variation in the barcoding gene sequences between this individual

and Southeast Asian specimens; nevertheless, the lack of morphological and mensural differences suggest they belong to the same species. Analyses of more samples and the inclusion of nuclear markers will be necessary to evaluate if this distinct lineage within *M. walstoni* represents a separate taxonomic unit.

Keywords: Central Nepal; *Col1*; distribution; Murininae; taxonomy

Dibya Raj Dahal and Dorottya Győrössi share first authorship.

***Corresponding author: Dibya Raj Dahal**, Central Department of Zoology, Tribhuvan University, Kirtipur 44613, Nepal; Sukuna Multiple Campus, Sundarharaincha 56604, Nepal; and Small Mammals Conservation and Research Foundation, Balkhu 44614, Nepal,
E-mail: dibyawildlifecon@gmail.com. <https://orcid.org/0000-0002-3299-9301>

Dorottya Győrössi, Department of Zoology, Hungarian Natural History Museum, Budapest 1088, Hungary; Hungarian University of Agriculture and Life Sciences, Gödöllő 2100, Hungary; and Department of Zoology, Eszterházy Károly Catholic University, Eger 3300, Hungary,
E-mail: gyorossi.dodo@gmail.com. <https://orcid.org/0000-0003-3219-3559>

Sanjan Thapa, Small Mammals Conservation and Research Foundation, Balkhu 44614, Nepal; and School of Life Sciences, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China, E-mail: sanjan.thapa2022@gmail.com. <https://orcid.org/0000-0002-2918-7409>

Gábor Csorba, Department of Zoology, Hungarian Natural History Museum, Budapest 1088, Hungary, E-mail: csorba.gabor@nhmus.hu. <https://orcid.org/0000-0001-5720-4600>

Tamás Görfölg, Department of Zoology, Hungarian Natural History Museum, Budapest 1088, Hungary; and National Laboratory of Virology, Szentágotthai Research Centre, University of Pécs, Pécs 7624, Hungary,
E-mail: tamas@gorfol.eu. <https://orcid.org/0000-0002-1910-4024>

Kishor Pandey, Prem Bahadur Budha and Nanda Bahadur Singh, Central Department of Zoology, Tribhuvan University, Kirtipur 44613, Nepal, E-mail: drkishorpandey1@gmail.com (K. Pandey), pb.budha@gmail.com (P.B. Budha), profdrnbs@gmail.com (N.B. Singh). <https://orcid.org/0000-0002-0619-9108> (K. Pandey). <https://orcid.org/0000-0002-9765-2050> (N.B. Singh)

1 Introduction

Bats represent the most diverse group of mammals in Nepal, with 55 species documented across the country extensive physiographic range, from the lowland plains to the high Himalayas (Dahal et al. 2024b). Vespertilionidae, is the most speciose family with 32 species recorded so far. Prior to 2020, four species of *Murina* were reported from the country (Acharya et al. 2010; Bates and Harrison 1997; Thapa 2014). A significant portion of Nepal, including eight protected areas, remains uncharted in terms of bat surveys. Intensive study and exploration of the remaining regions could yield new species discoveries for both the country and the global community (Acharya and Ruedas 2007; Dahal et al. 2024a,b; Thapa et al. 2021). Fortunately, the past decade has witnessed a gradual increase in bat research activities. Four new species of bat from various geographical areas of Nepal have been documented over a span of six years (Dahal et al. 2022a,b; Sharma et al. 2019, 2021). This is the result of survey conducted from 2019 to 2022, focused on a comprehensive study of bats from the Terai to the High Mountains. The present publication seeks to illuminate the potential of bat research in Nepal.

2 Materials and methods

2.1 Sample collection

In April 2020, a survey was conducted in Tunibote, Rising rural municipality, Tanahun District, western Nepal (Figure 1).

Tunibote is a hamlet situated in eastern bank of Seti Gandaki River about 14 km north of Damauli bazaar, the Headquarters of Tanahun District. Seti Gandaki River is a deep and fast flowing river originated from Annapurna Himalayan range. Dense riverine primary forest patches are located to the eastern and southern sides of the hamlet, with *Shorea robusta*, *Erythrina veriegata*, *Falconeria insigninis*, *Cordia dichotoma* and *Aesculus indica* as the dominant trees. Rock cliffs and deep-water streams are situated inside the forest patches. During the time of survey, heavy disturbance due to a massive forest fire, excessive grazing by domestic cattle and collection of woods and fodder were observed. Our survey station was in the southern forest patch, two km south of Tunibote hamlet (27.957°N and 84.173°E, 353 m a.s.l.).

During the two-night survey a two-banks harp-trap was set early evening in a narrow and deep gorge of streams and closed in early morning next day, and two monofilament Ecotone® mist nets (6 × 2.5 m², mesh size 14 mm) were installed over deep streams and forest patches under the canopy of dense riverine forest. Mist-nets were opened in the early evening (18:00 h) and closed in late night (23:00 h). Individuals caught were handled using leather gloves and kept in cotton bags for a short duration. Beside the

tube-nosed bat, two more species, *Cynopterus sphinx* and *Rhinolophus affinis* were caught, identified in the field, and released immediately at the spot.

On April 10, a male individual of *Murina* sp. was mist-netted at 19:12. The species ID could not be confirmed in the field, and it was taken as a voucher. The specimen, stored in 95–99 % ethanol with skull removed and cleaned, is kept in the Museum of Central Department of Zoology (CDZ) Tribhuvan University, Kirtipur, Kathmandu, and is catalogued under the number BAT_CDZ_MTU_103. External, cranial and dental measurements were taken using a Freemans FDC 150 digital calliper accurate to 0.01 mm (Table 1).

2.2 Molecular analyses

A ~3 mg pectoral muscle tissue was taken from the voucher specimen and preserved in 95–99 % ethanol and kept at room temperature in the Molecular Lab of Central Department of Zoology, Tribhuvan University. Total genomic DNA was extracted from the tissue deploying Thermo Fisher Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kit (K0721) (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/>

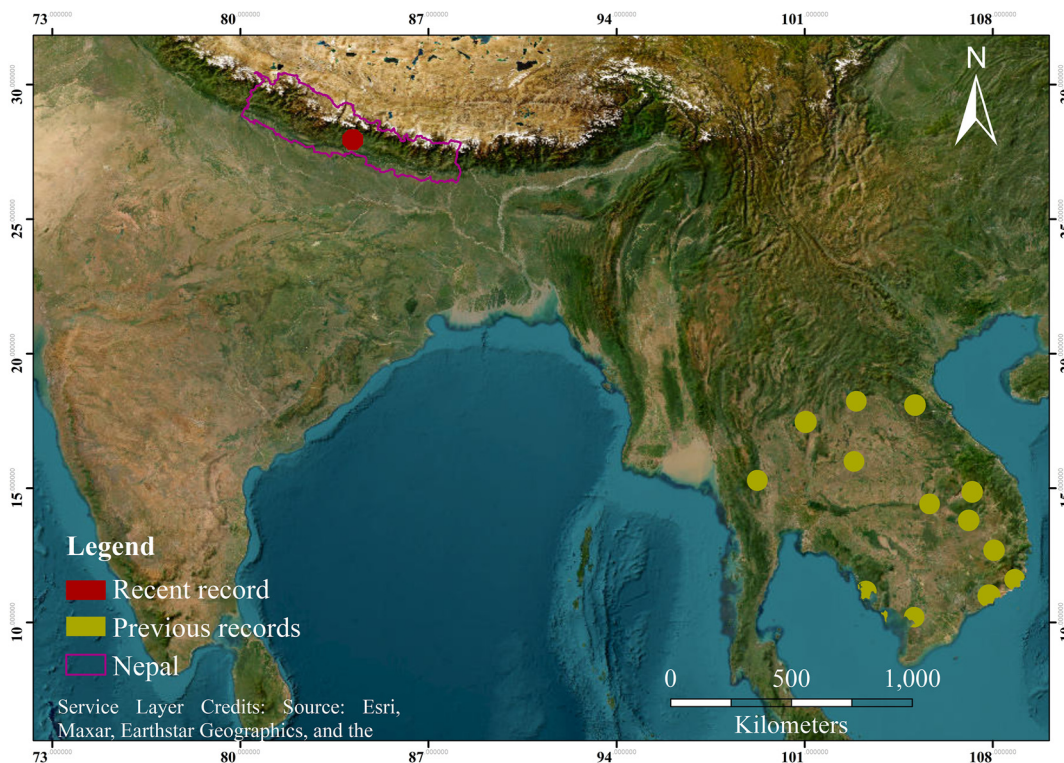


Figure 1: Map showing the distribution of *Murina walstoni* (after Burgin 2019); the recent record in Nepal is marked with red.

Table 1: Comparative external and craniodental measurements of *Murina walstoni* specimens (in mm).

Measurements	Recent record (CDZ MTU 103)	Holotype Csorba et al. (2011)	Soisook et al. (2017)	Son et al. (2015)
T	30.60	33.70	32.30	30.93
HF	6.77	7.10	7.60	6.52
Tib	15.10	15.40	16.20	14.08
FA	32.49	33.00	29.25	33.16
GLS	16.14	15.77	16.13	15.34
CBL	14.72		14.66	
CCL	13.90	13.92	13.89	13.43
ZB	8.90		9.30	9.08
BCH	5.93	6.15	6.18	6.18
MB	7.74	7.34	7.68	7.50
IC	4.24	4.16		
CM ³	5.43	5.46	5.34	
CM ₃	5.83	5.92	5.86	5.34
HC	3.73	3.70		3.68

T, tail length; HF, hind foot length; Tib, tibia length; FA, forearm length; GLS, greatest length of skull; CBL, condylo-basal length; CCL, condylo-canine length; ZB, zygomatic breadth; BCH, brain case height; MB, mastoid breadth; IC, interorbital constriction; CM³, maxillary tooth row length; CM₃, mandibular tooth row length; HC, least height of the coronoid process.

K0721) following the provided protocol. Extracted DNA template was stored at -20°C . Mitochondrial gene (mtDNA) Cytochrome c oxidase subunit I (*COI*, 670 bp) was amplified with a set of primers: reverse 5'-TAGACTTCTGGGTGGCCA AAGAATCA-3'; forward 5'TTCTCAACCAACCACAAAGACATT GG-3'.

Polymerase Chain Reaction (PCR) was conducted in the molecular lab of CDZ, TU following the protocol. Each PCR reaction volume of 20 μl included 7 μl ddH₂O, 12 μl New England Biolabs Taq 2x Master-Mix with 0.5 μl each forward and reverse primers and 0.5 μl (ca. 50 ng) of extracted DNA template. PCR were performed deploying the MyGene™ L Series Peltier Thermal Cycler with conditions as follows: 5 min at 94°C followed by 40 cycles of 30 s at 94°C , 30 s at 55°C and 60 s at 72°C , with a final extension of 10 min at 72°C . PCR products were stored at 4°C before the gel electrophoresis and at -20°C later.

A PCR sample (2 μl) was sequenced for *COI* gene in the Molecular Biotechnology Laboratory of the Nepal Academy of Science and Technology (NAST), Khumalatar, Lalitpur, Nepal in ABI 3500XL automated DNA sequencer (Applied Bio-systems, Forster City, CA, USA). Produced reverse and forward sequences were edited and combined using BioEdit 7.2. BLAST was performed for the combined nucleotide sequence.

The *COI* nucleotide sequence was submitted to NCBI (GenBank accession number: PQ060030) and compared with those downloaded from NCBI, following the most recent phylogenetic framework for *Murina* species by Wang et al. (2025).

Sequences downloaded from NCBI were: *Murina cyclo-tis* s.l (GU684744, JF443973, JQ601458, KF772775, MN549027), *Harpiocephalus harpia* (HM540274, JF443877, JQ601451, KY034092, MH137300), *Murina aenea* (HM540927, KY034085), *M. eleryi* (HM540930, JQ601448, KT762291), *M. cf. cyclotis* (HM540939), *M. guilleni* (HM540955, KY034094), *Murina walstoni* (HM540957, HM540958, HM540964, JQ601537), *M. cyclotis* (HM540966), *M. annamitica* (HM540967), *M. peninsularis* (HM540972, KY034082, KY034101), *M. harpioloides* (HM540975, JF443974), *M. cf. huttoni* (HM540976, JQ601452, KF772782, KX098592), *M. harrisoni* (HM540980, HM540983, KT982278, MN549036), *M. chrysochaetes* (HM540986), *M. leucogaster* (HM540987, JQ601457), *Murina suilla* (HM540989, KY034071), *M. feae* (HM540992, JQ601463, KF772777, KY034074), *M. ussuriensis* (HQ974648, JF442842), *M. hilgendorfi* (JF442829), *M. loreliae* (JN082179, KF772779), *M. shuipuenis* (JN082180, MN549073), *M. gracilis* (KJ198483), *M. recondita* (KJ198571), *M. kontumensis* (KT820760), *M. puta* (KT982277), *M. balaensis* (KY034093), *M. rozendaali* (KY034110), *M. rongjiangensis* (MF359931), *M. hkakaboraziensis* (MF537343), *M. cf. eleryi* (MF537344), *M. jaintiana* (MF537346), *M. huttoni* (MN339182), *M. jinchui* (MN549067), *M. yushuensis* (OR990561).

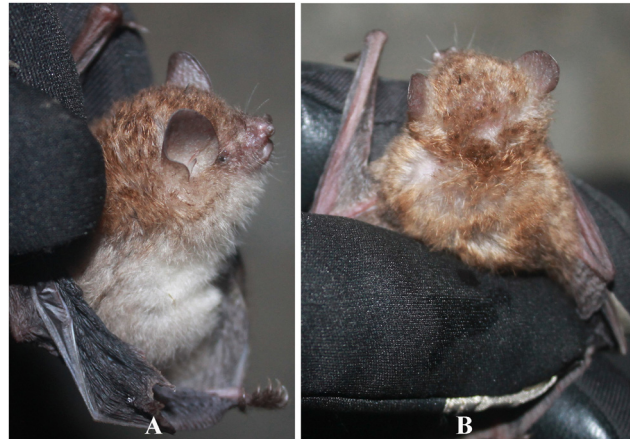


Figure 2: Walston's tube-nosed bat (*Murina walstoni*) from rising rural municipality, Tunibote, Tanahun, Nepal (CDZTU BAT_CDZ_MTU_103): (A) lateral view showing colour distinctness of dorsal and ventral pelage, (B) distinct variation of white base and silvery brown tips of hairs in dorsal pelage.

Alignments and calculations of genetic distances were performed using MEGA 11 (Tamura et al. 2021). The analyses of evolutionary divergence between sequences were estimated using the Kimura 2-parameter model (Kimura 1980), with rate variation among sites modeled by a gamma distribution (shape parameter = 1). The phylogenetic tree was constructed using IQ-TREE with the Maximum Likelihood method, employing the HKY + G + I best fit model and bootstrap support with 1,000 replicates.

3 Results

3.1 Morphological species determination

The Nepalese specimen is a medium-sized tube-nosed bat (Table 1). The plagiopatagium is attached at the base of claw of the first toe. The length of tragus is less than half of the ear length, narrow and blunt at its tip. Tail tip extends approx. one mm out of the interfemoral membrane. The hair of woolly dorsal pelage has more than 60 % white base and a silvery brown tip. The ventral pelage is uniformly white (Figure 2).

The braincase is domed with deep rostral depression and thick rostrum (Figure 3). Sagittal and lambdoid crests are well developed, the zygoma is strong in structure. The basioccipital pits are deep and well defined. The dentition is of typical “*suilla*-morphotype”. The basal area of C is less than that of P4; P2 is strongly compressed and has a basal area slightly less than one-half and a height approximately one-half that of P4; the mesostyles of M1 and M2 are developed.

3.2 Molecular analyses

According to the phylogenetic tree reconstructions using *COI* gene, the Nepalese specimen formed a monophyletic group with *M. walstoni* samples from Vietnam and Laos (Figure 4), which indicates a close relationship between them. Genetic analysis revealed ~5 % (4.6–5.4 %) variation in the genetic sequences between South Asian (Nepal) and Southeast Asian (Laos, Vietnam) specimens; *M. suilla*, as the morphologically and phylogenetically closely related species (Figure 4), was also included in this analysis (Table 2).

4 Discussion

Although dorsal pelage coloration of the Nepalese individual is slightly different compared to the Vietnamese and

Cambodian individuals (the tip of hair being silvery brown in Nepalese individual whereas darker brown in the SE Asian individuals), all quantitative and qualitative morphological characters – external and craniodental alike – of the Nepalese specimen of *M. walstoni* conform well with those of the holotype. Phylogenetic tree reconstructions based on the uniparentally inherited barcoding gene sequences, widely accepted in phylogenetic studies of Murinae (Li et al. 2024) reveal ~5 % variation between this individual and Southeast Asian specimens of *M. walstoni*. This level of variation, along with the morphological uniformity, supports the idea that all these bats belong to the same species. However, the observed genetic divergence is notable and suggests the presence of distinct lineages within *M. walstoni*. While this finding is intriguing, it would be premature to draw definitive taxonomic conclusions based solely on *COI* data.

To confirm and refine this hypothesis, further research is required, including analyses of additional mitochondrial and nuclear genes, as well as bioacoustic investigations. The case of *M. walstoni* described here shows many similarities with that of *Myotis sicarius* despite the high mitochondrial genetic difference, Győrössy et al. (2024) did not comment on the extent of taxonomic differences due to the lack of distinguishing morphological characters. Since its description from Veun Sai protected forest, Ratanakiri, Cambodia, the Walston’s tube-nosed bat has been reported from a handful of localities from Thailand, Cambodia, Vietnam and Laos (Csorba et al. 2011, 2020; Francis and Eger 2012; Kruskop 2013; Soisook et al. 2017; Son et al. 2015).

The present paper therefore represents the westernmost and northernmost record for the species, as well as the first record from South Asia (Csorba et al. 2020; Francis and Eger 2012; Soisook et al. 2013). Previously, the species was recorded from dry subtropical deciduous forests (Csorba et al. 2020; Kruskop 2013; Yu et al. 2020), and is known to be more tolerant to disturbed habitats than other *Murina* (Csorba et al. 2020; Francis and Eger 2012). Although the present record is from a primary riverine sub-tropical broad-leaved forest, the hills surrounding these habitat patches are dry and the area is heavily disturbed due to logging for fuel, fodder collection, forest fire and is overgrazed. The IUCN conservation status of Walston’s tube-nosed bat is assessed as Data Deficient (DD) due to very little information on its distribution, population status, behaviour, threats and ecology (Csorba et al. 2020). The result presented herewith adds to the distribution of the species but provide no clarifications of the other aspects, therefore at this point we suggest retaining the IUCN assessment as it is.

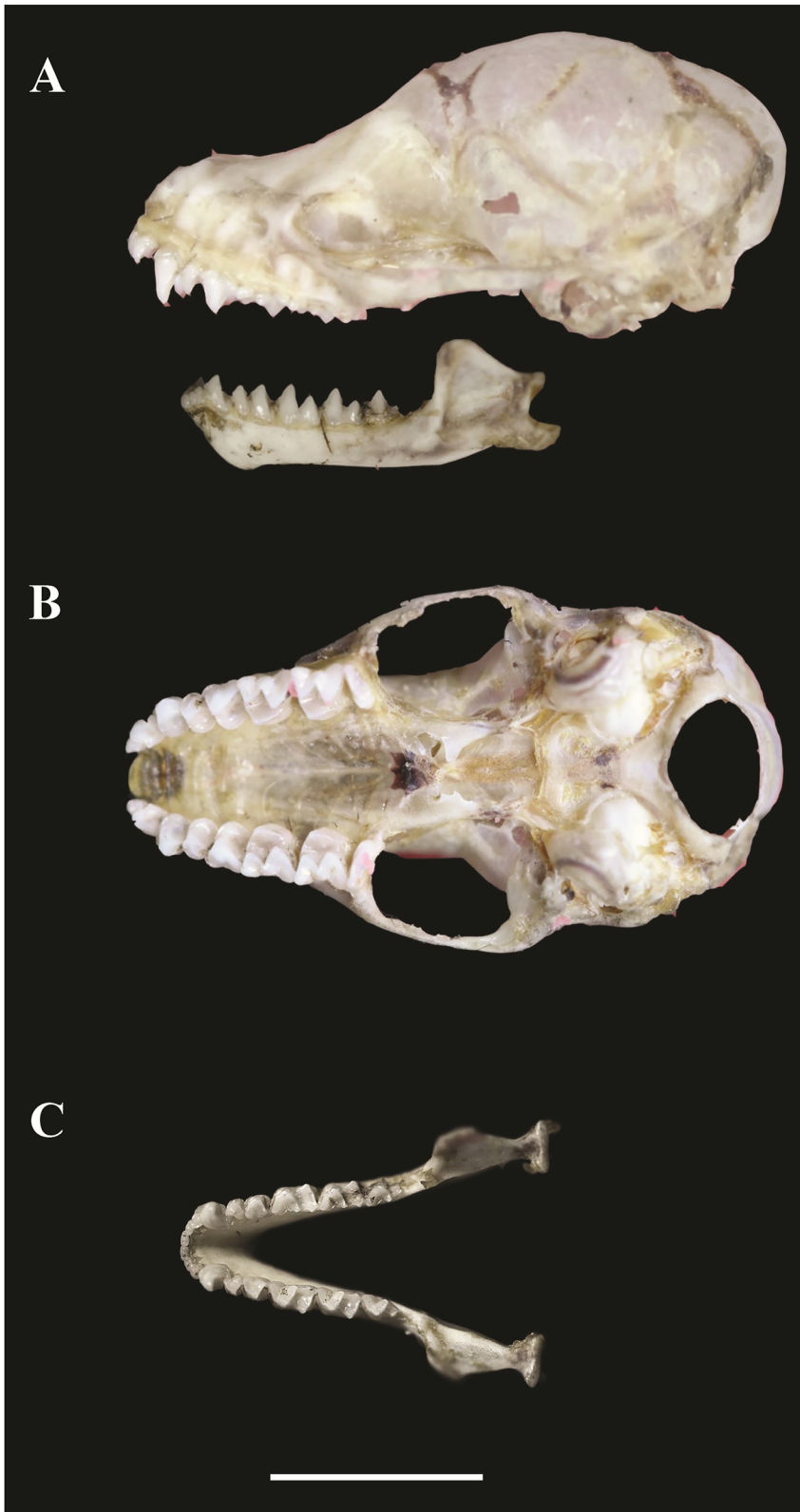


Figure 3: Skull of *Murina walstoni* from Tanahun, Nepal (CDZTU BAT_CDZ_MTU_103): (A) lateral view of skull and mandible, (B) ventral view of cranium, and (C) occlusal view of mandible. Scale = 5 mm. The morphological traits are in full agreement with the distinguishing characters of *M. walstoni* (Csorba et al. 2011), and its measurements are fully comparable to specimens of *M. walstoni* from Thailand, Vietnam and Laos (Table 1).

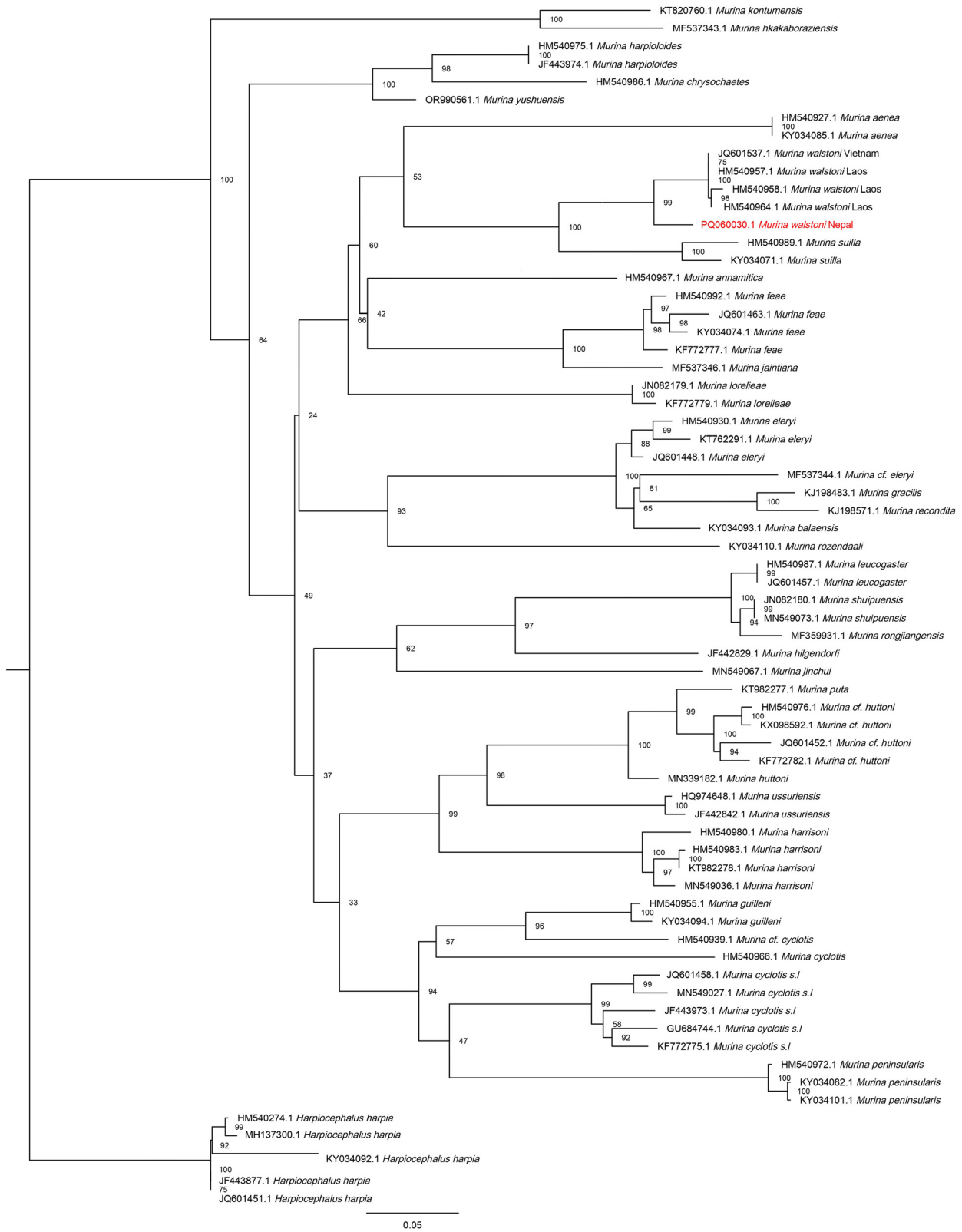


Figure 4: Maximum likelihood phylogenetic reconstruction of 66 vespertilionid samples using 657 bp alignment of the mitochondrial *CO1* gene.

Table 2: Estimates of evolutionary divergence between *Murina walstoni* and *Murina suilla* CO1 sequences, calculated using the Kimura 2-parameter model.

<i>M. walstoni</i> (PQ060030, Nepal)					
<i>M. walstoni</i> (HM540957, Laos)	0.046				
<i>M. walstoni</i> (HM540958, Laos)	0.054	0.008			
<i>M. walstoni</i> (HM540964, Laos)	0.048	0.002	0.006		
<i>M. walstoni</i> (JQ601537, Vietnam)	0.046	0.000	0.008	0.002	
<i>M. suilla</i> (HM540989, Malaysia)	0.128	0.133	0.139	0.135	0.133
<i>M. suilla</i> (KY034071, Thailand)	0.122	0.124	0.130	0.126	0.124

Acknowledgments: We express our gratitude to Ministry of Forest and Environment Department of Forest and Soil Conservation, Nepal, Division of Forest offices of Tanahun district for the research permission. We are very grateful to the Small Mammals Conservation and Research Foundation, Kathmandu, Nepal for survey equipment and technical support; and to the Central Department of Zoology, Tribhuvan University, Kathmandu, Nepal for the facility of deposition of voucher specimens, PCR and craniodental analysis. We thank Nepal Academy of Science and Technology, Lalitpur, Nepal for the genetic sequencing.

Research ethics: The survey was conducted under the permission #076/077-477 issued by the Ministry of Forest and Environment, Department of Forest and Soil Conservation, Babarmahal, Kathmandu, Nepal.

Informed consent: Not applicable.

Author contributions: Dibya Raj Dahal: field survey, skull preparation, morphometric measurements and identification, preparation of first draft; Dorottya Győrössi: genetic analysis, review and manuscript input; Sanjan Thapa: skull preparation, morphometric measurement, PCR, review and manuscript input; Gábor Csorba: species confirmation, review and manuscript input; Tamás Görföl: review and manuscript input; Kishor Pandey: PCR, review and manuscript input; Prem Bahadur Budha: field survey, review and manuscript input; Nanda Bahadur Singh: review and manuscript input. All authors have accepted responsibility for the entire content of this manuscript and approved its submission.

Use of Large Language Models, AI and Machine Learning Tools: None declared.

Conflict of interest: The authors state no conflict of interest.

Research funding: The study of Dorottya Győrössi, Gábor Csorba and Tamás Görföl was supported by the National Research, Development, and Innovation Fund of Hungary (NKFIH FK137778).

Data availability: The authors declare that all data and information presented in this manuscript are derived solely from their original research.

References

- Acharya, P.R. and Ruedas, L.A. (2007). The bat fauna of Nepal: a current conspectus. *Bat Net Newsl.* 8: 16–19.
- Acharya, P.R., Adhikari, H., Dahal, S., Thapa, A., and Thapa, S. (2010). *Bats of Nepal: a field guide*. Small Mammals Conservation and Research Foundations (SMCRF), Kathmandu.
- Bates, P.J.J. and Harrison, D.L. (1997). *Bats of the Indian Subcontinent*. Harrison Zoological Museum Publication, Sevenoaks.
- Burgin, C.J. (2019) *Murina walstoni*. In: Wilson, D.E., and Mittermeier, R.A. (Eds.). *Handbook of the mammals of the world, Vol. 9. Bats*. Lynx Edicions, Barcelona, pp. 915.
- Csorba, G., Son, N.T., Saveng, I., and Furey, N.M. (2011). Revealing cryptic bat diversity: three new *Murina* and redescription of *M. tubinaris* from Southeast Asia. *J. Mammal.* 92: 891–904.
- Csorba, G., Furey, N., and Görföl, T. (2020). *Murina walstoni*, The IUCN Red List of Threatened Species. e.T84562267A84562270. <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020-3.RLTS.T84562267A84562270.en> (Accessed 20 March 2025).
- Dahal, D.R., Thapa, S., Baral, S., Thapa, T.B., and Singh, N.B. (2022a). First record of East Asian tailless leaf-nosed bat (*Coelops frithii*) from Nepal and extension of its global range. *Mammalia* 86: 521–523.
- Dahal, D.R., Thapa, S., Ghimire, R., Csorba, G., and Singh, N.B. (2022b). First records of the Hairy-winged bat (*Harpiocephalus harpia*) from Nepal. *J. Bat Res. Conserv.* 15: 49–52.
- Dahal, D.R., Thapa, S., and Singh, N.B. (2024a). Responses of insectivorous bats to climate change in Nepal. *J. Zool.* 323: 29–44.
- Dahal, D.R., Thapa, S., and Singh, N.B. (2024b). Species diversity and elevational distribution of bats in Nepal. *Acta Chiropt.* 26: 101–111.
- Francis, C.M. and Eger, J.L. (2012). A review of tube-nosed bats (*Murina*) from Laos with a description of two new species. *Acta Chiropt.* 14: 15–38.
- Győrössi, D., Tu, V.T., Csorba, G., Thapa, S., Estók, P., Földvári, G., and Görföl, T. (2024). The grey zone of taxonomy – the case of the Sikkim myotis (*Chiroptera: Vespertilionidae: Myotis sicarius*), first recorded from Southeast Asia. *Vert. Zool.* 74: 737–749.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequence. *J. Mol. Evol.* 16: 111–120.
- Kruskop, S.V. (2013). *Bats of Vietnam: checklist and an identification manual*, 2nd ed., revised and supplemented. Russian Academy of Sciences, Moscow.
- Li, S., Mou, X., Li, M., Li, F., Li, M., Li, B., Li, M., Luo, X., Csorba, G., and Kuo, H. (2024). New records of *Harpiola isodon* (*Chiroptera, Vespertilionidae*) from the Chinese mainland. *Biodiv. Data J.* 12: 1–13.
- Sharma, B., Subedi, A., Subedi, B., Panthee, S., and Acharya, P.R. (2019). First record of the Small bamboo bat *Tylonycteris fulvida* (Peters, 1872) (Mammalia: Chiroptera: Vespertilionidae) from Nepal. *J. Threat. Taxa* 11: 14216–14219.
- Sharma, B., Chakravarty, R., and Acharya, P.R. (2021). The first record of European free-tailed bat, *Tadarida teniotis* Rafinesque, 1814, and note on probable elevational movement from Nepal. *J. Asia Pac. Biodiv.* 14: 248–253.
- Soisook, P., Karapan, S., Satasook, C., and Bates, P.J.J. (2013). A new species of *Murina* (Mammalia: Chiroptera: Vespertilionidae) from peninsular Thailand. *Zootaxa* 3746: 567–579.

- Soisook, P., Thaw, W.N., Kyaw, M., Oo, S.S.L., Pimsai, A., Suarez-Rubio, M., and Renner, S.C. (2017). A new species of *Murina* (Chiroptera: Vespertilionidae) from sub-Himalayan forests of northern Myanmar. *Zootaxa* 4320: 159–172.
- Son, N.T., Csorba, G., Tu, V.T., Thong, V.D., Wu, Y., Harada, M., Oshida, T., Endo, H., and Motokawa, M. (2015). A new species of the genus *Murina* (Chiroptera: Vespertilionidae) from the Central Highlands of Vietnam with a review of the subfamily Murinae in Vietnam. *Acta Chiropt.* 17: 201–232.
- Tamura, K., Stecher, G., and Kumar, S. (2021). MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis. Version 11. *Mol. Biol. Evol.* 38: 3022–3027.
- Thapa, S. (2014). A checklist of mammals of Nepal. *J. Threat. Taxa* 6: 6061–6072.
- Thapa, S., Baral, S., Hu, Y., Huang, Z., Yue, Y., Dhakal, M., Jnawali, S.R., Chettri, N., Racey, P.A., Yu, W., et al. (2021). Will climate change impact distribution of bats in Nepal Himalayas? A case study of five species. *Glob. Ecol. Conserv.* 26: 1–14.
- Wang, X., Han, X., Csorba, G., Wu, Y., Chen, H., Zhao, X., Dong, Z., Yu, W., and Lu, Z. (2025). A new species of tube-nosed bat (Chiroptera: Vespertilionidae: *Murina*) from Qinghai–Tibet plateau, China. *J. Mammal.* 106: 178–186.
- Yu, W.H., Csorba, G., and Wu, Y. (2020). Tube-nosed variations – a new species of the genus *Murina* (Chiroptera: Vespertilionidae) from China. *Zool. Res.* 41: 70–77.



BRILL



brill.com/ctoz

A reassessment of the taxonomic status and distribution of the subspecies of *Lyroderma lyra* (Chiroptera: Megadermatidae)

*Lei Feng** | ORCID: 0009-0007-3367-3470

Jilin Provincial Key Laboratory of Animal Resource Conservation and Utilization,
Northeast Normal University, Changchun 130117, China
Hunan Academy of Forestry, Changsha 410004, China

*Dorottya Győrössy** | ORCID: 0000-0003-3219-3559

Department of Zoology, Hungarian Natural History Museum, 1088 Budapest, Hungary
Hungarian University of Agriculture and Life Sciences, 2100 Gödöllő, Hungary
Department of Zoology, Eszterházy Károly Catholic University, 3300 Eger, Hungary

Roberto Portela Miguez

Department of Life Sciences, Natural History Museum, London, SW7 5BD, UK

Phaedra Kokkini

Department of Life Sciences, Natural History Museum, London, SW7 5BD, UK

Tamás Görföl | ORCID: 0000-0002-1910-4024

National Laboratory of Virology, Szentágotthai Research Centre, University of Pécs,
7624 Pécs, Hungary
Department of Zoology, Hungarian Natural History Museum, 1088 Budapest, Hungary

Shahneaz Ali Khan

Chattogram Veterinary and Animal Sciences University, Chattogram 4202, Bangladesh

Uttam Saikia

North Eastern Regional Centre, Zoological Survey of India, Risa Colony, Shillong,
793003, India

Shyamkant S. Talmale

Western Regional Centre, Zoological Survey of India, Pune, 411044, India

* These authors contributed equally to this article.

Wenhua Yu | ORCID: 0000-0001-5226-7725

College of Life Science, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China

Shaoying Liu | ORCID: 0000-0003-1382-7149

Sichuan Academy of Forestry, Chengdu 610081, China

Tinglei Jiang | ORCID: 0000-0003-3858-9458

Jilin Provincial Key Laboratory of Animal Resource Conservation and Utilization,
Northeast Normal University, Changchun 130117, China

jiangtl730@nenu.edu.cn

Gábor Csorba* | ORCID: 0000-0001-5720-4600

Department of Zoology, Hungarian Natural History Museum, 1088 Budapest, Hungary

RECEIVED 11 MAY 2024; REVISED 26 OCTOBER 2024; ACCEPTED 4 NOVEMBER 2024;

PUBLISHED ONLINE 10 DECEMBER 2024; PUBLISHED IN ISSUE

EDITOR: ALEXANDRA VAN DER GEER

Abstract

Lyroderma lyra is one of the six currently recognised species of the family Megadermatidae. Previous studies have suggested subspecific division within *L. lyra*, wherein the nominate subspecies is predominantly distributed in South Asia, and the other subspecies, *L. lyra sinense* is occurring in southern China and Southeast Asia. Based on the congruent results of comparative morphology of skulls and bacula, as well as phylogenetic tree reconstructions – the first ones including both subspecies and incorporating the most extensive geographic sampling of “*sinense*” to date – using *COI* and *cytb* sequences, we have elevated the Southeast Asian subspecies to a distinct species status, *Lyroderma sinense*.

Keywords

false vampire – *Megaderma* – morphometrics – phylogenetics – South Asia – Southeast Asia

Introduction

The false vampires, belonging to the family Megadermatidae, are restricted to the tropics and subtropics of the Old World (Wilson & Mittermeier, 2019). Members

of the family are characterized externally by a rounded anterior noseleaf, well-developed, simple and erect posterior noseleaf, large oval ears joined above the forehead, forked tragus, and well-developed interfemoral membrane but no

bony tail (Bates & Harrison, 1997; Wilson & Mittermeier, 2019). Cranially, the premaxillae are essentially absent, and the nasals are greatly reduced; and dentally, the lack of upper incisors and the strongly bifid upper canines are the defining characteristics of the family (Soisook et al., 2015; Wilson & Mittermeier, 2019).

Six genera are currently recognised, each containing one extant species, namely *Lavia frons* (distributed in sub-Saharan Africa), *Cardioderma cor* (East Africa), *Macroderma gigas* (Australia), *Megaderma spasma* (Southeast Asia), *Eudiscoderma thongareae* (Peninsular Thailand), and *Lyroderma lyra* (South and Southeast Asia) (American Society of Mammalogists (ASM), 2024; Simmons & Cirranello, 2024; Volleth et al., 2021; Wilson & Mittermeier, 2019).

Lyroderma Peters, 1872 was generally treated as a subgenus of *Megaderma* Geoffroy, 1810; but recent phylogenetic

reconstructions using various markers (Eick et al., 2005; Kanuch et al., 2015; Soisook et al., 2015) consequently separated *Lyroderma* and *Megaderma* as full genera. Soisook et al. (2015) provided a comprehensive overview of the taxonomic-nomenclatural history of Megadermatidae; for a short summary of the changes, see table 1.

Within *Lyroderma* two subspecies are currently recognised; the nominal form is widespread in South Asia, from Afghanistan to Bangladesh, whereas *L. lyra sinense* (originally described as *sinensis* but changed into *sinense* for gender agreement) is found in Southeast Asia, from South China to Peninsular Malaysia (Singh & Sharma, 2023; Soisook et al., 2015; Wilson & Mittermeier, 2019), but the exact distributional limits are not clear. The Myanmar (formerly Burma) population of *Lyroderma* was first regarded as belonging to the taxon “*lyra*” by Sinha (1980), albeit

TABLE 1 Nomenclatural history of the genera *Megaderma* and *Lyroderma*

Geoffroy (1810)	Andersen & Wroughton (1907)	Ellerman & Morrison (1951)	Corbet & Hill (1992)	Simmons (2005)	Francis (2019)	Simmons & Cirranello (2024)
<i>Megaderma</i>	<i>Eucheira</i> *	<i>Megaderma</i>	<i>Megaderma</i> (<i>Lyroderma</i>)	<i>Megaderma</i> (<i>Lyroderma</i>)	<i>Lyroderma</i>	<i>Lyroderma</i>
<i>lyra</i>	<i>lyra</i> <i>lyra</i> <i>caurina</i> <i>sinensis</i>	<i>lyra</i> <i>lyra</i> <i>caurina</i> <i>sinensis</i>	<i>lyra</i> <i>lyra</i> <i>sinensis</i>	<i>lyra</i> <i>lyra</i> <i>sinensis</i>	<i>lyra</i> <i>lyra</i> <i>sinense</i>	<i>lyra</i> <i>lyra</i> <i>sinense</i>
	<i>Megaderma</i>		<i>Megaderma</i> (<i>Megaderma</i>)	<i>Megaderma</i> (<i>Megaderma</i>)	<i>Megaderma</i>	<i>Megaderma</i>
<i>spasma</i> <i>trifolium</i>	<i>spasma</i> <i>carinatae</i> <i>natunae</i>	<i>spasma</i>	<i>spasma</i>	<i>spasma</i>	<i>spasma</i>	<i>spasma</i>

* According to Andersen and Wroughton (1907) *Eucheira* Hodgson, 1847 antedates the name *Lyroderma* Peters, 1872; however, *Eucheira* Hodgson, 1847 is preoccupied by *Eucheira* Westwood, 1834 (a Lepidoptera) (see Miller, 1907).

that his arguments are debatable. He considered the skull size as the only difference between “*lyra*” and “*sinense*” [*sinense* being the larger taxon] but noted that “Indian examples have smaller skulls than those from Burma” (Sinha, 1980).

The taxon *sinense* was described by Andersen & Wroughton (1907) as a new species in the genus *Euweira* based on two skins and skulls collected from Xiamen, Fujian Province and Shantou, Guangdong Province, South China (Andersen & Wroughton, 1907). The authors distinguished the new species from *E. lyra* on the basis of size and certain cranial traits (skull length of *sinense* is between 29.3–32.0 mm, the prenasal notch narrower, rounded posteriorly; vs. skull length between 27.8–29 mm, and the prenasal notch posteriorly wider, flattened in *lyra*) (Andersen & Wroughton, 1907). Sanborn (1933) published a study of bats from China, in which he measured 35 specimens of *E. sinensis* collected in western Sichuan, China, and 6 specimens collected in Fujian. Investigating if the two populations under study may represent two distinct forms, based on the external and craniodental measurements taken by him, he finally concluded that these two populations cannot be distinguished neither based on size nor on the observed slight color differences. Despite the limitations of his study (Sanborn, 1933), without further explanation he listed *sinense* as a subspecies of *L. lyra*, the view that is widely accepted by subsequent authors (Bates & Harrison, 1997; Corbet & Hill, 1991; Csorba & Topál, 1994; Ellerman & Morrison-Scott, 1951; Lekagul & McNeely, 1977; Sanborn, 1933; Simmons, 2005; Simmons &

Cirranello, 2024; Wei, 2023; Wilson & Mittermeier, 2019; Wilson & Reeder, 2005).

The karyology of the two subspecies has been studied, and they share the same karyotype (Wu & Harada, 2006). Nevertheless, the obvious morphological differences between the two subspecies (summarised by Csorba & Topál, 1994) have never been tested by molecular biological methods. In this study, we applied an integrative taxonomic approach, including analyses of morphological data and mtDNA sequences based on the most comprehensive taxonomic samplings to investigate the taxonomic status of *L. lyra lyra* and *L. lyra sinense*.

Methods

Specimens examined

For morphological comparison and partly for multivariate statistics, seventy-one specimens of *L. lyra* and eleven specimens of *Megaderma spasma* – the other common, widely distributed and frequently sympatric Asian false vampire species – were used. The specimens are housed in the following collections: GZHU – School of Life Sciences, Guangzhou University, Guangdong, China, HNHM – Hungarian Natural History Museum, Budapest, Hungary, HUNNU – Hunan Normal University, Changsha, Hunan, China, NENU – Northeast Normal University, Changchun, Jilin, China, NHMUK – Natural History Museum, London, United Kingdom, PSUZC – Prince of Songkla University Zoological Collection, Hat Yai, Thailand, SCAF – Sichuan Academy of Forestry, Chengdu, Sichuan, China, SMNH – Slovenian Museum of

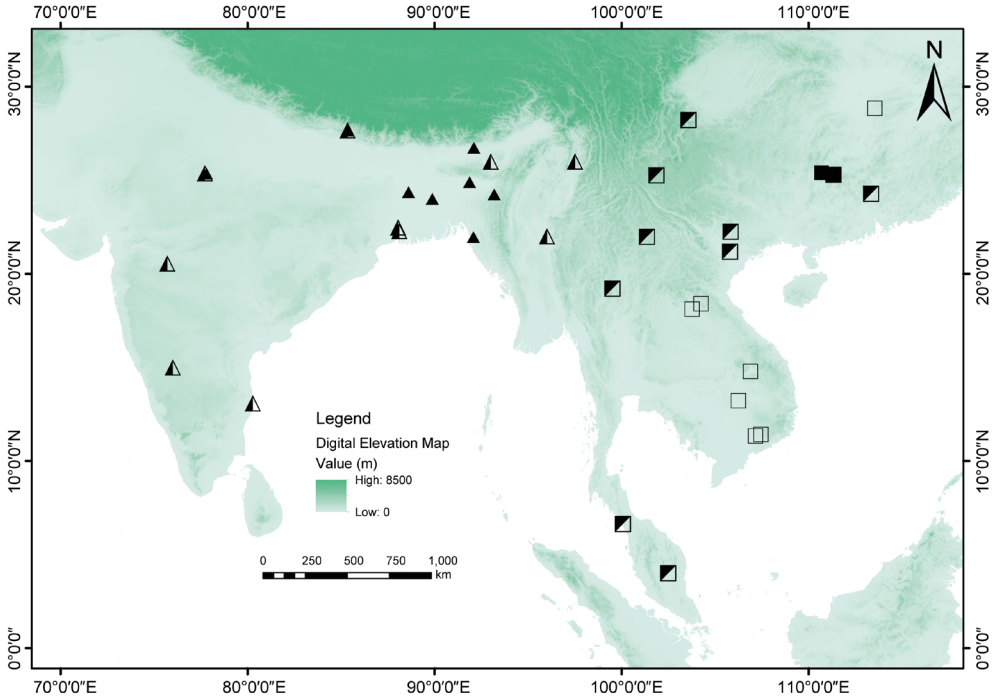


FIGURE 1 Geographic distribution of the Indian false vampire bat *Lyroderma lyra* (triangles) and Greater false vampire bat *Lyroderma sinense* (squares) and samples analysed in the present paper. Full symbols: both morphological and genetic data were used; empty symbols: only molecular data were available; half-full symbols: only morphological information was used. Some symbols represent multiple specimens from the same locality.

Natural History, Ljubljana, Slovenia, UKMMZ – Universiti Kebangsaan Malaysia, Muzium Zoologi, Bangi, Malaysia, ZSI Pune – Western Regional Centre, Zoological Survey of India, Pune and ZSI Shillong – North Eastern Regional Centre, Zoological Survey of India, Shillong. The distribution map of the sampling points is shown in fig. 1.

Lyroderma lyra lyra: BANGLADESH: HNHM-28234, ♀; HNHM-28235, ♀; HNHM-28237, ♀; HNHM-28238, ♀; HNHM-28239, ♀; HNHM-28241, ♂; INDIA, ASSAM: ZSI-VMERS-384, sex unknown; ZSI-VMERS-429, ♀; INDIA, KARNATAKA: HNHM-93.11.1, ♀; HNHM-93.11.2., ♂; INDIA, MADHYA

PRADESH: ZSI-CZRC-V-6175, ♀; ZSI-CZRC-V-6176, ♀; ZSI-CZRC-V-6179, ♀; INDIA, MAHARASHTRA: HNHM-92.79.1, sex unknown; HNHM-92.79.2., sex unknown; HNHM-92.78.2., ♂; HNHM-92.78.5., ♀; INDIA, MANIPUR: ZSI-VMERS-429, ♂; INDIA, TAMIL NADU: HNHM-93.13.2., ♀; HNHM-93.13.3., ♀; INDIA, WEST BENGAL: HNHM-93.10.1, ♂; HNHM-93.10.2., ♀; HNHM-93.10.3., ♀; HNHM-92.76.1, ♀; HNHM-92.76.2., ♂; HNHM-92.76.3., ♂; NEPAL: HNHM-98.5.2., ♂; HNHM-95.48.1, ♂; HNHM-95.48.2., ♂.

Lyroderma lyra sinense: CAMBODIA: HNHM-23746, ♂; CHINA, SICHUAN: SCAF-LDS-000, ♂; SCAF-LDS-001, ♀; SCAF-LDS-002, ♀; SCAF-LDS-003, ♂; SCAF-LDS-004, ♂;

SCAF-LDS-005, ♀; SCAF-LDS-006, ♂; SCAF-LDS-007, ♂; SCAF-LDS-009, ♂; SCAF-LDS-010, ♂; SCAF-LDS-011, ♀; CHINA, GUANGDONG: GZHU-01091, ♂; GZHU-99058, sex unknown; GZHU-99059, ♀; GZHU-99152, ♀; CHINA, GUANGXI: NENU-GX181022, ♂; CHINA, HUNAN: HUNNU-JY01, ♂; HUNNU-JY02, ♂; HUNNU-JY03, ♀; NENU-JY-19-02, ♀; NENU-JY-19-03, ♀; NENU-JY-19-04, ♀; NENU-HUN-10-32, ♀; CHINA, YUNNAN: NENU-YN-08-121, ♂; SMNH, not registered, sex unknown; MALAYSIA: UKMMZ-m1505, ♀; THAILAND: PSUZC-05.214, ♂; THAILAND, PENINSULAR: PSUZC-2014.159, ♀; VIETNAM: HNHM-2007.27.10., ♀; HNHM-95.49.1, ♂; HNHM-95.49.2., ♂; HNHM-95.49.3., ♀; HNHM-95.49.4., ♂; HNHM-95.49.5., ♂; HNHM-98.90.35., ♀; HNHM-98.90.37, sex unknown.

Lyroderma lyra ssp: MYANMAR: NHMUK-ZD1950.425, ♂; NHMUK-ZD1950.426, ♀; NHMUK-ZD1950.427, ♂; NHMUK-ZD1950.428, ♂; NHMUK-ZD1950.429, ♂; NHMUK-ZD1950.430, ♀; NHMUK-ZD1921.2.1.43, ♀; NHMUK-ZD1921.2.1.44, ♀.

Megaderma spasma: CAMBODIA: HNHM-2005.81.40, ♀; HNHM-2006.34.35, sex unknown, HNHM-2005.81.34, ♂; HNHM-2011.1.13, ♀; MALAYSIA, PENINSULAR: HNHM-95.47.1, ♀; HNHM-95.47.2, ♂; MALAYSIA, SARAWAK: HNHM-26465, ♂; VIETNAM: HNHM-2010.42.6, ♂; THAILAND, PENINSULAR: PSUZC-07.267, ♂; PSUZC-07.5, ♀; PSUZC-06.119, ♂.

Measurements and morphometric analysis

We took one external (forearm length) and 13 craniodental measurements, following Bates and Harrison (1997); definitions are

shown in table 2. The external measurements were taken in the field, the cranial and dental ones were measured under a stereomicroscope by digital vernier calliper to the nearest 0.01 mm. Measurements were recorded from adult specimens only.

Previous studies have indicated that the forearm of female individuals of *L. l. lyra* is longer than that of male individuals (Sinha, 1980). The results of the independent samples *t*-test show that the forearm length of female individuals of *L. l. sinense* is significantly longer than that of male individuals ($T = -3.525$, $p = 0.002$). Since the craniodental parameters did not meet the homogeneity of variances, we employed the Mann-Whitney *U* test to ascertain whether there were significant differences in the craniodental parameters between male and female individuals of *L. l. sinense* and *L. l. lyra* (Nachar, 2008). The skull length (GLS) and width (ZYW) of female *L. l. sinense* are significantly greater than those of male *L. l. sinense*, henceforth, the analysis of craniodental parameters was conducted separately for the two sexes. We employed 9 craniodental measurements of 58 specimens (a subset of the morphologically studied museum materials), with 29 individuals each for females and males (tables 3 and 4), to perform principal component analysis (PCA) and linear discriminant analysis (LDA). To reduce the potential influence of skewed distributions or outliers, we performed logarithmic transformation on the data before conducting PCA and LDA analyses. The results showed that the PCA and LDA outcomes before and after logarithmic transformation were similar. The analyses were carried out using R 4.3.1 (R Core Team, 2024), incorporating methods like

TABLE 2 Description of cranial, mandibular, and external dimensions and their abbreviations

Measurements	Acronyms	Descriptions
Forearm length	FA	From the elbow to the distal end of the forearm including carpals
Greatest length of skull	GLS	From the apex of the upper internal incisors to the occiput
Condylar-canine length	CCL	From the anterior surface of the upper canines to a line connecting the occipital condyles
Interorbital breadth	IOB	Least breadth between the orbits
Zygomatic width	ZYW	Greatest breadth across the outer margins of the zygomatic arches
Mastoid width	MAW	Greatest breadth across the mastoid region
Braincase width	BCW	Greatest breadth of the globular part of the braincase
Braincase height	BCH	Braincase height posteriorly to the auditory bullae
Maxillary canine outer width	CCW	Distance between outer margins of C ₁
Width of upper molars	M ₃ M ₃ W	Maximum distance between the bases of the outer edges of the third posterior molars on each maxillary side
Maxillary toothrow length	CM ₃ L	Maximum length from the anterior margin of the maxillary canine to the posterior margin of the base of the last molar on the same side
Mandible length	MANL	The length from the most anterior edge of the mandible (excluding incisors) to the most posterior edge of the mandible
Mandibular toothrow length	cm ₃ L	Maximum length from the anterior edge of the mandibular canine to the final edge of the last molar
Mandibular molariform toothrow length	m ₁ m ₃ L	Distance from the anterior edge of the m ₁ alveolus to the posterior edge of the m ₃ alveolus of the mandibular posterior molar

the Mann-Whitney *U* Test. Visualization of the results was accomplished using the `ggord`, `ggplot2`, `plot` and `factoextra` packages in R 4.3.1 (R Core Team, 2024). To assess the suitability of the data for use in PCA, we utilized Kaiser-Meyer-Olkin (KMO) test and the Bartlett's test of sphericity focusing on the skull dataset. The

Kaiser-Meyer Olkin measure of sampling adequacy (KMO) was greater than 0.5 and the Bartlett's test of sphericity was significant ($p < 0.001$), indicating that the data was suitable for PCA (Maskey et al., 2018). Missing data were filled with average values.

TABLE 3 Selected measurements (mm) of male group *L. sinense*, *L. lyra* and *M. spasma*, and vector correlation loadings with original variables of principal components (PC1 and PC2) and discriminant functions (DF1 and DF2) for selected samples of male group *L. l. sinense*, *L. l. lyra* and *M. spasma*. See Table 2 for variable abbreviations.

Measurements	<i>L. l. sinense</i>	<i>L. l. lyra</i>	<i>M. spasma</i>	PC1	PC2	DF1	DF2	p-value
GLS	30.63(29.92–31.96)16	28.85(28.1–29.68)8	24.93(23.36–25.61)5	-0.34	0.12	-0.68	0.34	< 0.001
CCL	27.43(26.54–28.55)16	25.53(24.77–26)8	21.65(20.47–22.62)5	-0.34	0.12	1.55	0.01	< 0.001
IOB	5.52(5.28–5.69)16	4.83(4.63–4.93)8	3.78(3.6–4.14)5	-0.34	0.13	5.59	1.37	< 0.001
ZYW	17.02(16.42–17.51)16	16.57(16.29–17.04)8	13.81(12.71–14.23)5	-0.34	0.22	0.78	-0.83	0.003
MAW	13.28(12.82–13.63)16	12.59(12.38–12.93)8	10.91(10.35–11.2)5	-0.34	0.19	0.57	1.00	< 0.001
BCW	12.64(12.37–13)16	12.32(11.86–12.49)8	10.55(9.83–10.79)5	-0.34	0.21	-1.07	-2.06	0.001
BCH	12.64(12.37–13)16	10.24(10.04–10.45)8	8.85(7.92–9.43)	-	-	-	-	< 0.001
CCW	6.42(6.01–8.6)16	5.67(5.46–5.87)8	5.18(4.86–5.46)5	-0.28	-0.81	-0.52	4.50	< 0.001
M3M3W	10.31(9.67–12.37)16	9.90(9.41–10.11)8	8.27(7.81–8.81)5	-0.32	-0.41	0.39	-4.43	0.016
CM3L	11.91(11.48–12.48)16	11.23(11.03–11.45)8	9.63(9.05–10.21)5	-0.35	0.06	-0.40	1.30	< 0.001
MANL	21.46(20.5–22.54)16	19.69(18.95–20.28)8	16.99(15.77–17.59)5	-	-	-	-	< 0.001
cm3L	12.96(12.52–13.41)16	12.22(11.96–12.6)8	10.70(9.97–11.26)5	-	-	-	-	< 0.001
mm3L	7.80(7.57–8.56)16	7.36(7.15–7.54)8	6.42(6.03–6.7)5	-	-	-	-	< 0.001

TABLE 4 Selected measurements (mm) of female group *L. sinense*, *L. lyra* and *M. spasma*, and vector correlation loadings with original variables of principal components (PC1 and PC2) and discriminant functions (DF1 and DF2) for selected samples of female group *L. l. sinense*, *L. l. lyra* and *M. spasma*. See Table 2 for variable abbreviations.

Measurements	<i>L. l. sinense</i>	<i>L. l. lyra</i>	<i>M. spasma</i>	PC1	PC2	DF1	DF2	<i>p</i> -value
GLS	30.96(30.18–31.73)17	28.80(28–29.55)8	25.10(24.12–25.8)4	-0.34	-0.12	-0.55	-0.51	< 0.001
CCL	27.58(26.39–28.5)17	25.56(24.93–26.21)8	22.25(21.35–22.89)4	-0.34	-0.06	-0.05	-3.52	< 0.001
IOB	5.55(5.26–6.09)17	4.89(4.78–5.07)8	3.64(3.34–3.96)4	-0.33	-0.30	-2.92	-1.89	< 0.001
ZYW	17.40(16.82–18.09)17	16.61(16.32–16.9)8	13.84(12.87–14.29)4	-0.34	0.25	0.90	1.56	< 0.001
MAW	13.49(12.86–13.92)17	12.73(12.38–13.17)8	10.97(10.57–11.37)4	-0.33	0.20	-2.16	0.81	< 0.001
BCW	12.86(12.37–13.28)17	12.40(11.95–12.68)8	10.45(10.05–10.65)4	-0.34	0.30	-0.55	3.58	< 0.001
BCH	11.22(10.66–12.07)17	10.24(10.1–10.38)8	8.55(8.37–8.81)4					< 0.001
CCW	6.35(6.09–6.72)17	5.71(5.53–5.89)8	5.09(4.94–5.39)4	-0.32	-0.76	0.55	-4.84	< 0.001
M3M3W	10.45(9.93–11.01)17	10.08(9.92–10.24)8	8.19(8.03–8.4)4	-0.33	0.30	-1.79	4.01	< 0.001
CM3L	11.86(11.45–12.44)17	11.32(11.04–11.59)8	9.74(9.45–10.02)4	-0.33	0.16	-0.40	3.41	< 0.001
MANL	21.57(20.47–22.63)17	19.66(19.29–20.07)8	17.17(16.49–17.7)4					< 0.001
cm3L	13.03(12.24–13.63)17	12.21(11.88–12.43)8	10.65(10.42–11.02)4					< 0.001
mim3L	7.83(7.53–8.3)17	7.39(7.26–7.51)8	6.49(6.24–6.74)4					< 0.001

Baculum

Preparation and preservation of the penial bone followed that of Friley (1947). The baculum was drawn, and its maximum length was measured using a Mitutoyo digital calliper to the nearest 0.01 mm under a stereomicroscope.

Phylogenetic inference

Total genomic DNA was extracted with DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Germany) according to the instructions of the manufacturer from ethanol-preserved tissue samples of 18 *Lyroderma* specimens forming part of the genetic resources' collections of HNHM, HUNNU, NENU, ZSI Pune and ZSI Shillong.

For phylogenetic analysis, the mitochondrial cytochrome oxidase c subunit I (*COI*, 657 bp) and the cytochrome b gene (*cytb*, 1140 bp) were amplified with the primers C1L705/UtyrLA (Hassanin et al., 2012) and Molcit-F/Cytb-H (Ibáñez et al., 2006; Weyeneth et al., 2008), respectively. PCR reactions were performed in 50 µl using 1 µl (ca. 20 ng) of genomic DNA, 1-1 µl of the primers (10 mM), 40.25 µl of nuclease-free water, 1.5 µl of dNTP, 5 µl of DreamTaq Green Buffer (Thermo Scientific, USA) and 0.25 µl of DreamTaq DNA Polymerase (Thermo Scientific, USA). Laboratory works were done in-country for respective specimens housed in a particular museum. The *COI* and *cytb* sequences were aligned with related taxa with MEGA7 (Kumar et al., 2016). The newly generated sequences were compared with 43 *COI* (including 6 outgroups) and 14 *cytb* (including 6 outgroups) gene sequences of false vampires downloaded from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank (supplementary table S3).

The phylogenetic analysis was performed using the maximum likelihood (ML) method, in the software MEGA7. To evaluate nodal support, we computed a nonparametric bootstrap using 1000 replicates. Additionally, the genetic distance (*p*-distance) of *COI* and *cytb* genes was calculated by Bootstrap method using MEGA7.

Results

Morphology and multivariate statistics

We could not establish any statistically significant difference (paired samples *T*-test, $F = 1.134$, $p = 0.295$) between *L. l. sinense* (67.76 ± 1.06 mm) and *L. l. lyra* (67.3 ± 1.55 mm) with respect to forearm length (FA).

The Mann-Whitney *U* Test was used to compare thirteen cranial parameters of males and females between two subspecies. The results showed significant sex differences in all cranial parameters of *L. l. lyra* and *L. l. sinense*. On average, within the same sex, the skull of *L. l. sinense* is longer and wider than that of *L. l. lyra* (tables 3 and 4, fig. 2, supplementary figs. S1 and S2) despite that overlapping values in all measurements were observed. However, in line with the observations of (Andersen & Wroughton, 1907), the anatomy of the interorbital region and the prenasal notch showed clear differences between the two taxa (see details in the Introduction and in fig. 2).

The first principal component (PC1) accounted for more than 93.00% of the total craniometric variation and represents the size of the upper jaw of the skull (figs. 3A and 4A). Along the PC1 axis, there is

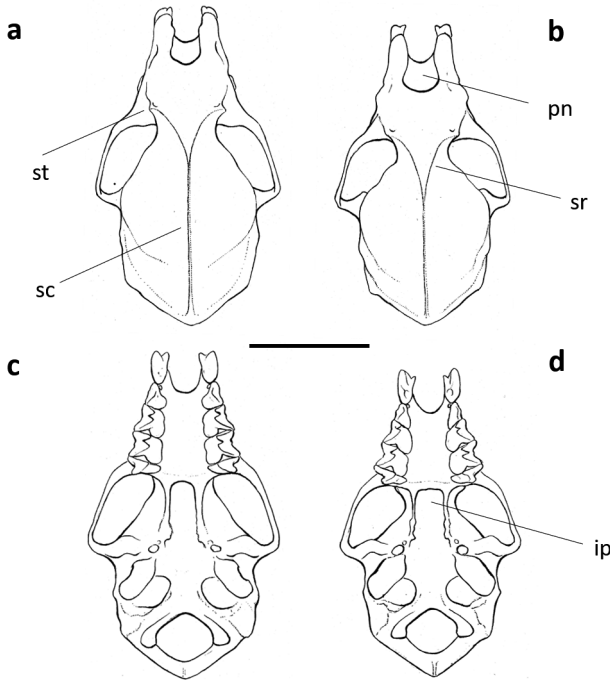


FIGURE 2 The dorsal and ventral views of the skulls of *L. sinense* (HNHM 98.90.35.) from Bac Thai, Vietnam (a, c), and *L. lyra* (HNHM 92.77.1.) from West Bengal, India (b, d). st = supraorbital tubercle; sc = sagittal crest; pn = prenasal notch; sr = supraorbital ridge; ip = interpterygoid. Scale = 10 mm

no overlap between the groups of male *M. spasma* and *L. l. lyra*, or between *M. spasma* and *L. l. sinense*; these groups show some overlap along PC2 between *M. spasma* and *L. l. lyra*, or between *M. spasma* and *L. l. sinense* (2.44%). However, male *L. l. lyra* and *L. l. sinense* exhibit overlap along both PC1 and PC2. Along the PC1 axis, there is no overlap among female *M. spasma*, *L. l. lyra*, and *L. l. sinense*; however, on the PC2 axis, all three groups show overlap (2.07%). For both male and female groups, the factor loadings show that the loadings for the first PC are very close, while on the second PC, the factor loadings for ccw and M₃M₃W are higher than those

of the other samples, indicating that they are the most useful discriminant factors; following these, the next important discriminant factors include BCW, ZYW, and IOB (tables 3 and 4, figs. 3B and 4B). The factor loadings of other PCs are shown in supplementary tables S1 and S2. The LDA of craniodental measurements shows that in LD1, there is no overlap among the three species for both males (89.67%) and females (80.41%), whereas in LD2, there is some overlap among the three species in males, and only between *L. l. sinense* and *M. spasma* in females (figs. 3C and 4C). In males, some parameters associated with the length or width of the skull and maxilla

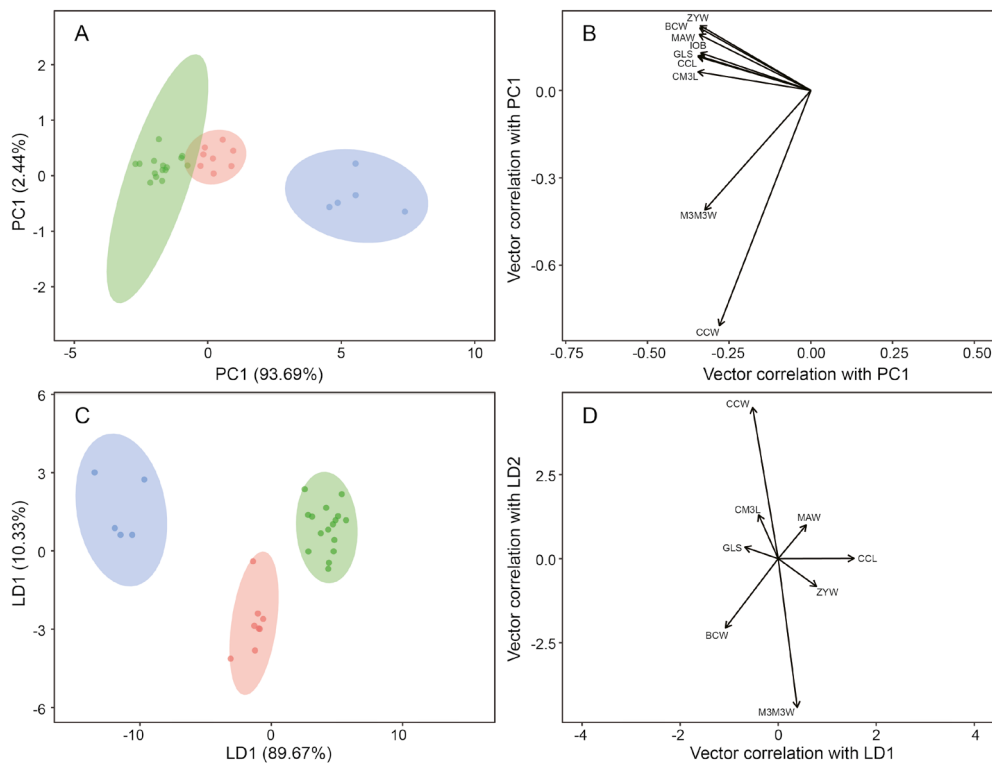


FIGURE 3 Two-dimensional PCA and vector correlation (A, B) and two-dimensional LDA and vector correlation (C, D) of cranial measurements for male *Lyroderma sinense* (green dots), *Lyroderma lyra* (red dots) and *Megaderma spasma* (blue dots). The range of the axes of A and B, C and D are different.

(IOB, CCL, BCW, GLS) are most helpful in distinguishing these three groups (fig. 3D, table 3). In females, however, some parameters related to the width of the skull and maxilla (IOB, MAW, M3M3W, ZYW) are most effective in differentiating these three groups (fig. 4D, table 4).

The baculum of both *L. l. sinense* and *L. l. lyra* consists of two separate, stick-like bones only partially connected with ligaments; the penis bones of *L. l. sinense* are distinctly longer than those of *L. l. lyra*, (1.01 mm vs. 0.69–0.72 mm) and straight (vs. distinctly bent dorsoventrally in *L. l. lyra*) (fig. 5).

Phylogenetic reconstructions

The newly obtained sequences included *COI* and *cytb* sequences for eight *L. l. sinense*, 10 *L. l. lyra*, and one *M. spasma*. All novel sequences were deposited in the NCBI GenBank and registered under the accession numbers PQ615380-PQ615394 and PQ619736-PQ619752.

The ML phylogenetic tree constructed based on *COI* and *Cytb* sequences revealed similar phylogenetic relationships, with *L. l. sinense* being closely related to and forming a sister clade with *L. l. lyra*, while *M. spasma* grouped with species of other genera within the Megadermatidae family,

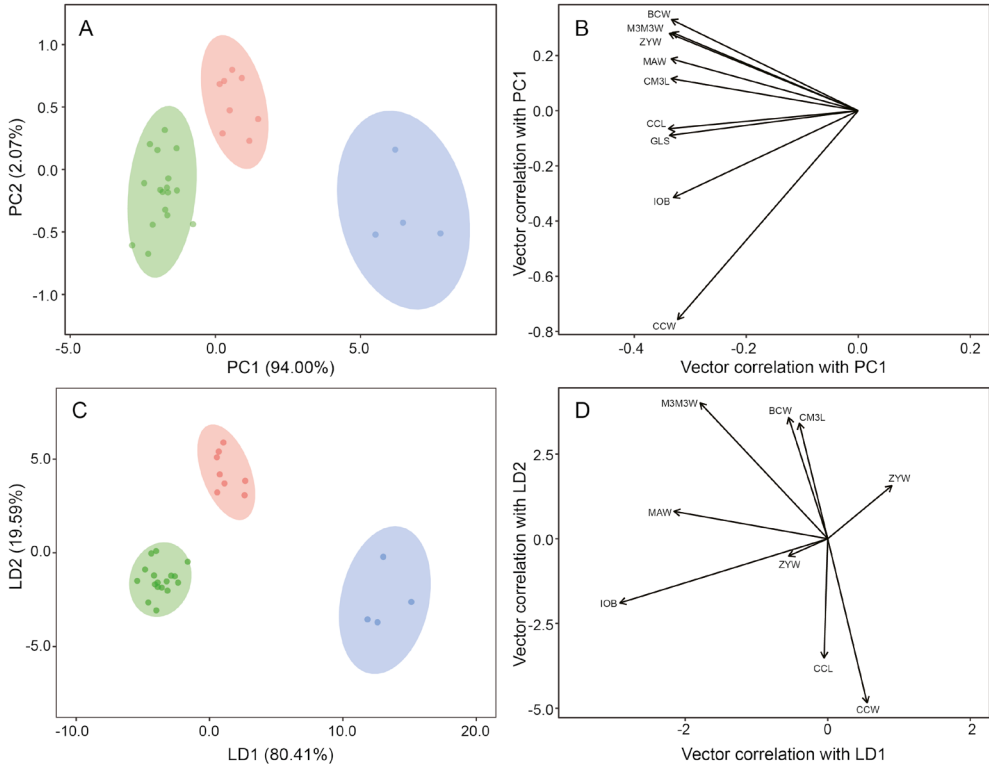


FIGURE 4 Two-dimensional PCA and vector correlation (A, B) and two-dimensional LDA and vector correlation (C, D) of cranial measurements for female *Lyroderma sinense* (green dots), *Lyroderma lyra* (red dots) and *Megaderma spasma* (blue dots). The range of the axes of A and B, C and D are different.

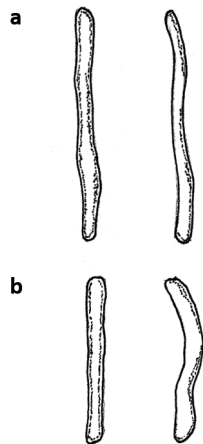


FIGURE 5 The dorsal (left) and lateral (right) views of the baculum of (a) *L. sinense* (HNHM 95.49.4.) from Bac Thai, Vietnam; and (b) *L. lyra* (HNHM 92.78.1.) from Maharashtra, India. Scale = 1 mm



FIGURE 6 Phylogenetic tree resulting from the Maximum Likelihood analysis of *COI* sequences of species of Megadermatidae, numbers indicate nodal support, the outgroup genes were derived from species of the genera *Hipposideros* and *Rhinolophus*.

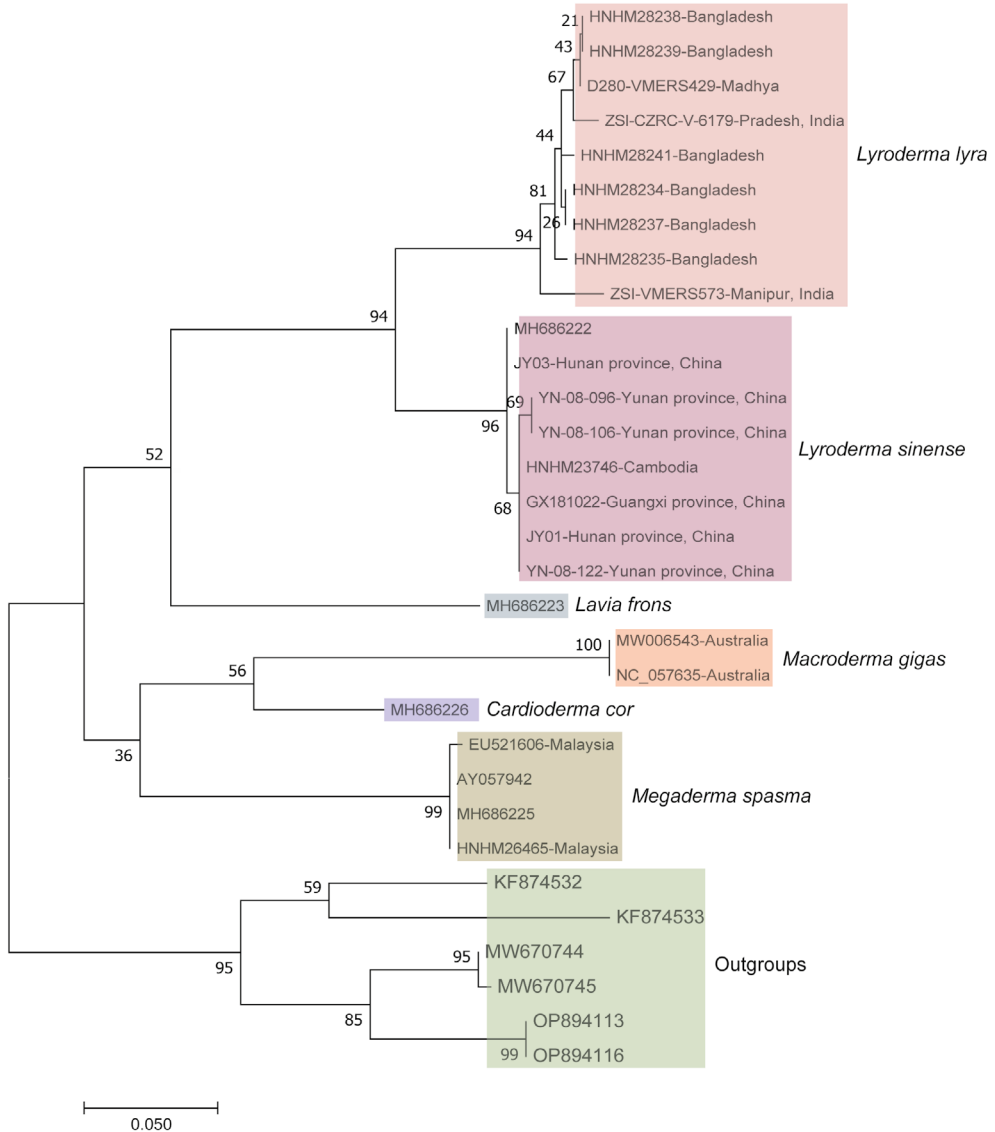


FIGURE 7 Phylogenetic tree resulting from the Maximum Likelihood analysis of *cytb* sequence of species of Megadermatidae, numbers indicate nodal support, the outgroup genes were derived from species of the genera *Hipposideros* and *Rhinolophus*.

despite the low nodal support for this phylogeny and branching events (figs. 6 and 7, supplementary fig. S3). The average *p*-distance between *L. l. sinense* and *L. l. lyra* for *COI* is 12.61%, and for *Cytb*, it is

9.86%, which is much lower than the average *p*-distances for the two mitochondrial genes between *Lyroderma* and *Megaderma* (both are higher than 17%; tables 5 and 6).

TABLE 5 Average *p*-distance within Megadermatidae based on *COI* sequences. Boldface value indicates the distance between *Lyroderma sinense* and *Lyroderma lyra*.

Taxa	1	2	3	4	5	6	7
1 <i>Lyroderma sinense</i>	–						
2 <i>Lyroderma lyra</i>	0.1261	–					
3 <i>Eudiscoderma thongareeae</i>	0.1715	0.2006	–				
4 <i>Megaderma spasma</i>	0.1886	0.1988	0.1692	–			
5 <i>Lavia frons</i>	0.1937	0.1968	0.1968	0.1914	–		
6 <i>Cardioderma cor</i>	0.1829	0.2032	0.1957	0.1857	0.1911	–	
7 <i>Macroderma gigas</i>	0.1818	0.1890	0.1864	0.1700	0.1830	0.1960	–

TABLE 6 Average *p*-distance genetic distance within Megadermatidae based on *cytb* sequences. Boldface value indicates the distance between *Lyroderma sinense* and *Lyroderma lyra*.

Taxa	1	2	3	4	5	6
1 <i>Lyroderma sinense</i>	–					
2 <i>Lyroderma lyra</i>	0.0986	–				
3 <i>Megaderma spasma</i>	0.1843	0.1796	–			
4 <i>Lavia frons</i>	0.1670	0.1683	0.1836	–		
5 <i>Cardioderma cor</i>	0.1711	0.1680	0.1603	0.1754	–	
6 <i>Macroderma gigas</i>	0.1671	0.1717	0.1718	0.1816	0.1693	–

Discussion

Although there have been variable amounts of overlap among all the measured craniodental characters, we observed significant differences between the two previously recognized subspecies of *L. lyra*. The results of the PCA of the nine craniodental measurements showed slight overlap between *L. l. sinense* and *L. l. lyra* males, whereas the results of the LDA showed no overlap in LD1 between male and female *L. l. sinense*, *L. l. lyra*, and *M. spasma*.

The morphological diversity of the mammalian baculum is subject to direct selection as a result of their role in copulation (Rakotondramanana & Goodman, 2017; Stockley, 2012), and the total length of the baculum of adult individuals is considered a diagnostic criterion for species characterization (Douangboubpha et al., 2010; Latorre, 2023; Soisook et al., 2015; Srinivasulu et al., 2020; Thomas, 1915; Vercillo & Ragni, 2011). The length of the baculum of a *Lyroderma* collected in Thailand was about 1 mm (Soisook

et al., 2015), whereas the bacular length of an Indian specimen was about 0.5 mm (Srinivasulu et al., 2020), which is similar to our results. The bacular differences among different genera of Megadermatidae are significant, which supports that bacular features play an important role in the classification of Megadermatidae (Soisook et al., 2015). The difference in baculum length between the two taxa, but the similarity in structure, supports the idea that *L. sinense* and *L. lyra* are two separate, but closely related species.

The phylogenetic reconstructions using *COI* and *cytb* gene sequences, consequently placed all *Lyroderma* samples into a single clade, sister to a clade containing all other genera. This result is consistent with other recent phylogenies and supports the validity of *Lyroderma* as a separate genus (Eick et al., 2005; Kanuch et al., 2015; Soisook et al., 2015).

Phylogenetic analyses also evidenced that *L. lyra* is divided into two independent clades, and the genetic distances between the *COI* and *cytb* gene fragments were more than 12% and nearly 10% between *L. lyra lyra* and *L. lyra sinense*, respectively. In line with the widely accepted view (Bradley & Baker, 2001) this magnitude of genetic distance is considered to indicate specific distinctiveness rather than subspecific status. The congruent results of the morphological, morphometric, and molecular analyses in the present study strongly support the view of Andersen and Wroughton (1907) that the genus *Lyroderma* consists of two species, *L. lyra* and *L. sinense*.

The critical evaluation of previous works, based on craniodental measurements and the structure of the interorbital region, helped us to clarify the taxonomic

status of the populations in Afghanistan and Pakistan where neither directly comparable museum specimens nor molecular data were available from. Shahbaz et al. (2020) reported the species from Jhelum, Punjab, Pakistan, and as it can be judged from the poor-quality photographs, on the bases of the shape of the interorbital region, anterior narial emargination and the interpterygoid region (fig. 1), the population is more likely to represent *L. lyra* (Shahbaz et al., 2020). Benda and Gaisler (2015) provided IOB measurements (the trait which proved to be a reliable distinguishing character between “*lyra*” and “*sinense*”, see fig. 1 and table 3) of three Afghani specimens (range 4.66–4.79 mm). Both above publications concur with the view of previous authors (Bates & Harrison, 1997; Corbet & Hill, 1992; Khajuria, 1980; Srinivasulu & Srinivasulu, 2012), that the westernmost populations of *Lyroderma* belongs to *L. lyra*.

The Myanmar specimens held in the collection of NHMUK (probably these are the same individuals as listed by Sinha) exceed the size limits of “*lyra*” given by Sinha (1980) (see the upper mensural extremes of *L. lyra* given in table 3), but the morphology of the interorbital region, narial emargination, and the interpterygoid region, indeed, clearly defines these specimens as *L. lyra* (fig. 1).

Conclusion

The present study is the first which included both former subspecies of *L. lyra* in a phylogenetic framework and used the widest geographic sampling of the taxon “*sinense*” so far. We have found significant

differences in cranial and dental measurements, and in the size of the bacula of the taxa “*lyra*” and “*sinense*”. These data were corroborated by multivariate statistical analyses (PCA and LDA) and by phylogenetic tree reconstructions based on mitochondrial markers. This integrative approach provides solid evidence that the two former subspecies represent separate species, *L. lyra* and *L. sinense*. Additionally, our results also supported that the westernmost and Myanmar populations of *Lyroderma* belongs to *L. lyra*. To sum up, *L. sinense* is distributed in southern China, Thailand, Laos, Vietnam, Cambodia, and Malaysia, whereas *L. lyra* occurs from Afghanistan to Myanmar (fig. 1). As the presence of *L. lyra* can be assumed in east Myanmar, future studies should involve the collection of more samples from that country and from the surrounding areas, to reveal the phylogenetic affinities of the Myanmar populations and to determine the precise distribution boundaries of the two species.

Acknowledgements

Li Xin and Li Xinyao are acknowledged for their invaluable suggestions on an earlier version of the manuscript. The preparation of the geographical distribution map was greatly enhanced by the contributions of Li Dianjun and Wang Zhiqiang. Dai Wentao and Shi Shengchao are thanked for their assistance in specimen collection. Furthermore, Liu Yingxun is appreciated for her help with morphometric analysis. Boris Krystufek (SNHM), Pipat Soisook (PSUZC), and Juliana Senawi (UKMMZ) kindly provided access to the specimens

under their care. We thank three anonymous reviewers for their valuable remarks.

Author contributions

Feng: conceptualization, methodology, formal analysis, writing – original draft, visualization; Győrössy: data curation, methodology, formal analysis, writing – review & editing; Portela Miquez: resources, writing – review & editing; Kokkini: resources, writing – review & editing; Görföl: writing – review and editing, supervision, funding acquisition; Ali Khan: resources, funding acquisition; Saikia: resources, writing – review and editing; Talmale: resources; Yu: resources; Liu: resources; Jiang: writing – review and editing, supervision, funding acquisition; Csorba: conceptualization, resources, writing – review and editing, supervision, funding acquisition.

Conflict of interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

Funding

This research received support from the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 32371562) and the Special Foundation for National Science and Technology Basic Research Program of China (2021FY100301) to TLJ; from the SYNTHESYS Project which is financed by the European Community Research Infrastructure Action under the FP7

“Capacities” Program and by the National Research, Development, and Innovation Fund of Hungary (NKFIH FK137778) to TG and GC.

Supplementary material

Supplementary material is available online at:

<https://doi.org/10.6084/m9.figshare.27718839>.

References

- Andersen, K. & Wroughton, R.C. (1907). On the bats of the family Megadermatidae. *Annals and Magazine of Natural History* 19: 129–145.
- American Society of Mammalogists (ASM) (2024) ASM Mammal Diversity Database, Version 1.13. Available at: <http://www.mam-maldiversity.org/index.html> (Accessed 20 September 2024).
- Bates, P.J.J. & Harrison, D.L. (1997). *Bats of the Indian Subcontinent*. Harrison Zoological Museum Publications, Sevenoaks, UK.
- Benda, P. & Gaisler, J. (2015). Bats (Mammalia: Chiroptera) of the Eastern Mediterranean and Middle East. Part 12. Bat fauna of Afghanistan: revision of distribution and taxonomy. *Acta Societatis Zoologicae Bohemicae* 79: 267–458.
- Bonfield, J.K., Smith, K.F. & Staden, R. (1995). A new DNA sequence assembly program. *Nucleic Acids Research* 23(24): 4992–4999.
- Bradle, R.D. & Baker, R.J. (2001). A test of the genetic species concept: Cytochrome-*b* Sequences and Mammals. *Journal of Mammalogy* 82(4): 960–973. <https://doi.org/10.1644/1545-15422>.
- Corbet, G.B. & Hill, J.E. (1991). *A World List of Mammalian Species*, 3rd edition. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Corbet, G.B. & Hill, J.E. (1992). *The Mammals of the Indomalayan Region: A Systematic Review*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Csorba, G. & Topál, G. (1994). First record and taxonomic status of *Megaderma lyra* from Vietnam (Mammalia, Chiroptera). *Annales Historico-Naturales Musei Nationalis Hungarici* 86: 125–132.
- Douangboubpha, B., Bumrungsri, S., Soisook, P., Satasook, C., Thomas, N.M. & Bates, P.J.J. (2010). A taxonomic review of the *Hipposideros bicolor* species complex and *H. pomona* (Chiroptera: Hipposideridae) in Thailand. *Acta Chiropterologica* 12(2): 415–438. <https://doi.org/10.3161/150811010X537990>.
- Eick, G.N., Jacobs, D.S. & Matthee, C.A. (2005). A nuclear DNA phylogenetic perspective on the evolution of echolocation and historical biogeography of extant bats (Chiroptera). *Molecular Biology and Evolution* 22(9): 1869–1886. <https://doi.org/10.1093/molbev/msi180>.
- Ellerman, J.R. & Morrison-Scott, T.C.S. (1951). *Checklist of Palaearctic and Indian Mammals 1758 to 1946*. British Museum, London, UK.
- Friley, C.E. (1947). Preparation and preservation of the baculum of mammals. *Journal of Mammalogy* 28(4): 395–397. <https://doi.org/10.2307/1375362>.
- Hassanin, A., Delsuc, F., Ropiquet, A., Hammer, C., Vuuren, B.J.V., Matthee, C.A., Ruiz-García, M., Catzeflis, F., Areskou, V., Nguyen, T. & Couloux, A. (2012). Pattern and timing of diversification of Cetartiodactyla (Mammalia, Laurasiatheria), as revealed by a comprehensive analysis of

- mitochondrial genomes. *Comptes Rendus – Biologies* 335(1): 32–50. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2011.11.002>.
- Ibáñez, C., García-Mударra, J.L., Ruedi, M., Stadelmann, B. & Juste, J. (2006). The Iberian contribution to cryptic diversity in European bats. *Acta Chiropterologica* 8(2): 277–297. [https://doi.org/10.3161/1733-5329\(2006\)8\[277:TICTCD\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.3161/1733-5329(2006)8[277:TICTCD]2.0.CO;2).
- Kanuch, P., Aghova, T., Meheretu, Y., Šumbera, R. & Bryja, J. (2015). New discoveries on the ecology and echolocation of the heart-nosed bat *Cardioderma cor* with a contribution to the phylogeny of Megadermatidae. *African Zoology* 50(1): 1–5. <https://doi.org/10.1080/15627020.2015.1021711>.
- Khajuria, H. (1980). Taxonomical and ecological studies on the bats of Jabalpur Dist. Madhya Pradesh, India (families Megadermatidae, Rhinolophidae and Vespertilionidae). *Rec. Zoological Survey of India Occ. Paper* 19: 1–69. Zoological Survey of India, New Alipore Kolkata, India.
- Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33(7): 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>.
- Latorre, D.V.D. (2023). Fossil bacula of five species of Borophaginae (Family: Canidae): Implications for their reproductive biology. *PLOS ONE* 18(1): e0280327. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0280327>.
- Lekagul, B. & McNeely, J.A. (1977). *Mammals of Thailand*. Sahakarnbbat, Bangkok, Thailand.
- Maskey, R., Fei, J. & Nguyen, H.-O. (2018). Use of exploratory factor analysis in maritime research. *The Asian Journal of Shipping and Logistics* 34(2): 91–111. <https://doi.org/10.1016/j.ajsl.2018.06.006>.
- Nachar, N. (2008). The Mann-Whitney U: A test for assessing whether two independent samples come from the same distribution. *Tutorials in Quantitative Methods for Psychology* 4(1): 13–20.
- Rakotondramanana, C.F. & Goodman, S.M. (2017). A review of the bacular morphology of Malagasy bats. *Acta Chiropterologica* 19(1): 51–70. <https://doi.org/10.3161/15081109ACC2017.19.1.004>.
- R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available at: <https://www.R-project.org/>.
- Sanborn, C.C. (1933). Bats from Szechwan and Kweichow, China. *Proceedings of the Biological Society of Washington* 46: 55–56.
- Shahbaz, M., Ullah, H., Khan, W., Javid, A., Attaullah, Rasheed, S.B., Anwar, K., Ullah, A., Zeb, J., Khan, M.I., Ahmad, Q.A., Khan, B.T., Khan, M., Ullah, I., Farooq, Z. & Hussain, A. (2020). Morphometrics of the Indian false vampire bat (*Megaderma lyra*) from district Jhelum, Pakistan. *Brazilian Journal of Biology* 81(4): 934–939. <https://doi.org/10.1590/1519-6984>.
- Simmons, N.B. (2005). Order Chiroptera. In: D. Wilson and D.M. Reeder (eds.) *Mammal Species of the World. A Taxonomic and Geographic Reference*, pp. 312–529. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD, USA.
- Simmons, N.B. & Cirranello, A.L. (2024). *Bat Species of the World: A Taxonomic and Geographic Database*. American Museum of Natural History, New York, NY, USA. Available at: <https://batnames.org/home.html>.
- Singh, D. & Sharma, D.K. (2023). New distribution record of the Greater False Vampire Bat (*Megaderma lyra*, Geoffroy 1810) from North-Western Himalaya. *Journal of Tropical*

- Life Science* 13(2): 377–382. <http://doi.org/10.11594/jtlls.13.02.16>.
- Sinha, Y.P. (1980). The bats of Rajasthan: taxonomy and zoogeography. *Records of the Zoological Survey of India* 76: 7–63. <https://doi.org/10.26515/rzsi/v76/i1-4/1980/161861>.
- Soisook, P., Prajakjitr, A., Karapan, S., Francis, C.M. & Bates, P.J.J. (2015). A new genus and species of false vampire (Chiroptera: Megadermatidae) from peninsular Thailand. *Zootaxa* 3931(4): 528–550. <http://doi.org/10.11646/zootaxa.3931.4.4>.
- Srinivasulu, B., Kaur, H., Shah, T., Gundena, D., Asad, G., Raman, S. & Srinivasulu, C. (2020). A review of the bacular morphology of some Indian bats (Mammalia: Chiroptera). *Journal of Threatened Taxa* 12(9): 15985–16005. <https://doi.org/10.11609/jott.5650.12.9.15985-16005>.
- Srinivasulu, C. & Srinivasulu, B. (2012). *South Asian Mammals: Their Diversity, Distribution, and Status*. Springer, Berlin, Germany.
- Stockley, P. (2012). The baculum. *Current Biology* 22(24): R1032–R1033.
- Thomas, O. (1915). The penis-bone, or baculum, as a guide to the classification of certain squirrels. *Annals and Magazine of Natural History* 8(15): 383–387.
- Vercillo, F. & Ragni, B. (2011). Morphometric discrimination between *Martes martes* and *Martes foina* in Italy: The use of the baculum. *Hystrix* 22(2): 325–331. <https://doi.org/10.4404/hystrix-22.2-4669>.
- Volleth, M., Müller, S., Heller, K.-G., Trifonov, V., Liehr, T., Yong, H.-S., Baker, R.J., Khan, F.A.A. & Sotero-Caio, C.G. (2021). Cytogenetic analyses detect cryptic diversity in *Megaderma spasma* from Malaysia. *Acta Chiropterologica* 23(2): 271–284. <https://doi.org/10.3161/15081109ACC2021.23.2.001>.
- Wei, F. (2023). *Taxonomy and Distribution of Mammals in China*. Science Press, Beijing, China.
- Weyeneth, N., Goodman, S.M., Stanley, W.T. & Ruedi, M. (2008). The biogeography of *Miniopterus* bats (Chiroptera: Miniopteridae) from the Comoro Archipelago inferred from mitochondrial DNA. *Molecular Ecology* 17(24): 5205–5219. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03994.x>.
- Wilson, D.E. & Mittermeier, R.A. (2019). *Handbook of the Mammals of the World (Volume 9): Bats*. Lynx Edicions, Barcelona, Spain.
- Wilson, D.E. & Reeder, D.M. (2005). *Mammal Species of the World*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD, USA.
- Wu, Y. & Harada, M. (2006). Karyology of seven species of bats (Mammalia: Chiroptera) from Guangdong, China. *Acta Theriologica Sinica* 26(4): 403–406.



The grey zone of taxonomy—The case of the Sikkim *Myotis* (Chiroptera: Vespertilionidae: *Myotis sicarius*), first recorded from Southeast Asia

Dorottya Győrössy^{1,2}, Vuong Tan Tu^{3,4}, Gábor Csorba¹, Sanjan Thapa^{5,6}, Péter Estók⁷, Gábor Földvári^{8,9}, Tamás Görföl^{1,8,10}

1 Department of Zoology, Hungarian Natural History Museum, Budapest, Hungary

2 Hungarian University of Agriculture and Life Sciences, Gödöllő, Hungary

3 Institute of Ecology and Biological Resources, Vietnam Academy of Science and Technology, Hanoi, Vietnam

4 Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology, Hanoi, Vietnam

5 Key Laboratory of Conservation and Application in Biodiversity of South China, School of Life Sciences, Guangzhou University, Guangzhou, China

6 Small Mammals Conservation and Research Foundation, Kathmandu, Nepal

7 Department of Zoology, Eszterházy Károly Catholic University, Eger, Hungary

8 Institute of Evolution, HUN-REN Centre for Ecological Research, Budapest, Hungary

9 Centre for Eco-Epidemiology, National Laboratory for Health Security, Budapest, Hungary

10 National Laboratory of Virology, Szentágotthai Research Centre, University of Pécs, Pécs, Hungary

<https://zoobank.org/282B1B89-0910-4205-95CA-27B8D6977260>

Corresponding author: Gábor Csorba (csorba.gabor@nhmus.hu)

Academic editor Clara Stefen | Received 25 July 2024 | Accepted 28 November 2024 | Published 17 December 2024

Citation: Győrössy D, Tu VT, Csorba G, Thapa S, Estók P, Földvári G, Görföl T (2024) The grey zone of taxonomy—The case of the Sikkim *Myotis* (Chiroptera: Vespertilionidae: *Myotis sicarius*), first recorded from Southeast Asia. *Vertebrate Zoology* 74 737–749. <https://doi.org/10.3897/vz.74.e127269>

Abstract

In taxonomic works, the weight to be given to morphological, mitochondrial, or nuclear signals, and the assessment of differences as species or subspecies distinctions has also varied considerably over the past decades and is largely a subjective research decision. This apparent example of the “grey zone of taxonomy” underpins the need of critical studies of as many specimens as possible and of using both mitochondrial and nuclear genes in taxonomic-systematic studies, as phylogeny based on uniparentally inherited genes alone may not represent true evolutionary scenarios. *Myotis sicarius*, a species occurring thorough the Himalayan foothills was found for the first time out of South Asia, in North Vietnam. Analysis of topotypical and Vietnamese specimens revealed high mitochondrial heterogeneity – at the upper limit of the usual threshold of intraspecific difference – but only minute nuclear sequence and negligible morphological differences. Albeit the large geographic distance between the two records might suggest the existence of two putative reproductively isolated taxonomic units, based on the incongruent results we concluded that the split of geographic populations of *M. sicarius* into different taxa is unsupported. As a morphologically closely resembling species, we also reviewed the taxonomic status of the two morphological forms of *M. annectans* and synonymizing *M. primula* with *M. annectans* was also corroborated by our phylogenetic analyses.

Keywords

Area expansion, bats, mito-nuclear discordance, multilocus phylogeny, Vietnam

Introduction

In the era of genetics, molecular data are more commonly used in studies on taxonomy and phylogeny, particularly for interpreting relationships among closely related taxa. In most of these studies, mitochondrial genes have usually been chosen because of their suitable characteristics i.e., maternal inheritance, lack of recombination, haploid status, high mutational rate, and easier recoverability from degraded samples (Hebert et al. 2003; Antil et al. 2023; Elyasiyorji et al. 2023). However, owing to their maternal inheritance, phylogenetic reconstructions based on mitochondrial signals may be inconsistent with the true evolutionary scenarios due to biological processes e.g., mitochondrial introgression, sex-biased dispersal (Castella et al. 2008; Flanders et al. 2009; Vallo et al. 2013; Andriollo et al. 2015; Platt et al. 2017) or misleading due to NUMTs (Nuclear mitochondrial DNA segments; Shaw 2002; Song et al. 2008). Hence, taxonomic inference based on mtDNA markers of certain taxa of interest need to be confirmed by additional phenetic analyses of morphological traits and/or nuclear gene (nuDNA) sequences (e.g., Tu et al. 2017, 2018; Hassanin et al. 2018; Petzold and Hassanin 2020). As the coalescence time of nuclear markers on average are several times longer than that of the uniparental markers (mtDNA), the use of nuDNA genes for delimitating species boundaries among recently diverged taxa (such as incipient species) and/or within-species lineages (subspecies) is also confounded with low genetic variation and/or incomplete lineage sorting of ancestrally polymorphic alleles (e.g., Hassanin et al. 2018). Nevertheless, the weight to be given to morphological, mitochondrial, or nuclear signals, and the assess-

ment of differences as species or subspecies distinctions (or other operational taxonomic units) has also varied considerably over the past decades and is largely a subjective research decision (Zachos 2018). This “grey zone of taxonomy” underpins the need of critical studies of as many specimens as possible and of using integrated taxonomic approaches.

During the systematic exploration of Southeast Asian bats, a specimen of *Myotis* was captured in Xuan Lien Nature Reserve (Vietnam), near the Lao border which was morphologically identifiable as *M. sicarius*, a species that was previously known only from a handful of records in montane forests on hill sides and in valleys from Nepal and India, South Asia (Bates and Harrison 1997; Srinivasulu and Srinivasulu 2019) (Fig. 1). Given the biogeographic barriers to dispersal and the possibly of limited gene flow between bats from the two known sampling sites in a distance of over 1700 km, further investigation is required to confirm the validity of the morphology-based species identification of the newly collected Vietnamese specimen and to explore its phylogenetic relationship with Indian and Nepalese congeners (Slatkin 1985; Avise 2000; Castella et al. 2008).

Morphologically, *M. sicarius* closely resembles species of the *montivagus*-complex, especially *M. indochinensis* and *M. annectans* (Son et al. 2013). By contrast, a previous phylogenetic study based on *cyt b* and *Rag2* genes found that this species forms a clade with *M. frater*, *M. bechsteini* and *M. daubentonii*, and is only distantly related to the *montivagus*-complex (Ruedi et al. 2013). Such incongruences between morphology and molecular phylogeny of *Myotis* species are relatively common, suggesting that this genus contains potential high cryptic (i.e., different species subsumed in one) and pseudocryp-

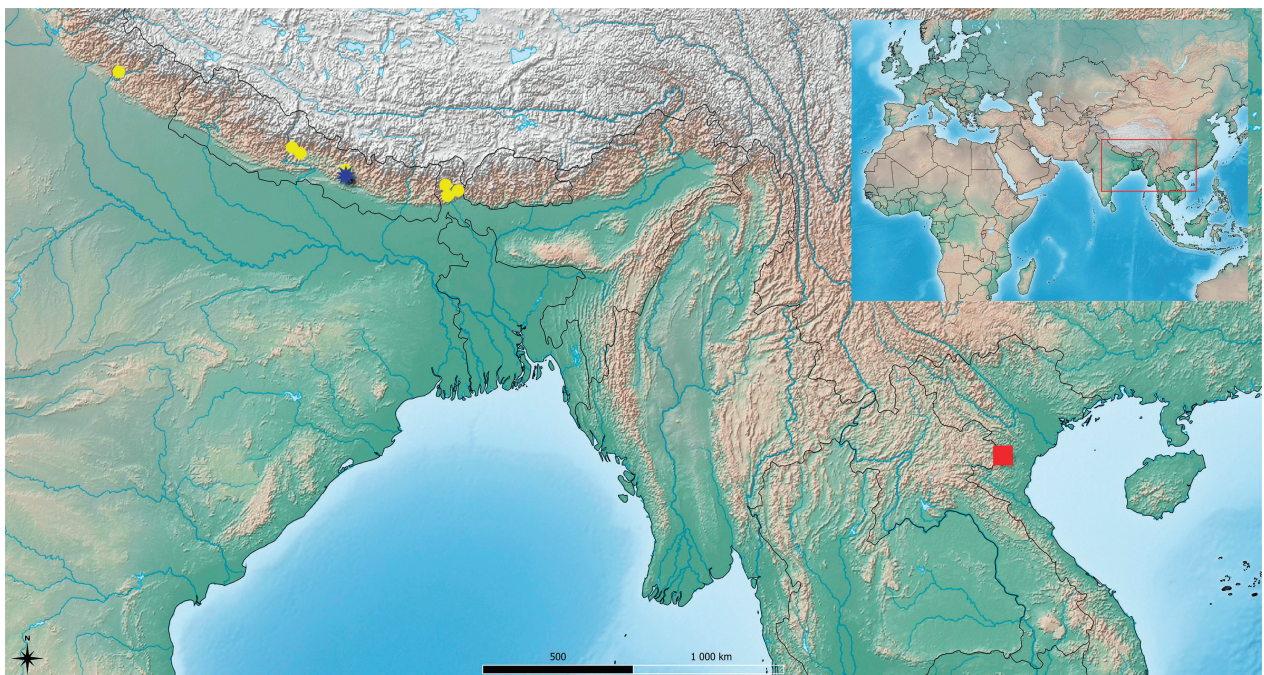


Figure 1. Known occurrences of *Myotis sicarius*. Yellow dots: former occurrences, blue star: new Nepalese records (CDZTU B4–B6), red square: new Vietnamese record (IEBR VN14-0252). The basemap from Natural Earth is used for better visualization only and does not indicate any territorial claims.

tic (i.e., individuals of a single species were misidentified into different sister ones) diversity and that further comprehensive studies using integrated analyses of multiple datasets (morphology, molecular and/or acoustic data) are required to confirm the taxonomic status of certain formerly recognized morphological species (Ruedi et al. 2015, 2021; Novaes et al. 2022; Kruskop et al. 2023).

An example of the above taxonomic issues can be found in a recent study of Chakravarty et al. (2020) who identified three *Myotis* bats – released on the spot – from Uttarakhand, India as *M. cf. annectans* on the bases of their forearm length (46.1–46.4 mm) following the keys published in previous studies (Görföl et al. 2013; Son et al. 2013). Nevertheless, one of these individuals' COI sequence appeared to be only distantly related to all other bats assigned to *M. annectans* collected from Southeast Asia suggesting that it may represent another species (Chakravarty et al. 2020). This external morphological confusion warranted the further investigation of the taxon *annectans* described originally in the genus *Pipistrellus* due to its missing middle upper premolar. *Myotis annectans* now includes *M. primula* as a junior synonym, the type specimen of which morphologically differs only by the presence of a middle upper premolar (Topál 1970). To elucidate the systematic position of the Vietnamese *M. sicarius*, the relationship between this species and *M. annectans*, and the intraspecific variations in the dental formula of the latter, we studied new material from Nepal and Vietnam using both mitochondrial and nuclear markers completed with morphological comparisons.

Methods

Collection acronyms

BNHS – Bombay Natural History Society, Mumbai, India; **CDZTU** – Central Department of Zoology, Tribhuvan University, Kathmandu, Nepal; **EBD** – Estación Biológica de Doñana, Sevilla, Spain; **FMNH** – Field Museum of Natural History, Chicago, USA; **GJ** – Gareth Jones field number; **GZHU** – Guangzhou University, Guangzhou, China; **HNHM** – Hungarian Natural History Museum, Budapest, Hungary; **HZM** – Harrison Institute, Sevenoaks, UK; **IEBR** – Institute of Ecology and Biological Resources, Vietnam Academy of Science and Technology, Hanoi, Vietnam; **KK** – Kuniko Kawai personal collection; **KM** – Kishio Maeda personal collection; **MHNG** – Muséum d'histoire naturelle de Genève, Geneva, Switzerland; **M** or **MR** – Manuel Ruedi field collection; **NHMUK** – Natural History Museum, London, UK; **NMP** – National Museum Prague, Prague, Czech Republic; **ROM** – Royal Ontario Museum, Toronto, Canada; **SMF** – Senckenberg Museum of Frankfurt, Frankfurt, Germany; **TiK** – Tigga Kingston field number; **UKM** – Universiti Kebangsaan Malaysia, Bangi, Malaysia; **ZMMU** – Zoological Museum of Moscow State University, Moscow, Russia.

Sample collection

Bats were captured and handled in the field with methods conforming to the guidelines approved by the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research and education (Sikes 2016). Mist-nets were erected before dusk and were regularly checked at least for four hours. Individuals representing different morphological forms that could not be identified to species level in the field were taken as vouchers. Tissue samples (pectoral muscles of voucher specimens or wing punches of released individuals) were also collected and preserved in 99% ethanol.

Three *M. sicarius* were caught in Nepal, Kathmandu, Bajrabarahi Religious Forest, 1485 m a.s.l., 27°36.0'N, 85°19.2'E, on 30 August 2016 by Sanjan Thapa and Gábor Csorba. All individuals were released after careful examination and taking a wing punch sample (samples registered under the numbers CDZTU B4–B6).

In Vietnam, a single specimen of the same species was collected in Vin village, Xuan Lien National Reserve, Thanh Hoa Province (19°59.28'N, 104°58.62'E, 717 m a.s.l.), near the border with Laos, on 17 October 2014 by Tamás Görföl, Vuong Tan Tu and Péter Estók. The specimen was taken as a voucher for further examination (IEBR VN14-0252).

Comparative material

Myotis annectans: CAMBODIA: HNHM 2005.82.8., sex unknown, Keo Seima Wildlife Sanctuary; HZM 1.32758, ♂, Cardamom Mts.; INDIA: NHMUK 1816.3.25.30 (*primula* holotype), ♂, Pashok, Darjeeling; NHMUK 1920.7.27.2, ♂, Teesta Valley; NHMUK 1920.7.27.3, ♀, Teesta Valley; THAILAND: NHMUK 1978.2355, ♀, Chiang Ma; VIETNAM: HNHM 24987, ♂, Xuan Lien Nature Reserve; HNHM 26056, ♂, Mu Cang Chai Nature Reserve; HNHM 2008.23.10., ♂, Pu Huong Nature Reserve.

Myotis sicarius: INDIA: NHMUK 1891.10.7.56 (holotype), sex unknown, Sikkim; FMNH 35419, ♂, Sikkim; FMNH 35424, sex unknown, Sikkim; NEPAL: BNHS 3783, ♀, Bans Bahari; BNHS 3784, ♂, Bans Bahari; CDZTU B4, ♀, Lalitpur; CDZTU B5, ♀, Lalitpur; CDZTU B6, ♀, Lalitpur; CDZTU BAT24, ♀, Lalitpur; CDZTU BAT25, ♀, Lalitpur; HZM 1.16284, ♂, Godawari; NHMUK 1923.1.9.4, ♀, Bans Bahari; NHMUK 1923.1.9.5, ♀, Bans Bahari; ZMMU 164493, ♀, Sudame; ZMMU 164494, ♀, Sudame; ZMMU 164495, ♂, Sudame; ZSI 17429, ♀, Bans Bahari; VIETNAM: IEBR VN14-0252, ♂, Xuan Lien Nature Reserve.

Myotis indochinensis: Vietnam: IEBR M-839-2 (holotype) ♀, A Luoi; HNHM 24210 (paratype) ♀, A Luoi.

Measurements and morphometrics

External measurements were taken from live animals (forearm of released bats) or fluid-preserved vouchers to

Table 1. The PCR conditions for amplifying target genes.

Gene	Initial denaturation	Cycles (denaturation / annealing / extension)	Final extension	Reference
cyt <i>b</i>	3 min at 94°C	40 cycles (45 sec at 94°C / 45 sec at 50->45°C (touchdown) / 1.5 min at 72°C)	5 min at 72°C	based on Weyeneth et al. (2008)
COI	1 min at 94°C	5 cycles (30 sec at 94°C / 40 sec at 50°C / 1 min at 72°C), followed by 35 cycles (30 sec at 94°C / 40 sec at 55°C / 1 min at 72°C)	10 min at 72°C	De Pasquale and Galimberti (2014)
Rag2	3 min at 94°C	39 cycles (45 sec at 94°C, 45 sec at 60°C and 1.5 min at 72°C)	5 min at 72°C	Stadelmann et al. (2007)
ABHD11 & THY	2 min at 94°C	2-2 cycles (15 sec at 95°C / 30 sec at 65, 63, 61, 59, and 57°C (touchdown) / 1 min at 72°C), followed by 30 cycles (15 sec at 95°C / 30 sec at 55°C / 1 min at 72°C)	5 min at 72°C	Dool et al. (2016)
PRKC1	3 min at 94°C	39 cycles (30 sec at 94°C / 1.5 min at 53°C / 1 min at 72°C)	10 min at 72°C	Eick et al. (2005)

the nearest 0.1 mm, and craniodental measurements to 0.01 mm using digital callipers. Measurements include only those taken from fully-grown individuals, as indicated by the presence of fully ossified metacarpal-phalangeal joints. Means and standard deviations were calculated with R v. 4.2.1 (R Core Team 2018).

Abbreviations and definitions for external and craniodental measurements include **FA**: forearm length – from the extremity of the elbow to the extremity of the carpus with the wings folded; **TAIL**: tail length – from the base to the tip of the tail; **EAR**: ear length – from the lower border of the external auditory meatus where it joins with the body to the tip of the pinna; **TIB**: tibia length – from the knee joint to the ankle; **HF**: hind foot – from the tip of the longest digit, excluding the claw, to the extremity of the heel, behind the os calcis; **GTL**: greatest length of skull – from the front of the 1st upper incisor to the most projecting point of the occipital region; **CCL**: condylo-canine length – from the exoccipital condyle to the most anterior part of the canine; **C¹C¹W**: width across the upper canines – greatest width across the outer borders of the upper canines; **M³M³W**: width across the upper molars – greatest width across the outer crowns of the last upper molars; **IOW**: interorbital width – least width of the interorbital constriction; **ZYW**: zygomatic width – greatest width of the skull across the zygomatic arches; **MAW**: mastoid width – greatest distance across the mastoid region; **BCW**: braincase width – greatest width of the braincase; **BCH**: braincase height – from the basisphenoid at the level of the hamular processes to the highest part of the skull, including the sagittal crest (if present); **AOB**: anteorbital width – the distance by which the anteorbital foramen is separated from orbit, measured from the foramen infraorbitale to the foramen lachrymale; **CM³L**: maxillary toothrow length – from the front of the upper canine to the back of the crown of the third molar; **CP⁴L**: upper canine–premolar length – from the front of the upper canine to the back of the crown of the last premolar; **MANL**: mandible length – from the anterior rim of the alveolus of the 1st lower incisor to the most posterior part of the condyle; **CM₃L**: mandibular toothrow length – from the front of the lower canine to the back of the crown of the 3rd lower molar; **CP₄L**: lower canine–premolar length – from the front of the lower

canine to the back of the crown of the last premolar; and **CPH**: least height of the coronoid process – from the tip of the coronoid process to the apex of the indentation on the inferior surface of the ramus adjacent to the angular process. Absolute crown height was used in all height comparisons for individual teeth (e.g., C¹ versus P⁴).

Molecular phylogenetics

Total genomic DNA was extracted with DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Germany) according to the instructions of the manufacturer. Considering the discrepancy in the available genetic sequences of Asiatic *Myotis* spp. deposited in GenBank by previous studies, in the first phase, we sequenced three commonly used genes from both mitochondrial (cyt *b*, 1140 bp and COI, 657 bp) and nuclear (Rag2, 1148 bp) genomes of selected specimens to reconstruct their phylogenetic relationships and to explore the congruence between gene trees. The primers used for PCR amplification of these three genes were Molcit-F/Cytb-H (Ibáñez et al. 2006; Weyeneth et al. 2008), VF1d/VR1d (Ivanova et al. 2006), and 179F/1458R (Stadelmann et al. 2007), respectively. Then, in the second phase, three additional nuDNA genes were used to ascertain the genetic signals obtained from the mtDNA and Rag2 phylogenies of our specimens of interest: Thyrotropin (THY), Protein kinase C iota (PRKC1), and Abhydrolase domain containing 11 (ABHD11). The respective primers used for PCR amplification of these three genes were THY_F/THY_R, BatPKa_F/BatPKa_R (Eick et al. 2005), and ABHD11-F1/ABHD11-R1 (Salicini et al. 2011).

PCR reactions were performed in 50 µl using 1 µl (ca. 20 ng) of genomic DNA, 1-1 µl of the primers (10 mM), 40.25 µl of nuclease-free water, 1.5 µl of dNTP, 5 µl of DreamTaq Green Buffer (Thermo Scientific, USA) and 0.25 µl of DreamTaq DNA Polymerase (Thermo Scientific, USA). The PCR conditions are summarized in the Table 1.

Sequencings were done with the PCR primers in the Molecular Taxonomy Laboratory of the Hungarian Natural History Museum, Budapest, Hungary; at MacroGen Europe, Maastricht, The Netherlands; and, in case of the Nepalese sample, in the Center for Molecular Dynamics Nepal, Kathmandu, Nepal. The newly generated sequenc-

es were deposited in GenBank under accession numbers, OR413179–OR413180 and OR413539–OR413554; additional sequences of related species used in the phylogenetic reconstructions were downloaded from GenBank (File S1 and Table S1).

The *cyt b*, *Rag2*, and COI sequences were aligned with related taxa of *Myotis* as well as with *Kerivoula*, *Murina*, and *Harpiocephalus* as outgroups (Ruedi and Mayer 2001; Kawai et al. 2003; Stadelmann et al. 2004a, 2004b, 2007; Jones et al. 2006; Lack et al. 2010; Ruedi et al. 2012, 2013; Wang et al. 2017; and see File S1 and Table S1) with MAFFT v. 7.505 (Katoh and Standley 2013). Separate trees (*cyt b*, *Rag2* and COI) were generated using Bayesian inference method (BI) with MrBayes v. 3.2.7a (Ronquist and Huelsenbeck 2003). It was run for 10 million generations and sampled every 1000th generation. Model parameters (HKY+I+G and GTR+I+G in case of *cyt b* and *Rag2*, COI dataset, respectively) was de-

termined with MrModeltest2 v. 2.4 (Nylander 2004). Ten percent of the generations were treated as burn-in and discarded. Posterior probabilities were calculated from the consensus of the remaining trees. Trees were visualized with iTOL v. 3 (Letunic and Bork 2016). Pairwise distances were calculated using Kimura 2-parameter model (Kimura 1980) in MEGA X v. 10.2.6 (Kumar et al. 2018).

Results

Morphology

The combination of the external traits mentioned below are typical of the species, and are essentially similar in the three Nepalese (CDZTU B4–B6), the Vietnamese (IEBR

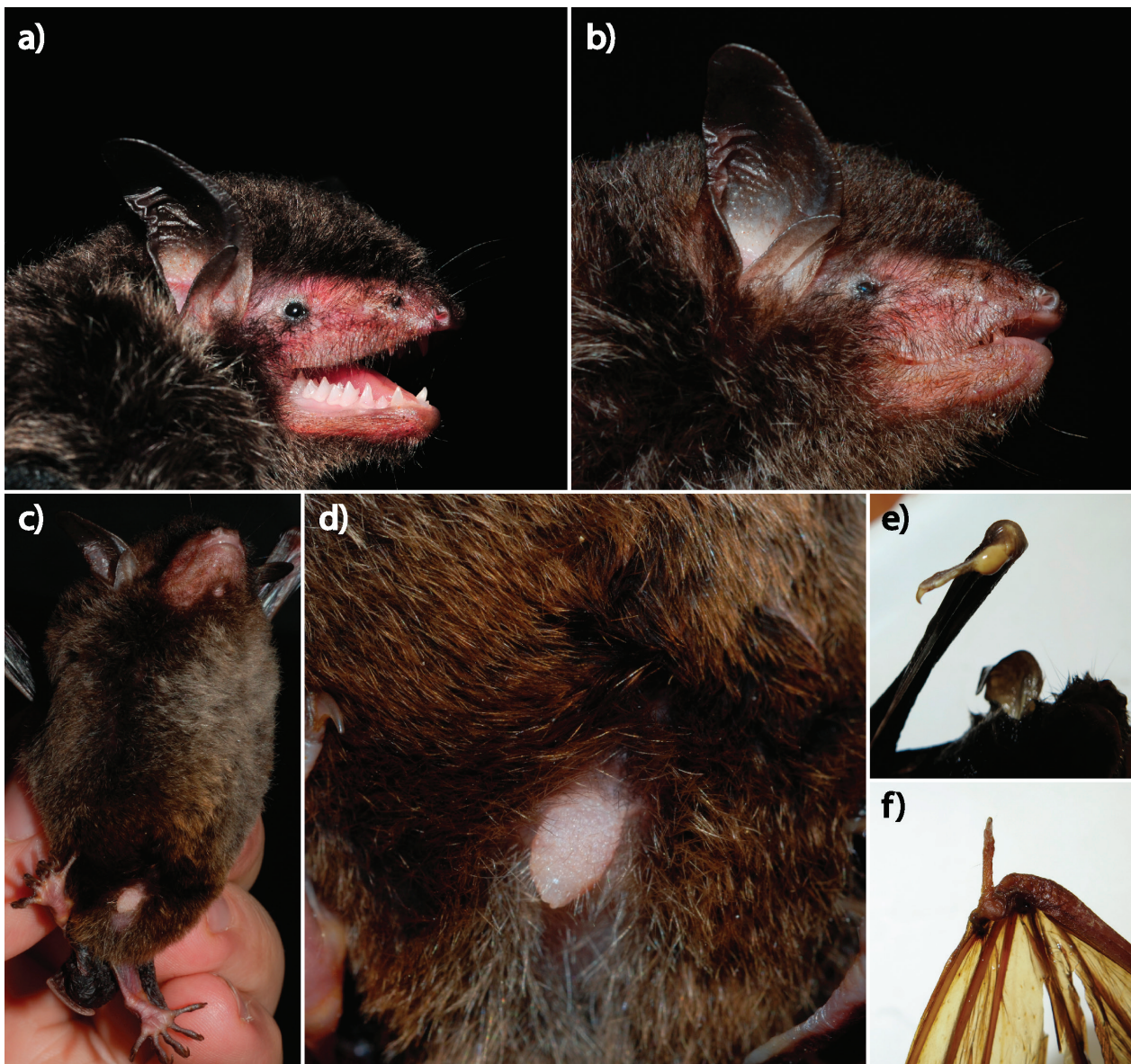


Figure 2. External traits of *M. sicarius*. **a** portrait of female CDZTU B4 bat from Nepal; **b** portrait; **c** ventral aspect; **d** genital region (note the reddish-chestnut fur on the belly); **e** thumb of the male IEBR VN14-0252 specimen from Vietnam; **f** thumb of holotype (NHMUK 1891.10.7.56).

VN14-0252) specimens, and the fluid-preserved holotype of *M. sicarius* (NHMUK 1891.10.7.56): ears reach the tip of the nostrils when laid forward; tragus with a well-developed basal lobe, and reaches almost half the length of the pinna; wing attaches at the base of the first toe; calcar extends to the half of the free edge of uropatagium, with a small, but visible “notch” at the end; the fur on the dorsum is uniform dark brown; crown hairs are with whitish tips; ventral surface of the fur is dark brown (as on the dorsum) basally, but tips lighter whitish brown; and conspicuous reddish-chestnut brown coloration can be observed on the belly. The only notable exception is that the Vietnamese specimen had a developed whitish “pad” at the thumb (Fig. 2).

Compared to other closely related *Myotis* species, the skull of *M. sicarius* is massive with a long rostrum; cranial profile flattened, the depression between the rostrum and braincase is shallow. Zygomas are strong, the sagittal crest is pronounced; anteorbital bridge is moderate to

relatively wide (Fig. 3). Upper incisors are bicuspid. The inner upper incisor (I^2) has the same height as the outer upper incisor (I^3) which exceeds the secondary cusp of I^2 . Upper canine (C^1) heavy and is higher than the third upper premolar (P^4). There is a definite gap between I^3 and C^1 . Middle upper premolar (P^3) minute, not visible when viewed laterally, totally intruded from the toothrow. Basal dimension of the anterior upper premolar (P^2) is one-fifth of P^4 and is approximately fourth the size of P^3 . First and second lower incisors (I_1 and I_2) with four lobes. Lower canine (C_1) about as high as third lower premolar (P_4). First lower premolar (P_2) about half the height of the corresponding canine and last premolar. Middle lower premolar (P_3) small, only slightly intruded from the toothrow, visible laterally; P_2 and P_4 are not in contact.

The (damaged) skull and dentition of the holotype (not figured) and a Nepalese specimen (NHMUK 1923.1.9.4) agrees well in all important details with the skull of the specimen collected in Vietnam (Fig. 3).

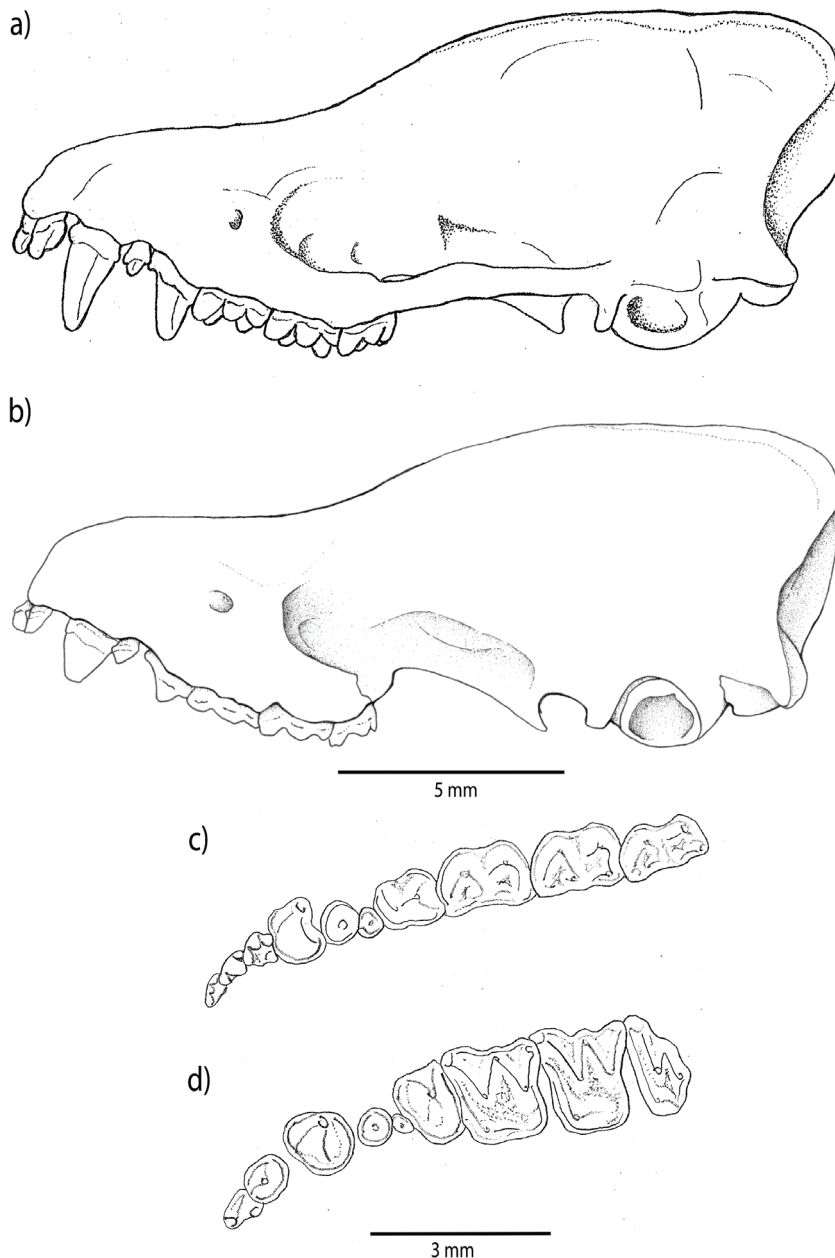


Figure 3. Lateral view of skulls of *M. sicarius*. **a** IEBR VN14-0252 from Vietnam; **b** NHMUK 1923.1.9.4 from Nepal; **c** occlusal view upper toothrow; **d** lower toothrow of *M. sicarius* IEBR VN14-0252 from Vietnam. Upper scale 5 mm, lower scale 3 mm.

Table 2. Selected external and craniodental measurements (in mm) of *Myotis sicarius* specimens. Values are given as mean±SD; min-max (n).

	<i>M. sicarius</i> (Himalayas)	<i>M. sicarius</i> (Vietnam)
FA	49.36±2.07; 46.1–54.5 (18)	49.7
TAIL		42.9
EAR		17.9
TIB	21.07±0.81; 20.6–22 (3)	21.7
HF	9.63±0.99; 8.5–10.8 (4)	9.7
GTL	18.84±0.18; 18.68–19.02 (4)	18.92
CCL	16.59±0.38; 16.19–17 (5)	16.37
C ¹ C ¹ W	5.12±0.18; 4.89–5.50 (10)	5.21
M ¹ M ¹ W	7.9±0.21; 7.59–8.20 (10)	7.97
IOW	4.47±0.22; 4.10–4.70 (9)	4.24
ZYW	12.03±0.27; 11.70–12.30 (5)	11.95
MAW	9.13±0.24; 8.80–9.50 (7)	9.00
BCW	8.19±0.16; 8.01–8.34 (4)	8.18
BCH	6.37±0.19; 6.14–6.60 (4)	6.16
AOB	1.05±0.13; 0.90–1.23 (7)	0.74
CM ³ L	7.38±0.16; 7.18–7.66 (11)	7.54
CP ¹ L	3.59±0.12; 3.45–3.76 (7)	3.53
MANL	14.1±0.32; 13.60–14.69 (10)	14.61
CM ₃ L	7.91±0.31; 7.20–8.40 (11)	8.16
CP ₄ L	3.15±0.16; 3.05–3.33 (3)	3.32
CPH	4.73±0.17; 4.52–5.01 (6)	4.60

The external and craniodental dimensions of the bats from the Himalayas and the new specimen from Vietnam are concordant, with no substantial differences found except the narrower AOB of the latter (Table 2).

Molecular phylogenetics

Consistent with the morphology-based species identification, our phylogenetic analyses using *cyt b* and COI sequences (Figs 4 and S1) indicated that the new material of *M. sicarius* collected from Nepal and Vietnam, and the Nepalese and Indian conspecifics found by previous authors (e.g., Stadelmann et al. 2004b; Chakravarty et al. 2020) group into a well-supported monophyletic lineage (PP=1), which mostly clusters with *M. longicaudatus kaguyae*, *M. bechsteini*, *M. frater*, and *M. daubentonii*, and is only distantly related to *M. annectans*. Within *M. sicarius*, both analyses showed that Nepalese bats have low intraspecific variation (Kimura's two-parameter, K2P distance ≤0.53%) but they differ from the Vietnamese specimen by 8.30–9.78% K2P distances (Tables 3 and S1). Within *M. annectans*, three examined specimens including two from Vietnam (HNHM 26056 and HNHM 24987, with and without the middle upper premolar, respectively), constituted a clade with very low genetic divergences (K2P≤0.6%) (Fig. 4; Table 3).

In relation to results obtained from mtDNA markers, our Rag2 sequence analysis revealed a similarly distant interrelationship between *M. sicarius* and *M. annectans* (Fig. 5). Bats of these two taxa differed from each other by a K2P distance of ca. 1% which is regarded as a po-

tential minimum interspecific distance between accepted species of the genus (Ruedi et al. 2013; Table 4). Within *M. annectans* low genetic divergence was observed (K2P distances ≤0.44%, Table 4), whereas within *M. sicarius*, Nepalese and Vietnamese bats exhibited very low genetic divergence (0.088% K2P distance, Table 4) with only a few heterozygous or transitional positions. Such low genetic divergence was also recovered in the pairwise comparisons of the nucleotide sequences in three other nuclear genes (ABHD11, PRKC1 and THY) of the two newly sequenced *M. sicarius* specimens.

Discussion

Taxonomic decisions in grey areas: The case of *Myotis sicarius*

Comprehensive studies suggested that the levels of mitochondrial sequence divergence below 2% may reflect intraspecific variation, whereas over 10% is indicating the presence of separate species (Bradley and Baker 2001). Between these (soft) limits are the grey-area cases where careful examinations of additional data (nuclear gene sequences, morphology, morphometrics, sound analysis, ecological information) are required to validate taxonomic decisions to split groups of organisms into separate species or to lump them together into a single taxon (Roux et al. 2016; Zachos 2018).

In the case of *M. sicarius*, the relatively high (8–10%) divergences in mtDNA sequences amongst Nepalese and Vietnamese samples are comparable with the variations found between several traditionally accepted and phylogenetically sister species of *Myotis*, i.e., *Myotis fimbriatus* vs. *M. pilosus*, *M. hasseltii* vs. *M. macrotarsus*, *M. emarginatus* vs. *M. formosus*, *M. alticranii* vs. *M. annamiticus*, and *M. punicus* vs. *M. myotis* (Ruedi et al. 2013; our own data).

The large geographic distance (which limit their gene flow, even if bats can be strong dispersers) between these samples suggests the existence of two putative reproductively isolated taxonomic units; however, the nuclear gene sequence data and the morphological results are incongruent with this taxonomic inference. In fact, the lack of or low genetic variation in nuDNA markers are attributable to the slower rate of evolution of the nuclear genome (Allio et al. 2017), and speciation is not always accompanied by morphological change, as it was confirmed in the *Myotis ater* complex (Kruskop et al. 2023), *Aselliscus* (Tu et al. 2015), *Tylonycteris* (Tu et al. 2017), or *Kerivoula hardwickii*-complex (Kuo et al. 2017; Tu et al. 2018). Nevertheless, the observed genetic structure of *M. sicarius* might be explained by sex-biased gene flow with female philopatry and male dispersal (Funk and Omland 2003). This inference is consistent with previous ecological studies of females of many bat species, especially in case of *Myotis* which are philopatric to their nursery roosts and to their swarming sites (Rivers et al.

Table 3. Estimates of evolutionary divergence between *cyt b* sequences (in %).

N	Species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	<i>Myotis sicarius</i> IEBR VN14-0252 Vietnam														
2	<i>Myotis sicarius</i> CDZTU B4 Nepal	9.78													
3	AJ841951 <i>Myotis sicarius</i> Nepal	9.59	0.53												
4	AF376847 <i>Myotis daubentonii</i>	19.28	20.33	19.47											
5	AF376843 <i>Myotis bechsteinii</i>	18.02	18.78	17.95	13.84										
6	KF312534 <i>Myotis frater</i>	20.53	19.64	18.77	15.66	16.91									
7	AB106593 <i>Myotis longicaudatus kaguyae</i>	18.22	16.05	15.55	13.91	15.19	15.47								
8	KF312533 <i>Myotis secundus</i>	19.42	20.77	19.99	19.91	22.20	20.23	16.89							
9	<i>Myotis indochinensis</i> GZHU15186	20.30	20.66	19.90	20.14	20.55	20.04	19.35	18.10						
10	KF312522 <i>Myotis cf. montivagus</i>	21.88	20.14	19.71	20.05	21.53	22.51	19.42	17.53	12.33					
11	AB106609 <i>Myotis gracilis</i>	21.85	23.47	23.18	21.23	22.20	21.68	21.28	22.51	23.42	21.43				
12	<i>Myotis annectans</i> HNHM 24987 Vietnam	26.01	25.13	24.72	24.43	24.07	26.73	25.24	25.28	21.33	21.81	25.13			
13	<i>Myotis annectans</i> HNHM 26056 Vietnam	26.40	25.50	25.10	24.80	24.44	27.13	25.62	25.66	21.67	22.16	25.50	0.18		
14	AJ841956 <i>Myotis annectans</i>	26.40	25.50	25.10	24.61	24.44	27.13	25.62	25.66	22.02	21.81	25.50	0.44	0.62	
15	AM261886 <i>Myotis brandtii</i>	20.73	20.20	20.15	21.30	22.02	20.98	19.28	22.76	20.23	21.67	14.58	24.47	24.84	24.84

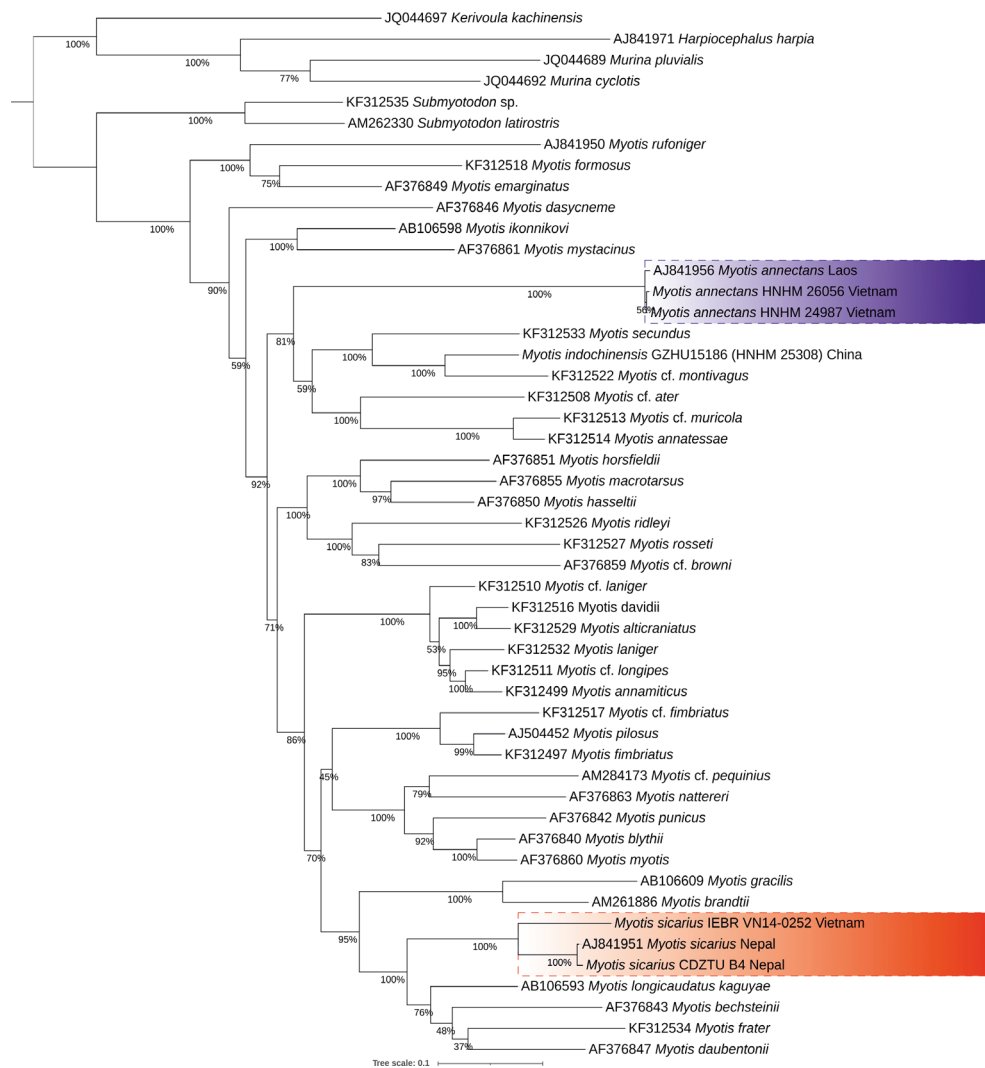
**Figure 4.** Bayesian inference tree based on *cyt b* sequences of selected species of *Myotis* (*Kerivoula*, *Murina* and *Harpiocephalus* sequences were included as outgroups). Numbers at splits indicate posterior probabilities. Red background colour indicates *M. sicarius*, whereas blue colour designates *M. annectans* samples.

Table 4. Estimates of evolutionary divergence between Rag2 sequences (in %).

N	Sample	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	<i>Myotis sicarius</i> IEBR VN14-0252 Vietnam													
2	<i>Myotis sicarius</i> CDZTU B4 Nepal	0.088												
3	<i>Myotis annectans</i> HNHM 24987 Vietnam	1.074	1.248											
4	<i>Myotis annectans</i> HNHM 26056 Vietnam	0.984	1.159	0.439										
5	AM265663 <i>Myotis annectans</i>	0.985	1.160	0.000	0.175									
6	KF312580 <i>Myotis frater</i>	0.991	1.166	0.800	0.711	0.712								
7	AM265653 <i>Myotis daubentonii</i>	1.260	1.435	1.067	0.797	0.888	0.984							
8	AM265643 <i>Myotis bechsteini</i>	1.539	1.714	1.711	1.435	1.529	1.352	1.161						
9	AM265647 <i>Myotis brandtii</i>	1.257	1.432	1.155	1.066	1.067	1.073	1.158	1.804					
10	KF312561 <i>Myotis longicaudatus kaguyae</i>	1.072	1.245	1.243	1.153	1.156	1.071	1.428	1.705	1.517				
11	KF312579 <i>Myotis secundus</i>	1.381	1.559	1.557	1.277	1.373	1.475	1.372	1.656	1.841	1.463			
12	<i>Myotis indochinensis</i> GZHU15186	1.254	1.428	1.062	0.973	0.974	0.799	1.155	1.706	1.334	1.424	1.743		
13	KF312565 <i>Myotis cf. montivagus</i>	1.351	1.526	1.157	1.067	1.069	0.892	1.251	1.713	1.431	1.520	1.845	0.440	
14	AM265660 <i>Myotis gracilis</i>	1.075	1.250	1.066	0.977	0.978	0.983	1.069	1.713	0.885	1.427	1.748	1.244	1.341

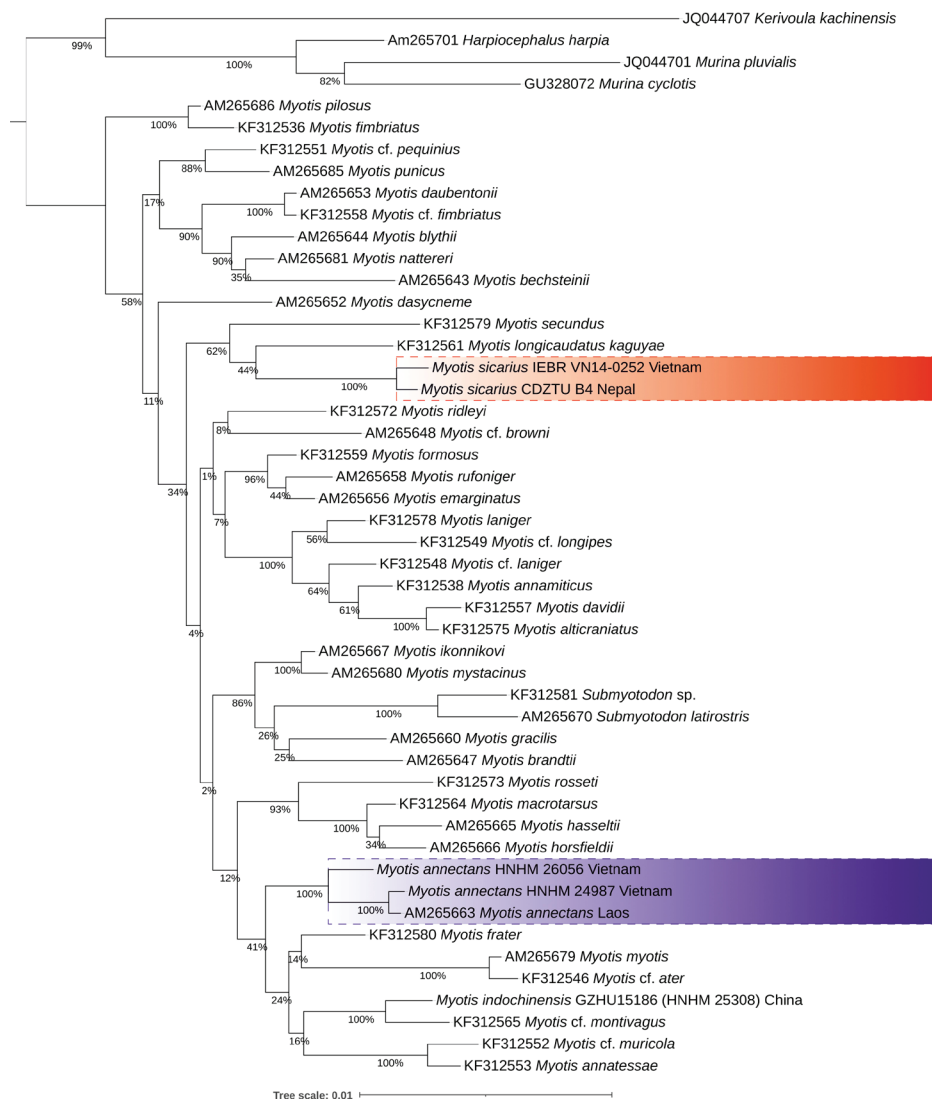


Figure 5. Bayesian inference tree based on Rag2 sequences of selected species of *Myotis* (*Kerivoula*, *Murina* and *Harpiocephalus* sequences were included as outgroups). Numbers at splits indicate posterior probabilities. Red background colour indicates *M. sicarius*, whereas blue colour designates *M. annectans* samples.

2005). Hence, although further examination is needed to confirm the shallow genetic variation of nuDNA genes and only one Vietnamese specimen was studied morphologically, the available data suggest that the split of geographic populations of *M. sicarius* into different taxonomic units is unsupported.

Myotis sicarius was previously thought to be a montane forest dwelling bat species, endemic to the southern slopes of the Himalayas between 950–1600 m a.s.l. (Srinivasulu and Srinivasulu 2019) (Fig. 1). With the new record, the occurrence of this species was extended by 1700 km south-eastwards to the border between Vietnam and Laos; nevertheless, the Vietnamese locality is connected to the southern part of the Himalayas through continuous mountains in North Vietnam, North Laos, North Myanmar, and South China. The Vietnamese specimen was caught in a mist-net set at the edge of a mixed evergreen secondary forest adjacent to a mosaic of terraced paddy fields, small streams, gardens and houses of Vin village at 717 m a.s.l. However, the area above the sampling site is extending up to the mountain peak (approximately 1500 m a.s.l.) and is covered by less disturbed evergreen forests.

Based on our data, it is postulated that *M. sicarius* can adapt to a wider range of habitats than previously known and that the dispersal of individuals (e.g., at least males to find counterparts during mating season) among its geographic populations might be less influenced by physical and ecological barriers (Tu et al. 2021). As such, geographic populations of *M. sicarius* are expected to maintain a long-range gene flow even under the impacts of extreme habitat changes during the Pleistocene glacial and interglacial periods and this allowed them to evolve a generalist phenotype to suit a variety of environments throughout its distribution range (Uhrin et al. 2010; Hollander et al. 2014; Tu et al. 2021).

Given that *M. sicarius* is a widespread species, its apparent rarity might be due to gaps in survey coverage in Myanmar, Laos, and Northeast India. The increasing intensity of bat research in these regions will therefore undoubtedly document additional bats that so far remain hidden from the eyes of researchers. Based on these and possible further results, the reassessment of the IUCN Red List status (Vulnerable) of the species will be needed, but at this point we suggest retaining it as it is.

Issues related to morphology-based identification of *Myotis annectans* and *M. sicarius*

The identification of *M. sicarius* by external characters may be challenging, as it was indicated by individuals caught in Uttarakhand, India (Chakravarty et al. 2020). These three individuals have the shortest forearm length recorded for the species to date and were initially identified as *M. cf. annectans* on the bases of these FA values. Although fur colour can be helpful in the identification of certain *Myotis* species, the reddish coloration around the genital region can also be observed in both

M. annectans and *M. sicarius*, and currently no mutually exclusive external character is known to tell apart these taxa. Chakravarty et al. (2020) provided information about the call parameters of *M. sicarius* (under the name *Myotis cf. annectans*) which can be useful to identify the species with acoustic methods. Nevertheless, the following craniodental features can be used to differentiate the two species: the interorbital bridge is narrow (0.4–0.7 mm) in *annectans* (vs. above this value in *sicarius*), the palatal emargination is wider than long and widening posteriorly in *annectans* (vs. quadrate or antero-posteriorly elongated in *sicarius*), P_2 and P_4 are in contact and P_3 is completely internal to the toothrow in *annectans* (vs. lower premolars are more or less in line in *sicarius*).

The dental anomalies in bats can be categorized into two groups: oligodontia and polyodontia. They are uncommon phenomena and may have a significant phylogenetic signal (Esquivel et al. 2021). In case of vespertilionid bats, the most common anomaly is the lack of premolars. There are several *Myotis* species with such anomalies (Esquivel et al. 2021); however, amongst the Asian species *M. annectans* seems to be one of the most common species showing this anomaly resulted in taxonomic complications (Topál 1970). Both morphological variants of *M. annectans* (with and without second upper premolar) were sequenced for mitochondrial and nuclear genes and the subsequent analyses showed low genetic divergences amongst them (0.18–0.62% for *cyt b* and 0.439% for *Rag2*). These values are comparable to intra-specific variations of the genus *Myotis* (Ruedi et al. 2013) which provides robust evidence that *M. primula* is a junior objective synonym of *M. annectans*. The localities of individuals with or without second upper premolar show no signs of geographical structuring suggesting that even subspecific separation does not seem justified.

Our article presents a typical example of the “grey zone of taxonomy”, and highlights the need to use different analytical methods and approaches to clarify taxonomic actions based on dense geographical sampling and voucher specimens.

Acknowledgements

In Vietnam, we would like to thank the directorate and staff of the Xuan Lien Nature Reserve and the IEBR for their support during the field survey. The field research was done under the permissions of the People’s Committees of Thanh Hoa provinces and the Vietnamese Ministry of Agriculture and Rural Development (Vietnam Administration of Forestry). In Nepal, we would like to express our grateful thanks to the Department of Forests and Soil Conservation for tissue sample collection permission to ST. This research received support from the National Research, Development, and Innovation Fund of Hungary (NKFIH FK137778, RRF-2.3.1-21-2022-00010 and RRF-2.3.1-21-2022-00006) to GC, TG and GF, the János Bolyai Research Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences (BO/00825/21) to TG, the Hungarian-Vietnamese bilateral mobility grant (NKM-2021-39) to GF, TG and VTT, and the Vietnam Academy of Science and Technology (Project No: QTHU01.01/22–23) to VTT.

References

- Allio R, Donega S, Galtier N, Nabholz B (2017) Large variation in the ratio of mitochondrial to nuclear mutation rate across animals: Implications for genetic diversity and the use of mitochondrial DNA as a molecular marker. *Molecular Biology and Evolution* 34: 2762–2772. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx197>
- Andriollo T, Naciri Y, Ruedi M (2015) Two mitochondrial barcodes for one biological species: The case of European Kuhl's pipistrelles (Chiroptera). *PLoS ONE* 10: e0134881. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134881>
- Antil S, Abraham JS, Sripoorna S, Maurya S, Dagar J, Makhija S, Bhagat P, Gupta R, Sood U, Lal R, Toteja R (2023) DNA barcoding, an effective tool for species identification: A review. *Molecular Biology Reports* 50: 761–775. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-08015-7>
- Avise JC (2000) *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge, 464 pp.
- Bates PJJ, Harrison DL (1997) *Bats of the Indian Subcontinent*. Harrison Zoological Museum, Sevenoaks, 258 pp.
- Bradley RD, Baker RJ (2001) A test of the Genetic Species Concept: Cytochrome-*b* sequences and mammals. *Journal of Mammalogy* 82: 960–973. [https://doi.org/10.1644/1545-1542\(2001\)082%3C0960:A-TOTGS%3E2.0.CO;2](https://doi.org/10.1644/1545-1542(2001)082%3C0960:A-TOTGS%3E2.0.CO;2)
- Castella V, Ruedi M, Excoffier L (2008) Contrasted patterns of mitochondrial and nuclear structure among nursery colonies of the bat *Myotis myotis*. *Journal of Evolutionary Biology* 14: 708–720. <https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.2001.00331.x>
- Chakravarty R, Ruedi M, Ishtiaq F (2020) A recent survey of bats with descriptions of echolocation calls and new records from the western Himalayan region of Uttarakhand, India. *Acta Chiropterologica* 22: 197–224. <https://doi.org/10.3161/15081109ACC2020.22.1.019>
- De Pasquale PP, Galimberti A (2014) New records of the Alcaethoe bat, *Myotis alcaethoe* (Vespertilionidae) for Italy. *Barbastella* 7: 3–5. <https://doi.org/10.14709/BarbJ.7.1.2014.01>
- Dool SE, Puechmaille SJ, Foley NM, Allegrini B, Bastian A, Mutumi GL, Maluleke TG, Odendaal LJ, Teeling EC, Jacobs DS (2016) Nuclear introns outperform mitochondrial DNA in inter-specific phylogenetic reconstruction: Lessons from horseshoe bats (Rhinolophidae: Chiroptera). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 97: 196–212. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.01.003>
- Eick GN, Jacobs DS, Matthee CA (2005) A nuclear DNA phylogenetic perspective on the evolution of echolocation and historical biogeography of extant bats (Chiroptera). *Molecular Biology and Evolution* 22: 1869–1886. <https://doi.org/10.1093/molbev/msi180>
- Elyasigorji Z, Izadpanah M, Hadi F, Zare M (2023) Mitochondrial genes as strong molecular markers for species identification. *Nucleus* 66: 81–93. <https://doi.org/10.1007/s13237-022-00393-4>
- Esquivel DA, Maestri R, Santana SE (2021) Evolutionary implications of dental anomalies in bats. *Evolution* 75: 1087–1096. <https://doi.org/10.1111/evo.14211>
- Flanders J, Jones G, Benda P, Dietz C, Zhang S, Li G, Sharifi M, Rossiter SJ (2009) Phylogeography of the greater horseshoe bat, *Rhinolophus ferrumequinum*: Contrasting results from mitochondrial and microsatellite data. *Molecular Ecology* 18: 306–318. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.04021.x>
- Funk DJ, Omland KE (2003) Species-level paraphyly and polyphyly: Frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 34: 397–423. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132421>
- Görföl T, Estók P, Csorba G (2013) The subspecies of *Myotis montivagus* – Taxonomic revision and species limits (Mammalia: Chiroptera: Vespertilionidae). *Acta Zoologica Hungarica* 59: 41–59.
- Hassanin A, Colombo R, Gembu G-C, Merle M, Tu VT, Görföl T, Akawa PM, Csorba G, Kearney T, Monadjem A, Ing RK (2018) Multi-locus phylogeny and species delimitation within the genus *Glauconycteris* (Chiroptera, Vespertilionidae), with the description of a new bat species from the Tshopo Province of the Democratic Republic of the Congo. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 56: 1–22. <https://doi.org/10.1111/jzs.12176>
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, DeWaard JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B* 270: 313–321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- Hollander J, Verzijden M, Svensson E, Brönmark C (2014) Dispersal and phenotypic plasticity. In: Hansson L-A, Åkesson S (Eds) *Animal Movement Across Scales*. Oxford University Press, Oxford, 110–125. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780199677184.003.0007>
- Ibáñez C, García-Mudarra JL, Ruedi M, Stadelmann B, Juste J (2006) The Iberian contribution to cryptic diversity in European bats. *Acta Chiropterologica* 8: 277–297. [https://doi.org/10.3161/1733-5329\(2006\)8\[277:TICTCD\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.3161/1733-5329(2006)8[277:TICTCD]2.0.CO;2)
- Ivanova NV, Dewaard JR, Hebert PDN (2006) An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA. *Molecular Ecology Notes* 6: 998–1002. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01428.x>
- Jones G, Parsons S, Zhang SY, Stadelmann B, Benda P, Ruedi M (2006) Echolocation calls, wing shape, diet and phylogenetic diagnosis of the endemic Chinese bat *Myotis pequinus*. *Acta Chiropterologica* 8: 451–463. [https://doi.org/10.3161/1733-5329\(2006\)8\[451:ECWSDA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.3161/1733-5329(2006)8[451:ECWSDA]2.0.CO;2)
- Katoh K, Standley DM (2013) MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* 30: 772–780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
- Kawai K, Nikaido M, Harada M, Matsumura S, Lin LK, Wu Y, Hasegawa M, Okada N (2003) The status of the Japanese and East Asian bats of the genus *Myotis* (Vespertilionidae) based on mitochondrial sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 28: 297–307. [https://doi.org/10.1016/S1055-7903\(03\)00121-0](https://doi.org/10.1016/S1055-7903(03)00121-0)
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111–120. <https://doi.org/10.1007/bf01731581>
- Kruskop SV, Solovyeva EN, Dudorova AV, Artyushin IV (2023) Same but different: Towards taxonomic status of *Myotis ater* (Chiroptera: Vespertilionidae) from the mainland Asia. *Mammalia* 87: 527–538. <https://doi.org/10.1515/mammalia-2023-0019>
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35: 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Kuo H-C, Soisook P, Ho Y-Y, Csorba G, Wang C-N, Rossiter SJ (2017) A taxonomic revision of the *Kerivoula hardwickii* complex (Chiroptera: Vespertilionidae) with the description of a new species. *Acta Chiropterologica* 19: 19–39. <https://doi.org/10.3161/15081109ACC-2017.19.1.002>
- Lack JB, Roehrs ZP, Stanley CE, Ruedi M, van den Bussche RA (2010) Molecular phylogenetics of *Myotis* indicate familial-level divergence for the genus *Cistugo* (Chiroptera). *Journal of Mammalogy* 91: 976–992. <https://doi.org/10.1644/09-MAMM-A-192.1>

- Letunic I, Bork P (2016) Interactive tree of life (iTOL) v3: An online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Research* 44: 242–245. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw290>
- Novaes RLM, Cláudio VC, Díaz MM, Wilson DE, Weksler M, Moratelli R (2022) Argentinean *Myotis* (Chiroptera, Vespertilionidae), including the description of a new species from the Yungas. *Vertebrate Zoology* 72: 1187–1216. <https://doi.org/10.3897/vz.72.e90958>
- Nylander JAA (2004) MrModeltest v2. Program distributed by the author.
- Petzold A, Hassanin A (2020) A comparative approach for species delimitation based on multiple methods of multi-locus DNA sequence analysis: A case study of the genus *Giraffa* (Mammalia, Cetartiodactyla). *PLoS ONE* 15: e0217956. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217956>
- Platt RN, Faircloth BC, Sullivan KAM, Kieran TJ, Glenn TC, Vandeweghe MW, Lee TE, Baker RJ, Stevens RD, Ray DA (2017) Conflicting evolutionary histories of the mitochondrial and nuclear genomes in New World *Myotis* bats. *Systematic Biology* 67: 236–249. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syx070>
- R Core Team (2018) A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rivers NM, Butlin RK, Altringham JD (2005) Genetic population structure of Natterer's bats explained by mating at swarming sites and philopatry. *Molecular Ecology* 14: 4299–4312. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02748.x>
- Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572–1574. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180>
- Roux C, Fraïsse C, Romiguier J, Anciaux Y, Galtier N, Bierne N (2016) Shedding light on the grey zone of speciation along a continuum of genomic divergence. *PLoS Biology* 14: e2000234. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2000234>
- Ruedi M, Biswas J, Csorba G (2012) Bats from the wet: Two new species of tube-nosed bats (Chiroptera: Vespertilionidae) from Meghalaya, India. *Revue Suisse de Zoologie* 119: 111–135.
- Ruedi M, Mayer F (2001) Molecular systematics of bats of the genus *Myotis* (Vespertilionidae) suggests deterministic ecomorphological convergences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 21: 436–448. <https://doi.org/10.1006/mpev.2001.1017>
- Ruedi M, Stadelmann B, Gager Y, Douzery EJP, Francis CM, Lin LK, Guillén-Servent A, Cibois A (2013) Molecular phylogenetic reconstructions identify East Asia as the cradle for the evolution of the cosmopolitan genus *Myotis* (Mammalia, Chiroptera). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 69: 437–449. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2013.08.011>
- Salicini I, Ibáñez C, Juste J (2011) Multilocus phylogeny and species delimitation within the Natterer's bat species complex in the Western Palearctic. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 61: 888–898. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.08.010>
- Shaw KL (2002) Conflict between nuclear and mitochondrial DNA phylogenies of a recent species radiation: What mtDNA reveals and conceals about modes of speciation in Hawaiian crickets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 16122–16127. <https://doi.org/10.1073/pnas.242585899>
- Sikes RS (2016) Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research and education. *Journal of Mammalogy* 97: 663–688. <https://doi.org/10.1093/jmammal/gyw078>
- Slatkin M (1985) Rare alleles as indicators of gene flow. *Evolution* 39: 53–65. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb04079.x>
- Son NT, Görföl T, Francis CM, Motokawa M, Estók P, Endo H, Thong VD, Dang NX, Oshida T, Csorba G (2013) Description of a new species of *Myotis* (Vespertilionidae) from Vietnam. *Acta Chiropterologica* 15: 473–483. <https://doi.org/10.3161/150811013X679099>
- Song H, Buhay JE, Whiting MF, Crandall KA (2008) Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 13486–13491. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803076105>
- Srinivasulu B, Srinivasulu C (2019) *Myotis sicarius*. The IUCN Red List of Threatened Species: e.T14202A22063965. <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2019-3.RLTS.T14202A22063965.en>
- Stadelmann B, Herrera LG, Arroyo-Cabrales J, Flores-Martínez JJ, May BP, Ruedi M (2004a) Molecular systematics of the fishing bat *Myotis (Pisonyx) vivesi*. *Journal of Mammalogy* 85: 133–139. [https://doi.org/10.1644/1545-1542\(2004\)085%3C0133:MSOTFB%3E2.0.CO;2](https://doi.org/10.1644/1545-1542(2004)085%3C0133:MSOTFB%3E2.0.CO;2)
- Stadelmann B, Jacobs DS, Schoeman C, Ruedi M (2004b) Phylogeny of African *Myotis* bats (Chiroptera, Vespertilionidae) inferred from cytochrome *b* sequences. *Acta Chiropterologica* 6: 177–192. <https://doi.org/10.3161/001.006.0201>
- Stadelmann B, Lin LK, Kunz TH, Ruedi M (2007) Molecular phylogeny of New World *Myotis* (Chiroptera, Vespertilionidae) inferred from mitochondrial and nuclear DNA genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 43: 32–48. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.06.019>
- Topál G (1970) On the systematic status of *Pipistrellus annectans* Dobson, 1871 and *Myotis primula* Thomas, 1920 (Mammalia). *Annales Historico-Naturales Musei Nationalis Hungarici* 62: 373–379.
- Tu VT, Csorba G, Görföl T, Arai S, Son NT, Thanh HT, Hassanin A (2015) Description of a new species of the genus *Aselliscus* (Chiroptera, Hipposideridae) from Vietnam. *Acta Chiropterologica* 17: 233–254. <https://doi.org/10.3161/15081109ACC2015.17.2.002>
- Tu VT, Csorba G, Ruedi M, Furey NM, Son NT, Thong VD, Bonillo C, Hassanin A (2017) Comparative phylogeography of bamboo bats of the genus *Tylonycteris* (Chiroptera, Vespertilionidae) in Southeast Asia. *European Journal of Taxonomy* 274: 1–38. <https://doi.org/10.5852/ejt.2017.274>
- Tu VT, Görföl T, Csorba G, Arai S, Kikuchi F, Fukui D, Koyabu D, Furey NM, Bawm S, Lin KS, Alviola P, Hang CT, Son, NT, Tuan TA, Hassanin A (2021) Integrative taxonomy and biogeography of Asian yellow house bats (Vespertilionidae: *Scotophilus*) in the Indomalayan Region. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 59: 772–795. <https://doi.org/10.1111/jzs.12448>
- Tu VT, Hassanin A, Furey NM, Son NT, Csorba G (2018) Four species in one: Multigene analyses reveal phylogenetic patterns within Hardwicke's woolly bat, *Kerivoula hardwickii*-complex (Chiroptera, Vespertilionidae) in Asia. *Hystrix* 29: 111–121. <https://doi.org/10.4404/hystrix-00017-2017>
- Tu VT, Hassanin A, Görföl T, Arai S, Fukui D, Thanh HT, Son NT, Furey NM, Csorba G (2017) Integrative taxonomy of the *Rhinolophus macrotis* complex (Chiroptera, Rhinolophidae) in Vietnam and nearby regions. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 55: 177–198. <https://doi.org/10.1111/jzs.12169>
- Uhrin M, Kaňuch P, Křištofik J, Paule L (2010) Phenotypic plasticity in the greater mouse-eared bat in extremely different roost conditions. *Acta Theriologica* 55: 153–164. <https://doi.org/10.4098/jat.0001-7051.073.2009>
- Vallo P, Benda P, Červený J, Koubek P (2013) Conflicting mitochondrial and nuclear paralogy in small-sized West African house bats

- (Vespertilionidae). *Zoologica Scripta* 42: 1–12. <https://doi.org/10.1111/j.1463-6409.2012.00563.x>
- Wang X, Guo W, Yu W, Csorba G, Motokawa M, Li F, Zhang Q, Zhang C, Li Y, Wu Y (2017) First record and phylogenetic position of *Myotis indochinensis* (Chiroptera, Vespertilionidae) from China. *Mammalia* 81: 605–609. <https://doi.org/10.1515/mammalia-2016-0063>
- Weyeneth N, Goodman SM, Stanley WT, Ruedi M (2008) The biogeography of *Miniopterus* bats (Chiroptera: Miniopteridae) from the Comoro Archipelago inferred from mitochondrial DNA. *Molecular Ecology* 17: 5205–5219. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03994.x>
- Zachos FE (2018) Mammals and meaningful taxonomic units: The debate about species concepts and conservation. *Mammal Review* 48: 153–159. <https://doi.org/10.1111/mam.12121>

Supplementary Material 1

Figure S1

Authors: Győrössy D, Tu VT, Csorba G, Thapa S, Estók P, Földvári G, Görföl T (2024)

Data type: .jpg

Explanation notes: Bayesian inference tree based on COI sequences of selected species of *Myotis* (*Kerivoula*, *Murina* and *Harpiocephalus* sequences were included as outgroups). Numbers at splits indicate posterior probabilities.

Copyright notice: This dataset is made available under the Open Database License (<http://opendatacommons.org/licenses/odbl/1.0>). The Open Database License (ODbL) is a license agreement intended to allow users to freely share, modify, and use this dataset while maintaining this same freedom for others, provided that the original source and author(s) are credited.

Link: <https://doi.org/10.3897/vz.74.e127269.suppl1>

Supplementary Material 2

Tables S1, S2

Authors: Győrössy D, Tu VT, Csorba G, Thapa S, Estók P, Földvári G, Görföl T (2024)

Data type: .zip

Explanation notes: **Table S1.** Origin of the specimens analysed for the COI genes — **Table S2.** Estimates of evolutionary divergence between COI sequences.

Copyright notice: This dataset is made available under the Open Database License (<http://opendatacommons.org/licenses/odbl/1.0>). The Open Database License (ODbL) is a license agreement intended to allow users to freely share, modify, and use this dataset while maintaining this same freedom for others, provided that the original source and author(s) are credited.

Link: <https://doi.org/10.3897/vz.74.e127269.suppl2>

Supplementary Material 3

File S1

Authors: Győrössy D, Tu VT, Csorba G, Thapa S, Estók P, Földvári G, Görföl T (2024)

Data type: .docx

Explanation notes: Origin of the specimens analysed for the *cyt b* and *Rag2* genes. NA denotes that *Rag2* sequence is not available from that specimen.

Copyright notice: This dataset is made available under the Open Database License (<http://opendatacommons.org/licenses/odbl/1.0>). The Open Database License (ODbL) is a license agreement intended to allow users to freely share, modify, and use this dataset while maintaining this same freedom for others, provided that the original source and author(s) are credited.

Link: <https://doi.org/10.3897/vz.74.e127269.suppl3>