

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EVALUACIÓN DEL PAPEL DEL SEXO Y LAS ETAPAS REPRODUCTIVAS EN LOS
PROCESOS DE COMUNICACIÓN ACÚSTICA EN EL MURCIÉLAGO DE
VENTOSAS *THYROPTERA TRICOLOR* (CHIROPTERA: THYROPTERIDAE)

Tesis sometida a la consideración de la comisión del programa de Estudios de Posgrado en
Biología para optar al grado y título de Maestría Académica en Biología

HÉCTOR ANDRÉS HERNÁNDEZ PINSÓN

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2022

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi familia, quien día a día me ha apoyado en este proceso de formación con las diferentes dificultades que se han presentado, sin reparo alguno. Siendo estos mi gran impulso a nunca desistir de ningún proceso en la vida. A mi madre y mis dos hermanos quienes han sido un ejemplo de vida para mí.

AGRADECIMIENTOS

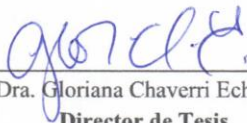
Agradezco enormemente a mi profesora consejera Gloriana Chaverri, por su guía y enseñanza, por su paciencia y sobre todo por su gran apoyo en todos los ámbitos a lo largo de este proceso. Sin su apoyo y gran enseñanza no hubiese sido posible iniciar y culminar este lindo proceso. Ella representa todo lo que un verdadero profesor consejero debería impactar en la vida de un estudiante. Agradezco a su esposo, Óscar Quiros, quien me brindó un gran apoyo también en una etapa importante y difícil para mí. Ambos me hicieron sentir como un miembro más de su familia, allí en Golfito. Agradezco a Stephen Stroud propietario del Centro de Investigaciones en el Refugio Nacional de Vida Silvestre Hacienda Barú, por permitirme desarrollar gran parte de esta investigación allí, a Ronald Villalobos quien estaba a cargo de administrar el refugio y me brindó su apoyo durante este tiempo. Agradezco a Hannia Ramírez porque desde el primer día me brindó un valioso apoyo e información en cada etapa y por su enorme paciencia y preocupación por culminar este proceso. Finalmente, agradezco a mis dos profesores consejeros, Gerardo y Marcelo, quienes compartieron sus valiosos aportes y conocimientos a través de cursos o asesorías para el desarrollo de esta tesis y a la Universidad de Costa Rica, por permitirme hacer parte de su estudiantado.

“Esta Tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Biología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en Biología”



Dr. Gilbert Alvarado Barboza

Representante de la Decana del Sistema de Estudios de Posgrado



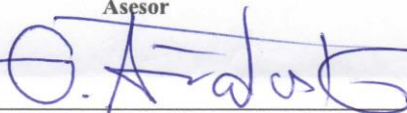
Dra. Gloriana Chaverri Echandi

Director de Tesis



Dr. Marcelo Araya Salas

Asesor



Dr. Gerardo Ávalos Rodríguez

Asesor

M. Sc. Paula Iturralde Pólit

Representante del Director del Programa de Posgrado en Biología



Héctor Andrés Hernández Pinsón

Candidato

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
HOJA DE APROBACIÓN.....	iv
RESUMEN.....	v
ABSTRACT.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1-3
LITERATURA CITADA.....	4-7
CAPÍTULO 1: Evaluación de las etapas reproductivas y el sexo en los procesos de comunicación acústica en <i>T.</i> <i>tricolor</i>	8
ABSTRACT.....	8
INTRODUCTION.....	9-10
MATERIAL AND METHODS.....	11-14
RESULTS.....	14-16
DISCUSSION.....	16-20
ACKNOWLEDGEMENTS.....	20
LITERATURE CITED.....	20-27
CAPÍTULO 2: Evaluación de distintos parámetros acústicos y si existe preferencia de llamadas de respuesta de acuerdo al sexo y época reproductiva en <i>Thyroptera</i> . <i>tricolor</i>	28
RESUMEN.....	29
ABSTRACT.....	29-30
INTRODUCCIÓN.....	31-33
MATERIALES Y MÉTODOS.....	33-36
RESULTADOS.....	37-39
DISCUSIÓN.....	40-41
NOTA ÉTICA.....	42
REFERENCIAS.....	43-47

RESUMEN

El comportamiento es uno de los rasgos más variables dentro del reino animal. Sin embargo, aún hay poca claridad sobre cuáles son los factores que inciden en su variabilidad. En muchas especies se sabe que con el inicio de las actividades reproductivas, el comportamiento se ve influenciado por la producción de hormonas, que hace que los individuos adopten estrategias como el reconocimiento y atracción de posibles parejas reproductivas, y que aumenten sus probabilidades de apareamiento. Entre las distintas señales que emplean los individuos para la transmisión de información relevante se encuentran las señales acústicas, que permiten obtener información sobre cómo realizar una identificación individual o grupal, identificar el sexo y el estado reproductivo de un individuo. *Thyroptera tricolor* es una especie reconocida por realizar un intercambio acústico de llamadas sociales que facilita el contacto con individuos cercanos y el reclutamiento a sitios de descanso. Esta investigación tiene como objetivo evaluar la importancia del sexo y los estados reproductivos en los procesos de comunicación acústica en *T. tricolor*.

En nuestro primer capítulo evaluamos si el sexo y la época reproductiva inciden en las vocalizaciones emitidas por *T. tricolor*. Para esto, se registraron las llamadas de respuesta en diferentes épocas reproductivas. Mediante un modelo lineal generalizado con distribución de Poisson encontramos una diferencia significativa en las vocalizaciones emitidas entre machos y hembras durante diferentes épocas reproductivas, siendo los machos quienes hicieron un mayor número de vocalizaciones cuando están activos reproductivamente, pues emitieron en promedio 5.8 llamadas de respuestas (± 3 desviación estándar), mientras que el resto de los individuos produjo entre 2 y 2.6 llamadas de respuesta. No encontramos una diferencia significativa en la vocalización de las hembras entre épocas reproductivas pero sí encontramos una diferencia significativa a la hora de comparar a los machos entre épocas reproductivas.

En el segundo capítulo, evaluamos si existe preferencia por responder a algún sexo determinado y si hay diferencias en los parámetros acústicos en las llamadas de consulta que permitan diferenciar entre sexos durante diferentes épocas reproductivas. Grabamos las llamadas de respuesta emitidas en diferentes épocas reproductivas, tanto por machos como

hembras. Para evaluar el efecto del sexo y el estado reproductivo en las tasas de llamadas de respuestas, se aplicó un modelo de regresión de efectos mixtos multinomial Bayesiano. La distribución posterior del estimado del modelo Bayesiano determinó que, en el caso de los machos, hay una mayor probabilidad de que estos respondan ante cualquier llamada de consulta cuando se encuentran activos. Por otra parte, son también los machos los que mostraron una mayor probabilidad de respuesta al sexo opuesto. En cuanto a evaluación de parámetros acústicos, encontramos mediante un análisis de Bosques Aleatorios (Random Forest) un error de predicción del 10.61% para asignar si un llamado pertenecía a machos o hembras, lo cual indica que existe una señal acústica que nos permite diferenciar a machos y hembras a partir de sus llamadas de consulta.

ABSTRACT

Behaviour is one of the most variable traits within the animal kingdom. However, there is still little clarity about the factors that influence its variability. In many species, it is known that with the onset of reproductive activities, behaviour is influenced by a series of hormonal outputs, which cause individuals to adopt different strategies such as recognition and attraction of potential mating partners to increase their chances of mating. Among the different signals used by individuals to obtain relevant information are acoustic signals, which provide information such as individual or group identification, sex and reproductive status. *Thyroptera tricolor* is a species known to perform an acoustic exchange of social calls that facilitates contact with nearby individuals and recruitment to roosting sites. This research aims to assess the importance of sex and reproductive stages in acoustic communication processes in *T. tricolor*.

In our first chapter we assessed whether sex and breeding season influence the vocalisations emitted by *T. tricolor*. For this purpose, response calls were recorded at different breeding seasons. Using a generalized linear model with Poisson distribution we found a significant difference in vocalizations emitted between males and females during different breeding seasons, with males emitting the highest number of vocalizations when reproductively active, emitting on average 5.8 response calls (± 3 standard deviation), while

the rest of individuals produced between 2 and 2.6 response calls. We did not find a significant difference in the vocalisation of females between breeding seasons but we did find a significant difference when comparing males between breeding seasons.

In the second chapter, we evaluated whether there is a preference to respond to a particular sex and whether there are differences in acoustic parameters in inquiry calls that allow us to differentiate between sexes during different breeding seasons. We recorded response calls issued by both males and females in different reproductive seasons. To assess the effect of sex and reproductive status on calling rates, a Bayesian multinomial mixed-effects regression model was applied. The posterior distribution of the Bayesian model estimate determined that males are more likely to respond to inquiry calls of both males and females when they are reproductively active. On the other hand, it is also males that showed a higher probability of responding to the opposite sex. We applied a Random Forest analysis to determine if inquiry calls could be correctly assigned to each sex, and found a prediction error of 10.61%. This indicates that there is an acoustic signal that allows us to differentiate males and females from their inquiry calls.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Número máximo de llamadas de respuesta emitidas a través de diferentes réplicas realizadas en los mismos individuos.....

Figura 2. Gráfico de violín mostrando el número de llamadas de respuestas emitidas de acuerdo al sexo del individuo (machos o hembras), y su condición reproductiva (activo o inactivo). Los puntos negros representan el promedio de llamadas de respuesta.....

CAPÍTULO 2

Figura 1. Estimación de la superposición de los posteriores para comparar la probabilidad de que un individuo (M: macho, H: hembra) en diferentes estados reproductivos (A: activo, I: inactivo) responda de acuerdo al sexo del emisor de la llamada de consulta (emisor es hembra: $\rightarrow H$, o emisor es macho: $\rightarrow M$). La línea roja discontinua sobre el punto cero marca un punto de neutralidad en la probabilidad de respuesta. Las pendientes hacia la derecha del cero determinan una mayor probabilidad de respuesta hacia ese sexo determinado; los puntos cercanos o a la izquierda del cero denotan una mínima o probabilidad contraria a que respondan a ese sexo determinado.....

LISTA DE ABREVIATURAS

Chapter/Capítulo	Abbreviation/Abreviatura	Description/Descripción
I,II	m.s.n.m.	Meters above sea level/Metros sobre el nivel del mar
I,II	N	North/Norte
I,II	W/O	West/Oeste
I,II	d.f.	Degrees of freedom/Grados de libertad
I,II	i.e.	It is/Es
I,II	Km	Kilometers/Kilometros
I,II	P	Probability/Probabilidad
I,II	e.g.	For example/Por ejemplo
I,II	Spp.	Species/Especies
I	χ^2	Chi-square/Chi cuadrado
II	MCMCglmm	Generalised Linear Mixed Models/Modelo lineal mixto generalizado
II	MFCC	Mel Frequency Cepstral Coeficientes/Coeficientes Ceptrales en las Frecuencias Mel



UNIVERSIDAD DE
COSTA RICA

SEP Sistema de
Estudios de Posgrado

Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.

Yo, Héctor Andrés Hernández Pinsón, con cédula de identidad 117002223610, en micondición de autor del TFG titulado EVALUACIÓN DEL PAPEL DEL SEXO Y LAS ETAPAS REPRODUCTIVAS EN LOS PROCESOS DE COMUNICACIÓN ACÚSTICA EN EL MURCIÉLAGO DE VENTOSAS THYROPTERA TRICOLOR (CHIROPTERA: THYROPTERIDAE)

Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado. SI NO*

*En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: _____ año (s).

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Manifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Kerwá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.

Héctor Hernández

FIRMA ESTUDIANTE

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada, cuyos alcances aseguran a la Universidad, que su contenido sea tomado como cierto. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para que quien declare contrario a la verdad de lo que manifiesta, puede como consecuencia, enfrentar un proceso penal por delito de perjurio, tipificado en el artículo 318 de nuestro Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mayor esfuerzo para que no sólo incluya información veraz en la Licencia de Publicación, sino que también realice diligentemente la gestión de subir el documento correcto en la plataforma digital Kerwá.

INTRODUCCIÓN GENERAL

En todas aquellas especies que son sociales, los individuos que permanecen asociados por largos períodos tienen una mayor probabilidad de desarrollar interacciones cooperativas (Nowak, 2012) que les permiten obtener beneficios de manera individual (Huang, 2009). En el macaco japonés (*Macaca fuscata*), para facilitar la unión del grupo, los miembros deben emplear diferentes estrategias para identificar con mayor precisión a aquellos individuos que pertenecen a su grupo (Sugiura *et al.*, 2011; Foster *et al.*, 2012). Una clara muestra de este comportamiento lo evidencian los murciélagos, los cuales son animales altamente sociales y muchas de las especies viven en grupos estables (McCracken y Wilkinson, 2000). Para mantener contacto con su grupo, los murciélagos utilizan una variedad de señales (Bradbury y Vehrencamp, 2011), la mayoría de las cuales son de origen acústico (Gillam y Fenton, 2016). Entre las distintas señales acústicas que producen los murciélagos, las llamadas sociales han recibido considerablemente menos atención en comparación a la ecolocalización. Sin embargo, muchas especies producen un diverso repertorio de llamadas que facilitan diversas interacciones sociales (Barclay *et al.*, 1979; Melendez *et al.*, 2006; Bohn *et al.*, 2008; Gillam y Chaverri, 2012).

En una variedad de taxones se ha demostrado que las señales acústicas permiten transmitir información como el sexo o la condición reproductiva de cada individuo, además de la identidad individual y grupal (Clayton y Emery, 2007; Rendall y Owren, 2002; Vignal *et al.*, 2008). El reconocimiento individual permite que los miembros de un grupo logren mantenerse unidos a pesar de separarse temporalmente para diferentes actividades (Chaverri *et al.*, 2010, 2013). Sin embargo, esta capacidad de codificar información que permita la identificación grupal o individual va a depender de las características de la señal acústica y el sitio donde se emita (Hiryu *et al.*, 2006). Las señales acústicas experimentan pérdidas de sus características temporales y espectrales, como duración o frecuencia de mayor amplitud, por fenómenos como la reverberación y la atenuación dependiente de la frecuencia (Bradbury y Vehrencamp, 2011). Lo anterior podría impedir a los receptores extraer la información que les permita identificar a los miembros de su grupo.

Hay otros factores que posiblemente puedan incidir en los procesos de comunicación acústica. Por ejemplo, se sabe que en babuinos, las hembras responden con mayor frecuencia a las llamadas de sus propias crías (Rendall *et al.*, 2000). Esto mismo se comprobó en lobos (Charrier *et al.*, 2003). Esta preferencia de respuesta entre padres e hijos está dada particularmente durante la época de lactancia en donde las crías son dependientes de sus madres para alimentarse. Otro factor que puede afectar los procesos de comunicación es la reproducción. Por ejemplo, se sabe que en especies como el mono ardilla (*Saimiri sciureus*) las interacciones vocales pueden verse afectadas por el período reproductivo y el sexo del individuo receptor de la señal acústica (Smith *et al.*, 1983).

Una de las especies de murciélagos en las que más se ha analizado la comunicación acústica es *Thyroptera tricolor*, especialmente sobre los llamados sociales y su relación con la cohesión de grupo. Esta especie realiza un intercambio de llamadas sociales que facilitan el contacto con individuos cercanos y el reclutamiento a sitios de descanso. Se han identificado dos tipos de llamadas que *T. tricolor* utiliza en este contexto: (1) la llamada de consulta realizada por individuos que se encuentran volando en búsqueda de un refugio, y (2) la llamada de respuesta emitida al percibir llamadas de consulta por individuos dentro de un refugio ya localizado y ocupado (Chaverri y Gillam, 2012). Por otra parte, también se ha evidenciado que los individuos pueden discriminar entre las llamadas de los miembros de su grupo y los miembros de otros grupos, y separarlas de otros grupos basándose en algunos de los rasgos acústicos de estas llamadas (Gillam y Chaverri, 2012). Los individuos que emiten una llamada de búsqueda podrían tener preferencia por individuos de su mismo grupo (Chaverri *et al.*, 2013).

Thyroptera tricolor es un pequeño murciélago insectívoro (3–4 g) que se encuentra en los bosques neotropicales de tierras bajas desde el sur de México hasta el sureste de Brasil (Wilson y Findley, 1977). Esta especie nos permite comprender la importancia que tienen los llamados sociales en la cohesión de grupo, ya que se enfrenta a la difícil tarea de buscar un sitio de refugio constantemente. Estos murciélagos están morfológicamente especializados para posarse por medio de unas ventosas que tienen en sus extremidades anteriores y posteriores en las hojas enrolladas en desarrollo de los miembros del orden Zingiberales (principalmente en los géneros *Heliconia* y *Calathea*), los cuales son un tipo

De refugio extremadamente efímero, ya que están disponibles por periodos que van desde 5 a 31 h (Vonhof y Fenton, 2004) donde posteriormente estas hojas de abren por completo. A pesar de cambiar de refugio diariamente, *T. tricolor* forma grupos sociales mixtos (machos y hembras) compuestos normalmente por unos 5 individuos (rango 1-11; Chaverri y Kunz, 2011b). Estos grupos son muy estables, ya que su composición permanece sin cambios incluso durante varios años (Chaverri y Gillam, 2010; Vonhof *et al.*, 2004). La estabilidad grupal seguramente se explica en gran medida gracias a la emisión constante de los dos tipos de sonidos sociales descritos anteriormente, al reconocimiento acústico de individuos del mismo grupo y quizás también por el uso de ámbitos de refugio relativamente pequeños (Chaverri y Kunz, 2011a).

Es importante comprender la importancia que tienen los refugios en los procesos de comunicación acústica, puesto que *T. tricolor* es un organismo adaptado a un refugio específico (Chaverri y Kunz, 2011a) y la incidencia que este pueda tener en la discriminación acústica va a ser vital en la cohesión del grupo. Así mismo, entender el papel que cumplen las etapas reproductivas y el reconocimiento vocal en estos procesos de comunicación mediante llamadas de contacto nos proporcionará una información valiosa para comprender si la discriminación acústica se da en función de los procesos reproductivos o del sexo del individuo vocal. En un estudio desarrollado por Buchalski y colaboradores (2014), se observó que las parejas reproductivas en *Thyoptera tricolor* pertenecen a grupos distintos y relativamente distantes. Esto sugiere que la comunicación vocal puede jugar un importante papel en el proceso de localización, atracción y/o reconocimiento de potenciales parejas, especialmente durante la época de apareamiento. El objetivo principal de este trabajo consiste en evaluar el papel que tienen las etapas reproductivas y el sexo en la comunicación acústica en *T. tricolor*.

LITERATURA CITADA

Barclay R.M.R., Fenton M.B. Thomas D.W. (1979). Social behavior of the little brown bat, *Myotis lucifugus*. 2. Vocal communication. Behavioral Ecology and Sociobiology, 6, 137e146.

Bohn K.M., Wilkinson G.S., Moss C.F. (2007). Discrimination of infant isolation calls by female greater spear-nosed bats, *Phyllostomus hastatus*. Animal Behavior , 73 , 423 - 432.

Bohn K.M., Schmidt-French B., Ma S.T. Pollak G.D. (2008). Syllable acoustics, temporal patterns, and call composition vary with behavioral context in Mexican free-tailed bats. Journal of the Acoustical Society of America, 124, 1838e1848.

Bradbury J.W., Vehrencamp S.L. (2011). Principles of animal communication. 2nd ed. Sunderland: Sinauer Associates.

Buchalski M.R., Chaverri G., Vonhof M.J. (2014). When genes move farther than offspring: gene flow by male gamete dispersal in the highly philopatric bat species *Thyroptera tricolor*- Molecular Ecology 23, pp 464-480.

Charrier I., Mathevon, N., Jouventin, P. (2003). Vocal signature recognition of mothers by fur seal pups. Animal Behavior. 65, 543 -550.

Chaverri G., Gillam E.H. (2010). Cooperative signaling behavior of roost location in a leaf-roosting bat. Communicative & Integrative Biology. 3:6, 599-601.

Chaverri G., Gillam, E. H. (2013). Sound amplification by means of a horn-like roosting structure in Spix's disc-winged bat. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 280(1772), 20132362.

Chaverri G., Gillam E.H. (2015). Repeatability in the contact calling system of Spix's disc-winged bat (*Thyroptera tricolor*). Royal Society Open Science, 2:140197.

Chaverri G., Gillam E.H., Vonhof, M.J. (2010). Social calls used by a leaf-roosting bat to signal location. *Biology Letters*, 6, 441e444.

Chaverri G., Gillam E.H., Kunz T.H. (2013). A call-and-response system facilitates group cohesion among disc-winged bats. *Behavioral Ecology*, 24: 481-487.

Chaverri G., Kunz T.H. (2011a). Response of a Specialist Bat to the Loss of a Critical Resource. *PLoS ONE* 6(12): e28821. doi:10.1371/journal.pone.0028821.

Chaverri G., Kunz T.H. (2011b). All-offspring natal philopatry in a neotropical bat. *Anim Behav* 82:1127–1133.

Clayton N.S., Emery N.J. (2007). The social life of corvids. *Current Biology*. 17 , R652 - R656.

Foster E.A., Franks D.W., Morrell L.J., Balcomb K.C., Parsons K.M., van Ginneken A., Croft D.P. (2012). Social network correlates of food availability in an endangered population of killer whales, *Orcinus orca*. *Anim Behav*. 83:731–736.

Gillam H.E., Chaverri G. (2012). Strong individual signatures and weaker group signatures in contact calls of Spix's disc-winged bat, *Thyroptera tricolor*. *Animal Behaviour* 83: 269-276.

Gillam E.H., Fenton M.B. (2016). Role of acoustic social communication in the lives of bats. In: Fenton M.B., Grinnell A.D., Popper A.N., Fay R.R. (eds) *Bat bioacoustics*. Springer, New York, NY.

Hiryu S., Katsura K., Nagato T., Yamazaki H., Lin L. K., Watanabe Y., Riquimaroux H. (2006). Intra-individual variation in the vocalized frequency of the Taiwanese leaf-nosed bat, *Hipposideros terasensis*, influenced by conspecific colony members. *Journal of Comparative Physiology A, Sensory Neural and Behavioral Physiology*, 192, 807e815.

Huang C.C. (2009). Knowledge sharing and group cohesiveness on performance: anempirical study of technology R and D teams in Taiwan. *Technovation*. 29:786–797.

McArthur P.D. (1982). Mechanisms and development of parent-young vocal recognition in the piñon jay (*Gymnorhinus cyanocephalus*). *Animal Behavior*, 30, 62 - 74.

McCracken G.F., Wilkinson G.S. (2000). Bat mating systems. In: Chrichton E.G., Krutzsch P.H. (eds) *Reproductive biology of bats*. Academic Press, London, pp 321–362.

Melendez K.V., Jones D.L., Feng A.S. (2006). Classification of communication signals of the little brown bat. *Journal of the Acoustical Society of America*, 120, 1095e1102.

Nowak M.A. (2012). Evolving cooperation. *J Theor Biol.* 299:1–8. Rendall D., Rodman P. S., Emond R. E. (1996). Vocal recognition of individuals and kin in free-ranging rhesus monkeys. *Animal Behaviour*, 51, 1007–1015.

Rendall D., Owren M.J. (2002). Animal vocal Communication: say what? En M., Bekoff C., Allen G.M. Burghardt (Eds.), *The cognitive animal*. Cambridge, MA: The MIT Press, pp. 307 - 313.

Sharp S.P., McGowan A., Wood M.J., Hatchwell B. (2005). Learned kin recognition cues in a social bird. *Nature*. 434, 1127 - 1130.

Smith, H. J., Newman J.D., Bernhards D.E., Symmes D. (1983). Effects of reproductive state on vocalizations in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). *Folia Primatologica*, 40: 233–246.

Sugiura H., Shimooka Y., Tsuji Y. (2011). Variation in spatial cohesiveness in a group of Japanese macaques (*Macaca fuscata*). *Int J Primat.* 32:1348–1366.

Vignal C., Mathevon, N., Mottin S. (2008). Mate recognition by female zebra finch: analysis of individuality in male call and first investigations on female decoding process. *Behavioral Processes*, 77, 191 - 198.

Vonhof M.J., Fenton M.B. (2004). Roost availability and population size of *Thyroptera tricolor*, a leaf-roosting bat, in northeastern Costa Rica. *J Trop Ecol.* 20:291–305.

Vonhof M.J., Whitehead H., Fenton M.B. (2004). Analysis of Spix's disc-winged bat association patterns and roosting home ranges reveal a novel social structure among bats. *Anim Behav.* 68:507–521.

Wilson D.E., Findley J.S. (1977) *Thyroptera tricolor*. *Mamm Species* 71: 1–3.

CAPÍTULO 1.

Seasonality in the Emission of Contact Calls in Spix's Disc-Winged Bats (*Thyroptera tricolor*) suggests a Potential Role in Mate Attraction

(Publicado en la revista Acta Chiropterologica)

ABSTRACT: Multiple studies show that animals exhibit consistent individual differences in behavior, but they also experience short-term changes in their behavioral responses associated with seasonal events, most notably reproduction. We compare calling rates between the breeding and non-breeding seasons, and between males and females, in Spix's disk-winged bats (*Thyroptera tricolor*). This species performs an exchange of inquiry and response calls in a context of social coordination and these vocalizations are used by individuals to signal roost location. Our results indicate that during the breeding season all males vocalize and also emit a greater number of response calls. In females, we found that there is no significant difference in their vocal behavior during the breeding and non-breeding seasons. Even though being vocal leads to greater energy costs and risk of predation, males were more vocal and emitted more vocalizations when females are known to be ovulating. Therefore, our results suggest that response calls may not only facilitate group cohesion, as found in previous studies, but that it may also play a role in courtship.

KEYWORDS: acoustics, communication, mating season, social calls, *Thyroptera tricolor*

INTRODUCTION

Compared to morphological traits, behavior is a highly variable phenotypic trait, allowing individuals to respond quickly and adaptively to external stimuli (Briffa *et al.*, 2008; Kight *et al.*, 2013; Dall *et al.*, 2004). Despite this flexibility, multiple studies show that there are consistent behavioral differences in many contexts, thus animals have personalities (Wolf and Weissing, 2012). For example, some individuals are consistently more exploratory than others (Mettke-Hofmann *et al.*, 2006), shyer or bolder (Wilson and Stevens, 2005), and more aggressive or voracious (Pintor *et al.*, 2008). These consistent differences in behavioral traits among conspecifics may be explained by shared ancestry (Yurk *et al.*, 2002), learning (Crockford *et al.*, 2004), social environment (Gros-Louis *et al.*, 2008) and parental effects (Carter *et al.*, 2012). Despite mounting evidence of consistent individual differences in behavior, animals also experience short and long-term changes in their behavioral responses. An individual's behavior often changes with age (Riopelle and Rogers, 1965; Bartus *et al.*, 1978; Van Horn *et al.*, 2003), or with its position within the group's hierarchy (Engh *et al.*, 2000; Johnson-Ulrich and Holekamp, 2020). Some of the factors that cause intra-individual differences in behavior, especially in relation to seasonal phenomena, are rarely studied in natural populations because recapturing the same individuals over long periods of time is often not possible.

One of the factors known to be responsible for seasonal changes in behavior is the onset of reproductive activities, as these affect the production of hormones known to influence various aspects of an individual's behavior (Stacey, 2003; Adkins-Regan, 2005). For example, it is known that during the reproductive season, warblers (*Protonotaria citrea*) exhibit intersexual variation in foraging behavior (Petit *et al.*, 1990). In ring-tailed lemurs (*Lemur catta*), males exhibit higher degrees of aggressiveness during the reproductive season (Cavigelli and Pereira, 2000). In other animals, such as the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*), it is known that during the reproductive season males vary their call production, specifically increasing their vocalization rates (Smith *et al.*, 1983). Therefore, despite an overall consistency in behavioral differences, we still often see variation in behaviors within and between individuals over time, which demonstrates the need to incorporate

seasonality in our studies of animal behavior to get a more comprehensive view of animal personalities (Briffa *et al.*, 2008; Rieucou *et al.*, 2010; Dingemanse *et al.*, 2012).

We study the effect of seasonality, specifically focusing on the mating and non-mating seasons, on social call production in Spix's disc-winged bat, *Thyroptera tricolor*. This Neotropical insectivorous species forms small and cohesive groups composed of highly philopatric and, thus, related males and females that mate once a year outside their social group (Chaverri, 2010; Chaverri and Kunz, 2011; Buchalski *et al.*, 2014). Individuals perform an exchange of social calls that facilitate contact with group members and recruitment to roosting sites. Two types of calls have been identified: (1) the inquiry call emitted by those individuals who are flying in search of a roost, and (2) the response call emitted by those individuals that have already located and occupied a roost (Chaverri *et al.*, 2010). To date, there is evidence that a greater proportion of males, both reproductively active and inactive, produce response calls compared to females (Chaverri and Gillam, 2015; Sagot *et al.*, 2018), and that they also produce a larger number of calls (Chaverri *et al.*, 2020). Previous studies also indicate that lactating females are less likely to respond compared to non-reproductive females (Chaverri and Gillam, 2015). However, we do not yet know if there are differences in response calling rates between males and females during the mating period compared to the non-mating period.

Although *T. tricolor* response calls are not known to be used in a context other than maintaining group cohesion, demonstrating that there are differences in response calling rates according to the reproductive season would allow us to determine if these signals could play a role during mate attraction and/or copulation, perhaps as a courtship signal. Therefore, the objective of this study is to evaluate the role that sex and reproductive condition have in the production of response calls in *T. tricolor*. Our hypothesis is that contact calls play a role in mate attraction. We expect to find that males will emit a greater number of contact calls during the mating season, as has been observed in other groups of mammals such as deer (De Vos *et al.*, 1967), walruses (Sjare *et al.*, 2003), whales (Darling *et al.*, 2006), and primates (Delgado, 2006).

MATERIALS AND METHODS

Study Area

Study Area This study was done at the Barú Biological Station, which is located in the southern Pacific coastal region of Costa Rica in the Paso de la Danta Biological Corridor (9°15'42.88"N, 83°52'16.85"W) at 12 m a.s.l. (meters above sea level) in the province of Puntarenas. The refuge is 1.5 km from the Barú river located in the city of Dominical and has about 330 ha of protected areas, including 3 km of beach and 1 km of riverbanks. This place has tropical rainforest, swamp forests, mangroves, estuaries, riverbanks and sea shores, on which large patches of *Heliconia* spp. and *Calathea* spp. are common. These patches are used as roosts by our study species, *T. tricolor*. Field data collection was carried out between August and December 2018.

Capturing and Tagging Bats

It is assumed that all individuals within the same roost (i.e., developing tubular leaves in plants such as *Heliconia* spp. or *Calathea* spp.) form the same social group (Chaverri and Gillam, 2013). All individuals living in the same roost were captured by obstructing the top of the leaf to prevent their escape and inserting the leaf into a plastic bag. The animals were then placed in a cloth bag, in which they were kept in shaded and ventilated areas within the Barú Biological Station. For all individuals, sex, age and reproductive condition were evaluated (Chaverri and Vonhof, 2011). A small PIT tag (passive integrated transponder), measuring 8.4 mm in length, was inserted subcutaneously in the mid dorsal area of all bats captured (Mini HPT8 model — Biomark, Boise, Idaho, USA). This allowed us to identify each individual by means of a unique code carried by each transponder. An electronic reader (HPR Plus — Bio mark) was used to read the transponders and to confirm whether or not individuals had been subject to any previous experiment. All capture locations were recorded and stored in the reader.

Recording of Response Calls

We evaluated whether the vocal behavior of males and females differed between the mating and non-mating seasons. Previous studies show that female *T. tricolor* ovulate in August (Findley and Wilson, 1974), which coincides with observations of scrotal males that have swollen and descended testicles (Chaverri and Vonhof, 2011) indicative of spermatogenesis (Racey, 1988). Therefore, from August to September, both males and females were classified as sexually active (mating season), where - as from October to December they were classified as inactive as males were no longer scrotal (non-mating season). As estrous cannot be established from external morphological characteristics in females, it is possible that some of them were recorded during early gestation; however, none showed signs of pregnancy (i.e., enlarged abdomen). Because bats only produce response calls after an inquiry call has been emitted (Chaverri *et al.*, 2010), inquiry calls that were previously recorded during the non-mating season (Fig. 1.1) were played back through an UltraSoundGate Player (model 216H — Avisoft Bioacoustics, Glienike/Nordbahn, Germany) with an omnidirectional ultrasonic speaker (Vifa, Avisoft Bioacoustics). Inquiry calls were recorded using a condenser microphone (model CM16 — Avisoft Bioacoustics) through an Avisoft UltraSoundGate 116Hm connected to a laptop computer running Avisoft-Recorder software (sampling rate of 375 kHz, 16-bit amplitude resolution).

Able inquiry calls (i.e., those with good signal-to-noise ratios) from 36 individuals to create 10 playback sequences. These 1-minute sequences were composed of eight inquiry calls from different groups with four from females and four from males. The order in which these calls were presented was randomized, but we used the same eight calls to prompt response calling for each test subject. Each experimental bat was tested a total of three times, each time with the same calls presented in different orders (Fig. 1.2).

For the response calling experiment, we placed each experimental bat inside a plastic tubular structure where it could roost in a normal position, and covered the entrance with mesh to prevent the bat's escape. After the bat had time to settle, we started our playback experiments by broadcasting the three sequences; each new sequence was broadcast immediately after the previous one (Fig. 1.3). A total of 79 individuals were tested to gauge response calling and we counted the number of response calls emitted using SASLab Pro

(Avisoft Bioacoustics) software. We used the maximum number of calls given in a single session for further analyses. At the end of the experiments, individuals were fed *Tenebrio molitor* mealworm larvae and given water. Bats were released at their capture site.

Statistical Analyses

The maximum number of calls were analyzed using a generalized linear model with a Poisson distribution. We evaluated whether sex and reproductive status affected the maximum number of response calls emitted. Response call rate was used as a dependent variable in the model, whereas reproductive condition and sex were the independent variables. We did not add group as a random variable in the model because an ANOVA done separately for males and females showed no differences in the number of calls emitted among these groups (♀♀: $F_{12, 25} = 1.55$, $P = 0.17$; ♂♂: $F_{9, 31} = 1.06$, $P = 0.41$). A chi-square test was also performed to evaluate whether the proportion of vocal (i.e., producing at least one response call) or non-vocal animals was different between males and females during the reproductive and non-reproductive seasons. All statistical analyses were performed in InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2018).

Ethical Note

All sampling protocols followed guidelines approved by the American Society of Mammalogists for capture, handling and care of mammals (Sikes *et al.*, 2016) and the ASAB/ABS Guidelines for the Use of Animals in Research. This study was conducted in accordance with the ethical standards for animal welfare of the Costa Rican Ministry of Environment and Energy, Sistema Nacional de Áreas de Conservación, permit no. SINAC-ACOPAC-RES-INV-008-2017 (Decree No. 32553-MINAE). Protocols were also approved by the University of Costa Rica's Institutional Animal Care and Use Committee (CICUA-42-2018).

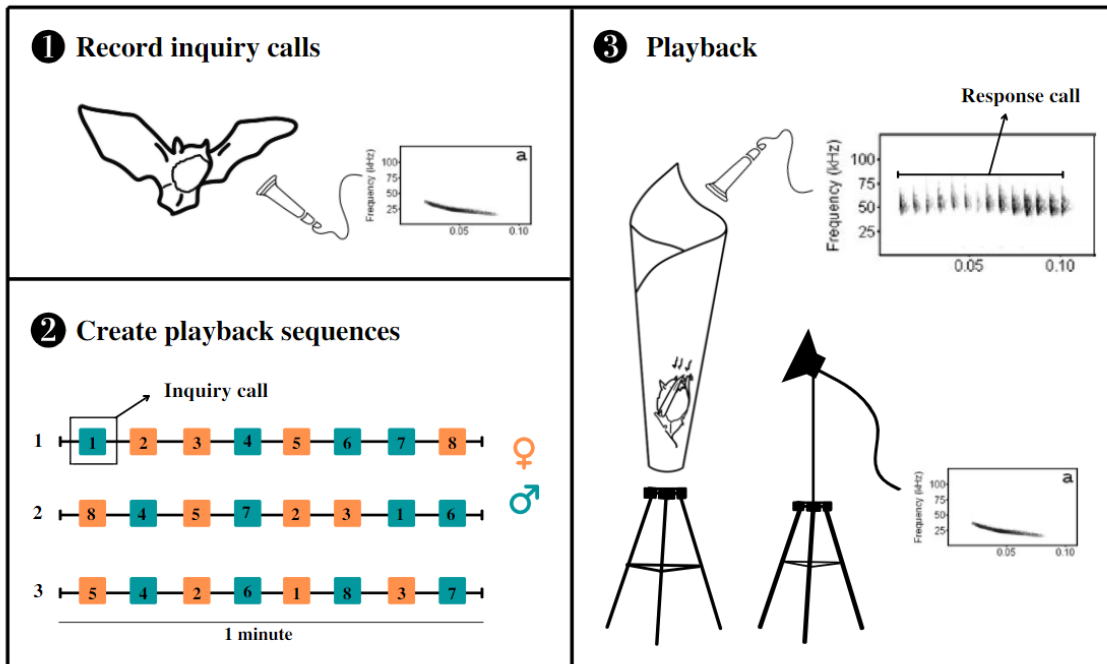


Fig. 1. Summary of the procedures used during playback experiments on *T. tricolor*. 1 — We first recorded inquiry calls from bats flying in a flight cage; 2 — Those inquiry calls were then used to create three 1-min playback sequences with eight different calls from four males and four females; 3 — Playback experiments were done by placing the experimental bat individually in a plastic tube, and then we broadcast the three sequences and recorded the response calls emitted by the roosting bat.

RESULTS

General Behavior

We tested 15 individuals on different occasions separated by 3–11 days. Based on these initial experiments we found that performing successive repetitions of the playback test to a given individual quickly decreased the number of response calls emitted. A generalized

linear model with a negative binomial distribution was applied to explain the variation in the number of response calls through an increased number of tests per individual. The response variable was the maximum number of calls recorded, whereas test number (1, 2, 3 or 4) and bat identity were used as the fixed and random variables, respectively. We found that there was a significant decrease in the production of response calls as we increased the number of tests in a single bat ($F_{2, 14} = 7.68$, $P < 0.01$). After two consecutive tests performed over short time periods of approximately three days, we found that individuals stopped responding (Fig. 2). Therefore, the 15 individuals captured during the initial stages of our project were not used for the experiments on response calling during the mating and non-mating seasons.

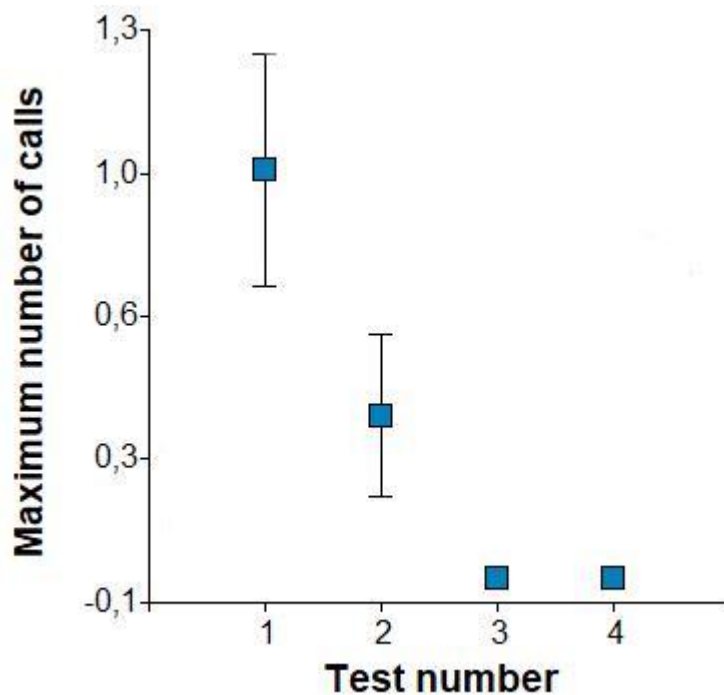


Fig. 2. Maximum number of response calls emitted by the same individuals of *T. tricolor*, with increasing number of replicate tests.

Response Calling During the Mating and Nonmating Seasons

We analyzed a total of 42 individuals that were classified as reproductively active (24 males and 18 females captured during the mating season) and a total of 37 individuals classified as inactive (17 males and 20 females captured during the nonmating season). Our generalized linear model, to explain the variation in the maximum number of response calls produced, shows that the interaction between sex and reproductive status is significant ($F_{1, 75} = 20.55, P < 0.01$). Reproductively active males produced more calls than inactive males; the latter produced a similar number of calls as both reproductively active and inactive females (Fig. 3). Active males produced an average of 5.8 response calls, while the remaining individuals produced between 2 and 2.6 response calls. We found that in the mating season, 67% of the females were non-vocal, whereas in the non-mating season 60% were non-vocal, but there was no significant statistical difference between the seasons ($\chi^2 = 0.18, \text{d.f.} = 1, P = 0.67$). We found that only 35% of males were vocal in the non-mating season; however, in the mating season, 100% of males vocalized. There was a significant difference in the percentage of vocal and non-vocal males between both periods ($\chi^2 = 21.22, \text{d.f.} = 1, P < 0.001$).

DISCUSSION

We tested whether sex and reproductive condition affected the number of vocalizations emitted by *T. tricolor* in the context of social coordination. We found that males emitted a greater number of response calls during the mating season, corroborating our initial hypothesis. This trend, that males vocalize more during the mating season, has been observed in birds such as brown-headed cowbirds (*Molothrus ater* — West *et al.*, 1998) and in mammals such as lemurs (*Microcebus murinus* — Zimmermann and Lerch, 1993), primates (e.g., orangutan *Pongo pygmaeus* — Mitani, 1985), howler monkeys (*Alouatta* spp. — Carpenter, 1935), and seals (*Erignathus barbatus* — Van Parjjs *et al.*, 2003). Even in other bat species, such as the common pipistrelle (*Pipistrellus pipistrellus* — Budenz *et al.*, 2009), hammer-headed bat (*Hypsignathus monstrosus* — Bradbury, 1977), sheath-tailed bat (*Coleura seychellensis* — Gerlach, 2009), and greater sac-winged bat (*Saccopteryx bilineata* — Behr and von Helversen, 2004), it has been shown that males emit a greater number of vocalizations during the mating season.

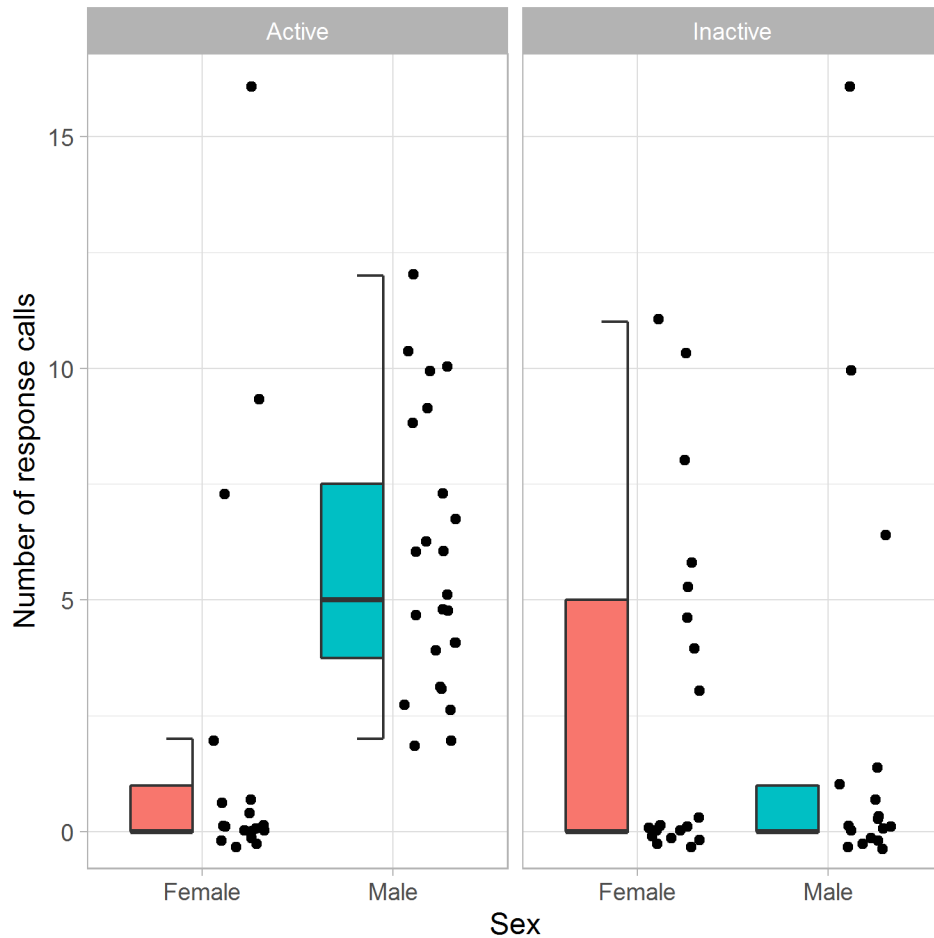


Fig. 3. Box plots showing the number of response calls emitted according to the sex and reproductive condition (active or inactive) of individuals of *T. tricolor*. Black dots on the right of each box show the distribution of values

In *T. tricolor*, social groups are composed of a combination of vocal and non-vocal individuals in the context of response calling (Chaverri *et al.*, 2020). Consequently, about 50% of individuals respond when hearing an inquiry call, whereas the remainder do not vocalize (Chaverri and Gillam, 2015; Sagot *et al.*, 2018). However, our results indicate that, during the reproductive season when females are known to be ovulating (Findley and

Wilson, 1974), all males produce response calls, while males in the non-reproductive season responded in a similar proportion to reproductively active and inactive females. The emission of contact calls is an energetically costly activity in *T. tricolor* and other taxa ((Ryan, 1988; Prestwich, 1994; Noren *et al.*, 2013; Chaverri *et al.*, 2021), and it has been shown that the energetic demand can be up to eight times higher in animals that vocalize compared to those that remain silent (Ophir *et al.*, 2010). For example, vocalizations emitted by amphibians such as gray treefrogs (*Hyla versicolor*) are one of the most energetically expensive activities in vertebrates (Taigen and Wells, 1985). In some mammals such as rock hyrax (*Procavia capensis*), the vocalizations emitted by males require a significant energy expenditure (Ilany *et al.*, 2013), and in birds the production of songs carries a significant metabolic cost (Oberweger and Goller, 2001). Vocalizing also puts individuals at greater risk of being detected by predators (Mougeot and Bretagnolle, 2000; Krams, 2001). The latter explains why some individuals do not vocalize more frequently, and indicates that sound production should be focused on activities that represent a clear fitness benefit (Amorim *et al.*, 2002). Our results provide the first evidence that response calls of *T. tricolor* may not only serve the social functions of recruitment and group cohesion (Chaverri *et al.*, 2013), but also carry importance in a reproductive context, as these energetically costly calls are produced more often in the mating season.

Males may be vocal and produce a larger number of calls during the mating season as this might increase their chances of attracting potential partners. In other mammals, such as deer, it has been found that males that begin vocal activity earlier and emit more vocalizations during the reproductive season are more likely to mate successfully (Mcelligott *et al.*, 1999). Similarly, it has been found that in some primates, males that vocalize more during the mating season are the most likely to reproduce (Delgado, 2006). In other bat species, such as *S. bilineata*, males have a greater vocal repertoire, emit a greater number of vocalizations during the mating season, and have a greater number of females in their territories (Davidson and Wilkinson, 2004). This suggests that for *T. tricolor* males, being vocal, but also emitting a greater number of vocalizations, might ensure greater reproductive success. This is something that should be tested in future studies to reinforce our hypothesis of the potential role of response calls as courtship signals in *T. tricolor*.

To test the effect of reproductive season on the production of response calls, our initial objective was to compare how the same individuals responded at different reproductive stages. However, we found that individuals who were recaptured and tested several times in close succession (three days) failed to respond. It has been reported that successive repetitions of a stimulus can decrease an individual's response to it (Henderson, 1990; Kabadayi *et al.*, 2017), since learning and habituation to a test that has been replicated several times can decrease the novelty of the stimulus (Greenberg and MettkeHofmann, 2001; Wahlsten, 2001). This meant that after individuals stopped responding, we needed to perform our tests only with previously untested individuals. Therefore, no recaptures were possible to compare an individual's vocal behavior in different breeding seasons, which would have strengthened our conclusions. Despite the latter, our work provides strong evidence for our main conclusion, that vocal behavior for response calling differs significantly among males and females for the mating and non-mating seasons, particularly in light of previous findings on calling rates in *T. tricolor* (Chaverri and Gillam, 2010; Chaverri *et al.*, 2020).

In conclusion, our study provides the first evidence that response calls can have a function in reproduction in *T. tricolor*. Many studies to date have begun to shed light into the behavioral contexts in which specific acoustic signals are emitted in bats, but this is often accomplished with great difficulty given the nocturnal and mobile nature of these mammals. By studying how calling rates differ by season, we are providing new evidence that a call with an already well-established role in maintaining contact between group members may have another role during the mating season. In other mammals, studies have shown similar trends. In coyotes (*Canis latrans*), individuals typically vocalize year-round to maintain territory boundaries, but calling rates increase during the mating season. Vocalizations increase most likely to facilitate pair-bonding (Gese and Ruff, 1998), and changes could be attributed to seasonal fluctuations in estrogen or testosterone levels (Terkel *et al.*, 1976). In our study, we have chosen to evaluate differences in emission rates only for response calls, but it could also be of interest to evaluate seasonal differences in the emission of inquiry calls because *T. tricolor* does not produce response calls without a previous inquiry call (Chaverri *et al.*, 2010). For example, if response calls allow males to attract females, do the latter modify their inquiry call parameters during the mating season

to more strongly prompt responses from males? An answer to this and other questions will continue to strengthen our understanding of acoustic communication in general, and more specifically in bats.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Zeltia López for valuable help during field work, and Ronald Villalobos for logistics support. We also thank Julio Bustamante and Lilliana Rubí Jimenez for their help during research permit application. Finally, we thank the Centro Biológico Hacienda Barú for their continuous support of our research.

LITERATURE CITED

- ADKINS-REGAN, E. 2005. Hormones and animal social behavior. Princeton University Press, Princeton, NY, 416 pp.
- AMORIM, M. C. P., M. L. MCCRACKEN, and M. L. FINE. 2002. Metabolic costs of sound production in the oyster toadfish, *Opsanus tau*. *Canadian Journal of Zoology*, 80: 830–838.
- BARTUS, R. T., D. FLEMING, and H. R. JOHNSON. 1978. Aging in the rhesus monkey: debilitating effects on short-term memory. *Journal of Gerontology*, 33: 858–871.
- BEHR, O., and O. VON HELVERSEN. 2004. Bat serenades—complex courtship songs of the sac-winged bat (*Saccopteryx bilineata*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 56: 106–115.
- BRADBURY, J. W. 1977. Lek mating behavior in the hammerheaded bat. *Zeitschrift für Tierpsychologie*, 45: 225–255.
- BRIFFA, M., S. D. RUNDLE, and A. FRYER. 2008. Comparing the strength of behavioral plasticity and consistency across situations: animal personalities in the hermit crab *Pagurus bernhardus*. *Proceedings of the Royal Society*, 275B: 1305–1311.

BUCHALSKI, M. R., G. CHAVERRI, and M. J. VONHOF. 2014. When genes move farther than offspring: gene flow by male gamete dispersal in the highly philopatric bat species *Thyroptera tricolor*. *Molecular Ecology*, 23: 464–480.

BUDENZ, T., S. HEIB, and J. KUSCH. 2009. Functions of bat social calls: the influence of local abundance, interspecific interactions and season on the production of pipistrelle (*Pipistrellus pipistrellus*) type D social calls. *Acta Chiropterologica*, 11: 173–182.

CARPENTER, C. R. 1935. A field study of the behavior and social relations of howling monkeys. *Comparative Psychology Monographs*, 19: 1–168.

CARTER, G. G., R. LOGSDON, B. D. ARNOLD, A. MENCHACA, and R. A. MEDELLIN. 2012. Adult vampire bats produce contact calls when isolated: acoustic variation by species, population, colony, and individual. *PLoS ONE*, 7: e38791.

CAVIGELLI, S. A., and M. E. PEREIRA. 2000. Mating season aggression and fecal testosterone levels in male ring-tailed lemurs (*Lemur catta*). *Hormones and Behavior*, 37: 246–255.

CHAVERRI, G. 2010. Comparative social network analysis in a leaf-roosting bat. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 64: 1619–1630.

CHAVERRI, G., and E. H. GILLAM. 2010. Cooperative signaling behavior of roost location in a leaf-roosting bat. *Communicative & Integrative Biology*, 3: 599–601.

CHAVERRI, G., and E. H. GILLAM. 2013. Sound amplification by means of a horn-like roosting structure in Spix's disc-winged bat. *Proceedings of the Royal Society*, 280B: 20132362.

CHAVERRI, G., and E. H. GILLAM. 2015. Repeatability in the contact calling system of Spix's disc-winged bat (*Thyroptera tricolor*). *Royal Society Open Science*, 2: 1–11.

CHAVERRI, G., and T. H. KUNZ. 2011. All-offspring natal philopatry in a neotropical bat. *Animal Behavior*, 82: 1127–1133.

CHAVERRI, G., and M. J. VONHOF. 2011. Reproduction and growth in a neotropical insectivorous bat. *Acta Chiropterologica*, 13: 147–155.

CHAVERRI, G., E. H. GILLAM, and M. J. VONHOF. 2010. Social calls used by a leaf-roosting bat to signal location. *Biology Letters*, 6: 441–444.

CHAVERRI, G., E. H. GILLAM, and T. H. KUNZ. 2013. A call-and-response system facilitates group cohesion among disc-winged bats. *Behavioral Ecology*, 24: 481–487.

CHAVERRI, G., Y. G. ARAYA-AJOY, and M. SAGOT. 2020. Contact calling in context: Intra and intergroup variation in vocalization rates depend on a call's function. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 74: 57.

CHAVERRI, G., N. I. SANDOVAL-HERRERA, P. ITURRALDE-PÓLIT, A. ROMERO-VÁSQUEZ, S. CHAVES-RAMÍREZ, and M. SAGOT. 2021. The energetics of social signaling during roost location in Spix's disc-winged bats. *Journal of Experimental Biology*, 224: jeb238279.

CROCKFORD, C., I. HERBINGER, L. VIGILANT, and C. BOESCH. 2004. Wild chimpanzees produce group-specific calls: a case for vocal learning? *Ethology*, 110: 221–243.

DALL, S. R. X., A. I. HOUSTON, and J. M. MCNAMARA. 2004. The behavioural ecology of personality: consistent individual differences from an adaptive perspective. *Ecology Letters*, 7: 734–739.

DARLING, J. D., M. E. JONES, and C. P. NICKLIN. 2006. Hump-back whale songs: do they organize males during the breeding season? *Behaviour*, 143: 1051–1101.

DAVIDSON, S. M., and G. S. WILKINSON. 2004. Function of male song in the greater white-lined bat, *Saccopteryx bilineata*. *Animal Behaviour*, 67: 883–891.

DELGADO, R. A. 2006. Sexual selection in the loud calls of male primates: signal content and function. *International Journal of Primatology*, 27: 5–25.

DE VOS, A., P. BROKX, and V. GEIST. 1967. A review of social behavior of the North American cervids during the reproductive period. *American Midland Naturalist*, 77: 390–417.

DINGEMANSE, N. J., K. M. BOUWMAN, M. VAN DE POL, T. VAN OVERVELD, S. C. PATRICK, E. MATTHYSEN, and J. L. QUINN. 2012. Variation in personality and behavioral plasticity across four populations of the great tit *Parus major*. *Journal of Animal Ecology*, 81: 116–126.

DI RIENZO, J. A., F. CASANOVES, M. G. BALZARINI, L. GONZA - LEZ, M. TABLADA, and C. W. ROBLEDO. 2018. InfoStat version 2018. InfoStat Transfer Center, Faculty of Agricultural Sciences, National University of Córdoba, Argentina. Available at <http://www.infostat.com.ar>.

ENGH, A. L., K. ESCH, L. SMALE, and K. HOLEKAMP. 2000. Mechanisms of maternal rank inheritance in the spotted hyaena, *Crocuta crocuta*. *Animal Behaviour*, 60: 323–332.

FINDLEY, J. S., and D. E. WILSON. 1974. Observations on the Neotropical disk-winged bat, *Thyroptera tricolor* Spix, *Journal of Mammalogy*, 55: 562–571.

GERLACH, J. 2009. Social vocalizations in the Seychelles sheath-tailed bat *Coleura seychellensis*. *Le Rhinolophe*, 18: 1–6. GESE, E. M., and R. L. RUFF. 1998. Howling by coyotes (*Canis latrans*): variation among social classes, seasons, and pack sizes. *Canadian Journal of Zoology*, 76: 1037–1043.

GREENBERG, R., and C. METTKE-HOFMANN. 2001. Ecological aspects of neophobia and neophilia in birds. *Current Ornithology*, 16: 119–178.

GROS-LOUIS, J. J., S. E. PERRY, C. FICHTEL, E. WIKBERG, H. GIL - KENSON, S. WOFSY, and A. FUENTES. 2008. Vocal repertoire of *Cebus capucinus*: acoustic structure, context, and usage. *International Journal of Primatology*, 29: 641–670.

HENDERSON, N. D. 1990. Quantitative genetic analysis of neurobehavioral phenotypes. Pp. 283–397, in *Developmental behavior genetics: neural, biometrical, and evolutionary*

approaches (M. E. HAHN, J. K. HEWITT, N. D. HENDERSON, and R. BENNO, eds.). Oxford University Press, London, 352 pp.

ILANY, A., A. BAROCAS, M. KAM, T. ILANY, and E. GEFFEN. 2013. The energy cost of singing in wild rock hyrax males: evidence for an index signal. *Animal Behaviour*, 85: 995–1001.

JOHNSON-ULRICH, L., and K. E. HOLEKAMP. 2020. Group size and social rank predict inhibitory control in spotted hyaenas. *Animal Behaviour*, 160: 157–168.

KABADAYI, C., A. KRASHENINNIKOVA, L. O'NEILL, J. VAN DE WEIJER, M. OSVATH, and A. M. P. VON BAYERN. 2017. Are parrots poor at motor self-regulation or is the cylinder task poor at measuring it? *Animal Cognition*, 20: 1137–1146.

KIGHT, C. R., D. MORGAN, and S. R. X. DALL. 2013. The Evolution of animal personality variation. Pp. 1–8, in *Encyclopedia of life sciences* (H. KEHRER-SAWATZKI, ed.), John Wiley and Sons Ltd., Chichester.

KRAMS, I. 2001. Communication in crested tits and the risk of predation. *Animal Behaviour*, 61: 1065–1068. MCELLIGOTT, A. G., K. P. O'NEIL, and T. J. HAYDEN. 1999. Cumulative long-term investment in vocalization and mating success of fallow bucks, *Dama dama*. *Animal Behaviour*, 57: 1159–1167.

METTKE-HOFMANN, C., K. C. ROWE, T. J. HAYDEN, and V. CANOINE. 2006. Effects of experience and object complexity on exploration in garden warblers (*Sylvia borin*). *Journal of Zoology* (London), 268: 405–413.

MITANI, J. C. 1985. Sexual selection and adult male orangutan long calls. *Animal Behaviour*, 33: 272–283.

MOUGEOT, F., and V. BRETAGNOLLE. 2000. Predation as a cost of sexual communication in nocturnal seabirds: an experimental approach using acoustic signals. *Animal Behaviour*, 60: 647–656.

NOREN, D. P., M. M. HOLT, R. C. DUNKIN, and T. M. WILLIAMS. 2013. The metabolic cost of communicative sound production in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Journal of Experimental Biology*, 216: 1624–1629.

OBERWEGER, K., and F. GOLLER. 2001. The metabolic cost of birdsong production. *Journal of Experimental Biology*, 204: 3379–3388.

OPHIR, A. G., S. B. SCHRADER, and J. F. GILLOOLY. 2010. Energetic cost of calling: general constraints and species-specific differences. *Journal of Evolutionary Biology*, 23: 1564–1569.

PETIT, L. J., D. R. PETIT, K. E. PETIT, and W. J. FLEMING. 1990. Intersexual and temporal variation in foraging ecology of prothonotary warblers during the breeding season. *The Auk*, 107: 133–145.

PINTOR, L. M., A. SIH, and M. L. BAUER. 2008. Differences in aggression, activity and boldness between native and introduced populations of an invasive crayfish. *Oikos*, 117: 1629–1636.

PRESTWICH, K. N. 1994. The energetics of acoustic signaling in anurans and insects. *American Zoologist*, 34: 625–643.

RACEY, P. A. 1988. Reproductive assessment in bats. Pp. 31–45, in *Ecological and behavioral methods for the study of bats* (T. H. KUNZ, ed.). Smithsonian Institution Press, Washington, D.C., 920 pp.

RIEUCAU, G., J. MORAND-FERRON, and L. A. GIRALDEAU. 2010. Group size effect in nutmeg mannikin: between-individuals behavioral differences but same plasticity. *Behavioral Ecology*, 21: 684–689.

RIOPELLE, A. J., and C. M. ROGERS. 1965. Age changes in chimpanzees. Pp. 449–462, in *Behavior of nonhuman primates*. Volume 2 (A. M. SCHRIER, H. F. HARLOW, and F. STOLLNITZ, eds.). Academic Press, New York, 668 pp.

RYAN, M. J. 1988. Energy, calling and selection. *American Zoologist*, 28: 885–898.

SAGOT, M., C. R. SCHÖNER, A. J. JAGO, I. RAZIK, and G. CHA - VERRI. 2018. The importance of group vocal behavior in roost finding. *Animal Behaviour*, 142: 157–164.

SIKES, R. S., and THE ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE OF THE AMERICAN SOCIETY OF MAMMALOGISTS. 2016. Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research and education. *Journal of Mammalogy*, 97: 663–688.

SJARE, B., I. STIRLING, and C. SPENCER. 2003. Structural variation in the songs of Atlantic walrus breeding in the Canadian High Arctic. *Aquatic Mammals*, 29: 297–318.

SMITH, H. J., J. D. NEWMAN, D. E. BERNHARDS, and D. SYMMES. 1983. Effects of reproductive state on vocalizations in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). *Folia Primatologica*, 40: 233–246.

STACEY, N. 2003. Hormones, pheromones and reproductive behavior. *Fish Physiology and Biochemistry*, 28: 229–235.

TAIGEN, T. L., and K. D. WELLS. 1985. Energetics of vocalization by an anuran amphibian (*Hyla versicolor*). *Journal of Comparative Physiology B*, 155: 163–170.

TERKEL, A. S., C. L. MOORE, and C. G. CERVEZA. 1976. The effects of testosterone and estrogen on the rate of long-calling vocalization in juvenile laughing gulls, *Larus atricilla*. *Hormones and Behavior*, 7: 49–57.

VAN HORN, R. C., T. L. MCELHINNY, and K. E. HOLEKAMP. 2003. Age estimation and dispersal in the spotted hyena (*Crocuta crocuta*), *Journal of Mammalogy*, 84: 1019–1030.

VAN PARJIS, S. M., C. LYDERSEN, and K. M. KOVACS. 2003. Vocalizations and movements suggest alternative mating tactics in mane bearded seals. *Animal Behaviour*, 65: 273–283.

WAHLSTEN, D. 2001. Standardizing tests of mouse behavior: reasons, recommendations and reality. *Physiology and Behavior*, 73: 695–704.

WEST, M. J., A. P. KING, and T. M. FREEBERG. 1998. Dual signaling during mating in brown-headed cowbirds (*Molothrus ater*, family Emberizidae/Icterinae). *Ethology*, 104: 250–267.

WILSON, A. D. M., and E. D. STEVENS. 2005. Consistency in context-specific measures of shyness and boldness in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Ethology*, 111: 849–862.

WOLF, M., and F. J. WEISSING. 2012. Animal personalities: consequences for ecology and evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, 27: 452–461.

YURK, H., L. BARRETT-LENNARD, J. K. B. FORD, and C. O. MATKIN. 2002. Cultural transmission within maternal lineages: vocal clans in resident killer whales in southern Alaska. *Animal Behaviour*, 66: 1103–1119.

ZIMMERMANN, E., and C. LERCH. 1993. The complex acoustic design in an advertisement call in male mouse lemurs (*Microcebus murinus*, Prosimii, Primates) and sources of its variation. *Ethology*, 93: 211–224.

CAPÍTULO 2. Señales sexuales en las llamadas de contacto en *Thyoptera tricolor* y su función en los procesos de discriminación según estado reproductivo.

RESUMEN

Para lograr un mayor éxito reproductivo, los individuos deben emplear distintas estrategias que les permitan aumentar sus probabilidades de apareamiento. En este contexto, el intercambio de señales acústicas, como las llamadas sociales, permitiría que los individuos puedan obtener información para localizar posibles parejas de apareamiento, especialmente durante la época reproductiva. En este estudio evaluamos la importancia que tienen la época reproductiva y el sexo en la emisión de llamadas sociales en el murciélago de ventosas (*Thyroptera tricolor*). Además, evaluamos si existen señales sexuales en las llamadas de consulta mediante el análisis de diferentes parámetros acústicos espectrales y Coeficientes Cepstrales en las Frecuencias de Mel. Esta es una especie que es reconocida por realizar un intercambio de llamadas de consulta y respuesta en un contexto de coordinación social. Encontramos que se pueden discriminar las llamadas de consulta entre hembras y machos mediante los diferentes parámetros acústicos evaluados. Mediante nuestro modelo de regresión de efectos mixtos multinomial Bayesiano también encontramos una tendencia a que los machos siempre respondan cuando están reproductivamente activos. Sin embargo, no se observó una mayor probabilidad de que los machos activos respondieran a hembras en comparación con la respuesta hacia otros machos. Se encontró una mayor probabilidad de que un macho responda ante el llamado de consulta de una hembra cuando este se encuentra reproductivamente activo que cuando no lo está. En la comparación de la actividad vocal de machos activos y hembras activas, encontramos que hay una mayor probabilidad de que sean los machos activos quienes respondan cuando escuchan un llamado de consulta del sexo opuesto. .

Palabras clave: comunicación acústica, parámetros acústicos, llamadas sociales, época reproductiva, *Thyroptera tricolor*

ABSTRACT

In order to achieve greater reproductive success, individuals must employ different strategies to increase their chances of mating. In this context, the exchange of acoustic signals, such as social calls, would allow individuals to obtain information to locate potential mating partners, especially during the breeding season. In this study, we assessed

the importance of breeding season and sex on the emission of social calls in Spix's disc-winged bat (*Thyroptera tricolor*). In addition, we evaluated whether by analysing different spectral acoustic parameters and Cepstral Coefficients at Mel frequencies, we can differentiate between sexes in their inquiry calls. This is a species that is known to perform an exchange of inquiry and response calls in a context of social coordination. We found that inquiry calls can be accurately discriminated by sex by means of the different acoustic parameters evaluated. Using a Bayesian multinomial mixed-effects regression model, we found a tendency for males to always respond when reproductively active. However, we did not observe an increased likelihood of active males responding to females compared to responding to other males. A male was more likely to respond to a female's inquiry call when he was reproductively active than when he was not. Comparing the vocal activity of active males and active females, we found that active males are more likely to respond when they hear an inquiry call from the opposite sex.

Keywords: acoustic communication, acoustic parameters, social calls, breeding season, *Thyroptera tricolor*

INTRODUCCIÓN

Las señales acústicas son el mecanismo de comunicación más importante para la interacción de muchas especies (Bradbury y Vehrencamp, 1998). Como en otros rasgos de comportamiento, los animales modifican su comportamiento vocal en respuesta a múltiples factores. Por ejemplo, en el caso de títes cabeciblancos (*Saguinus oedipus*; Hotchkin *et al.*, 2013) y las belugas (*Delphinapterus leucas*) se ha demostrado que el comportamiento vocal se ve modificado por factores externos como el ruido (Lesage *et al.*, 1999). En otras especies como el pinzón cebra (*Taeniopygia guttata*) se ha observado una variación en el comportamiento vocal a causa del estrés (Perez, 2013).

La actividad reproductiva puede ser una fuente importante de variación intraindividual en el comportamiento vocal, ya que se sabe que muchas especies modifican su comportamiento debido a cambios hormonales (Darling *et al.*, 2006; Delgado, 2006). Por ejemplo, se sabe que en algunas aves, además de existir un reconocimiento individual en el intercambio de llamadas sociales, también presentan una respuesta selectiva hacia las llamadas emitidas por compañeros de apareamiento (Vignal *et al.*, 2004), lo cual puede ser generado por la alteración de señales en las llamadas emitidas durante esta época. En otras especies de mamíferos como lémures se ha comprobado que durante la época reproductiva, los machos que se encuentran reproductivamente activos producen una serie de llamadas que permiten diferenciarlos ante las hembras, lo cual facilita una posible selección de pareja (Zimmermann y Lerch, 1993). Esta diferencia en el comportamiento vocal también es evidente en el número de vocalizaciones, ya que también se ha observado que los machos reproductivamente activos son quienes emiten un mayor número de vocalizaciones para atraer hembras (Rasoloharijaona *et al.*, 2006). Al igual que en estos mamíferos, en el murciélago marrón (*Eptesicus fuscus*) se ha evidenciado que hay un dimorfismo sexual en las vocalizaciones acústicas durante la temporada reproductiva, (Grilliot *et al.*, 2014). Esto último sugiere que la época reproductiva tiene una incidencia en el comportamiento acústico en algunas especies.

Una de las especies en la que más se han realizado estudios de comunicación acústica es el murciélago de ventosas de Spix, *Thyroptera tricolor*, reconocida por emplear un sistema de

comunicación único entre las aproximadas 1.400 especies de murciélagos reportadas a la fecha (Chaverri *et al.*, 2010). Esta especie realiza un intercambio de llamadas sociales que facilita el contacto con individuos cercanos y de su mismo grupo y su reclutamiento a sitios de descanso. En esta especie se han logrado identificar de manera clara dos tipos de llamadas: (1) la llamada de consulta emitida por aquellos individuos que se encuentran volando en búsqueda de un sitio para refugiarse, y (2) la llamada de respuesta generada por aquellos individuos dentro de un refugio ya ocupado (Chaverri *et al.*, 2010). En esta especie se ha demostrado que no se genera una llamada de respuesta sin que previamente se haya emitido una llamada de consulta que estimule su respuesta (Chaverri *et al.*, 2010). Este sistema de comunicación en *T. tricolor* ha sido ampliamente estudiado en un contexto social. Sin embargo, a la fecha hay pocas investigaciones que nos permitan entender si este sistema de comunicación tan eficiente en un ámbito social, también juega algún papel en un ámbito reproductivo. Tampoco sabemos si este comportamiento se modifica entre distintas etapas reproductivas de acuerdo a las relaciones entre emisor y receptor.

Hernández-Pinsón *et al.* (2021) reportaron que en *T. tricolor* hay una variación en su comportamiento vocal con el inicio de las actividades reproductivas en machos, pero no en hembras. Se observó que los machos son quienes emiten un mayor número de llamadas de respuesta en la época de apareamiento (cuando se sabe que las hembras están ovulando), pero tienen una tasa de emisión de llamadas similar a la de las hembras durante la época no reproductiva. Por lo tanto, este estudio determinó que existe una relación significativa entre el sexo y el estado reproductivo con respecto a la variación en el comportamiento vocal, y sugiere por primera vez que este intercambio de llamadas emitidas por *T. tricolor* puede tener, además de una función social, una función reproductiva.

El objetivo de este estudio fue evaluar si existen diferencias en parámetros acústicos en las llamadas de consulta de *T. tricolor* de acuerdo con el sexo. Queremos determinar si los individuos responden de manera selectiva dependiendo del sexo del emisor y la época reproductiva. De haber diferencias significativas en los parámetros acústicos de las llamadas de consulta entre hembras y machos, predecimos que los individuos responderán más a las llamadas de consulta de individuos del sexo opuesto durante la época reproductiva, como ocurre en otras especies (Curé *et al.*, 2012; Yorzinski *et al.*, 2006).

Estudios anteriores (Araya-Salas *et al.*, 2020; Gillam y Chaverri, 2012) han demostrado que en *T. tricolor* existen fuertes firmas individuales tanto en las llamadas de consulta como en las llamadas de respuesta. Lo que no se sabe hasta el momento es si los llamados pueden codificar información confiable sobre el sexo. En algunas especies de murciélagos, las frecuencias empleadas en la comunicación acústica son sexualmente dimórficas, generalmente las hembras emplean frecuencias más altas que los machos en sus llamadas (Yoshino *et al.*, 2006). Por esta razón, nuestro estudio cobra relevancia en términos de evaluar la importancia que tienen los llamados utilizados para mantener cohesión intragrupal en los procesos de reconocimiento intersexual, que en *T. tricolor* se dan a nivel intergrupar ya que se sabe que esta especie busca parejas reproductivas fuera de su grupo social (Buchalski *et al.*, 2014).

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

Esta investigación fue realizada en el Refugio Nacional de Vida Silvestre Hacienda Barú (RNVSHB). Este refugio forma parte del Corredor Biológico Paso de la Danta (CBPD), ubicado en el Pacífico Sur de Costa Rica (9°15'42.88"N, 83°52'16.85"O), provincia de Puntarenas a 12 msnm. Dentro del refugio se encuentran diferentes ecosistemas que van desde bosque tropical lluvioso, bosques pantanosos, manglares, estuarios, bordes de río y orilla de mar. En los sitios boscosos hay grandes parches de *Heliconia* spp. y *Calathea* spp., los cuales representan los principales sitios de refugio empleados por *T. tricolor*. La toma de datos fue realizada entre agosto y diciembre del 2018.

Captura de individuos

En el refugio se buscó hojas tubulares en desarrollo donde pudiera refugiarse *T. tricolor*. Se ha establecido que todos aquellos individuos que habitan dentro de un refugio (hojas en desarrollo de heliconias o calateas) conforman un mismo grupo social (Chaverri y Gillam, 2013). Por esta razón, se procedió a capturar a todos aquellos individuos que habitaran un mismo refugio obstruyendo la parte superior de la hoja cuidadosamente, evitando cualquier posibilidad de escape, e inmediatamente se introdujo una bolsa plástica tubular para extraer

todos los individuos. Posteriormente, los murciélagos fueron introducidos en bolsas de tela e inmediatamente fueron trasladados al Centro de Investigación del RNVSHB. Para todos los individuos se determinó su sexo, edad y condición reproductiva. Todos los individuos capturados de agosto a septiembre fueron clasificados como reproductivamente activos ya que en esta época es más probable encontrar a los machos con los testículos escrotados (hinchados y descendidos, Chaverri y Vonhof, 2011), lo que coincide a su vez, con el momento en que las hembras empiezan a ovular (Findley y Wilson, 1974). Los individuos capturados de octubre a diciembre fueron clasificados como reproductivamente inactivos (los machos ya no evidenciaban sus testículos escrotados).

Marcaje con transpondedores

Cada individuo fue marcado con un transpondedor, el cual es un microchip que emite una señal de radiofrecuencia de corto alcance (Modelo Mini HPT8; Biomark, Boise, Idaho, USA; ISO 11784/11785; Peddy-Mark, UK) que mide 8.4 mm de largo. Estos transpondedores se introdujeron de manera subcutánea mediante una diminuta incisión en la parte dorsal de cada individuo capturado. Con la ayuda del lector electrónico modelo HPR plus 1.15 (Biomark), se llevó a cabo la lectura de los transpondedores instalados en cada individuo, lo que nos permitió diferenciar cada individuo y confirmar si ya se habían realizado experimentos previos en este individuo particular o no.

Grabación de llamadas de respuesta

Se reprodujeron llamadas de consulta (Chaverri *et al.*, 2010) previamente grabadas para evocar llamadas de respuesta. Las llamadas de consulta se grabaron liberando a un individuo dentro de una jaula de vuelo portátil (10 x 4 x 3m), mientras el resto de los individuos permanecían guardados en una bolsa de tela con al menos 20 m de distancia de la jaula para evitar interferencia acústica. Las llamadas de consulta fueron grabadas mediante un micrófono de condensador Avisoft (CM16, Avisoft Bioacoustics, Berlín, Alemania), conectado a un UltraSoundGate Recorder modelo 116Hme en un computador portátil con el software Avisoft Recorder (Chaverri *et al.*, 2010). Este proceso se repitió con

cada miembro del grupo, los cuales volaron por un máximo de 5 min dentro de la jaula de vuelo.

Una vez grabadas las llamadas de consulta, estas fueron reproducidas a través de un UltraSoundGate Player (modelo 216H, Avisoft Bioacoustics), con un altavoz ultrasónico omnidireccional (Vifa, Avisoft Bioacoustics). Para esto, introducimos a cada individuo dentro de una hoja tubular, sobre la cual colocamos una pequeña malla para evitar su escape. A continuación, fueron reproducidas tres secuencias conformadas por ocho llamadas de consulta (cuatro llamadas de hembras y cuatro llamadas de machos), de individuos de distintos grupos sociales (Chaverri *et al.*, 2010; Chaverri y Kunz, 2011). Cada una de estas tres grabaciones contenía un orden diferente generado de forma aleatoria (se generaron en total tres secuencias para evitar la pseudoreplicación). Cada secuencia tenía una duración de 1 min y el tiempo que pasaba entre la reproducción de cada una de las secuencias fue de 15 s. En este experimento evaluamos un total de 79 individuos, 42 clasificados como reproductivamente activos (24 machos, 18 hembras) y 37 inactivos (17 machos, 20 hembras). Luego del experimento, cada individuo fue alimentado con larvas de *Tenebrio molitor* y se les brindó agua *ad libitum*; posteriormente fueron liberados en sus mismos sitios de captura.

Preferencia por responder según sexo

En cada experimento se contó el número de llamadas de respuesta emitidas en respuesta a cada llamada de consulta en el programa SASLab Pro (Avisoft Bioacoustics). El efecto del sexo y el estado reproductivo en las tasas de las llamadas se evaluó con un modelo de regresión de efectos mixtos multinomial Bayesiano en el paquete de R MCMCglmm (Hadfield, 2010), el cual incluyó una interacción de tres niveles entre las variables del sexo de la llamada de consulta, sexo de la llamada de respuesta y el estado reproductivo de cada individuo como variables independientes. La variable dependiente en el modelo fue si el animal emitió llamadas de respuesta o no. Se incluyó la identificación del individuo focal como una variable aleatoria en el modelo. Todos los análisis fueron hechos con el paquete MCMCglmm (Hadfield 2010), en la plataforma de programación R (v 4.0). Los intervalos

de credibilidad del 95% de la distribución posterior de los estimados del modelo fueron usados para la prueba de hipótesis. Aquellos que no contenían cero fueron identificados como efectos significativos.

Señales sexuales en la estructura de las llamadas de consulta

Para evaluar las diferencias en los parámetros acústicos entre las llamadas de consulta de machos y hembras cuantificamos la estructura de las llamadas utilizando parámetros espectrales y coeficientes cepstrales de las Frecuencias de Mel (CCFM). Estos últimos parámetros se emplean para cuantificar señales a lo largo de una escala logarítmica que se asemeja a la percepción del tono en mamíferos, incluidos los murciélagos (Grinnell, 1995). Los CCFM han sido exitosamente utilizados para cuantificar la variación de la estructura de la señal acústica en murciélagos (Mirzaei *et al.*, 2012; Prat *et al.*, 2016), incluyendo *T. tricolor* (Araya-Salas *et al.*, 2020) y varios otros mamíferos (Clemins y Johnson, 2013; Fedurek *et al.*, 2016; Mouy *et al.*, 2008). Posteriormente se construyó un modelo para discriminar las llamadas entre sexos utilizando el algoritmo de aprendizaje de máquina (“machine learning”) de Bosques Aleatorios (“Random Forest”, Breiman, 2001). Para esto se entrenaron dos modelos, uno para cada conjunto de variables predictoras (parámetros espectrales y MFCC), usando el paquete de R 'ranger' (Wright y Ziegler, 2017; número de árboles =10.000, importancia= "impureza"). Finalmente, se crearon modelos nulos aleatorizando las posiciones de las etiquetas de machos y hembras y se estimó el porcentaje de error para cada modelo. Esto con el fin de estimar el porcentaje de discriminación esperado en ausencia de una estructura acústica diferencial entre sexos. Todos los parámetros acústicos se midieron usando las funciones "spectro analysis" (parámetros espectrográficos) y “mfcc_stats” (descriptores de los coeficientes cepstrales) del paquete R 'warbleR' en R v.1.1.16. Las grabaciones fueron anotadas en Raven Pro (Cornell Laboratorio de Ornitología, Ithaca, NY, U.S.A.) y posteriormente importadas a R usando el paquete 'Rraven' v.1.0.6 (Araya-Salas, 2017).

RESULTADOS

Señales sexuales en la estructura de las llamadas de consulta

El análisis de parámetros espectrales para establecer diferencias en parámetros acústicos entre machos y hembras determinaron una predicción de error del 23%, mientras que los CCFM arrojaron un error de predicción del 11% basado en los 25 Coeficientes Cepstrales. Por esta razón, se decidió hacer un análisis en conjunto con estos dos parámetros acústicos (parámetros espectrales y Coeficientes Cepstrales). Para lo anterior se usó un análisis de Bosques Aleatorios. Este análisis determinó un error de predicción del 10.61% para asignar si un llamado pertenecía a machos o hembras, utilizando parámetros acústicos. Finalmente, los valores del modelo nulo fueron significativamente mayores que los valores reales en cuanto a su error de predicción, el cual fue del 43%. Todo lo anterior indica que existen claras diferencias estructurales entre las llamadas de consulta que nos permite diferenciar a machos y hembras.

Preferencia por responder según sexo

evaluamos un total de 79 individuos, de los cuales 43 emitieron al menos una llamada de respuesta para las tres réplicas de llamadas de consulta empleadas y 36 no emitieron ninguna llamada de respuesta (registrándose en total 2.444 llamadas de respuestas). Encontramos una tendencia significativa en machos activos a responder a las llamadas de consulta, lo que indica que hay una tendencia a que los machos siempre respondan cuando están activos ($p=0.023$; Fig. 1a) en comparación a cuando no lo están (Fig. 1b). Sin embargo, no se observó un aumento en la probabilidad de que los machos activos respondan a hembras en comparación de machos ($p=0.97$).

Se encontró una mayor probabilidad de que un macho responda ante la llamada de consulta de una hembra cuando este se encuentra reproductivamente activo que cuando no lo está ($p=0.03$; Fig. 1b). En la comparación de la actividad vocal de machos activos y hembras activas, encontramos que hay una mayor probabilidad ($p=0.01$) de que sean los machos

activos quienes respondan cuando escuchan una llamada de consulta del sexo opuesto (Fig. 1c). En cuanto a las hembras, cuando estas están activas, no tuvieron una preferencia por responder a llamadas de consulta de un sexo en particular ($p= 0.39$; Fig. 1d). Aún cuando no se observó una diferencia en la distribución posterior de los estimados en hembras inactivas respondiendo ante machos y hembras ($p=0.96$), en el caso de las hembras inactivas hubo una mayor probabilidad de que respondieran ante una llamada de consulta de machos, ya que el mayor porcentaje de la distribución de posteriores no traslapa con 0 (Fig. 1e). Sin embargo, sí hubo un traslape de la distribución de posteriores cuando las hembras inactivas responden ante una llamada de una hembra (Fig. 1d).

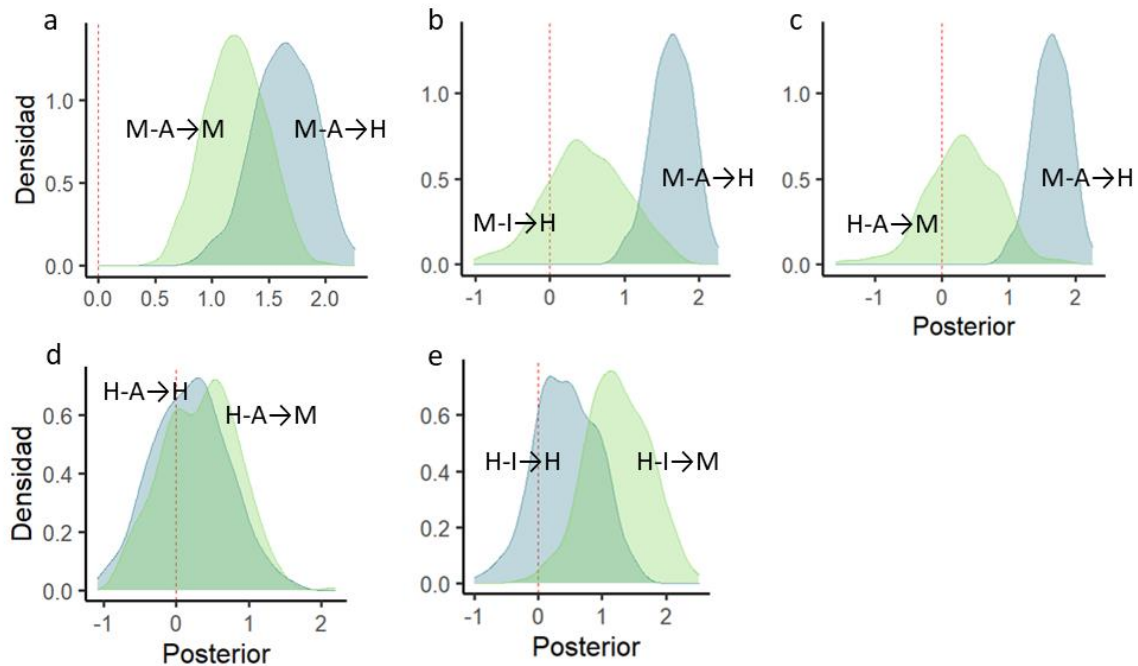


Fig.1. Distribuciones posteriores de los estimados del modelo de regresión Bayesiano para comparar la probabilidad de que un individuo (M: macho, H: hembra) en diferentes estados reproductivos (A: activo, I: inactivo) responda de acuerdo al sexo del emisor de la llamada de consulta (emisor es hembra: $\rightarrow H$, o emisor es macho: $\rightarrow M$). La línea roja discontinua sobre el punto cero marca un punto de neutralidad en la probabilidad de respuesta. Las pendientes hacia la derecha del cero determinan una mayor probabilidad de respuesta hacia ese sexo determinado, los puntos cercanos o a la izquierda del cero denotan una mínima o probabilidad contraria a que respondan a ese sexo determinado.

DISCUSIÓN

Nuestra predicción establecía que en caso de encontrar diferencias en los distintos parámetros acústicos de las llamadas de consulta entre hembras y machos en *T. tricolor*, los individuos emitirían un mayor número de llamadas de respuesta al sexo opuesto durante la época reproductiva en comparación a la época no reproductiva. Bajo esta predicción, nuestros resultados demostraron diferencias en los parámetros acústicos que permiten discriminar entre machos y hembras en las llamadas de consulta en esta especie. Esto demuestra preferencia por responder a un sexo determinado, ya que se ha demostrado que el intercambio de llamadas de contacto proporciona información relevante sobre el remitente (Kondo y Watanabe, 2009) y las respuestas que emiten los animales a las llamadas de diferentes individuos preceden su comportamiento. Por ello, la información que obtienen los receptores de estas señales codifican una gran cantidad de información lo cual determina la respuesta (Seyfath *et al.*, 2010). Comprobar que hay parámetros acústicos que permiten la discriminación de sexos en *T. tricolor* demuestra la importancia de las llamadas de consulta durante la época reproductiva en la selección de pareja.

Nuestro segundo objetivo fue evaluar si existía una preferencia por responder a un sexo determinado de acuerdo con la época reproductiva. Encontramos que para los machos activos sí existió una incidencia en su comportamiento vocal, aun cuando no parecen tener preferencia por responder a un sexo determinado (Fig. 1a), ya que hubo una mayor probabilidad de que respondieran cuando están activos (Fig. 1b). La mayor actividad vocal de los machos durante la época de apareamiento sugiere que este comportamiento se da debido a una posibilidad mínima de apareamiento (Carpenter, 1935; Van Parjis *et al.*, 2003), ya que se sabe que en esta misma época las hembras se encuentran en proceso de ovulación (Findley y Wilson, 1974). A diferencia de los machos, cuando las hembras están activas no evidencian una tendencia a responder a la llamada de consulta de un sexo particular (Fig. 1d), pero cuando se encuentran inactivas, estas muestran una mayor tendencia a responder a los machos (Fig. 1e). Estos resultados pueden estar relacionados con costos energéticos, ya que se sabe que la emisión de sonidos puede ser una actividad realmente costosa energéticamente hablando (Speakman *et al.*, 1989; Noren *et al.*, 2013),

especialmente la emisión de llamadas de respuesta en *T. tricolor* (Chaverri *et al.*, 2021). Entonces, cuando las hembras están en etapas reproductivas que requieren una alta inversión energética, como ovulación, gestación, lactación (Kurta *et al.*, 1989; Thompson, 1993), producir llamadas de respuesta les puede resultar difícil. Por lo tanto, disminuir cualquier otra actividad que demande costos energéticos adicionales puede ser una prioridad.

Nuestros resultados de variación en distintos parámetros acústicos en las llamadas de consulta que permiten discriminar entre sexos se ven apoyados por lo evidenciado en otros taxones como la gaviota tridáctila (*Rissa tridactyla*), en la cual se ha comprobado que existen firmas acústicas que permiten determinar el sexo y la individualidad del emisor a través de la emisión de llamadas de contacto (Aubin *et al.*, 2007). De igual manera, la variación vocal reflejada por los machos de acuerdo al contexto reproductivo en que estos se encontraban en nuestro estudio, se ha visto en algunos primates no humanos como el bonobo (*Pan paniscus*), en los cuales se ha comprobado que el contexto social en el que surge el intercambio de llamadas entre emisor y receptor incide en el comportamiento vocal (Schamberg *et al.*, 2016). Por otra parte, en el pez sapo (*Opsanus tau*), los machos poseen firmas acústicas en las vocalizaciones emitidas como cortejo durante la época de apareamiento, y pueden alterar sus vocalizaciones con respecto a la época reproductiva, lo cual permite que haya un reconocimiento y aumenta sus probabilidades de apareamiento (Van Wert y Mensinger 2019). La variación en los parámetros acústicos en *T. tricolor* es de vital importancia para procesos de discriminación de sexos durante diferentes épocas reproductivas y nos permiten aclarar como su comportamiento vocal puede variar entre diferentes épocas de acuerdo con sus intereses reproductivos.

En conclusión, nuestra investigación revela información novedosa y relevante sobre cómo la variación en el comportamiento vocal en *T. tricolor* es el resultado de una interacción compleja de factores sociales y reproductivos, facilitados por la transmisión de información que permiten las señales acústicas en las llamadas de consulta. Lo anterior permite ampliar el panorama sobre la importancia que tiene este sistema de intercambio de llamadas sociales en *T. tricolor* en un contexto social, que ya se ha estudiado ampliamente, pero además reproductivo.

NOTA ÉTICA

Todos los protocolos de muestreos estaban fundamentados en las directrices aprobadas por la Sociedad Americana de Mastozoología para la captura, manejo y cuidado de los mamíferos (Sikes *et al.*, 2016) y los lineamientos ASAB/ABS para el uso de animales con fines de investigación. Finalmente, este estudio fue llevado a cabo en concordancia con las normas éticas de bienestar animal del Ministerio de Ambiente y Energía de Costa Rica, el Sistema Nacional de Áreas de Conservación, permiso No. SINAC-ACOPAC-RES-INV-008-2017 (Decreto No. 32553-MINAE). Los protocolos fueron además aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de la Universidad de Costa Rica (CICUA-42-2018).

REFERENCIAS

Araya-Salas M. (2017). Raven: Connecting R and Raven bioacoustic software (R package version 1.0.0).

Araya-Salas M., Hernández-Pinsón H.A., Rojas N., Chaverri G. (2020). Ontogeny of an interactive call-and-response system in Spix's disc-winged bats, *Animal Behaviour*. 166:233-245 Pp.

Amorim M.C.P., Vasconcelos R.O., Marques, J.F., Almada F. (2006). Seasonal variation of sound production in the Lusitanian toadfish *Halobatrachus didactylus*. *Journal of Fish Biology*, 69, 1892-1899 Pp.

Aubin T., Mathevon N., Staszewski V., Boulinier T. (2007). Acoustic communication in the Kittiwake *Rissa tridactyla*: potential cues for sexual and individual signatures in long calls. *Polar Biology*, 30, 1027–1033 Pp.

Bradbury J.W., Vehrencamp S.L. (1998) *Principles of Animal Communication*, Sinauer.

Breiman L. (2001). Random forests. *Machine Learning*, 45(1), 5e32 Pp.

Buchalski M.R., Chaverri G., Vonhof M.J. (2014). When genes move farther than offspring: Gene flow by male gamete dispersal in the highly philopatric bat species *Thyroptera tricolor*. *Molecular Ecology* 23:464–480 Pp.

Carpenter C.R. (1935). A field study of the behavior and social relations of howling monkeys. *Comparative Psychology Monographs*, 19, 1-168 Pp.

Chaverri G., Gillam E.H. (2013). Sound amplification by means of a horn-like roosting structure in Spix's disc-winged bat. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 280(1772), 1-7 Pp.

Chaverri G., Gillam E.H., Vonhof M.J. (2010). Social calls used by a leaf-roosting bat to signal location. *Biology Letters*, 6:4, 441-444 Pp.

Chaverri G., Sandoval-Herrera N.I., Iturralde-Pólit P., Romero-Vásquez A., Chaves-Ramírez S., Sagot M. (2021). The energetics of social signaling during roost location in Spix's disc-winged bats. *J Exp Biol.* 224(14).

Chaverri G., Kunz, T.H. (2011). Response of a specialist bat to the loss of a critical resource. *PLoS ONE* 6(12): e28821, doi: 10.1371/journal.pone.0028821.

Chaverri G. Vonhof M.J. (2011). Reproduction and Growth in a Neotropical Insectivorous Bat. *Acta Chiropterologica*, 13(1), 147–155 Pp.

Clemins P.J., Johnson M.T. (2013). Automatic type classification and speaker identification of African elephant (*Loxodonta africana*) vocalizations. *Journal of the Acoustical Society of America*, 113(4): 2306e2306.

Curé C., Mathevon N., Mundry R., Aubin T. (2012). Acoustic cues used for species recognition can differ between sexes and sibling species: evidence in shearwaters. *Animal Behaviour*, 84(1): 239-250 Pp.

Darling J.D., Jones M.E., Nicklin C.P. (2006). Humpback whale songs: do they organize males during the breeding season? *Behaviour*, 143:9, 1051–1101 Pp.

Delgado R.A. (2006). Sexual selection in the loud calls of male primates: Signal Content and Function, 27:5, 5-25 Pp.

Fedurek P., Zuberbühler K., Dahl C.D. (2016). Sequential information in a great ape utterance. *Scientific Reports*, 6, 38226.

Findley J.S., Wilson D.E. (1974). Observations on the Neotropical Disk-Winged Bat, *Thyroptera tricolor* Spix, *Journal of Mammalogy*, 55:3, 562–571 Pp.

Grinnell A. D. (1995). Hearing in bats: An overview. In A. N. Popper, R. R. Fay (Eds.), *Hearing by bats*. Springer handbook of auditory research, 5, pp. 1-36). New York, NY: Springer.

Gillam H.E., Chaverri G. (2012). Strong individual signatures and weaker group signatures in contact calls of Spix's disc-winged bat, *Thyroptera tricolor*. *Animal Behaviour* 83:1, 269-276 Pp.

Grilliot M.E., Burnett S.C., Mendonça A.T. (2014). Sex and season differences in the echolocation pulses of big brown bats (*Eptesicus fuscus*) and their relation to mating activity. *Acta Chiropterologica*, 16:2,379-386 Pp.

Hadfield J. D. (2010). MCMC methods for multi-response generalized linear mixed models: The MCMCglmm R package. *Journal of Statistical Software*, 33(2), 1e22.

Hernández-Pinsón H.A., Chaves-Ramírez S., Chaverri G. (2022). Seasonality in the emission of contact calls in Spix's disc-winged bats (*Thyroptera tricolor*) suggest a potential role in mate attraction. *Acta Chiropterologica*, 23(2):413-420 Pp.

Hotchkin C. F., Parks, S. E., Weiss D. J. (2013). Vocal modifications in primates: Effects of noise and behavioral context on vocalization structure. In: *Proceedings of Meetings on Acoustics*. 19: 1, 1-6 Pp.

Kondo N., Watanabe S. (2009). Contact calls: Information and social function. *Japanese Psychological Research*, 51(3), 197e208.

Kurta A., Bell G.P., Nagy K.A., Kunz T.H. (1989). Energetics of pregnancy and lactation in free-ranging little brown bats (*Myotis lucifugus*). *Physiological Zoology*, 62(3), 804-818 Pp.

Lesage V., Barrette C., Kingsley M.C.S., Sjare B. (2006). The effect of vessel noise on the vocal behavior of belugas in the St. Lawrence river estuary, Canada. *Marine Mammal Science*, 15:1.65-84 Pp.

Li B.G., Chen F.G., Luo S.Y., Chen F.G., Xie W.Z. (1993). Major categories of vocal behavior in wild Sichuan Golden monkey. *Acta Theriologica Sinica*, 13 (3): 181- 187 Pp.

Mirzaei G., Majid M.W., Ross J., Jamali M.M., Gorsevski P.V., Frizado J.P. (2012). The BIO-acoustic feature extraction and classification of bat echolocation calls. In *Proceedings*

of the IEEE International Conference on Electro/Information Technology, 6e8 May 2012, Indianapolis, IN 1-4 Pp.

Mouy X., Leary D., Martin B., Laurinolli M. (2008). A comparison of methods for the automatic classification of marine mammal vocalizations in the Arctic. In Proceedings of New Trends for Environmental Monitoring Using Passive. 1-6 Pp.

Noren D.P., Holt M.M., Dunkin R.C., Williams T.M. (2013). The metabolic cost of communicative sound production in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). J Exp Biol 216 :1624–1629 Pp.

Perez E. (2013). Communicating about stress: modulation of vocalisations in the zebra finch. Vertebrate Zoology.

Prat Y., Taub M., Yovel Y. (2016). Everyday bat vocalizations contain information about emitter, addressee, context, and behavior. Scientific Reports, 6, 39419.

Rasoloharijaona S., Randrianambinina B., Braune P., Zimmermann E. (2006). Loud calling, spacing, and cohesiveness in a nocturnal primate, the Milne Edwards' sportive lemur (*Lepilemur edwardsi*). American Journal of Physical Anthropology, 129:4, 591-600 Pp.

Rivera-Caceres K.D., Templeton C. N. (2019). A duetting perspective on avian song learning. Behavioural Processes, 163, 71e80. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2017.12.007>.

Schamberg I., Cheney D.L., Clay Z., Hohmann G., Seyfarth R.M. (2016). Call combinations, vocal exchanges and interparty movement in wild bonobos. Animal Behaviour, 122,109-116 Pp.

Seyfarth R.M., Cheney D.L., Bergman T., Fischer J., Zuberbühler K., Hammerschmidt K. (2010). The central importance of information in studies of animal communication, Animal Behaviour, 80:1, 3-8 Pp.

Shen X., Wang H.Z., Na J. (2007). Study of gryllus bimaculatus's structure foundation of three different sounds. Journal of Shenyang Normal University: Natural Science Edition, 25 (2): 245- 248 Pp.

Sikes R. S. (2016). Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research and education. *Journal of Mammalogy*, 97, 663e688.

Speakman J.R., Anderson M.E., Racey P.A. (1989). The energy cost of echolocation in pipistrelle bats (*Pipistrellus pipistrellus*). *Journal of Comparative Physiology*, 165: 679-685 Pp.

Thompson S.D. (1993). Gestation and lactation in small mammals: basal metabolic rate and the limits to energy use. *Mammalian Energetics Interdisciplinary Views of Metabolism and Reproduction*, 213–260 Pp.

Van Parijs S.M., Lydersen C., Kovacs K.M. (2003). Vocalizations and movements suggest alternative mating tactics in mane bearded seals. *Animal Behaviour*, 65:2, 273-283 Pp.

Van Wert J.C., Mensinger A.F. (2019). Seasonal and daily patterns of the mating calls of the oyster toadfish, *Opsanus tau*. *The Biological Bulletin*, 236:2.

Vignal C., Mathevon N., Mottin S. (2004). Audience drives the male songbird's response to its partner's voice. *Nature*, 430, 448 – 451 Pp.

Wright M.N., Ziegler A. (2017). Ranger: A fast implementation of random forests for high dimensional data in Cpp and R. *Journal of Statistical Software*, 77(1), 1e17 Pp.

Yoshino H., Matsumura S., Kinjo K., Tamura H., Ota H., Izawa M. (2006). Geographical variation in echolocation call and body size of the Okinawan least horseshoe bat, *Rhinolophus pumilus* (Mammalia: Rhinolophidae), on Okinawa-jima island, Ryukyu archipelago, Japan, *Zoological Science*. 23(8): 661-667 Pp.

Yorzinski J.L., Vehrencamp S.L., McGowan K.J., Clark A.B. (2006). The inflected alarm caw of the American crow: differences in the acoustic structure among individuals and sexes, *The Condor*. 108(3):518-529 Pp.

Zhou Z.M., Zhou Y.B., Hu J.C., Zhuang H., Zhu W., Chen T. (2004). Vocal behaviors of male sand martin (*Riparia riparia*) in breeding season. *Chinese Journal of Zoology*, 39 (6): 77- 81 Pp.