



## TESIS DOCTORAL

# **Efectos denso-dependientes en las estrategias reproductivas en aves: aproximación observacional y experimental en el estornino negro**

Autor:

Daniel Fuentes Romero

Director:

Vicente Polo Sacristán

Programa de Doctorado en Conservación de Recursos Naturales

Escuela Internacional de Doctorado

Enero 2020



*El campo mismo se hizo  
árbol en ti, parda encina.  
Ya bajo el sol que calcina,  
ya contra el hielo invernizo,  
el bochorno y la borrasca,  
el agosto y el enero,  
los copos de la nevasca,  
los hilos del aguacero,  
siempre firme, siempre igual,  
impasible, casta y buena*

*Antonio Machado*







*A mi familia,*

*a Isa.*



# **Indice**

<i>Resumen abreviado .....</i>	11
<i>Introducción general .....</i>	19
<i>Lista de capítulos .....</i>	63
<i>Capítulo 1 / Chapter 1: Long-term fitness consequences of breeding density in starling colonies: an observational approach .....</i>	65
<i>Capítulo 2 / Chapter 2: Nest decoration as social signals by males and females: greenery and feathers in starling colonies .....</i>	85
<i>Capítulo 3 / Chapter 3: Is primary sex ratio related with breeding density? Life-history strategies of the semi-colonial Spotless starling .....</i>	107
<i>Capítulo 4 / Chapter 4: Early mechanisms of density dependence differ between sexes in a colonial bird: a cross-fostering experiment .....</i>	123
<i>Discusión general .....</i>	157
<i>Conclusiones .....</i>	183



# Resumen abreviado

## Antecedentes

La denso-dependencia es uno de los procesos fundamentales para que las poblaciones animales alcancen su equilibrio ecológico. La regulación de las poblaciones ha intrigado a los investigadores desde mediados del siglo XIX. Durante décadas de investigación, la mayoría de los estudios se han centrado en datos observacionales. Sin embargo, la medida en la los procesos denso-dependientes afectan tanto a las variaciones de rasgos de los individuos como a la dinámica poblacional y, por tanto, al papel que jugaría en los procesos adaptativos, continúa planteando incógnitas. Para descifrar estas incógnitas a menudo se requiere acometer estudios a largo plazo y el uso manipulaciones experimentales a medio y largo plazo que permitan indagar en las causas y consecuencias de la densidad reproductiva sobre las poblaciones animales. Los estudios experimentales con poblaciones salvajes de vertebrados son escasos, ya que son complejos de llevar a cabo por características intrínsecas propias de este tipo de organismos. Entre estas dificultades puede citarse el que son especies con elevada movilidad espacial y temporal, con gran variedad de sistemas de emparejamiento y reproducción y cuidados a la descendencia y el que presentan patrones dispersivos muy complejos y diversos. Esta situación ha limitado enormemente el número de evidencias empíricas con rango de causalidad y, por el contrario, se disponga de numerosas evidencias observacionales a las que no podemos dar el rango de causa-efecto.

En esta Tesis se investigan los procesos denso-dependientes en el modelo reproductivo de una población silvestre de estornino negro, *Sturnus unicolor* Temminck, una especie semi-colonial y con marcada territorialidad durante la época de cría. Esta especie cría exclusivamente en cavidades secundarias abandonadas por otros animales, acepta con facilidad las cajas nido y presenta una elevada filopatría. Trabajos previos en la especie muestran la existencia de interacciones competitivas entre conespecíficos de ambos sexos

por acceder a los recursos reproductivos y al mantenimiento de territorios. Todas estas características les hacen ser un sujeto de estudio idóneo para abordar los posibles efectos de la densidad poblacional desde una aproximación experimental, mediante la manipulación del número y proximidad de los nidos disponibles y, de esta forma, abordar los efectos sobre las estrategias vitales de estas aves. En la medida en que esta especie sea un modelo adecuado, los resultados podrán ser generalizados a otras aves.

## ***Objetivos y metodología***

El objetivo general de esta Tesis es entender el alcance de los efectos negativos y/o positivos de la densidad reproductiva sobre las relaciones de competencia entre los reproductores y describir cuáles son los posibles mecanismos implicados. La tesis que defiendo es que la denso-dependencia reproductiva provoca efectos a corto, medio y largo plazo que actúan tanto sobre las razones próximas como sobre los procesos evolutivos de las poblaciones. Se pretende, así, esclarecer la importancia de la denso-dependencia en las estrategias vitales de las aves. Este objetivo general se ha abordado en los siguientes objetivos concretos: (1) analizar los efectos de la proximidad de nidos en el éxito reproductivo y en la dispersión natal de la descendencia con una doble aproximación observacional y experimental. La aproximación observacional ha usado datos reproductivos (volantones y reclutas) del seguimiento continuado de 13 años en una población de la especie modelo. La aproximación experimental de la densidad de nidos (tratamiento de alta y baja densidad de cajas nidos) ha analizado los mismos efectos en un estudio a 4 años sobre la misma población de estudio; (2) investigar los cambios de la manipulación experimental de la distancia entre nidos sobre las conductas de señalización de las madres y los rasgos del fenotipo extendido de los machos como herramienta para evaluar las interacciones competitivas entre reproductores; (3) investigar si el tratamiento de densidad reproductiva determina un ajuste facultativo de la proporción de sexos en el momento de la eclosión de los pollos, siguiendo las predicciones

del modelo propuesto por Trivers & Willard; y finalmente (4) investigar mediante la segunda aproximación experimental, y el intercambio de pollos (*cross-fostering*), la importancia de los efectos maternos frente a los efectos ambientales en la descendencia y si estos efectos se transmiten a larga distancia cuando los pollos emancipados se convierten en nuevos reproductores.

## **Resultados**

Los resultados obtenidos a lo largo de esta Tesis evidencian cambios en las conductas de los reproductores y en el éxito reproductivo a corto y medio plazo (**capítulos 1 y 2**) y en la inversión inicial de las madres por sexos (**capítulo 3**). En concreto, la reducción experimental de la distancia entre cajas nido produjo variaciones de las conductas de señalización tanto en los machos, aumentando el uso de plantas aromáticas en los nidos durante los días previos al inicio de la puesta, como en las hembras, incrementando la decoración del nido con plumas foráneas durante la fase de incubación (**capítulo 2**), demostrando un papel crucial de la denso-dependencia sobre la comunicación intra-específica e intra-sexual en el estornino negro. En relación con los efectos observacionales a largo plazo de la proximidad de cajas nido (**capítulo 1**), hemos encontrado que la tasa de reclutamiento de jóvenes nacidos en alta densidad disminuye con respecto a aquellos de baja densidad. Sin embargo, la reducción de la tasa de reclutamiento con la proximidad de cajas nido se debe principalmente a un descenso en el número de hembras reclutadas, mientras que la tasa de reclutamiento en los machos parece mantenerse (**capítulo 1**). El tratamiento experimental de aproximación de cajas nido ha provocado un mantenido sesgo de las puestas hacia el sexo más barato de producir (las hembras en el caso del estornino negro) en cada uno de los cuatro años del experimento (**capítulo 3**), lo que parece indicar que es la elevada competencia por los recursos reproductivos experimentada por las madres lo que estas valoran a la hora de ajustar el número de machos de la puesta. Sin embargo, y en aparente contradicción con lo anterior,

algunos de los resultados fundamentales acerca de los mecanismos a corto y medio plazo del tratamiento experimental de aproximación de cajas nido sobre los pollos parece evidenciar un efecto más negativo de la densidad reproductiva en las hijas que en los hijos (**capítulo 4**). Esto sugiere una posible paradoja adaptativa al contradecir las presunciones teóricas esperadas o bien que la denso-dependencia es un proceso multifaceta que opera a muy distintos niveles y con efectos tanto positivos como negativos. En cuanto a los mecanismos próximos que explicarían los procesos denso-dependientes, hemos demostrado la importancia del efecto materno sobre el efecto ambiental en la descendencia (**capítulo 4**): las hijas disminuyeron su condición física (i.e. peso y talla) si su procedencia natal era de un nido de alta densidad. En los hijos, por el contrario, no hemos encontrado unas diferencias directas en su condición. Aparte del cambio diferencial en la condición física de la progenie en función del sexo, hemos encontrado un efecto ambiental sobre la longitud de los telómeros en todos los pollos, machos y hembras, criados en alta densidad (**capítulo 4**); pero nuevamente, son las hijas las que parecen sufrir más que sus hermanos al ser criadas en un nido de alta proximidad a otros nidos, mediante un claro acortamiento de la longitud de sus telómeros (**capítulo 4**). Los definitivos efectos de la manipulación sobre la eficacia biológica y sobre la diferencia de inversión de los padres por el sexo de sus hijos e hijas, que definirían de una vez los efectos finales positivos, negativos o neutros de la denso-dependencia queda aún por realizar al necesitarse de tres años adicionales para recabar todo el volumen de reclutas.

## **Conclusiones**

Los resultados de esta Tesis indican que la competencia intraespecífica es la causa última más probable para los efectos denso-dependientes encontrados en el estornino negro. Así, la variación en las conductas de acarreo de plantas verdes por parte de los machos y de plumas por parte de las hembras podría tener una función de señalización social para responder a un ambiente competitivo. Esta situación de partida experimentada por las hembras deriva

en cambios en el fenotipo expresado por la descendencia. Interesantemente los efectos de la densidad experimentada por las madres repercuten en las hijas producidas y no en los hijos. En etapas posteriores del desarrollo de la progenie los ambientes densos suponen un descenso del éxito reproductivo de la especie a corto plazo (disminución del número de volantones) y a largo plazo (descenso del número de reclutas). Sin embargo, la asignación de sexos en las puestas sugiere resultados contradictorios evolutivamente al producir el sexo menos costoso (hembras) en ambientes de alta densidad de nidos y, a su vez, los efectos negativos se evidencian en el mismo sexo. En contra de resultados previos, hemos demostrado que la densidad reduce las distancias de dispersión de los futuros reclutas. En conjunto, los procesos denso-dependientes podrían tener efectos en la estrategia reproductiva de la madre, i.e. favoreciendo la mortalidad de parte de la descendencia y, a su vez, ejerciendo una presión selectiva hacia individuos capaces de establecerse en áreas de alta densidad poblacional.



---

# *Introducción general*

---





# ***Introducción general***

## ***Breve historia de los procesos denso-dependientes***

En 1798 Thomas Malthus publicó el primer tratamiento teórico sobre dinámica poblacional humana titulado '*An essay on the principle of population*'. En su obra argumentó que, si bien las poblaciones crecen de forma geométrica, los recursos de los que dependen se producen generalmente de forma aritmética o se mantienen constantes. Los efectos del trabajo de Malthus fueron una base fundamental para el desarrollo de las teorías denso-dependientes. Casi medio siglo después, Verhulst (1838) planteó el modelo logístico poblacional\*, el cual es una generalización de la ecuación exponencial de crecimiento, pero con un valor máximo para una población dada. Por lo tanto, el crecimiento poblacional debe limitarse cuando el tamaño poblacional excede la disponibilidad de un recurso.

Desde entonces la regulación de las poblaciones animales ha intrigado a investigadores del ámbito de la Ecología con un avance sustancial en la primera mitad del siglo XX. El primero en introducir el concepto de regulación mediante factores denso-dependientes fue Nicholson (1933). La idea surgió a partir de observaciones de poblaciones, las cuáles raras veces se extinguían y crecían sin límites en medios controlados identificando que las poblaciones se regulan en el tiempo. En palabras del propio Nicholson “*Populations must be in a state of balance with their environment... For the production of balance, it is essential that a controlling factor should act more severely against an average individual when the density of animals is high, and less severely when the density is low*” (Nicholson 1933). Es decir, planteaba un balance mediado por factores que, a su vez, influyen en menor o mayor medida con la densidad de individuos. Los factores considerados como punto de partida fueron la competición intra- e interespecífica entre organismos por su supervivencia. Durante las dos décadas posteriores otros investigadores fueron aceptando los conceptos iniciales planteados por Nicholson y, además, fueron ampliando e incorporando la base fundamental para la comprensión del

concepto de denso-dependencia (Varley 1947, Solomon 1949, Lack 1954).

Las ideas iniciales sobre las que se asentaron las posteriores bases de los procesos/ teoría denso-dependientes en la época se enumeran a continuación (Sinclair 1989):

- aceptar la existencia en el ambiente de factores denso-dependientes (DD) y factores denso-independientes (DI);
- el principal motor de la DD es la competencia intraespecífica por recursos como la disponibilidad de comida y acceso a emplazamientos/territorios. A su vez, la presión depredadora y la carga de parásitos también dependen de la densidad;
- efectos sinérgicos, antagónicos o aditivos entre factores que pueden actuar de forma simultánea;
- DD no opera de forma continua en el tiempo y en el espacio, en ciertos casos los factores DI entran en juego superando los efectos cuantificables de los factores DD;
- La escasez de un recurso aumenta la competencia por el mismo y puede generar el agotamiento de dicho recurso. En caso de que esta situación tenga lugar, no existe el balance necesario para el equilibrio poblacional y se producen ciclos entre el recurso explotado y la dinámica poblacional;
- derivado del anterior punto, el efecto añadido de factores como la depredación o el parasitismo en un proceso de ajuste cíclico puede dar lugar a la extinción de las poblaciones;
- las especies viven en un hábitat finito en el espacio, por tanto, los límites de dichos hábitats favorecen la territorialidad y promocionan la dispersión y la colonización de nuevos territorios.

Durante las décadas de los años ‘50 y ‘60 del siglo XX, las ideas propuestas continuaron su evolución. Lack introdujo una visión darwiniana al considerar que los procesos DD están regulados por la selección natural basándose en sus investigaciones con aves (Lack 1954, 1966). Sin embargo, esta visión estaba encorsetada en los factores extrínsecos al individuo, como recursos, depredación o parásitos. Fuera del periodo reproductivo la mortalidad de la descendencia es mayor, así pues, se trata de un periodo esencial para mantener la eficacia biológica de los reproductores (Lack 1966). El principal factor relacionado con el incremento de la mortalidad es la variación en la disponibilidad de alimento fuera de la época reproductiva como fuerza reguladora de los procesos DD, excluyendo de esta forma la importancia del periodo reproductivo y el comportamiento de los animales como procesos reguladores. La visión monolítica de Lack sobre la disponibilidad de recursos como el principal determinante de la eficacia biológica se mantuvo durante las siguientes décadas (revisiones en Ricklefs 2000a y Ricklefs 2000b) pero no exenta de debate.

En contrapartida a las teorías de Lack, otros autores fueron elaborando hipótesis complementarias. En primer lugar, Chitty (1960) enfatizó la importancia de factores intrínsecos de los individuos (comportamiento, fisiología y genes), los cuales pueden actuar regulando las poblaciones de forma subyacente a los umbrales impuestos por la disponibilidad de alimento. Después Christian et al. 1961 se centraron en la investigación de las respuestas del sistema endocrino como mecanismo regulador de la competencia intraespecífica (Christian 1961, Christian y Davis 1964). Por último, Wynne-Edwards (Wynne-Edwards 1962, 1965) incorpora la regulación poblacional basada en el comportamiento funcional específico de los individuos para mantener las poblaciones por debajo del nivel impuesto por la disponibilidad de alimento (ver revisión en Sinclair 1989).

En las décadas de los años ‘70 y ‘80 se desarrollaron modelos predictivos para mostrar la relación general entre dinámicas temporales y los procesos denso-dependientes (May

*et al.* 1974). La validación de estos modelos y otros posteriores fueron corroborados en poblaciones de invertebrados (Hassell 1975, May *et al.* 1981). Durante los últimos años del siglo XX e inicios del siglo XXI nuevas evidencias han emergido en vertebrados destacando la importancia de los procesos denso-dependientes en la regulación de las poblaciones (Both 1998a, Kruuk *et al.* 1999b, Sinervo *et al.* 2000). Sin embargo, la medida en que los procesos denso-dependientes y adaptativos son responsables de las variaciones en los rasgos de los individuos, como de la dinámica de las poblaciones, continúa sin resolverse de forma clara. Los efectos denso-dependientes son procesos fundamentales a través de los cuales las poblaciones alcanzan su equilibrio ecológico (Kokko y Rankin 2006), pero las evidencias experimentales que soportan las asunciones de los modelos descritos continúa siendo escasa en vertebrados (Travis y French 2000, Matthysen 2005).

### ***¿A qué se debe esta falta de evidencias experimentales?***

Los trabajos experimentales con vertebrados son difíciles de llevar a cabo en el medio natural ya que se trata generalmente de especies con elevada movilidad espacial y temporal. Esto implica la necesidad de tamaños muestrales grandes con las dificultades inherentes que conlleva. Por otra parte, la mayoría de especies son longevas en comparación con invertebrados. Además, tienen sistemas reproductivos, cuidados parentales y patrones dispersivos complejos y diversos en los diferentes integrantes del subfilo *Vertebrata* (Cuvier 1812). Todas estas características conllevan que analizar los procesos denso-dependientes no suponga una tarea exenta de complejidad, pues otros procesos y factores pueden estar actuando a la vez en el espacio y en el tiempo. La mayoría de estos estudios proceden de datos observacionales y no de experimentos a medio-largo plazo. Hasta ahora los estudios empíricos en general han tratado de encontrar las relaciones entre las variables ambientales y la densidad, o bien, la relación entre la supervivencia de los individuos reproductores y la densidad (ver revisiones en Fowler 1981, Murdoch 1994, Wolff 1997, Newton 1998). Sin

embargo, la única forma de conocer las causas y consecuencias de la densidad es por medio de la experimentación, es decir, cambiando el número de individuos en la población lo que supone una situación de gran complejidad. Con el uso de aproximaciones experimentales es posible abordar los efectos adaptativos de la denso-dependencia sobre las estrategias de los reproductores y los mecanismos subyacentes (Alatalo y Lundberg 1984, Both 1998b, 2000, Nevoux *et al.* 2011).

### ***Principales hipótesis que explican los procesos denso-dependientes en aves***

La mayoría de las especies de aves durante la época reproductiva exhiben comportamientos territoriales, de los 320 taxones de aves más del 60% tiene cría territorial (Rolland *et al.* 1998, Sachs *et al.* 2007), y desde una perspectiva teórica esta situación favorece una regulación denso-dependiente negativa (Rolland *et al.* 1998). Dos hipótesis principales han sustentado esta relación negativa. En primer lugar, '*Habitat Heterogeneity Hypothesis*' (Rodenhouse *et al.* 1997) propone que, al aumentar la densidad de individuos, la heterogeneidad del hábitat relega a determinados individuos a ocupar parches de hábitat de menor calidad. Como resultado se reduce el éxito medio de la población, porque hay más individuos en las zonas de menor calidad reproductiva y genera una regulación denso-dependiente (Adrewartha y Birch 1954, Dhondt *et al.* 1992, Ferrer y Donazar 1996). En segundo lugar, la conocida como '*Individual Adjustment Hypothesis*' basada en que la variación de la fecundidad y éxito reproductivo surge de un incremento en la frecuencia de interacciones negativas entre reproductores. La competencia entre individuos resultaría en un ambiente social desfavorable que conlleva la regulación de la población (Dhondt *et al.* 1992).

Hasta ahora solo se han mencionado los efectos negativos denso-dependientes, pero un aumento de la densidad también implica efectos positivos. Son muchas las hipótesis planteadas que explican los beneficios de la agregación de individuos. Por ejemplo, la

agregación de individuos durante la reproducción reduce la susceptibilidad individual a la depredación (Darling 1938, Ims 1990), favorece las oportunidades de reproducción para individuos que no son capaces de mantener un territorio mediante el parasitismo de puesta (Ležalová-Piálková 2011). En otros casos la agregación supone beneficios al favorecer comportamientos coordinados que facilitan la localización de lugares óptimos para encontrar comida o evitar depredadores (Darling 1938, Richner y Heeb 1996), aumenta las probabilidades de encontrar pareja (Wagner 1993) o bien, los individuos pueden beneficiarse del conocimiento de otros congéneres de la calidad de un hábitat para seleccionarlo (Danchin *et al.* 1998, Wagner y Danchin 2003) entre otras. Un punto intermedio entre los efectos negativos y positivos son las hipótesis que combinan ambos efectos, por ejemplo, ‘*the funcional hypothesis*’ (Alexander 1974, Lauder 1986, Sachs *et al.* 2007) sugiere un balance entre los costes y beneficios de la agregación relacionado con un aumento o detrimento de la eficacia biológica como causa última.

Como hemos visto en los dos párrafos anteriores, la importancia de las interacciones entre reproductores ha sido y continúa siendo un puzzle complejo para la biología evolutiva (Stearns 1992, Sutherland 1996, Danchin y Wagner 1997, Rodenhouse *et al.* 1997, Travis *et al.* 1999, Sutherland y Norris 2002). Las poblaciones animales han evolucionado en el tiempo con la existencia de los procesos denso-dependientes subyacentes. En la mayoría de casos, para llegar a resultados satisfactorios en el estudio de los procesos denso-dependientes es necesario largas series temporales de datos y grandes escalas espaciales, situación que en escasas ocasiones es viable si se trabaja con poblaciones de vertebrados. La única alternativa para abordar los procesos denso-dependientes es mediante el uso de aproximaciones experimentales, pero hay que tener en cuenta la heterogeneidad espacial del hábitat, la cual puede actuar como un factor de confusión (Nevoux *et al.* 2011). Esta situación se puede controlar por medio de dos maneras, por un lado, modificando la calidad del hábitat, o

bien incrementando la densidad de reproductores. Como veremos posteriormente, en esta segunda posibilidad es donde encaja el potencial de la presente Tesis. Por ello, la contribución de nuevas evidencias experimentales es esencial para comprender y predecir la regulación de las poblaciones animales (Sinervo *et al.* 2000, Matthysen 2005, Kokko y Rankin 2006, Nicolaus *et al.* 2016).

En las siguientes secciones, se presenta una breve revisión de aspectos clave para los procesos denso-dependientes descritos en vertebrados. Por un lado, (1) los efectos directos de la denso-dependencia en la competencia entre reproductores en el éxito reproductivo y sobre las conductas de los mismos; por otro lado (2) los efectos adaptativos de factores claves en las estrategias reproductivas de aves, como son los ajustes facultativos de la sex ratio, los efectos ambientales frente a los maternos y la dispersión natal de la descendencia.

## ***Efectos de la denso-dependencia en la competencia de reproductores.***

### ***Competencia intraespecífica y éxito reproductivo***

Los factores por los que compiten los individuos de una misma población son la disponibilidad de alimento, el acceso a parejas reproductivas, los lugares para criar a la descendencia, y la interacción entre estos factores (Newton 1998). Los hábitats de alta calidad favorecen el establecimiento de un mayor número de territorios para los individuos de una especie, pero a su vez, dando lugar a zonas de conflicto al incrementar la cantidad de interacciones entre congéneres como agresiones, sabotajes, infanticidio o parasitismo (López-Sepulcre *et al.* 2010). Por lo tanto, no todos los individuos en hábitat favorables son capaces de mantener su territorio, y podrían reducir su productividad potencial en determinadas situaciones. (Kokko y Rankin 2006, Rankin *et al.* 2007). En un contexto de aumento de la densidad poblacional, además de cambios en el éxito reproductivo en el corto plazo, también es clave el éxito en la futura supervivencia de los juveniles (Both *et al.* 1999). Por ejemplo, en la población

de cernícalos de la isla Mauricio (*Falco punctatus*), tanto el éxito reproductivo (número de volantones por puesta) como la supervivencia juvenil en años posteriores decrece a medida que incrementa el tamaño poblacional (Nevoux *et al.* 2011). Sin embargo, pocos estudios han observado la importancia de la densidad poblacional en el éxito reproductivo desde una aproximación experimental, por ejemplo manipulando la cantidad de nidos disponibles (Alatalo y Lundberg 1984, Both 1998b).

El estudio experimental de los efectos de la densidad poblacional sobre el éxito reproductivo en aves se ha llevado a cabo solo con un grupo reducido de paseriformes, entre ellos: el papamoscas cerrojillo (*Ficedula hypoleuca*), el carbonero común (*Parus major*) y con el herrerillo común (*Parus caeruleus*), (Alatalo y Lundberg 1984, Both 1998a, Serrano-Davies *et al.* 2017). Toda la información referente a la denso-dependencia apunta a una relación negativa entre aumentos de la densidad y medidas del éxito reproductivo, pero en el caso de aves coloniales surge una pregunta clave: ¿si la densidad supone un coste a los individuos que la experimentan, por qué los individuos continúan agregándose o criando de forma colonial?. Ante la escasez de evidencias experimentales, continuar investigando los procesos denso-dependientes tanto en el éxito reproductivo como en la supervivencia juvenil son necesarios para comprender las dinámicas espacio-temporales de las poblaciones animales.

### ***Competencia intraespecífica y comportamiento***

El comportamiento de los individuos y sus interacciones sociales también juegan un papel importante en la competencia intraespecífica y el futuro éxito reproductivo, como por ejemplo en la lagartija de turbera, *Zootoca vivipara*, (Cote *et al.* 2008) o el carbonero común, *Parus major*, (Quinn *et al.* 2009, Nicolaus *et al.* 2016). Las conductas de señalización u ornamentales, como señales de calidad genética o condición física, han sido principalmente descritas en machos de especies sociales. Sin embargo, cada vez aparecen nuevas evidencias de beneficios al señalizar su condición física y estatus por parte de las hembras (Johnstone 1996, Amundsen 2000).

El uso de conductas y/o rasgos de señalización están principalmente relacionados con la selección sexual, es decir, con variaciones del comportamiento que aumentan el atractivo o la capacidad para competir por parejas reproductivas de los individuos que los llevan a cabo (Keagy *et al.* 2011, Clutton-Brock y Huchard 2013). En los machos, la causa última es la atracción de hembras, comunicación inter-sexual (Coleman *et al.* 2004, Veiga *et al.* 2006). En el caso de las hembras, el uso de ornamentos se dirige tanto a miembros del sexo opuesto como del propio, comunicación intra- e intersexual (Sergio *et al.* 2011, García-Navas *et al.* 2015). En un contexto de denso-dependencia, la densidad podría afectar las conductas de los reproductores hacia conespecíficos, sin embargo, las evidencias de cómo responden a cambios del número de individuos en una población son escasas.

### ***Efectos adaptativos a la denso-dependencia sobre las estrategias de los reproductores.***

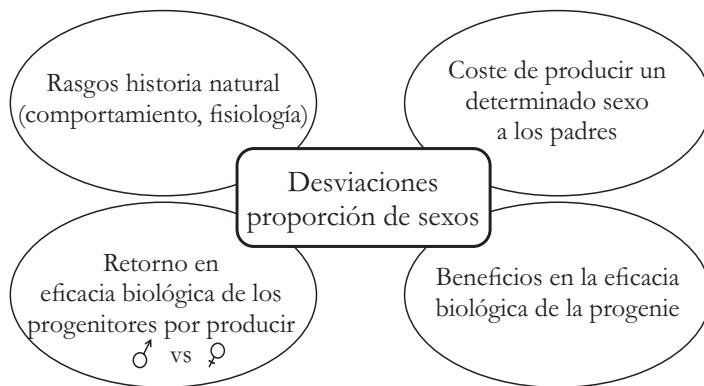
En este apartado se tratan aspectos clave de las estrategias vitales en aves, 2.1 ajustes facultativos de la proporción de sexos, 2.2 efecto ambiental *vs* efecto materno, 2.3 efectos sobre la dispersión natal y el estado del arte con respecto a los procesos denso-dependientes.

#### ***Ajustes facultativos de la proporción de sexos ('Sex allocation theory')***

En la actualidad, está aceptado que la selección natural favorece a los padres que modifican la inversión en un sexo u otro para maximizar su eficacia biológica (ver cuadro 1). Sobre todo, si se considera el sexo como el rasgo fenotípico con mayor influencia en las oportunidades para reproducirse en la descendencia (Navara 2018). Sin embargo, en vertebrados aún se debate el carácter adaptativo o no de la asignación de sexos, a partir de ahora sex ratio, (Cockburn *et al.* 2002, Hasselquist y Kempenaers 2002, Komdeur 2012, Navara 2018). Las evidencias empíricas sugieren sesgos adaptativos de la sex ratio en respuesta a condiciones ambientales y sociales. Los principales factores demostrados en aves y mamíferos son: la condición de las hembras reproductoras (Nager *et al.* 1999), el estatus de dominancia de las

hembras reproductoras (Sheldon y West 2004), la disponibilidad de alimento (Byholm *et al.* 2002), el papel que desempeña la producción de machos o hembras bajo determinadas condiciones varía la eficacia biológica de la madre (Silk y Brown 2008) y las características fenotípicas de atractivo y calidad de los machos (Ellegren *et al.* 1996). Como hemos descrito, hay gran variedad de factores que influyen en la sex ratio. Para comprender estos ajustes es necesario el uso de distintas perspectivas para interpretar su posible carácter adaptativo (Fig.1).

Los procesos denso-dependientes también influyen en la proporción de sexos aunque principalmente se han evidenciado en mamíferos ungulados y roedores (Kruuk *et al.* 1999a, Clutton-Brock *et al.* 2002, Sheldon y West 2004, Bryja *et al.* 2005, Servanty *et al.* 2007). En el caso de las aves, los estudios específicos entre densidad de reproductores y sex ratio



**Figura 1.** Diagrama que muestra los factores necesarios para comprender la importancia adaptativa o potencialmente adaptativa de la asignación de sexos en un sistema (adaptado de Navara 2018).

son escasos. En un estudio realizado con el carricero de Seychelles (*Acrocephalus sechellensis*) se evidenció un sesgo a hembra en hábitats de calidad y baja densidad de reproductores (Komdeur *et al.* 2002). Otro ejemplo es el descrito en el papamoscas collarino (*Ficedula albicollis*) donde si los reproductores crían en un hábitat con abundancia de territorios disponibles, la sex ratio es sesgada hacia machos favoreciendo el establecimiento de la descendencia en los territorios disponibles (Hjernquist *et al.* 2009). Sin embargo, estudios experimentales

**Cuadro 1.** En 1930 Fisher estableció que la selección natural debe actuar en la asignación de sexos favoreciendo el equilibrio de los mismos. En una situación donde hay un desajuste en la proporción, la producción del sexo minoritario retornará mayor beneficio a la inversión parental favoreciendo de nuevo el ajuste a frecuencias equitativas. Hasta tres décadas después, no se identificaron evidencias que contradijeran las asunciones del modelo propuesto por Fisher (1930). En 1967 Hamilton identificó asignaciones no equitativas a nivel grupal en himenópteros, donde las interacciones entre grupos favorecía el ajuste de la sex ratio hacia el sexo que experimenta la menor cantidad de competencia con sus familiares directos. En la siguiente década, Trivers y Willard (1973) plantearon un modelo verbal de la sex ratio demostrando ajustes en respuesta a las condiciones ambientales. La asunción principal de la hipótesis de Trivers y Willard es que los individuos reproductores en mejor condición invierten más en el sexo que deriva el mayor aumento de su eficacia biológica para un determinado nivel de inversión. En el caso de especies poligínicas, los machos tienen una mayor variación en el éxito reproductivo. Si las madres invierten en hijos, este aumento de la inversión se verá recompensada con el retorno aportado a su eficacia biológica por los hijos. A partir del modelo planteado por Trivers y Willard han resultado variaciones del mismo en relación a otros procesos relevantes como la dispersión o cambios en la perspectiva de la eficacia biológica de los progenitores o de la descendencia (ver revisión en Cockburn *et al.* 2002).

para analizar la influencia directa de la densidad reproductiva en ajustes de la sex ratio no se han realizado por el momento. Los posibles ajustes de la proporción de sexos en un contexto denso-dependiente y su influencia en las estrategias reproductivas son cuestiones fundamentales para la comprensión de las dinámicas poblacionales, además de esenciales para realizar predicciones de las mismas en un medio cambiante como el experimentado en la actualidad (Moritz y Agudo 2013).

### ***Variabilidad del fenotipo: efectos ambientales y efectos maternos***

La variabilidad en los rasgos expresados del fenotipo y del fenotipo extendido depende tanto de la influencia del ambiente como de la herencia genética recibida. Las características de los rasgos fenotípicos pueden ser contemplados a nivel genético y ambiental, en este caso vamos a excluir deliberadamente los efectos de la herencia genética, es decir, vamos a contemplar los rasgos más allá de la mera contribución genética de los progenitores a los genes de la descendencia. En primer lugar, trataremos el papel que juega un determinado ambiente (densidad reproductiva) en la variación individual de los rasgos fenotípicos, y con especial

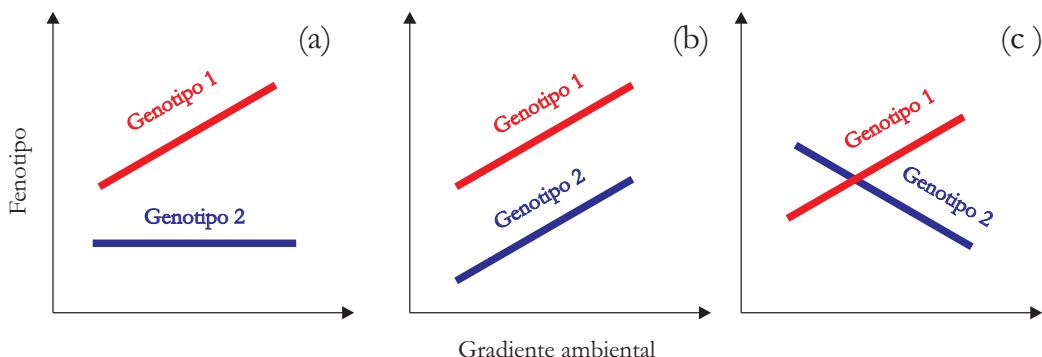
énfasis en el ambiente experimentado durante las fases tempranas de desarrollo (efecto ambiental). En segundo lugar, trataremos el papel que juega un determinado ambiente (densidad reproductiva) en el fenotipo de los progenitores y su influencia en los futuros rasgos fenotípicos exhibidos por la progenie (efecto materno).

*a) Efectos ambientales*

Las condiciones ambientales en las etapas tempranas de desarrollo pueden conllevar efectos para toda la trayectoria vital del individuo (Metcalfe y Monaghan 2001, Monaghan 2008). La importancia de este hecho radica en que determinados genotipos producen diferentes fenotipos en respuesta a un determinado ambiente, esto se conoce como plasticidad fenotípica. Una forma sencilla de exemplificar el concepto de plasticidad fenotípica con respecto al efecto ambiental es mediante su representación gráfica (Fig. 2, normas de reacción; Schmalhausen 1949, Stearns y Koella 1986, Pigliucci 2001).

El beneficio de la plasticidad fenotípica para un individuo es la capacidad para producir un mejor fenotipo en un ambiente dado (Fig. 2, b y c). En el caso de que la plasticidad fenotípica sea adaptativa, permitiría una tolerancia frente a un cambio ambiental (Miner *et al.* 2005, Charmantier *et al.* 2008, Gienapp *et al.* 2008). No obstante, en la naturaleza el beneficio aportado por la expresión de un fenotipo se encuentra dentro de unos límites (DeWitt *et al.* 1998). Por ello, pueden darse situaciones donde la variación ambiental es extrema (natural o inducida), situándose fuera de los límites soportados por la plasticidad fenotípica provocando una relación negativa entre factores ambientales y el éxito reproductivo (Ghalambor *et al.* 2007).

La denso-dependencia de los efectos ambientales ha sido demostrada en distintas especies principalmente en relación a la condición física y supervivencia de los reproductores. Por ejemplo, un aumento de la densidad en poblaciones de candelita norteña americana (*Setophaga ruticilla*) en manglares de alta calidad reduce la condición física y supervivencia de las aves.



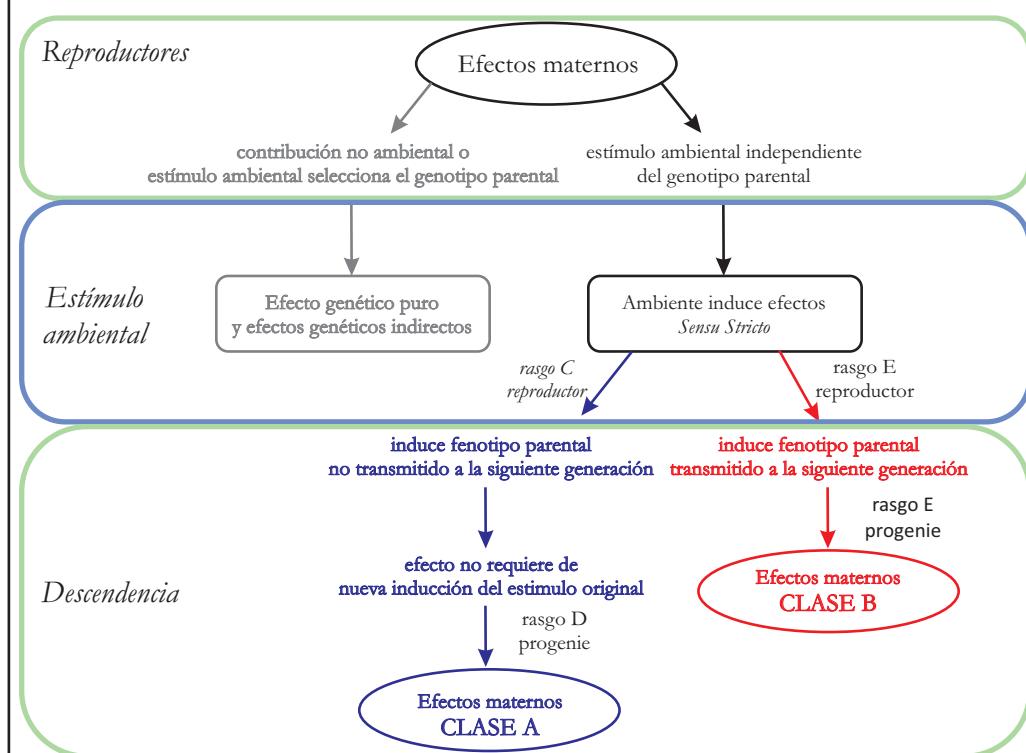
**Figura 2.** Representación gráfica de las normas de reacción de dos genotipos. El genotipo 1 (rojo) muestra una pendiente mayor que cero, indicando plasticidad fenotípica, es decir, variación del fenotipo expresado en función del cambio en el ambiente. a) El genotipo 1 (rojo) muestra una pendiente diferente de cero, indicando plasticidad fenotípica ante cambios en el ambiente. El genotipo 2 (azul) muestra una pendiente igual a cero, indicando ausencia de plasticidad fenotípica. b) El genotipo 1 y genotipo 2 muestran normas de reacción con la misma pendiente, indicando ausencia de interacción entre genotipo y ambiente. Ambos genotipos responden igual ante el cambio ambiental. c) Los genotipos 1 y 2 muestran distintas pendientes, indicando la existencia de interacción entre genotipo y ambiente. Distintas respuestas fenotípicas para el mismo cambio ambiental (adaptado de Stearns 1992).

Mientras que, en hábitat de baja calidad la alta densidad sólo afecta a la condición física pero no a la supervivencia (Marra *et al.* 2015). Otro ejemplo es el caso del pinzón cebra (*Taeniopygia guttata*) en cautividad. En esta especie la densidad poblacional disminuye la condición física de la descendencia y, como consecuencia el éxito reproductivo de los reproductores, además de promover cambios en el comportamiento como señales sonoras y agresividad hacia conespecíficos (Poot *et al.* 2012).

### b) Efectos maternos

Los efectos maternos se definen como cualquier influencia parental en el fenotipo de la progenie que no puede atribuirse únicamente al genotipo (*e.g.* el número de alas de un individuo), ni tampoco a la influencia directa de los componentes no parentales del entorno de la descendencia (*e.g.* abundancia de alimento), o la combinación de ambos (definición adaptada de Lacey 1998). En otras palabras, la expresión de un rasgo fenotípico en la siguiente generación como consecuencia de la interacción entre un estímulo ambiental y el genotipo de los progenitores. Al igual que se describió en el epígrafe anterior, determinados

**Cuadro 2.** Tipos de efectos maternos (Fig.C2); *clase a*) un estímulo/señal ambiental determina el fenotipo expresado del rasgo C en los progenitores. Este fenotipo induce la expresión de un determinado rasgo D de la descendencia. Por ejemplo, el caso de las tortugas marinas, las cuales la profundidad a la que depositan sus huevos en las playas las tortugas marinas hace variar la temperatura del huevo (rasgo C) determinando el sexo de la progenie (rasgo D) (Roosenburg 1996). *Clase b*) la señal ambiental altera la expresión fenotípica del rasgo E en los progenitores, pero en este caso, dicha expresión fenotípica se manifiesta en el mismo rasgo de la descendencia. Por ejemplo, en un experimento con el carbonero común se observó una interacción entre las condiciones alimenticias experimentadas por las madres previas a la eclosión de los huevos y las condiciones posteriores de crianza en la nidada. Los pollos, con suplemento materno previo y sin suplemento alimenticio durante su desarrollo y viceversa, mostraron que el efecto materno proporcionaba la capacidad de compensar la falta de alimento en el desarrollo temprano (Giordano *et al.* 2014).



**Figura C2.** Diagrama conceptual de efectos maternos. En azul efectos maternos Clase A, un determinado rasgo del fenotipo parental inducido por el ambiente afecta a un rasgo diferente del fenotipo de la descendencia. En rojo efectos maternos Clase B, un determinado rasgo del fenotipo parental inducido por el ambiente afecta al mismo rasgo del fenotipo de la descendencia (adaptado de Lacey 1998, en Mousseau y Fox 1998).

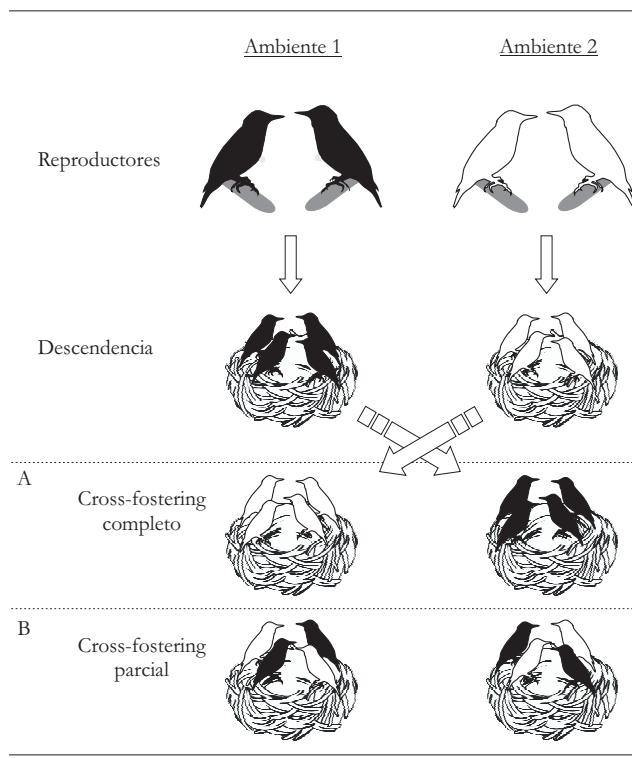
genotipos producen diferentes fenotipos en respuesta a un determinado ambiente, a su vez los estímulos ambientales generan diferentes tipos de efectos maternos, ver cuadro 2 (Mousseau y Fox 1998).

Las evidencias de efectos maternos en un contexto de denso-dependencia son escasas en vertebrados y principalmente se han encontrado en ungulados y en roedores, por ejemplo en el caso del ciervo rojo, *Cervus elaphus*, (Kruuk *et al.* 1999a), en el topillo de la tundra, *Microtus oeconomus*, (Bian *et al.* 2015) y la ardilla roja, *Sciurus vulgaris*, (Dantzer *et al.* 2013). Un único estudio en aves ha mostrado esta relación de forma directa en poblaciones salvajes (Bentz *et al.* 2013). En este estudio con golondrina bicolor (*Tachycineta bicolor*) se manipuló la densidad de nidos en una colonia para alterar los niveles de competencia social. Las hembras en alta densidad experimentaron un mayor número de interacciones agresivas, y sus huevos presentaban mayores concentraciones de hormonas. La progenie de estos huevos mostró un crecimiento más rápido y mostraron comportamientos más competitivos. Esto sugiere la existencia de efectos maternos que prepara a las crías para un ambiente social determinado, pero por ahora las evidencias son escasas para esclarecer cuales son los patrones generales en función de la densidad poblacional y cuáles son los mecanismos subyacentes a dichos procesos. Por ello, la variación de la densidad podría actuar sobre las estrategias reproductivas de los progenitores con implicaciones para la progenie o bien, tan sólo hay efecto ambiental durante el desarrollo de la descendencia. El uso de aproximaciones experimentales es esencial para abordar estas cuestiones (ver cuadro 3).

### ***Dispersión natal de la progenie***

La dispersión natal es un proceso clave en dinámica poblacional y en ecología evolutiva (Clobert *et al.* 2001 y Garant *et al.* 2005 respectivamente). La dispersión en animales ha sido definida como movimientos activos del lugar de nacimiento o reproducción hacia otro lugar para reproducirse (Clobert *et al.* 2009). Si consideramos sólo la nueva generación de

**Cuadro 3.** Los métodos observacionales no permiten diferenciar efectos maternos de los efectos debidos al ambiente. Una herramienta clásica para discernir estos efectos es el uso de técnicas de intercambio o ‘cross-fostering’, la cual permite distinguir entre ambos efectos de forma sencilla y elegante. La técnica del *cross-fostering* consiste en diferenciar rasgos fenotípicos de los padres biológicos del esperado por el efecto del ambiente donde se desarrolla la descendencia. Para ello, es necesario combinar/intercambiar individuos entre nidadas o camadas, donde las crías comparten el mismo ambiente de desarrollo, pero procedan de orígenes distintos (Fig.C3).



**Figura C3.** Representación esquemática de un experimento de cross-fostering. Para determinar los efectos prenatales o ambientales se intercambian individuos de diferente ascendencia genética (individuos negros o blancos) para que comparten el mismo ambiente durante su desarrollo y, a la inversa, que individuos de misma ascendencia genética crezcan en ambientes distintos. A, intercambio completo de individuos, todos son hermanos/as, pero se desarrollan en un ambiente diferente al correspondiente por sus progenitores. B, intercambio parcial de individuos. El ambiente de desarrollo es compartido por hermanos/as genéticos y por hermanos/as adoptivos.

La técnica del *cross-fostering* ha sido ampliamente usada en especies ovíparas (Young *et al.* 1965, Merilä y Sheldon 2001, Estramil *et al.* 2014), aunque los primeros trabajos en vertebrados para observar efectos maternos con un experimento de intercambio fueron llevados a cabo con roedores (Bateman 1954, Cox *et al.* 1959). La técnica es especialmente útil en aves ya que los embriones se desarrollan fuera del cuerpo de la madre. Esto permite controlar la información materna recibida debido a que la madre incorpora al huevo todo lo referente a su condición física, genética (incluida la carga paternal) y la influencia del ambiente experimentado. Si un huevo es intercambiado a otra puesta, tenemos la certeza de un origen distinto al lugar donde se criará el individuo. Otra posibilidad es realizar el intercambio en el momento de la eclosión de los huevos (en el caso de aves altriciales\*). En función de las preguntas planteadas, esta opción aporta ciertas ventajas como el marcaje de los individuos sin necesidad del uso de técnicas invasivas o monitoreo permanente.

individuos producidos en un evento reproductivo, una máxima que deriva del término de dispersión es la importancia de la supervivencia para acceder a la reproducción.

Para un individuo, el simple hecho de dispersar supone costes como consecuencia de un proceso activo. Por ejemplo, los costes pueden ser energéticos, tiempos de desplazamiento y exposición a depredadores entre otros (Clobert *et al.* 2001). Sin embargo, también existen oportunidades para los individuos dispersantes como evitar la competencia intraespecífica, disponibilidad de nuevos territorios o encontrar parejas sin parentesco (Clobert *et al.* 2004, Bowler y Benton 2005, Bonte *et al.* 2012). En el caso de las aves, el sexo es relevante a la hora de explicar los patrones de dispersión (Greenwood 1980, Matthysen 2005, Li y Kokko 2019).

En este contexto, la competencia entre individuos por los recursos locales y sus interacciones con otros congéneres se tornan factores esenciales para entender los patrones dispersivos de una parte de su descendencia (Lambin *et al.* 2001). El aumento de densidad podría favorecer la aparición de fenotipos dispersivos. La denso-dependencia adaptativa en la dispersión natal está bien documentada en algunos taxones de insectos (Denno y Peterson 1995). Evidencias en delfácidos han mostrado que un aumento de densidad provoca la producción de las formas más dispersivas en la progenie como consecuencia del uso de plantas hospedadoras distintas a la especie óptima para reproducirse. En este caso la competencia por los recursos activa la dispersión (Denno *et al.* 1991). Sin embargo, los estudios que abordan una prevalencia efectiva de la dispersión y su relación con el nivel de competencia continúa siendo escasa y confusa en vertebrados (Matthysen 2005). De hecho, los estudios que han investigado la relación entre densidad y dispersión son contradictorios o presentan aproximaciones variables para testar la relación (Nilsson 1989, Forero *et al.* 2002, Nevoux *et al.* 2010).

Las evidencias que relacionan la dispersión con las condiciones previas experimentadas por los individuos continúan emergiendo. Por ejemplo, en especies emparentadas de azulejos

(familia *Turdidae*), la expansión a nuevas zonas de una especie u otra se debe a la relación entre dispersión y agresividad de las distintas poblaciones, desplazando a las poblaciones con un comportamiento menos agresivo (Duckworth y Badyaev 2007). Otros ejemplos sugieren sensibilidad de la dispersión como consecuencia de la densidad reproductiva, como es el caso de los piqueros patiazules (*Sula nebouxii*). A densidades moderadas-altas, las distancias de dispersión mostraron una dependencia positiva de la densidad. En cambio, en densidades bajas-moderadas, el patrón de dispersión se invierte (Kim *et al.* 2009). La variedad de patrones en las evidencias empíricas directas entre la densidad de reproductores y la dispersión natal de la descendencia complica la comprensión actual de cuáles son los patrones generales. Por tanto, continúa la necesidad de abordar estas cuestiones desde aproximaciones experimentales.

### ***¿Dónde encaja la presente Tesis?***

Esta tesis aborda los procesos denso-dependientes en el modelo reproductivo del estornino negro (*Sturnus unicolor*, Temminck), una especie colonial y con marcada territorialidad durante la época de cría (Cramp y Perrins 1994). Investigaciones previas en estorninos muestran interacciones negativas como consecuencia de la competencia intraespecífica por el acceso a parejas, adquisición y mantenimiento de territorios (Sandell y Smith 1997, Sandell 1998 en el cercano estornino pinto, *Sturnus vulgaris*; Veiga *et al.* 2001, 2012 en el estornino negro). Estas características resultan idóneas para testar los procesos denso-dependientes desde una perspectiva empírica. El principal potencial de la presente Tesis es abordar los procesos denso-dependientes desde una aproximación experimental para explorar aspectos claves en la estrategia vital del estornino negro. Esto nos permitirá una visión global de los procesos denso-dependientes en poblaciones de aves coloniales con reproducción territorial. Las principales preguntas que nos planteamos en esta Tesis son: ¿es la densidad reproductiva un proceso denso-dependiente positivo o negativo en la especie modelo?, ¿cuáles son

los posibles mecanismos que generan los procesos denso-dependientes?, y ¿es la denso-dependencia un proceso adaptativo para las estrategias vitales en aves?

## ***Estructura y organización general de la Tesis***

### ***Objetivos generales***

Esta Tesis aborda dos objetivos principales:

- 1) los efectos denso-dependientes en la competencia entre reproductores, y
- 2) los efectos denso-dependientes sobre las estrategias vitales en aves,

usando como modelo de estudio una población de estornino negro (*Sturnus unicolor*). Para abordar los objetivos de esta tesis se planteó una doble metodología: observacional (a largo plazo con datos acumulados durante más de una década de seguimiento poblacional) y experimental (manipulación de la densidad de cajas nido e intercambio de pollos, ‘*cross-fostering*’).

**Capítulo 1.** Analizar los efectos de la proximidad de nidos en el éxito reproductivo y cómo influye en la dispersión natal de la descendencia. Así, se analiza si la densidad reproductiva actúa como un proceso modulador a largo plazo y sirve como punto de partida para afirmar la existencia de procesos denso-dependientes en la especie modelo. Para ello se usaron datos observacionales durante 13 años en una población de estornino negro en el éxito reproductivo y posterior reclutamiento de individuos como nuevos reproductores en la población. Los siguientes capítulos abordan los procesos denso-dependientes desde una aproximación experimental. Para ello, empleando la misma población de estornino negro, se manipuló la disponibilidad de cajas nido simulando dos ambientes de densidad diferenciada.

**Capítulo 2.** Investigar cómo la densidad reproductiva modula las conductas de señalización en machos y hembras de estornino negro (el uso de plantas verdes en machos y el uso de plumas ornamentales en hembras). La finalidad del capítulo es tratar de aportar una visión

de cómo la densidad reproductiva modularía dos rasgos del fenotipo extendido de machos y hembras y sus consecuencias diferenciales para los sistemas de emparejamiento y éxito reproductivo en ambos sexos.

**Capítulo 3.** Analizar el ajuste facultativo de la proporción de sexos en función de la densidad de reproductores y, por tanto, en la estrategia reproductiva de la especie modelo. Empleando la sex ratio primaria al momento de la eclosión, se pretende demostrar que la densidad reproductiva es un factor determinante para las hembras al ajustar la producción de machos y hembras en consecuencia.

**Capítulo 4.** Incluir una segunda aproximación experimental mediante un intercambio de pollos (*cross-fostering*) para discernir entre efectos maternos o efecto ambiental en la descendencia. Para ello se analizan cuáles son los mecanismos próximos en el desarrollo temprano y supervivencia de la progenie y su relación con la densidad reproductiva (*i.e.*, el tamaño corporal y la longitud de los telomeros). Se especula que el ambiente experimentado por la madre biológica favorece la diferencia de peso entre hijos e hijas favoreciendo una competencia desigual dentro del nido, donde los hijos compiten mejor que sus hermanas para maximizar su eficacia biológica. Por último, se discute las posibles vías que maximizan el éxito reproductivo y la eficacia biológica de los reproductores.

## **Modelo de estudio: el estornino negro (*Sturnus unicolor*)**

Las aves constituyen un modelo idóneo para el estudio de los procesos denso-dependientes en historia natural. Se trata de un grupo taxonómico con especies que viven de forma colonial, semi-colonial o sin agregar pero que la mayoría exhiben territorialidad en época reproductiva. Son especies relativamente longevas con sistemas de emparejamiento diversos y proporcionan cuidados parentales a la descendencia. Además, las aves que anidan en cavidades naturales aportan un extra al facilitar su manipulación experimental por medio del uso de cajas nido.



**Figura 3.** Ejemplar de estornino negro (Fotografía D. Fuentes).

El estornino negro es un ave paseriforme de pequeño-medio tamaño que se distribuye alrededor de la región mediterránea occidental (Cramp y Perrins 1994), Fig. 3. En la Península Ibérica, las poblaciones se establecen en un amplio rango de hábitats que abarca desde los bosques abiertos hasta las zonas urbanas. Se trata de una especie que anida estrictamente en cavidades (naturales o artificiales). El estornino negro presenta cierto grado de dimorfismo sexual, siendo los machos más grandes en tamaño corporal (90.19 g de media en machos frente a 86.54 g en hembras), además muestran un plumaje más llamativo y presentan plumas en la garganta más estilizadas y pronunciadas. Durante la época reproductiva, el macho tiene

la base del pico azulado, mientras que el de la hembra es rosáceo, siendo la punta del pico amarilla en ambos sexos (ver Fig. 4, a y b). Las hembras comienzan a reproducirse al año de vida, sin embargo, en el caso de los machos no acceden a la reproducción hasta los 2 años de edad, momento en el que adquieren el tamaño suficiente para ser capaces de competir por un territorio. Las densidades poblacionales pueden variar desde 8-10 aves/10 ha en formaciones arboladas abiertas y 15-50 aves/10 ha en zonas urbanas (Veiga y Polo 2016). Es un ave social durante todo el año pero que durante el periodo reproductivo muestra una marcada territorialidad en ambos sexos. Además, presenta un sistema de emparejamiento facultativamente poligínico, es decir, en determinadas ocasiones los machos pueden controlar más de un nido y, por tanto, acceso a varias parejas reproductivas (Moreno *et al.* 2002). Por el contrario, las hembras se emparejan con un macho por evento reproductivo, aunque se



**Figura 4.** (a) Detalle de coloración del pico en hembras reproductoras. (b) Detalle de coloración del pico en machos reproductores. (c) Nido con puesta previa a la eclosión de los huevos donde se puede ver el total de plumas foráneas introducidas por la hembra residente. (d) Detalle de plantas verdes acarreadas por los machos previo a la construcción del nido. (Fotografías D. Fuentes).

han evidenciado cópulas extra-pareja desde un 10% hasta un 20% (Cordero *et al.* 2003). Al comienzo de la temporada reproductiva (inicios de marzo) los machos compiten por los territorios mostrando un cortejo (*display*) sonoro y visual. Una vez establecido el territorio los machos exhiben un comportamiento particular, atribuible a su fenotipo extendido, el acarreo de plantas verdes al nido (Fig. 4, d).

Por su parte, las hembras inspeccionan los nidos y evalúan la calidad del macho residente retirando las plantas verdes acarreadas (Veiga y Polo 2011). Una vez establecida la pareja reproductiva, a finales de marzo comienza la construcción del nido principalmente por la hembra, aunque el macho en ocasiones también colabora. Finalizada la construcción del nido, la hembra deposita un huevo por día hasta completar la puesta. En esta etapa es frecuente el sabotaje, robo y pérdida de las puestas por la competencia entre hembras por acceder a los machos y a lugares para nidificar (Veiga y Polo 2016). El tamaño medio de las puestas es 4 y 5 huevos las más comunes en nuestra población (Fig. 5). La incubación se iniciará con la puesta del penúltimo huevo y durará de media 11 días hasta la eclosión de la puesta. Previo a la eclosión, las hembras exhiben otro comportamiento conductual con diferentes interpretaciones, el acarreo de plumas foráneas dispuestas en los laterales del nido y sin contacto con los huevos (Fig. 4 c). Este comportamiento comienza con la puesta



**Figura 5.** Tamaño medio de puesta en la zona de estudio (Fotografía A. Illuminati).

del primer huevo y finaliza en el momento de la eclosión.

Una vez eclosionados los huevos comienza la crianza de los pollitos altriciales con una dieta basada en proteínas (Fig. 6 a). En el área de estudio principalmente compuesta por larvas de típulas, pero también multitud de otras especies de invertebrados según avanza la temporada. Las cebas corren a cargo de la hembra, aunque está documentado el aporte paterno. Los machos monógamos invierten más en el cuidado de las crías que los machos poligínicos, los cuales invierten mayor tiempo en la protección del territorio (Veiga *et al.* 2002). A los 5-6 días de vida los pollos comienzan a abrir los ojos y a desarrollar los cañones que posteriormente darán paso al plumaje. Durante el desarrollo en el nido competirán entre sí por el acceso al recurso alimenticio proporcionado por los progenitores. Ya en estas fases tempranas del desarrollo existe un leve dimorfismo sexual en el peso entre machos y hembras. Los volantones pasarán de media 23 días en el nido hasta alcanzar el tamaño adecuado (en promedio 81.2 g en los machos frente a 77.4 g en hembras, D. Fuentes, datos no publicados) para salir al exterior (Fig. 6 b). Después de finalizar las primeras puestas, en caso de completarse con éxito, comienza de nuevo todo el proceso en segundas puestas entorno a finales de mayo o primeros días de junio para finalizar los primeros días de julio.



**Figura 6 a.** Pollos de estornino negro con 4 días de vida. Como se puede apreciar en la fotografía los pollos a esa edad no tienen los ojos abiertos y no han comenzado a desarrollar el plumaje (Fotografía D. Fuentes).



**Figura 6 b.** Volantones a día 16 de vida. A esa edad prácticamente los individuos tienen el plumaje y tamaño adecuado para abandonar el nido (Fotografía D. Fuentes).

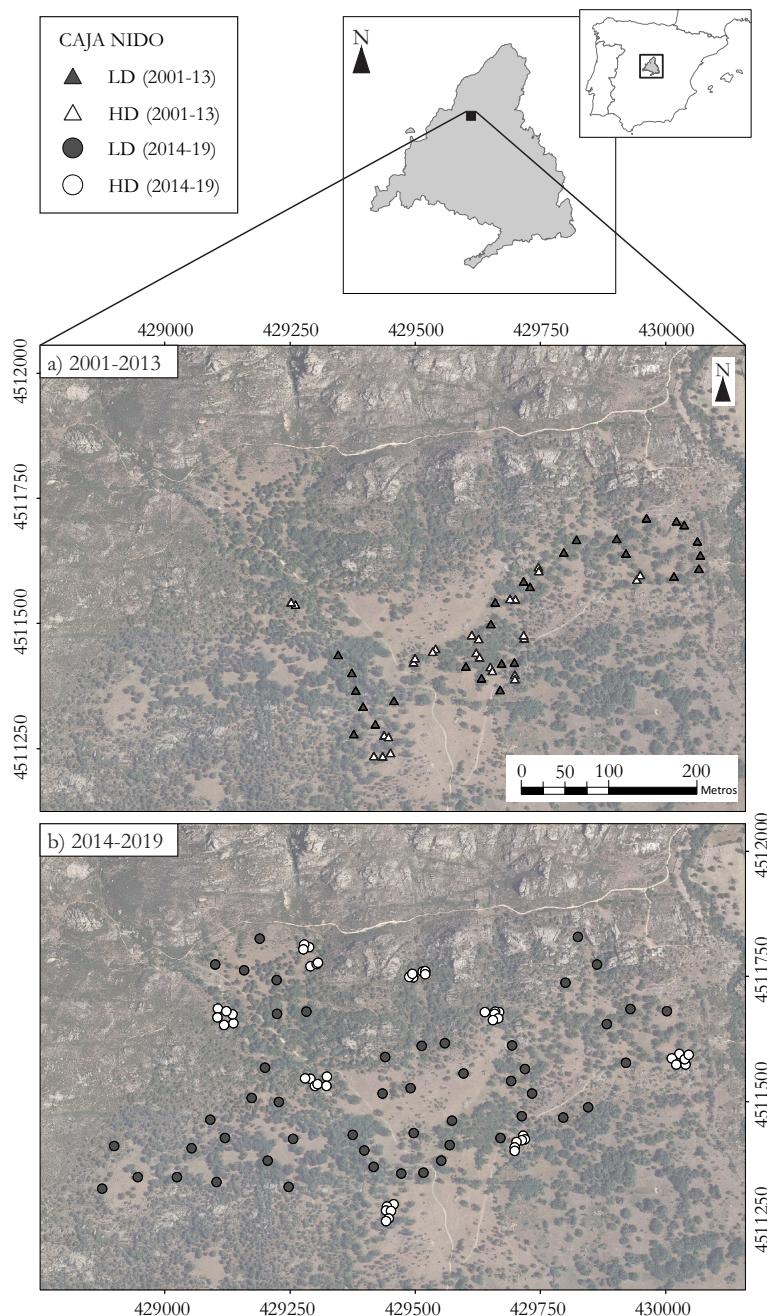
## Área de estudio

El área de estudio se sitúa en una dehesa ganadera de 40 ha en Manzanares el Real ( $40^{\circ}45'N$ ,  $3^{\circ}50'W$ , en la provincia de Madrid, España, Fig. 7) con una altitud de 980 m.s.n.m. La dehesa muestra unas condiciones homogéneas del hábitat, que consisten en zonas de pastos con árboles dispersos como encinas (*Quercus rotundifolia*), melojos (*Quercus pyrenaica*) y fresnos (*Fraxinus angustifolia*), Fig. 7. Las zonas de pasto son inundadas con alternancia para asegurar la disponibilidad de alimento para el ganado y, a su vez, grandes cantidades de alimento (invertebrados principalmente) que habitan en los pastos y son esenciales para la alimentación de los estorninos.



**Figura 7.** Vista panorámica de la dehesa de Colmenarejo, Manzanares el Real donde se instalaron las cajas nido empleadas para el desarrollo de la Tesis (Fotografía D. Fuentes).

Desde el año 2001 se han usado cajas nidos dispuestas en ramas de árboles para el seguimiento de forma ininterrumpida de una población salvaje de estornino negro. Hasta el año 2013 hubo 54 cajas nidos colocadas en la misma configuración espacial con un rango de distancias desde  $9.4\text{ m} \pm 3.5$  (media aritmética  $\pm$  desviación estándar) hasta los  $30.4\text{ m} \pm 10.8$  (Fig. 8, a). En el año 2014 se amplió el número de cajas a 98 unidades. El total de cajas nido

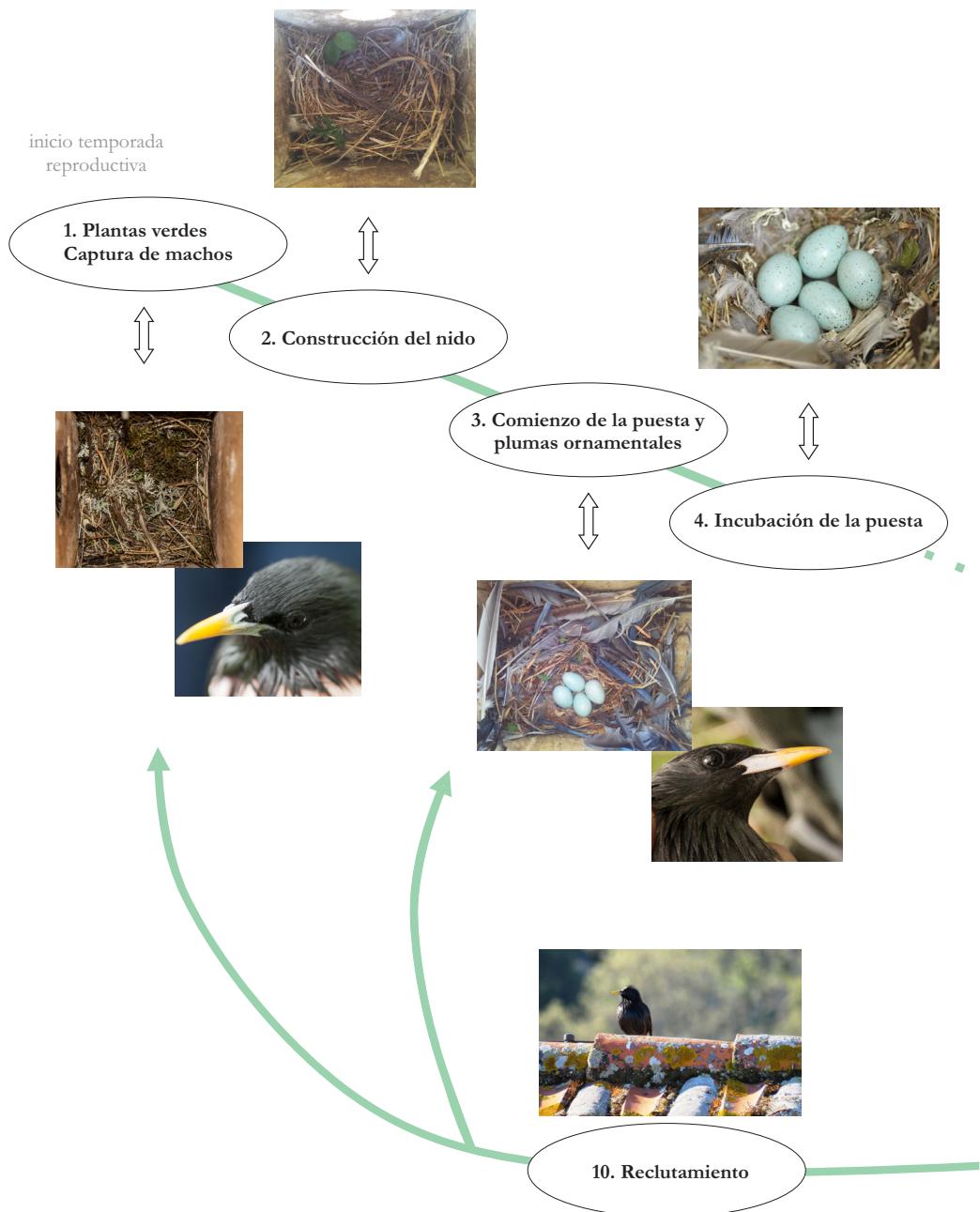


**Figura 8.** Localización geográfica de la zona de estudio. Mapas con la distribución de cajas nido en distintos períodos de tiempo. a) Distribución espacial de 54 cajas-nido durante los años 2001-2013, usados como aproximación observacional para evaluar los efectos de la denso-dependencia. b) Distribución espacial actual de 98 cajas-nido (2014-2019) usadas como aproximación experimental. Los triángulos muestran la disposición de cajas nido entre los años 2001 y 2013. Los cuadrados muestran la distribución de cajas nido desde el año 2014 hasta la actualidad. En ambos símbolos (triángulos y cuadrados) el color negro indica cajas nido de baja densidad (LD) y el color blanco de alta densidad (HD).

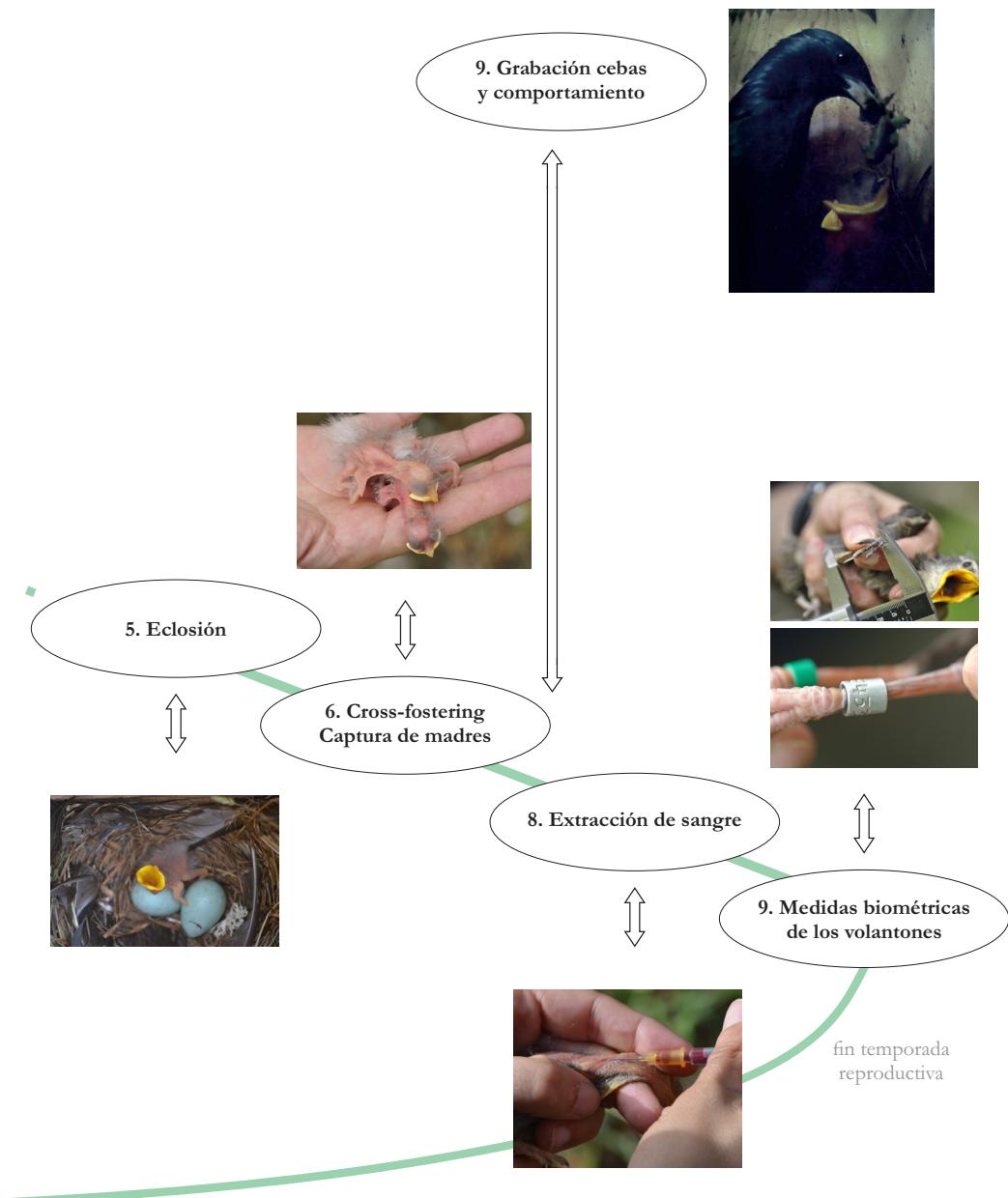
se dispusieron con una nueva configuración espacial simulando 2 ambientes de densidad claramente diferenciados (a partir de ahora zona alta densidad (HD) y zona baja densidad (LD), ver Fig. 8, b). En la zona HD se dispusieron grupos de 6 cajas nidos con distancias inferiores a los 10 m ( $\pm 5$ m) entre ellas. En total se distribuyeron 8 grupos de 6 cajas como zonas HD (48 unidades). El resto de cajas nidos (50 unid.) se distribuyeron por toda el área de estudio con distancias de 58 m ( $\pm 13$  m) con respecto a cualquier otra caja nido para simular un ambiente de baja densidad de reproductores (LD). En el diseño experimental descrito, el rango empleado de distancias entre cajas nido se encuentra dentro del observado en la zona de estudio de forma natural (Veiga y Polo 2016).

### ***Metodología general para la adquisición de datos de campo***

Todos los datos empleados en esta tesis proceden de la misma metodología de campo. A continuación, se muestra un cuadro-resumen de las distintas fases ejecutadas para la adquisición de datos durante 4 temporadas de campo (Fig. 9). Los distintos apartados muestran cómo y en qué momento se han obtenido los datos (capturas de reproductores, seguimiento de conductas de señalización, inicio de puestas, eclosión y desarrollo de la progenie, muestras de sangre, medidas biométricas y finalmente reclutamiento). Para más detalle ver las metodologías específicas de cada capítulo que conforman la presente Tesis.



**Figura 9.** Metodología general de trabajo. Desde la izquierda a la derecha se muestra en orden cronológico cada una de las etapas de adquisición de datos en campo.



1. *Cuantificación de plantas verdes y captura de machos:* a inicios del mes de marzo los machos en busca de territorio para la reproducción comienzan a introducir plantas verdes en las cavidades que se emplearan como nidos (líquenes, musgos, pequeñas plantas completas o fragmentos de las mismas como lavanda, santonina brotes de roble y encina entre otros).

Cada 2-3 días se realiza un seguimiento del estado del nido mediante el conteo del número de plantas verdes depositadas en el interior del nido. Para registrar y comparar esta información se ha usado una escala categórica como se detalla a continuación (Veiga *et al.* 2006):

- categoría 0: ausencia de fragmentos de plantas verdes en el nido
- categoría 1: un único fragmento de tamaño inferior a 5 cm o dos fragmentos menores de 2 cm.
- categoría 2: tres y/o cuatro fragmentos entre los 2 y los 5 cm y todas las posibles combinaciones.
- categoría 3: cinco o seis fragmentos de 2 a 5 cm o de siete u ocho fragmentos con dimensiones inferiores a 2 cm.
- categoría 4: más de seis fragmentos de 2 a 5 cm o de nueve fragmentos con dimensiones inferiores a 2 cm.
- categoría 5: más de 10 fragmentos con tamaños superiores a 2 cm.

En esta etapa se colocan trampas dentro de las cajas nido para identificar al macho propietario de la misma. En caso de capturar un individuo sin anillar se procede a la colocación de una anilla metálica con una combinación única de letras y número para su identificación en posibles recapturas. Además, se registra el peso del individuo, la longitud del tarso y la longitud alar desde la base del húmero hasta la longitud máxima de las plumas primarias.

2. *Construcción del nido:* Una vez establecida la pareja, las hembras comienzan a introducir material para construir el nido. Al igual que en el apartado anterior cada 2-3 se realiza un seguimiento del estado del nido y se ha categorizado las fases de construcción para facilitar la comparación entre nidos.

- L (*low*): tres o cuatro fragmentos de material con una disposición aleatoria

-LM (*low-medium*): más de 5 fragmentos de material con una disposición determinada.

-M (*medium*): material dispuesto en forma de media luna.

-MH (*medium-high*): material dispuesto con forma circular y aún se observa la base de la caja nido.

-H (*high*): la misma disposición de la categoría anterior, pero sin ver la base de la caja nido.

3. *Inicio de la puesta:* Las hembras depositan un huevo por día hasta completar la puesta. La variable fundamental que registramos es la fecha de puesta del primer huevo. Cada 1-2 días se revisa la puesta con las primeras luces del día. Las hembras depositan los huevos aproximadamente pasadas dos-tres horas desde el amanecer. Esta situación nos permite controlar la presencia de huevos parásitos en caso de encontrar dos huevos nuevos, además a priori los huevos parásitos tienen distinta forma y coloración permitiendo distinguirlos de la secuencia de huevos real de la puesta. Cada huevo es pesado y marcado con un rotulador no tóxico para determinar el orden de los huevos.

4. *Determinación del número de plumas e incubación:* Una vez las hembras depositan el penúltimo huevo comienza la incubación de la puesta. En este momento las hembras comienzan a introducir plumas foráneas en el nido durante los 11 días que dura el periodo de incubación. Una vez finalizada la puesta se revisa cada 2 días cada caja nido y se cuenta el número de plumas en el nido hasta el momento de eclosión del primer huevo, el cual coincide con el máximo número de plumas dentro del nido.

5. *Eclosión:* con la eclosión del primer huevo el resto de huevos eclosionan a lo largo de ese

día, aunque es frecuente que el último huevo que completó la puesta tenga un retraso de 1 día con respecto al resto de huevos. La fecha de eclosión y el número de total de huevos eclosionados es una variable registrada con la mayor precisión posible, por tanto, es necesario un control diario de las puestas durante esta fase.

6. *Cross-fostering y captura de hembras:* Las hembras son capturadas mediante el uso de trampas en las cajas nido. Al igual que en los machos se determina el peso corporal, longitud de tarso y alar. En caso de hembras sin identificar se les coloca una anilla identificativa. Una vez eclosionados todos los huevos, se procede al intercambio de pollos entre puestas. La condición para llevar a cabo los intercambios es que ambas puestas hayan eclosionado el mismo día y pertenezcan a niveles de tratamiento diferentes. Dentro del primer o segundo día de vida se realiza el intercambio parcial de pollos, es decir dos pollos de una puesta a otra, y viceversa. En caso de puestas con menos de 3 pollos sólo se intercambia un individuo entre puestas. Los pollos son seleccionados aleatoriamente y para su transporte se usa una bolsa de tela para minimizar las pérdidas de calor y el posible estrés ocasionado. Los pollos intercambiados son marcados mediante marcas de color (rotulador no tóxico) o bien retirando el plumón de los flancos.

7. *Grabaciones de comportamiento y cebas de los progenitores:* Una vez los pollos tienen 5 días de vida en el 50% de las cajas nido instaladas se realizaron grabaciones de video de 60 min por nido (años 2017-2018). Con el uso de cámaras instaladas en un falso techo se han obtenido medidas del número de cebas proporcionadas por la hembra o el macho, además de las conductas de solicitud de alimento por parte de los pollos.

8. *Extracción de sangre:* Cuando los pollos llegan a la edad de 8-10 días de vida se procedió a la extracción de una muestra de sangre y el anillado de cada individuo. La sangre se centrifugó para separar suero del material celular el cual se emplea para el sexado de los individuos (Griffiths *et al.* 1998). Por otra parte, en la temporada 2018 se ha cuantificado la longitud

telomérica en cada individuo sexado.

9. *Medidas biométricas de los volantones*: Entre los días 15 y 17 de vida de los pollos se procede a la toma de medidas del peso corporal y longitud del tarso. La variación del peso y tarso hasta el abandono del nido es escasa en este periodo y se asume como los valores definitivos registrados. En esta fase se cuantifica el éxito reproductivo del nido en función del número de huevos eclosionados y el número final de pollos que abandonan el nido.

10. *Reclutamiento y dispersión natal*: Todos los individuos nacidos en las cajas nido de la colonia están identificados mediante anillas metálicas. Aproximadamente entre un 5-10 % de los individuos nacidos son reclutados como individuos adultos de nuevo en la colonia (datos no publicados, Fuentes, D., Rubalcaba, J. y Polo, V.). Durante el inicio de la temporada reproductiva en los machos (fase 1) o bien una vez eclosionados los huevos en el caso de las hembras (fase 6) los individuos capturados se confirman como reclutas. En caso de no confirmarse la reproducción (machos jóvenes o hembras sin placa incubatoria) se registran como reclutas potenciales. Por último, se registra la dispersión natal como medida de la filopatria de los individuos reclutados. Para ello se determina la distancia lineal entre el nido de nacimiento y el nido donde se establece como reproductor por primera vez.

## Referencias

- Adrewartha, H. G. and Birch, L. C. 1954. The distribution and abundance of animals. - University of Chicago Press.
- Alatalo, R. V. and Lundberg, A. 1984. Density-Dependence in Breeding Success of the Pied Flycatcher (*Ficedula hypoleuca*). - J. Anim. Ecol. 49: 666–685.
- Alexander, R. D. 1974. The Evolution of Social Behavior. - Annu. Rev. Ecol. Syst. 5: 325–383.
- Amundsen, T. 2000. Why are female birds ornamented? - Trends Ecol. Evol. 15: 149–155.
- Bateman, N. 1954. The measurement of milk production of mice through preweaning growth of suckling young. - Physiol. Zool. 27: 163–173.
- Bentz, A. B., Navara, K. J. and Siefferman, L. 2013. Phenotypic plasticity in response to breeding density in tree swallows: An adaptive maternal effect? - Horm. Behav. 64: 729–736.
- Bian, J. H., Du, S. Y., Wu, Y., Cao, Y. F., Nie, X. H., He, H. and You, Z. B. 2015. Maternal effects and population regulation: Maternal density-induced reproduction suppression impairs offspring capacity in response to immediate environment in root voles *Microtus oeconomus*. - J. Anim. Ecol. 84: 326–336.
- Bonte, D., Van Dyck, H., Bullock, J. M., Coulon, A., Delgado, M., Gibbs, M., Lehouck, V., Matthysen, E., Mustin, K., Saastamoinen, M., Schtickzelle, N., Stevens, V. M., Vandewoestijne, S., Baguette, M., Barton, K., Benton, T. G., Chaput-Bardy, A., Clobert, J., Dytham, C., Hovestadt, T., Meier, C. M., Palmer, S. C. F., Turlure, C. and Travis, J. M. J. 2012. Costs of dispersal. - Biol. Rev. 87: 290–312.
- Both, C. 1998a. Density Dependence of Clutch Size: Habitat Heterogeneity or Individual Adjustment? - J. Anim. Ecol. 67: 659–666.
- Both, C. 1998b. Experimental evidence for density dependence of reproduction in great tits. - J. Anim. Ecol. 67: 667–674.
- Both, C. 2000. Density dependence of avian clutch size in resident and migrant species: is there a constraint on the predictability of competitor density? - J. Avian Biol. 31: 412–417.
- Both, C., Visser, M. E. and Verboven, N. 1999. Density-dependent recruitment rates in great tits: the importance of being heavier. - Proc. R. Soc. Lond. B 266: 465–469.
- Bowler, D. E. and Benton, T. G. 2005. Causes and consequences of animal dispersal strategies: relating individual behaviour to spatial dynamics. - Biol. Rev. Camb. Philos. Soc. 80: 205–225.
- Bryja, J., Nesvadbová, J., Heroldová, M., Jánová, E., Losík, J., Trebatická, L. and Tkadlec, E. 2005. Common vole (*Microtus arvalis*) population sex ratio: Biases and process variation. - Can. J. Zool. 83: 1391–1399.
- Byholm, P., Ranta, E., Kaitala, V., Lindén, H., Saurola, P. and Wikman, M. 2002. Resource availability and goshawk offspring sex ratio variation: A large-scale ecological phenomenon. - J. Anim.

- Ecol. 71: 994–1001.
- Charmantier, A., McCleery, R. H., Cole, L. R., Perrins, C., Kruuk, L. E. B. and Sheldon, B. C. 2008. Adaptive phenotypic plasticity in response to climate change in a wild bird population. - Science. 320: 800–803.
- Chitty, D. 1960. Population processes in the vole and their relevance to general theory. - J. Chem. Inf. Model. 38: 99–113.
- Christian, J. J. 1961. Phenomena associated with population density. - Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 47: 428–449.
- Christian, J. J. and Davis, D. E. 1964. Endocrines, behaviour, and population. - Science. 146: 1550–1560.
- Clobert, J., Dhondt, A. a and Nichols, J. D. 2001. Dispersal. - Oxford University Press.
- Clobert, J., Ims, R. A. and Rousset, F. 2004. Causes, Mechanisms and Consequences of Dispersal. - In: Ecology, genetics and evolution of metapopulations. Academic press, pp. 307–335.
- Clobert, J., Le Galliard, J. F., Cote, J., Meylan, S. and Massot, M. 2009. Informed dispersal, heterogeneity in animal dispersal syndromes and the dynamics of spatially structured populations. - Ecol. Lett. 12: 197–209.
- Clutton-Brock, T. H. and Huchard, E. 2013. Social competition and selection in males and females. - Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. 368: 20130074.
- Clutton-Brock, T. H., Coulson, T. N., Milner-Guiland, E. J., Thomson, D. and Armstrong, H. M. 2002. Sex differences in emigration and mortality affect optimal management of deer populations. - Nature 415: 633–637.
- Cockburn, A., Legge, S. and Double, M. C. 2002. Sex ratios in birds and mammals : can the hypotheses be disentangled ? - In: Hardy, I. C. W. (ed), Sex Ratios: Concepts and Research Methods. Cambridge, pp. 266–286.
- Coleman, S. W., Patricelli, G. L. and Borgia, G. 2004. Variable female preferences drive complex male displays. - Nature 428: 742–745.
- Cordero, P. J., Veiga, J. P., Moreno, J. and Parkin, D. T. 2003. Extra-pair paternity in the facultatively polygynous spotless starling, *Sturnus unicolor*. - Behav. Ecol. Sociobiol. 54: 1–6.
- Cote, J., Dreiss, A. and Clobert, J. 2008. Social personality trait and fitness. - Proc. R. Soc. B Biol. Sci. 275: 2851–2858.
- Cox, D. F., Legates, J. E. and Cockerham, C. C. 1959. Maternal influence on body weight. - J. Anim. Sci. 18: 519–527.
- Cramp, S. and Perrins, C. 1994. Handbook of the birds of Europe, the Middle East and North Africa. - Oxford University Press.

- Cuvier, G. (Baron) 1812. Sur un nouveau rapprochement à établir entre les classes qui composent le règne animal. - Ann. Muséum Natl. D'Histoire Nat. 19: 73–84.
- Danchin, E. and Wagner, R. H. 1997. The evolution of coloniality: The emergence of new perspectives. - Trends Ecol. Evol. 12: 342–347.
- Danchin, E., Boulinier, T. and Massot, M. 1998. Conspecific reproductive success and breeding habitat selection: implication for the study of coloniality. - Ecology 79: 2415–2428.
- Dantzer, B., Newman, A. E. M., Boonstra, R., Palme, R., Boutin, S., Humphries, M. M. and McAdam, A. G. 2013. Density Triggers Maternal Hormones That Increase Adaptive Offspring Growth in a Wild Mammal. - Science. 139: 971–989.
- Darling, F. F. 1938. Bird Flocks and the Breeding Cycle: A Contribution to the Study of Avian Sociality. - University press, Cambridge.
- Dawkins, R. 1982. The Extended Phenotype. - Oxford Landmark Science.
- Denno, R. F. and Peterson, M. A. 1995. Density-dependent dispersal and its consequences for population dynamics. - In: Cappuccino, N. and Price, P. W. (eds), Population dynamics: new approaches and synthesis. Academic press, pp. 113–130.
- Denno, R. F., Roderick, G. K., Olmstead, K. L. and Dobel, H. G. 1991. Density-related migration in planthoppers (Homoptera: *Delphacidae*): the role of habitat persistence. - Am. Nat. 138: 1513–1541.
- DeWitt, T. J., Sih, A. and Wilson, D. S. 1998. Cost and limits of phenotypic plasticity. - Trends Ecol. Evol. 13: 77–81.
- Dhondt, A. a, Kempenaers, B. and Adriaensen, F. 1992. Density-Dependent Clutch Size Caused by Habitat Heterogeneity. - J. Anim. Ecol. 61: 643–648.
- Duckworth, R. a and Badyaev, A. V 2007. Coupling of dispersal and aggression facilitates the rapid range expansion of a passerine bird. - Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104: 15017–15022.
- Ellegren, H., Gustafsson, L. and Sheldon, B. C. 1996. Sex ratio adjustment in relation to paternal attractiveness in a wild bird population. - Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93: 11723–11728.
- Estramil, N., Eens, M. and Müller, W. 2014. Cross-fostering mismatches parent-offspring behaviors but this does not entail costs to family life. - Behav. Ecol. Sociobiol. 68: 1019–1028.
- Ferrer, M. and Donazar, J. a 1996. Density-Dependent Fecundity by Habitat Heterogeneity in an Increasing Population of Spanish Imperial Eagles. - Ecology 77: 69–74.
- Fisher, R. A. 1930. The Genetical Theory of Natural Selection. - Clarendon Press, Oxford.
- Forero, M. G., Donázar, J. A. and Hiraldo, F. 2002. Causes and Fitness Consequences of Natal Dispersal in a Population of Black Kites. - Ecology 83: 858–872.

- Fowler, C. W. 1981. Density Dependence as Related to Life History Strategy. - *Ecology* 62: 602–610.
- Garant, D., Kruuk, L. E. B., Wilkin, T., McCleery, R. H. and Sheldon, B. C. 2005. Evolution driven by differential dispersal within a wild bird population. - *Nature* 433: 60–65.
- García-Navas, V., Valera, F. and Griggio, M. 2015. Nest decorations: An “extended” female badge of status? - *Anim. Behav.* 99: 95–107.
- Ghalambor, C. K., McKay, J. K., Carroll, S. P. and Reznick, D. N. 2007. Adaptive versus non-adaptive phenotypic plasticity and the potential for contemporary adaptation in new environments. - *Funct. Ecol.* 21: 394–407.
- Gienapp, P., Teplitsky, C., Alho, J. S., Mills, J. A. and Merilä, J. 2008. Climate change and evolution: Disentangling environmental and genetic responses. - *Mol. Ecol.* 17: 167–178.
- Giordano, M., Groothuis, T. G. G. and Tscharren, B. 2014. Interactions between prenatal maternal effects and posthatching conditions in a wild bird population. - *Behav. Ecol.* 25: 1459–1466.
- Greenwood, P. J. 1980. Mating systems, philopatry and dispersal in birds and mammals. - *Anim. Behav.* 28: 1140–1162.
- Griffiths, R., Double, M. C., Orr, K. and Dawson, R. J. G. 1998. A DNA test to sex most birds. - *Mol. Ecol.* 7: 1071–1075.
- Hamilton, W. D. 1967. Extraordinary Sex Ratios. - *Science.*: 477–488.
- Hassell, B. Y. M. P. 1975. Density-Dependence in Single-Species Populations. - *J. Anim. Ecol.* 44: 283–295.
- Hasselquist, D. and Kempenaers, B. 2002. Parental care and adaptive brood sex ratio manipulation in birds. - *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 357: 363–372.
- Hjernquist, M. B., Thuman Hjernquist, K. A., Forsman, J. T. and Gustafsson, L. 2009. Sex allocation in response to local resource competition over breeding territories. - *Behav. Ecol.* 20: 335–339.
- Howard, W. E. 1960. Innate and environmental dispersal of individual vertebrates. - *Am. Midl. Nat.* 63: 152–161.
- Ims, R. A. 1990. On the adaptive value of reproductive synchrony as a predator-swamping strategy. - *Am. Nat.* 136: 485–498.
- Johannsen, A. W. 1911. The Genotype Conception of Heredity. - *Am. Nat.* 45: 129–159.
- Johnstone, R. A. 1996. Multiple displays in animal communication: ‘backup signals’ and “multiple messages.” - *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 351: 329–338.
- Keagy, J., Savard, J. F. and Borgia, G. 2011. Complex relationship between multiple measures of cognitive ability and male mating success in satin bowerbirds, *Ptilonorhynchus violaceus*. - *Anim. Behav.* 81: 1063–1070.

- Kim, S. Y., Torres, R. and Drummond, H. 2009. Simultaneous positive and negative density-dependent dispersal in a colonial bird species. - *Ecology* 90: 230–239.
- Kokko, H. and Rankin, D. J. 2006. Lonely hearts or sex in the city? Density-dependent effects in mating systems. - *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 361: 319–334.
- Komdeur, J. 2012. Sex allocation. - In: Royle, N. et al. (eds), *The Evolution of Parental Care*. Oxford University Press, pp. 171–188.
- Komdeur, J., Magrath, M. J. L. and Krackow, S. 2002. Pre-ovulation control of hatching sex ratio in the Seychelles warbler. - *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 269: 1067–1072.
- Kruuk, L. E. B., Clutton-Brock, T. H., Albon, S. D., Pemberton, J. M. and Guinness, F. E. 1999a. Population density affects sex ratio variation in red deer. - *Nature* 399: 459–461.
- Kruuk, L., Clutton-Brock, T. H., Rose, K. E. and Guinness, F. E. 1999b. Early determinants of lifetime reproductive success differ between the sexes in red deer. - *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 266: 1655–1661.
- Lacey, E. P. 1998. What Is an Adaptive Environmentally Induced Parental Effect? - In: Mousseau, T. A. and Fox, C. W. (eds), *Maternal Effects as Adaptations*. Oxford University Press, pp. 54–66.
- Lack, D. 1954. *The Natural Regulation of Animal Numbers*.
- Lack, D. 1966. *Population studies of birds*. - Oxford University Press.
- Lambin, X., Aars, J. and Piertney, S. B. 2001. Dispersal, intraespecific competition, kin competition and kin facilitation: a review of the empirical evidence. - In: Clobert, J. et al. (eds), *Dispersal*. Oxford University Press, pp. 110–122.
- Lauder, G. V. 1986. Homology, analogy and the evolution of behavior. - In: Nitecki, M. H. and Kitchell, J. A. (eds), *Evolution of Animal Behavior: Paleontological and Field Approaches*. Oxford University Press, pp. 9–40.
- Ležálová-Piálková, R. 2011. Molecular evidence for extra-pair paternity and intraspecific brood parasitism in the Black-headed Gull. - *J. Ornithol.* 152: 291–295.
- Li, X. Y. and Kokko, H. 2019. Sex-biased dispersal: a review of the theory. - *Biol. Rev.* 94: 721–736.
- López-Sepulcre, A., Kokko, H. and Norris, K. 2010. Evolutionary conservation advice for despotic populations: Habitat heterogeneity favours conflict and reduces productivity in Seychelles magpie robins. - *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 277: 3477–3482.
- Malthus, T. 1798. *An Essay on the Principle of Population*.
- Marra, P. P., Studds, C. E., Wilson, S., Scott Sillett, T., Sherry, T. W. and Holmes, R. T. 2015. Non-breeding season habitat quality mediates the strength of density dependence for a migratory bird. - *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 282: 1–8.

- Matthysen, E. 2005. Density-Dependent Dispersal in Birds and Mammals. - *Ecography* (Cop.). 28: 403–416.
- May, R. M., Conway, G. R., Hassell, M. P. and Southwood, T. R. E. 1974. Time delays, density-dependence and single-species oscillations. - *J. Anim. Ecol.*: 747–770.
- May, R. M., Hassell, M. P., Anderson, R. M. and Tonkyn, D. W. 1981. Density Dependence in Host-Parasitoid Models. - *J. Anim. Ecol.* 50: 855–865.
- Merilä, J. and Sheldon, B. C. 2001. Avian quantitative genetics. - In: *Current Ornithology*. pp. 179–255.
- Metcalfe, N. B. and Monaghan, P. 2001. Compensation for a bad start- grow now, pay later? - *Trends Ecol. Evol.* 16: 254–260.
- Miner, B. G., Sultan, S. E., Morgan, S. G., Padilla, D. K. and Relyea, R. A. 2005. Ecological consequences of phenotypic plasticity. - *Trends Ecol. Evol.* 20: 685–692.
- Monaghan, P. 2008. Early growth conditions, phenotypic development and environmental change. - *Philos. Trans. R. Soc. London B Biol. Sci.* 363: 1635–1645.
- Moreno, J., Veiga, J. P., Romasanta, M. and Sanchez, S. 2002. Effects of maternal quality and mating status on female reproductive success in the polygynous spotless starling. - *Anim. Behav.* 64: 197–206.
- Moritz, C. and Agudo, R. 2013. The future of species under climate change: Resilience or decline? - *Science*. 341: 504–508.
- Mousseau, T. A. and Fox, C. W. 1998. *Maternal Effects as Adaptations*. - Oxford University Press.
- Murdoch, W. W. 1994. Population regulation in theory and practice. - *Ecology* 75: 271–287.
- Nager, R. G., Monaghan, P., Griffiths, R., Houston, D. C. and Dawson, R. 1999. Experimental demonstration that offspring sex ratio varies with maternal condition. - *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 570–573.
- Navara, K. J. 2018. *Choosing Sexes. Mechanisms and Adaptive Patterns of Sex Allocation in Vertebrates*. - Springer.
- Nevoux, M., Weimerskirch, H. and Barbraud, C. 2010. Long- and short-term influence of environment on recruitment in a species with highly delayed maturity. - *Oecologia* 162: 383–392.
- Nevoux, M., Gimenez, O., Arlt, D., Nicoll, M., Jones, C. and Norris, K. 2011. Population regulation of territorial species: both site dependence and interference mechanisms matter. - *Proc. Biol. Sci.* 278: 2173–81.
- Newton, I. 1998. *Population limitation in birds*. - Elsevier.
- Nicholson, A. J. 1933. Supplement: the Balance of Animal Populations. - *Anim. Ecol.* 2: 131–178.

- Nicolaus, M., Tinbergen, J. M., Ubels, R., Both, C. and Dingemanse, N. J. 2016. Density fluctuations represent a key process maintaining personality variation in a wild passerine bird. - *Ecol. Lett.* 19: 478–486.
- Nilsson, B. Y. J. 1989. Causes and Consequences of Natal Dispersal in the Marsh Tit , *Parus palustris*. - *J. Anim. Ecol.* 58: 619–636.
- Pigliucci, M. 2001. Phenotypic Plasticity Beyond Nature and Nurture. - The Johns Hopkins University Press.
- Poot, H., ter Maat, A., Trost, L., Schwabl, I., Jansen, R. F. and Gahr, M. 2012. Behavioural and physiological effects of population density on domesticated Zebra Finches (*Taeniopygia guttata*) held in aviaries. - *Physiol. Behav.* 105: 821–828.
- Quinn, J. L., Patrick, S. C., Bouwhuis, S., Wilkin, T. A. and Sheldon, B. C. 2009. Heterogeneous selection on a heritable temperament trait in a variable environment. - *J. Anim. Ecol.* 78: 1203–1215.
- Rankin, D. J., Bargum, K. and Kokko, H. 2007. The tragedy of the Commons in Evolutionary Biology. - *Trends Ecol. Evol.* 22: 643–651.
- Richner, H. and Heeb, P. 1996. Communal life: honest signaling and the recruitment center hypothesis. - *Behav. Ecol.* 7: 115–119.
- Ricklefs, R. E. 2000a. Density dependence, evolutionary optimization, and the diversification of avian life histories. - *Condor* 102: 9–22.
- Ricklefs, R. E. 2000b. Lack, Skutch, and Moreau: The Early Development of Life-History Thinking. - *Condor* 102: 3–8.
- Rodenhouse, N. L., Sherry, T. W. and Holmes, R. T. 1997. Site-dependent regulation of population size: A new synthesis. - *Ecology* 78: 2025–2042.
- Rolland, C., Danchin, E. and de Fraipont, M. 1998. The evolution of coloniality in birds in relation to food, habitat, predation, and life-history traits: a comparative analysis. - *Am. Nat.* 151: 514–529.
- Roosenburg, W. M. 1996. Maternal condition and nest site choice: An alternative for the maintenance of environmental sex determination? - *Am. Zool.* 36: 157–168.
- Sachs, J. L., Hughes, C. R., Nuechterlein, G. L. and Buitron, D. 2007. Evolution of Coloniality in Birds: A Test of Hypotheses With the Red-Necked Grebe (*Podiceps Griseogenus*). - *Auk* 124: 628–642.
- Sandell, M. I. 1998. Female aggression and the maintenance of monogamy: female behaviour predicts male mating status in European starlings. - *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 265: 1307–1311.
- Sandell, M. I. and Smith, H. G. 1997. Female aggression in the European starling during the breeding season. - *Anim. Behav.* 53: 13–23.

- Schmalhausen, I. I. 1949. Factors of evolution: the theory of stabilizing selection.
- Sergio, F., Blas, J., Blanco, G., Tanferna, A., López, L., Lemus, J. A. and Hiraldo, F. 2011. Raptor nest decorations are a reliable threat against conspecifics. - *Science*. 331: 327–330.
- Serrano-Davies, E., Barrientos, R. and Sanz, J. J. 2017. The role of nest-box density and placement on occupation rates and breeding performance: A case study with Eurasian Blue Tits. - *Ornis Fenn.* 94: 21–32.
- Servanty, S., Gaillard, J. M., Allainé, D., Brandt, S. and Baubet, E. 2007. Litter size and fetal sex ratio adjustment in a highly polytocous species: The wild boar. - *Behav. Ecol.* 18: 427–432.
- Sheldon, B. C. and West, S. A. 2004. Maternal Dominance, Maternal Condition, and Offspring Sex Ratio in Ungulate Mammals. - *Am. Nat.* 163: 40–54.
- Silk, J. B. and Brown, G. R. 2008. Local resource competition and local resource enhancement shape primate birth sex ratios. - *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 275: 1761–1765.
- Sinclair, A. R. E. 1989. Population regulation in animals. - In: Cherret, J. M. (ed), Ecological Concepts. The contribution of Ecology to an Understanding of the Natural World. Blackwell Science, pp. 197–241.
- Sinervo, B., Svensson, E. and Comendant, T. 2000. Density cycles and an offspring quantity and quality game driven by natural selection. - *Nature* 406: 1–4.
- Solomon, M. . E. . 1949. The Natural Control of Animal Populations. - *J. Anim. Ecol.* 18: 1–35.
- Stearns, S. C. 1992. The evolution of life histories. - Oxford University Press.
- Stearns, S. C. and Koella, J. . 1986. The Evolution of Phenotypic Plasticity in Life-History Traits: Predictions of Reaction Norms for Age and Size at Maturity. - *Evolution (N. Y.)*. 40: 893–913.
- Sutherland, W. J. 1996. From individual behaviour to population ecology. - Oxford University Press.
- Sutherland, W. J. and Norris, K. 2002. Behavioural models of population growth rates: Implications for conservation and prediction. - *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 357: 1273–1284.
- Travis, J. M. J. and French, D. R. 2000. Dispersal functions and spatial models: Expanding our dispersal toolbox. - *Ecol. Lett.* 3: 163–165.
- Travis, J. M. J., Murrell, D. J. and Dytham, C. 1999. The evolution of density-dependent dispersal. - *Proc. R. Soc. London B Biol. Sci.*: 1837–1842.
- Trivers, R. L. and Willard, D. E. 1973. Natural Selection of Parental Ability to Vary the Sex Ratio of Offspring. - *Science*. 179: 90–92.
- Varley, G. C. 1947. The Natural Control of Population Balance in the Knapweed Gall-Fly (*Urophora jaceana*). - *J. Anim. Ecol.* 16: 139–187.

- Veiga, J. P. and Polo, V. 2011. Female Spotless Starlings (*Sturnus unicolor*) remove green plants from their nests. - *J. Ornithol.* 153: 291–296.
- Veiga, J. P. and Polo, V. 2016. Estornino negro – *Sturnus unicolor* Temminck. - In: Salvador, A. and Morales, M. B. (eds), Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles. Museo Nacional de Ciencias Naturales. Available from: <http://www.vertebradosibericos.org/>.
- Veiga, J., Moreno, J., Cordero, P. and Minguez, E. 2001. Territory size and polygyny in the spotless starling: resource-holding potential or social inertia? - *Can. J. Zool. Can. Zool.* 79: 1951–1956.
- Veiga, J. P., Moreno, J., Arenas, M. and Sanchez, S. 2002. Reproductive consequences for males of paternal vs territorial strategies in the polygynous Spotless starling under variable ecological and social conditions. - *Behaviour* 139: 677–693.
- Veiga, J. P., Polo, V. and Viñuela, J. 2006. Nest green plants as a male status signal and courtship display in the spotless starling. - *Ethology* 112: 196–204.
- Veiga, J. P., Polo, V., Arenas, M. and Sánchez, S. 2012. Intruders in Nests of the Spotless Starling: Prospecting for Public Information or for Immediate Nesting Resources? - *Ethology* 118: 917–924.
- Verhulst, P. F. 1838. Notice sur la loi que la population suit dans son accroissement. - *Corresp. Math. Phys* 10: 113–126.
- Wagner, R. H. 1993. The pursuit of extra-pair copulations by female birds: A new hypothesis of colony formation. - *J. Theor. Biol.* 163: 333–346.
- Wagner, R. H. and Danchin, E. 2003. Conspecific copying: A general mechanism of social aggregation. - *Anim. Behav.* 65: 405–408.
- Wolff, J. O. 1997. Population regulation in mammals: an evolutionary perspective. - *J. Anim. Ecol.*: 1–131997.
- Wynne-Edwards, V. C. 1962. Animal dispersion in relation to social behaviour. - Oliver & Boyd.
- Wynne-Edwards, V. C. 1965. Self-Regulating Systems in Populations of Animals. - *Science*. 147: 1543–1548.
- Young, C. W., Legates, J. E. and Farthing, B. R. 1965. Prenatal and Postnatal Influences on Growth, Prolificacy and Maternal Performance in Mice. - *Genetics*: 553–561.

## ***Afiliación de los coautores***

**Vicente Polo:** Biología, Geología, Física y Química Inorgánica, ESCET, Universidad Rey Juan Carlos, C/ Tulipán s/n, 28933, Móstoles, España.

**Juan G. Rubalcaba:** Área de Biodiversidad y Conservación, Depto. de Biología, Geología, Física y Química Inorgánica, ESCET, Universidad Rey Juan Carlos, C/ Tulipán s/n, 28933, Móstoles, España.

**José P. Veiga:** Departamento de Ecología Evolutiva. Museo Nacional de Ciencias Naturales. C/José Gutierrez Abascal, 2, 28006, Madrid, España.

**Pat Monaghan:** Institute of Biodiversity Animal Health & Comparative Medicine. University of Glasgow, Graham Kerr Building, Glasgow G12 8QQ, United Kingdom

**Winnie Boner:** Institute of Biodiversity Animal Health & Comparative Medicine. University of Glasgow, Graham Kerr Building, Glasgow G12 8QQ, United Kingdom



## ***Lista de capítulos***

Esta tesis está basada en cuatro manuscritos escritos para publicar en revistas científicas internacionales. Ver debajo autores que han contribuido, el título específico y el estado actual de publicación.

Capítulo 1. **Daniel Fuentes**, Juan G. Rubalcaba, José P. Veiga, Vicente Polo. Long-term fitness consequences of breeding density in starling colonies: an observational approach. 2019 - Journal of Ornithology, *in press*.

Capítulo 2. Juan G. Rubalcaba, **Daniel Fuentes**, José P. Veiga, Vicente Polo. Nest decoration as social signals by males and females: greenery and feathers in starling colonies. 2017 - Behavioral Ecology, 28: 1369-1375.

Capítulo 3. **Daniel Fuentes**, Juan G. Rubalcaba, Vicente Polo. Is primary sex ratio related with breeding density? Life-history strategies of the facultative colonial Spotless starling. Manuscrito en preparación.

Capítulo 4. **Daniel Fuentes**, Juan G. Rubalcaba, Winnie Boner, Pat Monaghan, Vicente Polo. Early mechanisms of density dependence differ between sexes in a colonial bird: a cross-fostering experiment. Manuscrito en preparación.



# *Capítulo 1 / Chapter 1*

## *Long-term fitness consequences of breeding density in starling colonies: an observational approach*

---



---

Daniel Fuentes, Juan G. Rubalcaba, José P. Veiga, Vicente Polo

*Manuscrito publicado en Journal of Ornithology (2019)*

## Abstract

Understanding the evolution of gregarious breeding in birds necessitates assessing how fitness components vary in relation to conspecific density. So far, the ultimate causes of breeding density remain contentious, owing to the logistic challenges in both obtaining and interpreting long-term effects of density on fledgling survival, recruitment rates or natal dispersal in wild populations. Here, we used observational data from a 13-year study on the reproduction of a facultatively gregarious bird, the Spotless Starling, *Sturnus unicolor*, to investigate the consequences of breeding density for fitness and offspring natal dispersal. We compared breeding performance, recruitment success and dispersal distances of offspring arising from nestboxes placed in either a high (HD) or a low density (LD). We found that although neither clutch size nor fledgling survival varied in relation to density, HD nests produced significantly fewer recruits. Moreover, recruits from HD nests settled closer to their natal territories than those from LD nests. These findings suggest that the proximity to neighbours incurs delayed fitness costs in the Spotless Starling. Furthermore, the negative density-dependent dispersal may result from the increased mortality of individuals in worse condition and with lower ability to compete for breeding vacancies in the vicinity of their natal territories. With this study, we provide long-term observational results that may be a basis for further experiments intended to unravel proximate mechanisms underpinning density-dependent patterns in wild breeding colonies.

**Keywords** Colonial breeding · Density dependence · Natal dispersal · Spotless Starling · *Sturnus unicolor*

## ***Introduction***

The evolution of gregarious breeding remains an outstanding question in evolutionary ecology (Danchin *et al.* 1998; Jungwirth *et al.* 2015; Evans *et al.* 2016). The aggregation of individuals leads to increased interference among conspecifics competing for breeding resources, mates or nesting sites that ultimately reduce their fitness (Sutherland 1996; Hötker 2000; Nevoux *et al.* 2011). However, conspecifics can also have positive effects on individual fitness, for example, improving defence against predators or facilitating assessment of habitat quality (Wagner 1993; Danchin and Wagner 1997). Assessing the balance between the fitness costs and benefits of conspecific interactions is critical to understand why individuals aggregate; this requires investigating how long-term fitness components such as survival, recruitment success or natal dispersal vary in relation to conspecific density in wild populations (Danchin and Wagner 1997; Brown and Brown 1986). However, empirical evidence on the fitness consequences of density comes almost exclusively from research focused on short-term components of reproductive success (see Brown and Brown 2001 for a review). In vertebrates, few studies have investigated the effect of density on multivariate fitness components and individual movements in the long term (Forero *et al.* 2002; Serrano *et al.* 2005).

The interference competition hypothesis states that increasing breeding density in a homogeneous habitat enhances aggressive interactions among conspecifics competing for food or breeding resources (Lack 1954; Fernandez *et al.* 1998). In most bird populations, higher local densities during the breeding period lead to increased interference and aggressive interactions among individuals (Brown and Brown 1986; Sutherland 1996; Hötker 2000; Nevoux *et al.* 2011), which in turn could influence parental behaviour, fledgling condition and young survival (Green and Cockburn 2001; Veiga and Polo 2008; Serrano-Davies *et al.* 2017). Therefore, most populations of territorial birds exhibit negative density dependence, i.e.,

lower reproductive success and survival with increasing breeding density (Both 1998; Ferrer and Donazar 1996). Despite this general trend, some populations of colonial birds exhibit a positive effect of density on individual components of fitness (Danchin and Wagner 1997; Serrano *et al.* 2005), suggesting that fitness benefits of coloniality outweigh the costs of breeding density (Wagner 1993; Picman *et al.* 2002; Jungwirth *et al.* 2015; Evans *et al.* 2016).

Population density is also a major determining factor of offspring dispersal (Lambin *et al.* 2001; Matthysen 2005; Rodrigues and Johnstone 2014). Although dispersal distance generally increases with increased population density, i.e., positive density dependence (Negro *et al.* 1997; Poethke and Hovestadt 2002; Matthysen 2005), in some species individuals move larger distances when dispersing from areas of low population density (Forero *et al.* 2002; Serrano *et al.* 2005; Martín *et al.* 2008). This negative density-dependent dispersal is generally explained in the context of the conspecific attraction hypothesis, which suggests that the benefits of cuing on the abundance of reproductive success of conspecifics are needed to select where to settle and outweigh the costs of conspecific competition (Serrano *et al.* 2005; Parejo *et al.* 2007). However, fitness costs and benefits can interact in a complex way with breeding density in natural populations, giving rise to a diversity of patterns in which both positive and negative density dependence can coexist in the same population (e.g., Stephens *et al.* 1999; Kim *et al.* 2009). Predicting whether populations should exhibit either a positive or negative density dependence in demographic rates and dispersal patterns remains a challenge for both theoretical and empirical research.

In this study, we used observational data from a long-term (13-year) study of the Spotless Starling *Sturnus unicolor* to investigate the consequences of breeding density for fitness and natal dispersal. The Spotless Starling is a colonial species in which individuals usually occupy all available nesting sites, breeding close to each other and reaching high densities (Cramp and Perrins 1994). More than one decade of field research has allowed us to unravel different

aspects of the social behaviour of starlings and the way they interact with conspecifics in their breeding colonies, competing for breeding territories or mates, gathering public information from conspecific nests, or synchronizing breeding activities with their neighbours (Veiga *et al.* 2001, 2012; Parejo *et al.* 2008; Polo *et al.* 2010; Rubalcaba *et al.* 2017). Understanding how these interactions influence the overall relationship between fitness and breeding density can help to further understand the ultimate causes of the gregarious behaviour of starlings in their breeding colonies. Here, we document the relationship between breeding density versus short-term components of reproductive success (clutch size and fledgling survival) and long-term fitness components (offspring recruitment rates and natal dispersal distance) by comparing nest-boxes placed at low (LD) or high density (HD). Ultimately, we aim to understand whether proximity to neighbours involves either positive, negative or no effect on fitness and offspring dispersal in the gregarious Spotless Starling.

## ***Materials and methods***

### ***Species and study area***

The Spotless Starling is a medium-sized and relatively long lived passerine. Starling colonies often reach high densities of nests with active breeding pairs. The average distance between nests depends on the availability and spatial distribution of cavities in the breeding colony, ranging from 2 to 10 m in tiled roofs and buildings, to 70 m in pasturelands and woodlands (Cramp and Perrins 1994). In Spotless Starlings, males defend breeding territories and compete over the number of nesting sites and mating opportunities they have access to (Veiga *et al.* 2001). Female territory owners show aggressive behaviour towards intruders (Veiga *et al.* 2012), which also influences their reproductive effort and their subsequent fitness (Veiga and Polo 2008; Polo *et al.* 2015). Therefore, we assumed that an increase in breeding density might enhance agonistic interactions between breeders in high breeding

density, as the interference competition hypothesis suggests (Lack 1954).

The study area comprises 40 ha in Manzanares el Real ( $40^{\circ}45'N$ ,  $3^{\circ}50'W$ , Madrid province, Spain), with homogeneous habitat conditions, consisting of a pastureland with scattered trees such as the Narrow-leaved Ash *Fraxinus angustifolia*, Pyrenean Oak *Quercus pyrenaica*, and Holm Oak *Quercus rotundifolia* (Fig. 1). The colony was monitored continuously for 13 years (2001–2014). For this study, we excluded all clutches that took part in a previous experiment where were manipulated the offspring body condition and recruitment rates (Polo *et al.* 2015).

### **Field methods**

We distributed 54 nest-boxes in scattered trees of the study area, resembling the natural range of densities observed in this kind of habitat (Cramp and Perrins 1994) and positions of nest-boxes were maintained over the study period. Nestboxes were distributed in two conditions: (1) nest-box with a close neighbour nest-box as high density nest-boxes (HD), mean nearest-neighbour distance  $\pm$  SD:  $9.38\text{ m} \pm 3.49$  (total of 27 nest-boxes); (2) nest-boxes without a close neighbour nest-box as low density (LD), mean nearest-neighbour distance  $30.35\text{ m} \pm 10.82$  apart (total of 27 nest-boxes). The HD nest-boxes were randomly distributed over the entire study area (see Fig. 1).

We monitored nest-boxes to record clutch size and determine the sex of nestlings (from blood samples taken when 5 days old, Griffiths *et al.* 1998). Furthermore, we marked fledglings before emancipation, when 16 days old, with individually numbered bands for future identification. We captured and marked breeding males during the period in which they compete for nesting sites, and breeding females when they were feeding nestlings approximately 5–6 days after hatching. The same procedure was followed for first clutches (from mid-April to May) and second clutches (from the end of May to early July). In some cases, we could not confirm if the clutch was first or second because of we did not know if

these females had tried breeding before. To avoid biased result, we excluded these clutches from the statistical analysis. We considered three components of reproductive success: clutch size, fledgling survival (i.e., number of 16-day-old fledglings in relation to the total number of eggs laid) and probability of recruitment (i.e., number of recruits in relation to the number of eggs in their natal nest). We surveyed data of recruitment at the study colony and two nearby colonies with 68 and 150 nest-boxes, respectively, located at 1 and 2 km away from the study colony to minimise data loss outside of the study boundaries. Finally, natal dispersal distance of recruits was measured as the linear distance between the nest-box of birth and the nest-box of first recapture (Greenwood 1980).

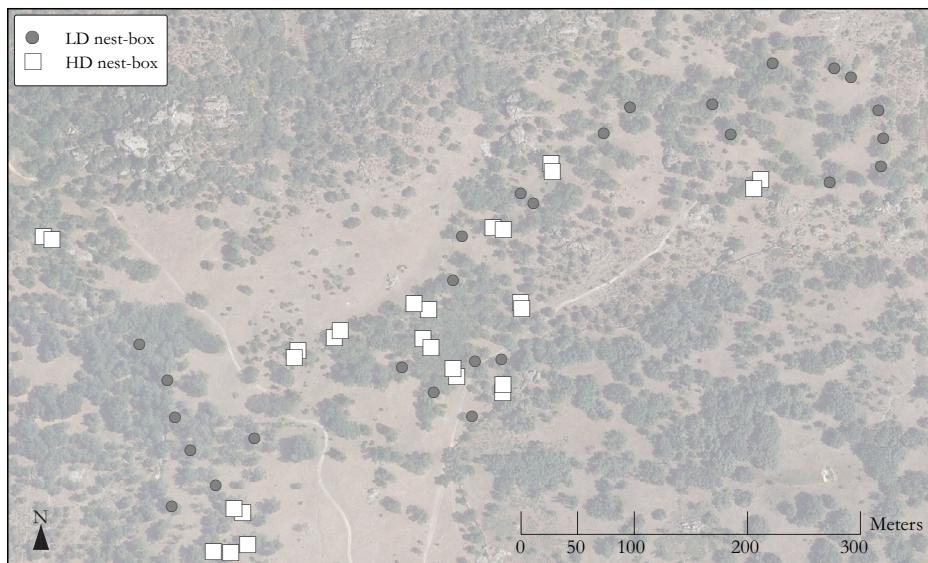
In total, we recorded data from 840 broods (417 LD and 423 HD) over 13 years for both first and second clutches, which includes approximately four generations of the Spotless Starling (V. Polo *et al.* unpublished data). Out of a total of 3870 eggs, 2089 fledglings were raised. Finally, during this period within the study area, we recorded 158 recruits (100 females and 58 males) to analyse natal dispersal distance. The inter-annually rate of occupation did not differ between the LD and HD nest-boxes (see Table S1 in Supplementary material). Overall average was 99.1% *versus* 97.8% in first clutches (LD vs. HD;  $X^2_1 = 0.025, P = 0.874$ ), and 83.0% *versus* 83.9% in second clutches (LD vs. HD;  $X^2_1 = 0.016, P = 0.897$ ).

### **Data analysis**

We analysed differences between LD and HD nest-boxes on three components of reproductive success: (a) the clutch size was analysed using general linear mixed model (LMM), including breeding density as a fixed factor (LD, as reference category, *vs.* HD) and clutch order (first or second clutches) as a covariate. Alternatively, we also tested the effect on breeding density output and dispersal using a continuous variable (the number of occupied nest-boxes in a 20 m radius). Results are presented in the Supplementary material. The year and the identity of each nest box were included as random factors to avoid pseudoreplication. The clutch size

was Box-Cox transformed to normalise the residuals. (b) The probability of fledgling survival and (c) offspring recruitment were analysed using generalised linear mixed models (GLMM) assuming a binomial error distribution and using logit link function while correcting for overdispersion. To do this, we compared residual deviance against residual degrees of freedom (parameter *phi*) and included in models to reanalysed only when necessary. The same structure of fixed and random factors in model (a) were also used in models (b) and (c).

The effect of breeding density on natal dispersal distance was analysed using a general



**Figure 1.** Map of the study area with the positions of nest-boxes located at low density (LD; grey dots), or high density (HD; white squares)

linear mixed-effect model (LMM) including density (LD, as reference category, vs. HD), sex (female, as a reference category, vs. male) and their interaction as fixed factors (Table 1d). Dispersal distances were Box–Cox transformed to normalize model residuals. We included the identity of the mother and year as random factors to control for the nonindependence of recruits of the same mother and born in the same year. All models were fitted using the statistical package *lme4* (Bates et al. 2015) in R 3.3.2 (R Core Team 2017).

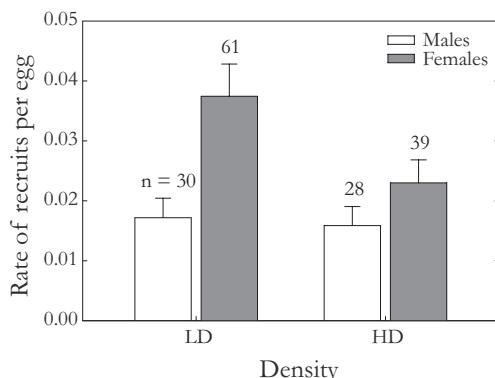
## Results

### Reproductive success

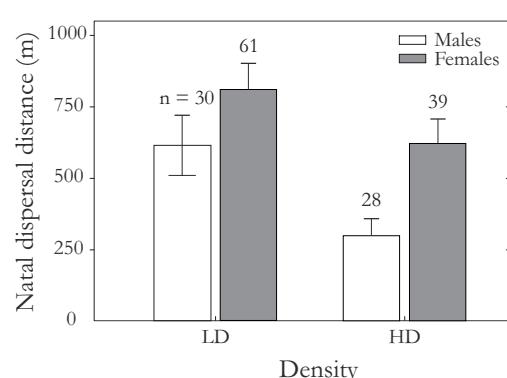
The probability of recruitment was significantly lower in HD nest-boxes (mean  $\pm$  SE: HD,  $0.042 \pm 0.005$ ,  $n = 67$  vs. LD,  $0.058 \pm 0.006$ ,  $n = 91$ , Table 1c; Fig. 2). The effect of density on recruitment rates was consistent with an alternative definition of density such as the number of nest-boxes in a fixed radius ( $X^2_1 = 5.98$ ;  $P = 0.016$ , see Fig. S1 and Table S2 in Supplementary material). No significant effect of density was found for either clutch size (HD,  $4.609 \pm 0.037$  vs. LD,  $4.604 \pm 0.039$ ) or fledgling survival (HD,  $2.34 \pm 0.094$  vs. LD,  $2.635 \pm 0.092$ , Table 1a, b). Although the number of fledgling survivors in HD nest-boxes showed a tendency to be lower compared with LD nest-boxes (Table 1b). Clutch order was negatively correlated with fledgling survival and recruitment rate (Table 1b, c).

### Natal dispersal

Individuals born in LD nest-boxes dispersed further than those that were born in HD nest-boxes (mean  $\pm$  SE: HD,  $466 \pm 62$  m vs. LD,  $732 \pm 65$  m, Table 1d). Moreover, natal dispersal distances were significantly greater in females (females,  $720 \pm 63$  m vs. males,  $446 \pm 61$  m,



**Figure 2.** Rate of recruitment of males and females (proportion of recruits per laid egg, mean  $\pm$  SE) in low-density (LD) and high-density nest-boxes (HD)



**Figure 3.** Natal dispersal distance (means  $\pm$  SE) of males and females recruit born either in low density (LD) and high density (HD) nestboxes

**Table 1.** Reproductive success models: results of the mixed-effect models for the effect of breeding density on (a) clutch size, (b) fledgling survival rate, (c) offspring recruitment rate and natal dispersal model: (d) results of mixed-effect model of breeding density on natal dispersal distance of recruits

	Coefficient beta ( $\pm$ SE)	$\chi^2$	df	P
<i>Reproductive success models</i>				
(a) Clutch size				
Intercept	4.616 ( $\pm$ 0.094)			
Density (LD reference category)	-0.009 ( $\pm$ 0.035)	0.075	1	0.785
Clutch order	-0.02 ( $\pm$ 0.057)	0.128	1	0.72
(b) Fledgling survival rate				
Intercept	0.59 ( $\pm$ 0.136)			
Density (LD reference category)	0.122 ( $\pm$ 0.063)	3.749	1	0.057
Clutch order	-0.323 ( $\pm$ 0.073)	19.181	1	<b>&lt;0.001</b>
(c) Recruitment rate				
Intercept	-2.431 ( $\pm$ 0.253)			
Density (LD reference category)	0.194 ( $\pm$ 0.082)	5.511	1	<b>0.019</b>
Clutch order	-0.437 ( $\pm$ 0.193)	5.078	1	<b>0.024</b>
<i>Natal dispersal model</i>				
(d) Natal dispersal distance				
Intercept	0.811 ( $\pm$ 0.103)			
Density (LD reference category)	0.331 ( $\pm$ 0.101)	10.705	1	<b>0.004</b>
Sex (female reference category)	0.316 ( $\pm$ 0.101)	9.668	1	<b>0.007</b>
Density $\times$ sex	-0.056 ( $\pm$ 0.1)	0.334	1	0.563

Bold indicates Pvalue < 0.05

Table 1d; Fig. 3), with no significant interaction between density and sex (Table 1d).

## Discussion

We found that nest-boxes placed at high density (HD) produced significantly fewer recruits (Fig. 2), and these recruits settled closer to their natal territories than those from LD nests (Fig. 3). On the other hand, no effect of density was found on the short-term components of reproductive success, i.e., clutch size and fledgling survival, although there was tendency of lower fledgling survival in HD nest (Table 1). These results suggest that the interference between neighbours during the breeding period had little influence on fledgling condition and survival, but had a delayed impact on their recruitment rates. While evidence of density-dependence mechanisms in starlings is still scarce, previous studies with Spotless Starlings showed that aggressive interactions between females during the breeding period

affect maternal physiology (increasing levels of circulating testosterone; Polo *et al.* 2010), thereby reducing maternal provisioning rates, offspring condition and recruitment success in subsequent years (Veiga and Polo 2008; Polo *et al.* 2015). Furthermore, in the related European Starling (*Sturnus vulgaris*), only one study explored a possible mechanism of density effects (Pilz and Smit h 2004). In this study, females in colonies with higher breeding density deposited higher amounts of androgen in eggs, suggesting that aggressive interactions between mothers can further influence offspring phenotype via maternal effects. Although the proximate causes of the lower recruitment success in HD nests still need to be addressed for the Spotless Starling, breeding density may have influenced parameters related to post-fledging survival such as immune response or androgen levels (see discussion in López-Rull *et al.* 2011). Therefore, the long-term fitness costs in our results suggest that interference between conspecifics may act as an underpinning mechanism of negative density dependence in starling colonies.

The greater philopatry of recruits from HD nests is a striking result that requires further explanation (Fig. 3). The negative density dependence of dispersal in birds has often been explained by the conspecific attraction hypothesis, which posits that new individuals select breeding territories based on abundance and reproductive success of conspecifics (Danchin *et al.* 1998; Serrano *et al.* 2005; Parejo *et al.* 2007). Here, we found no differences in shortterm components of reproductive success, and therefore it is unlikely that shorter dispersal distances of recruits from HD nests resulted from a preferential selection of areas with high breeding density. In our study area, population size and density influence competition for nesting sites and interference between breeders and floaters (see Veiga *et al.* 2012). Therefore, shorter natal dispersal distances (philopatric individuals) in HD nests suggest that recruits originating from these nests were more competitive and able to settle in the available territories of the colony. In this sense, this pattern may be a consequence

of the increased mortality of certain offspring in worse condition or with lower ability to compete for breeding vacancies in the vicinity of their natal territories. This hypothesis will be interesting to address in future experimental approach.

Although starling colonies vary in size (Cramp and Perrins 1994), they can reach high densities similar to those simulated in our study colony (see Fig. 1). Therefore, it is somewhat surprising that density has a negative effect on fitness. The aggregation of conspecifics influences multiple components of behaviour or physiology (see Hötker 2000; Bentz *et al.* 2013, respectively), including both beneficial interactions such as communal defence against predators, and costs resulting from conspecific competition. Stephens *et al.* (1999) first pointed out that the interaction between these fitness costs and benefits can give rise to different patterns of density dependence in populations, which can vary in a complex way in relation to population size or density. Thus, the interaction between fitness benefits and costs can generate optimal population densities. This means that both positive and negative density dependence can coexist in the population when increasing or decreasing density from its optimal value, respectively (see also Kim *et al.* 2009; Angulo *et al.* 2018). Therefore, despite the fact that starlings generally display a gregarious behaviour and aggregate forming colonies during the breeding period, negative effects of density could take place when increasing proximity between neighbours above an optimal density level (Fig. 2). Testing this hypothesis requires a further study providing nest-boxes at more variable density levels.

Alternatively, individuals in natural populations are differently affected by competition, because they differ in condition, competitive ability or personality. Spatial heterogeneity in breeding density has been shown to be a fundamental process maintaining these individual differences in wild bird populations (Nicolaus *et al.* 2016). In a previous study, we found that areas with a higher density of nestboxes were occupied primarily by males that carried greater amounts of green, aromatic plants (Rubalcaba *et al.* 2017), a trait related to male

attractiveness and level of polygyny (Veiga *et al.* 2006). Although testing differences in the level of polygyny might require assessing paternity, we speculate that polygynous males prefer high-density areas where they can monopolise several nests within a smaller territory (Rubalcaba *et al.* 2017). Therefore, males could outweigh the lower productivity per nest by increasing the number of nests controlled during the breeding period. A consequence of this potential spatial segregation of polygynous and monogamous males is that overall patterns of fitness to density are obscured by spatial heterogeneity. Thus, although density had a negative effect on fitness, competitive individuals could still select high-density breeding territories. A further experimental study could allow us to distinguish whether individuals with different attributes are segregated in relation to breeding density in wild starling colonies.

In this study, we provide evidence of fitness consequences of increasing breeding density using long-term fitness parameters. Despite a lack of density dependence shown by short-term components, delayed effects on recruitment success revealed fitness costs owing to the proximity to neighbours in starling colonies. Our results provide an observational basis to design further experiments intended to explore proximate mechanisms underpinning negative density-dependent processes in colonies. Furthermore, here we emphasize the need to investigate overall patterns of density dependence in a spatially explicit way, accounting for the fact that individuals can segregate spatially depending on their ability to cope with conspecific competition in natural colonies.

## ***Acknowledgements***

Financial support was provided by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (project number CGL2014-59670-P). D.F was supported by PhD grant by the Spanish Government. The authors particularly thank Kala Thaker for kindly revising the writing style, and two reviewers for their suggestions to improve an earlier version of the manuscript.

## References

- Alatalo RV, Lundberg A. 1984. Density-dependence in breeding success of the pied flycatcher *Ficedula hypoleuca*. - J Anim Ecol. 53:969–977.
- Amundsen T. 2000. Why are female birds ornamented? - Trends Ecol Evol. 15:149–155.
- Andersson MB. 1994. Sexual selection. Princeton (NJ): Princeton University Press.
- Bates D, Maechler M, Bolker B, Walker S. 2015. Fitting Linear Mixed- Effects Models. Using lme4. J Stat Software. 67:1–48.
- Birkhead TR. 1978. Behavioural adaptations to high density nesting in the common guillemot *Uria aalge*. - Anim Behav. 26:321–331.
- Borgia G, Gore MA. 1986. Feather stealing in the satin bowerbird *Ptilonorhynchus violaceus*: male competition and the quality of display. - Anim Behav. 34:727–738.
- Both C. 1998. Experimental evidence for density dependence of reproduction in great tits. - J Anim Ecol. 67:667–674.
- Both C, Visser ME, Verboven N. 1999. Density-dependent recruitment rates in great tits: the importance of being heavier. - Proc R Soc Lond B. 266:465–469.
- Brouwer L, Komdeur J. 2004. Green nesting material has a function in mate attraction in the European starling. Anim Behav. - 67:539–548.
- Clutton-Brock T. 2007. Sexual selection in males and females. - Science. 318:1882–1885.
- Clutton-Brock TH. 2009. Sexual selection in females. - Anim Behav. 77:3–11.
- Clutton-Brock TH, Huchard E. 2013. Social competition and selection in males and females. - Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 368:20130074.
- Cramp S, Perrins CM. 1994. Handbook of the birds of Europe, the Middle East and North Africa. Vol. VIII. Oxford: Oxford University Press.
- Crowhurst CJ, Zanollo V, Griggio M, Robertson J, Kleindorfer S. 2012. White flank spots signal feeding dominance in female diamond firetails, *Stagonopleura guttata*. - Ethology. 118: 63–75.
- Fugle GN, Rothstein SI. 1987. Experiments on the control of deceptive signals of status in white-crowned sparrows. - Auk. 104:188e197.
- García-López de Hierro L, Moleón M, Ryan PG. 2013. Is carrying feathers a sexually selected trait in house sparrows? - Ethology. 119:199–211.
- García-Navas V, Valera F, Griggio M. 2015. Nest decorations: an ‘extended’ female badge of status? - Anim Behav. 99:95–107.
- Griggio M, Zanollo V, Hoi H. 2010. Female ornamentation, parental quality, and competitive ability

- in the rock sparrow. - J Etol. 28: 455–462.
- Kraaijeveld K, Kraaijeveld-Smit FJ, Komdeur J. 2007. The evolution of mutual ornamentation. - Anim Behav. 74:657–677.
- López-Idiáquez D, Vergara P, Fargallo JA, Martínez-Padilla J. 2016. Female plumage coloration signals status to conspecifics. - Anim Behav. 121:101–106.
- Mennерат A, Mirleau P, Blondel J, Perret P, Lambrechts MM, Heeb P. 2009. Aromatic plants in nests of the blue tit *Cyanistes caeruleus* protect chicks from bacteria. - Oecologia. 161:849–855.
- Moreno J. 2012. Avian nests and nest-building as signals. - Avian Biology Research. 5: 238–251.
- Nevoux M, Gimenez O, Arlt D, Nicoll M, Jones C, Norris K. 2011. Population regulation of territorial species: both site dependence and interference mechanisms matter. - Proc Biol Sci. 278:2173–2181.
- Nicolaus M, Tinbergen JM, Ubels R, Both C, Dingemanse NJ. 2016. Density fluctuations represent a key process maintaining personality variation in a wild passerine bird. - Ecol Lett. 19:478–486.
- Parejo D, Pérez-Contreras T, Navarro C, Soler JJ, Avilés JM. 2008. Spotless starlings rely on public information while visiting conspecific nests: an experiment. - Anim Behav. 75:483–488.
- Peralta-Sánchez JM, Møller AP, Martin-Platero AM, Soler JJ. 2010. Number and colour composition of nest lining feathers predict eggshell bacterial community in barn swallow nests: an experimental study. - Funct Ecol. 24:426–433.
- Penteriani V. 2003. Breeding density affects the honesty of bird vocal displays as possible indicators of male/territory quality. - Ibis. 145:127–135.
- Pinxten R, de Ridder E, Eens M. 2003. Female presence affects male behavior and testosterone levels in the European starling (*Sturnus vulgaris*). - Horm Behav. 44:103–109.
- Polo V, Veiga JP. 2006. Nest ornamentation by female spotless starlings in response to a male display: an experimental study. - J Anim Ecol. 75:942–947.
- Polo V, López-Rull I, Gil D, Veiga JP. 2010. Experimental addition of green plants to the nest increases testosterone levels in female spotless starlings. - Ethology. 116:129–137.
- Polo V, Rubalcaba JG, Veiga JP. 2015. Green plants in nests reduce offspring recruitment rates in the spotless starling. - Behav Ecol. 26:1131–1137.
- R Core Team 2016. R: A language and environment for statistical computing. Vienna (Austria): R Foundation for Statistical Computing.
- Robinson MR, Kruuk LE. 2007. Function of weaponry in females: the use of horns in intrasexual competition for resources in female Soay sheep. - Biol Lett. 3:651–654.
- Rodenhouse NL, Sillett TS, Doran PJ, Holmes RT. 2003. Multiple densitydependence mechanisms

- regulate a migratory bird population during the breeding season. - *Proc Biol Sci.* 270:2105–2110.
- Rohwer S. 1977. Status signaling in Harris sparrows: Some experiments in deception. - *Behaviour.* 61:107–129.
- Rosvall KA. 2008. Sexual selection on aggressiveness in females: evidence from an experimental test with tree swallows. - *Anim Behav.* 75:1603–1610.
- Rosvall KA. 2011. Intrasexual competition in females: evidence for sexual selection? - *Behav Ecol.* 22:1131–1140.
- Rubalcaba JG, Fuentes D, Veiga JP, Polo V. 2017. Nest decoration as social signals by males and females: greenery and feathers in starling colonies. - *Behav. Ecol.* 28:1369–1375.
- Rubenstein DR, Lovette IJ. 2009. Reproductive skew and selection on female ornamentation in social species. - *Nature.* 462:786–789.
- Ruiz-Castellano C, Tomás G, Ruiz-Rodríguez M, Martín-Gálvez D, Soler JJ. 2016. Nest Material Shapes Eggs Bacterial Environment. - *PLoS One.* 11:e0148894.
- Scott-Baumann JF, Morgan ER. 2015. A review of the nest protection hypothesis: does inclusion of fresh green plant material in birds' nests reduce parasite infestation? - *Parasitology,* 142:1016–1023.
- Sillett TS, Rodenhouse NL, Holmes RT. 2004. Experimentally reducing neighbour density affects reproduction and behavior of a migratory songbird. - *Ecology.* 85:2467–2477.
- Soler JJ, Cuervo JJ, Møller AP, De lope F. 1998. Nest building is a sexually selected behaviour in the barn swallow. - *Anim Behav.* 56:1435–1442.
- Soler JJ, Ruiz-Castellano C, Figuerola J, Martín-Vivaldi M, Martínez-de la Puente J, Ruiz-Rodríguez M, Tomás G. 2017. Telomere length and dynamics of spotless starling nestlings depend on nest-building materials used by parents. - *Anim Behav.* 126:89–100.
- Stamps JA, Losos JB, Andrews RM. 1997. A comparative study of population density and sexual size dimorphism in lizards. - *Am Nat.* 149:64–90.
- Tarjuelo R, Vergara P, Martínez-Padilla J. 2016. Intra-sexual competition modulates calling behavior and its association with secondary sexual traits. - *Behav Ecol Sociobiol.* 70:1633–1641.
- Tobias JA, Montgomerie R, Lyon BE. 2012. The evolution of female ornaments and weaponry: social selection, sexual selection and ecological competition. - *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 367:2274–2293.
- Tomás G, Merino S, Martínez-de la Puente J, Moreno J, Morales J, Rivero-de Aguilar J. 2013. Nest size and aromatic plants in the nest as sexually selected female traits in blue tits. - *Behav Ecol.* 24:926–934.

- Veiga JP, Moreno J, Cordero PJ, Mínguez E. 2001. Territory size and polygyny in the spotless starling: resource-holding potential or social inertia? - *Can J Zool.* 79:1951–1956.
- Veiga JP, Polo V, Arenas M, Sánchez S. 2012. Intruders in nests of the spotless starling: prospecting for public information or for immediate nesting resources? - *Ethology.* 118:917–924.
- Veiga JP, Polo V. 2005. Feathers at nests are potential female signals in the spotless starling. - *Biol Lett.* 1:334–337.
- Veiga JP, Polo V, Viñuela J. 2006. Nest Green plants as a male status signal and courtship display in the spotless starling. - *Ethology.* 112:196–204.
- Veiga JP, Polo V. 2008. Fitness consequences of increased testosterone levels in female spotless starlings. - *Am Nat.* 172:42–53.
- Veiga JP, Polo V. 2011. Feathers in the spotless starling nests: a sexually selected trait? - *Behaviour.* 148:1355–1371.
- Veiga JP, Polo V. 2016. Estornino Negro – *Sturnus unicolor* Temminck. En: Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles. In: Salvador A., Morales MB, editors. Madrid: Museo Nacional de Ciencias Naturales. Available from: <http://www.vertebradosibericos.org/>.

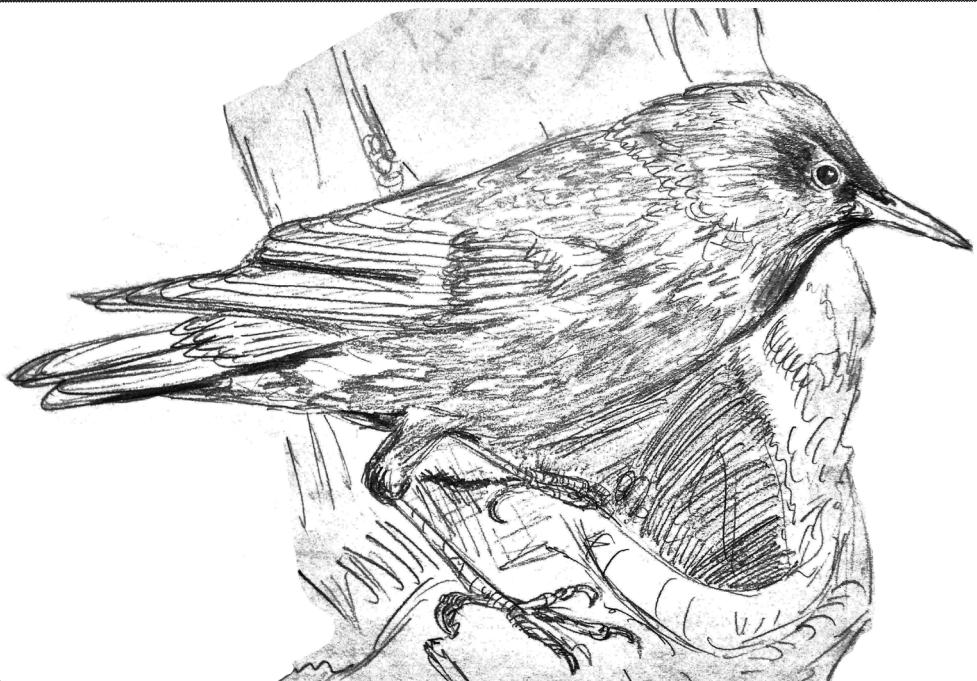




## *Capítulo 2 / Chapter 2*

### *Nest decoration as social signals by males and females: greenery and feathers in starling colonies*

---



---

Juan G. Rubalcaba, Daniel Fuentes, José P. Veiga, Vicente Polo

*Manuscrito publicado en Behavioral Ecology (2017)*

## **Abstract**

The expression of elaborated displays provides reliable information to conspecifics about the quality of the signaler. Competition for breeding resources or mates is predicted to affect the expression of signals in both males and females; however, the literature has been typically focused on male behaviours. The spotless starling is an interesting example where both sexes decorate the nest to signal their condition and social status: males add green plants at the beginning of the breeding period, and females place foreign feathers during the incubation period. In this study, we investigate nest decoration by males and females in relation to the intensity of conspecific competition during the breeding period. We distributed nest boxes at either a high (HD) or a low density (LD) and recorded the amount of green plant material added before laying, the number of feathers at hatching, and the breeding productivity under these different density treatments. The amount of green plant material and the number of feathers at hatching were higher in HD than in LD nests. Furthermore, nest boxes at higher density had lower breeding productivity. Our results suggest that manipulating the density of nest boxes increased competition for breeding resources. The aggregation of males competing for territories and mates may stimulate them to add greater amounts of plants, and competition over those males or other resources for reproduction may induce females to add feathers. This study shows that social environment has the potential to influence the expression of signalling behaviours in both males and females.

**Keywords:** breeding density, female ornaments, green nesting material, nest decoration, ornamental feathers, sexual selection, *Sturnus unicolor*

## **Introduction**

In many species, females, as well as males, exhibit elaborated ornaments and ritualized behaviours (Andersson 1994; Amundsen 2000; Kraaijeveld *et al.* 2007; Clutton-Brock 2009; Clutton-Brock and Huchard 2013), which has major implications for our understanding of how sexual selection operates (Clutton-Brock 2007, 2009; Kraaijeveld *et al.* 2007; Rosvall 2011; Tobias *et al.* 2012). Recent evidence is giving consistence to the idea that competition over mates and other resources for reproduction, typically considered as ultimate causes for male ornamentation, can also explain ornamental trait evolution in females (Amundsen 2000; Veiga and Polo 2005; Robinson and Kruuk 2007; Kraaijeveld *et al.* 2007; Rosvall 2008; Rubenstein and Lovette 2009; Clutton-Brock and Huchard 2013). When the competition for breeding resources and mates is intense in both sexes, both males and females are expected to develop badges of social status and territorial displays. These signals of social status may represent reliable proxies of individual quality and competitive ability when they have associated costs that only high quality individuals can afford, for example, those derived from or increased predation (differential predation hypothesis; Fugle and Rothstein 1987) or from increased intrasexual aggression (social control hypothesis; Rohwer 1977; López-Idiáquez *et al.* 2016; Tarjuelo *et al.* 2016).

Nest-building behaviour and nest decoration may have become ritualized into signals by the territory-owners to conspecifics in several avian species (Borgia and Gore 1986; Soler *et al.* 1998; Veiga *et al.* 2006; Moreno 2012). Males of different species decorate their nests with green plants, foreign feathers, or plastics to signal their quality and attract females to their territories (e.g. Brouwer and Komdeur 2004; Veiga *et al.* 2006; García-López de Hierro *et al.* 2013). Although the function of the nest ornaments has been typically studied in males, there is also evidence that females use odd materials to signal their quality or social status to their mate or to conspecific competitors (Veiga and Polo 2005; Tomás *et al.* 2013; García-

Navas *et al.* 2015).

The use of conspicuous signals may be particularly advantageous when the density of conspecifics is high and there are frequent antagonistic interactions between neighbours (Birkhead 1978; Stamps *et al.* 1997; Penteriani 2003). Although breeding density is an important factor determining fitness and social behaviour of birds (Sillett *et al.* 2004; Nevoux *et al.* 2011), little is known about its potential to modulate male and female signalling behaviours in wild populations (Birkhead 1978; Penteriani 2003). Here, we investigate whether nest decoration by male and female spotless starlings (*Sturnus unicolor*) is affected by the density of conspecifics and competition during the breeding period.

The spotless starling is a facultatively colonial and moderately polygynous bird that breeds in natural cavities and in artificial nest boxes. Both males and females defend breeding territories from same-sex conspecifics and perform territorial displays during different phases of the breeding period. Males typically compete for breeding territories at the beginning of the season and incorporate green plants, aromatic herbs, flowers, and lichens to their nest boxes. By carrying green nesting material, males attract females to the nest box and stimulate them for reproduction (Veiga *et al.* 2006; Polo *et al.* 2010). Later, during the laying and incubation periods, the female nest-owners place flight feathers of different bird species into the cavity-nest in places that maximize the conspicuousness of the nest (Veiga and Polo 2005). The number of feathers that are displayed is related to the age of the female nest-owner and to the amount of green plant material carried by the male in the days before laying (Polo and Veiga 2006). We assume that the female invests in a time consuming collection of feathers during part of the breeding period to signal her quality to her partner, or to competing females that try to reproduce with the same male. Female competition for breeding resources and mates is important in this species, as they try to prevent their mates from attracting other females and defend their brood against intruders after mating (Veiga

and Polo 2008; Polo *et al.* 2010; Veiga *et al.* 2012; Polo *et al.* 2015). As this competition is costly to a female's fitness, it has the potential to act as an ultimate cause in the evolution of conspecific signalling behaviours.

In this experiment, we manipulated conspecific density during the breeding period by distributing nest boxes at a high (HD nests) and a low density (LD nests), and examined the effect of this manipulation on the sexual display of males and females. We used the breeding productivity as a surrogate of conspecific competition during the breeding period. Males competing for nest boxes in dense areas might increase the intensity of their sexual displays, and therefore, we expected to find greater amounts of green nesting material in HD nests during the courtship period than in LD nests. Competition between females for the preferred males may also stimulate their signalling behaviour using feathers during the laying and incubation periods, and therefore, we predicted that the number of feathers at hatching would be greater in HD nests than in LD nests. Ultimately, we aim to understand how breeding density may affect social displays of both males and females.

## **Material and Methods**

### ***Species and study area***

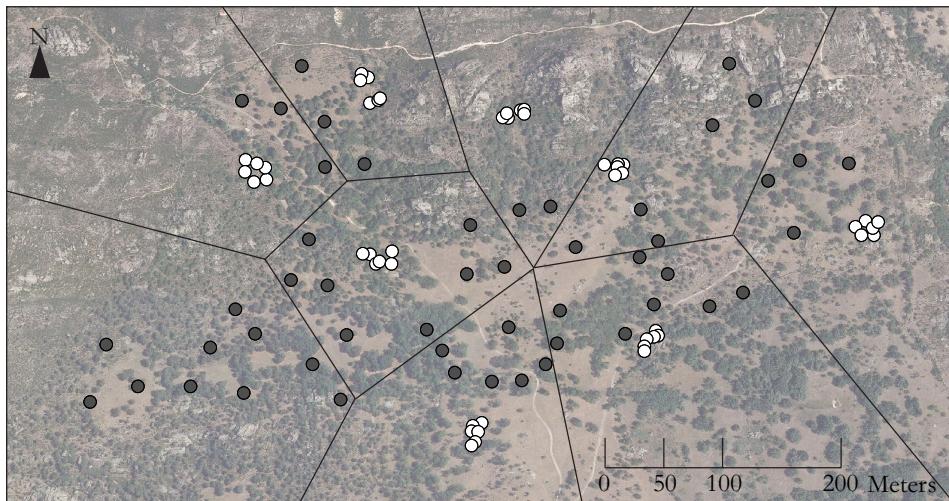
The spotless starling is a facultatively colonial species; previous observations showed that they breed both solitarily, in loose neighbourhood groups (average nearest-neighbour distance above 70 m) and in high densities, occupying all available nesting sites on roofs and buildings (average distances between neighbours 2–10 m; Cramp and Perrins 1994). Although it is the male who defends breeding territories and competes to increase the number of nesting sites and mating opportunities (Veiga *et al.* 2001), the competition among females for breeding resources is also important in this species and has the potential to affect the fitness and breeding behaviour of females (Veiga and Polo 2008, Polo *et al.* 2015).

Starlings generally lay 2 clutches a year, the first by mid-April and the second ca. 40 days later, by the end of May. Males incorporate fragments of lichens, green twigs, and flowers during the 7–10 days immediately preceding the laying period; they generally stop adding green nesting material when the first egg has been laid (Veiga *et al.* 2006). Starting approximately 3 days before the onset of laying, the female incorporates a variable number of flight feathers of different bird species into the nest. These feathers are placed around the nest cup, frequently arranged against the nest box walls, and not necessarily in contact with the eggs (Veiga and Polo 2005; Polo and Veiga 2006). The number of feathers in the nest increases during the laying and the incubation periods and reaches a maximum, on average 7 feathers in a range from 0 to 40, on the day the first egg hatches (Polo and Veiga 2006).

We studied a colony of spotless starling breeding in nest boxes in Manzanares el Real ( $45^{\circ} 45' N$ ;  $3^{\circ} 50' W$ , Madrid province, Central Spain). The breeding area is a pastureland at 1000 m a.s.l. with scattered trees (Narrow-leaved Ash, *Fraxinus angustifolia*, Pyrenean oak, *Quercus pyrenaica*, and Holm oaks, *Quercus rotundifolia*). The colony has been studied continuously since 2001. For the present experiment, carried out during 2015 and 2016, we modified the spatial distribution of 98 nest boxes as shown in Fig. 1 (see Experimental design section for details).

### ***Experimental design***

Nest boxes were distributed in 2 treatments: high density (HD; 48 nest boxes clustered in 8 groups of 6 nests; average nearest-neighbour distance of  $10 \pm 5$  m, mean  $\pm$  SD) and low density (LD; 50 nest boxes placed on average  $58 \pm 13$  m apart; Figure 1). These average distances between nest boxes simulate 2 extremes within the range of densities observed in natural conditions (Cramp and Perrins 1994; Veiga and Polo 2016). Nest boxes were distributed along the entire study area to occupy all different habitats in the area and their position was maintained for the 2 years of the experiment. To account for any potential



**Figure 1.** Map of the study area with the positions of the nest boxes in the highdensity (HD); grey dots and the low-density (LD) treatments; white dots. Polygons represent the spatial clusters generated with a *k-means* grouping procedure, conducted to control for potential errors due to spatial pseudo-replication.

effects that may be due to the fact that nest boxes within the same group share the same environment, we classified the study area into 9 spatial clusters and considered the cluster as a random factor in mixed models (see Data analysis section). The spatial clusters were generated using the *k-means* grouping method: the nest boxes were grouped into a number of clusters in such a way that each nest box was assigned to the cluster that minimized the Euclidean distance to the centroid of the cluster. This method requires to determine a priori the total number of clusters; for our purpose, we used the number of clusters necessary to separate each HD group into an individual cluster. However, a sensitivity analysis revealed that the outcome of our analyses did not depend on the number of spatial clusters considered in the analyses.

We visited the nest boxes periodically during the entire breeding season and determined the amount of green nesting material and the number of feathers in each nest box. The amount of green plant material was measured using an exponential classification scale with 6

levels (the same scale was used in previous studies, e.g. Veiga *et al.* 2006): 1) absence of green plants in the nest; 2) traces of green plant material: a single fragment less than 2–4 cm or 2 fragments of up to 2 cm; 3) small amount of plant material: a single fragment of 4–5 cm or 2 fragments of between 2–4 cm; 4) intermediate amount of plant material: 2 or 3 fragments of between 2–5 cm or 3 to 5 fragments of up to 2 cm; 5) large amount of plant material: 4 or 5 fragments of between 2–5 cm or 6 to 8 fragments of up to 2 cm; and 6) very large amount of plant material: more than 5 fragments between 2–5 cm or more than 8 fragments less than 2 cm. Researchers were previously trained to prevent potential biases in the estimations. We determined the amount of green plant material in several visits starting from 2 weeks before the onset of laying until the first egg appeared (for an average of 5.9, ranging from 3 to 10, times per nest and reproductive attempt). Finally, we considered the average of the 3 maximum values found during the sampling interval for each nest.

The number of feathers was counted at every visit from ca.3 days before the onset of laying until hatching. We recorded the maximum number counted in the nest at any one time, which was generally 0–2 days before hatching of the first laid egg (Polo and Veiga 2006). We also considered in the analyses those clutches that were abandoned 1 to 2 days before the expected date of hatching (25 and 21 clutches in the LD and HD treatments respectively, 12.6% of the total sample). For those cases, we considered the number of feathers observed at the moment of desertion. For the rest of the broods, we could determine the number of eggs, hatchlings and fledglings and identified the mother of the brood. Breeding females were captured within their nest boxes when feeding 5-days-old nestlings and were marked with numbered aluminium rings for individual identification. To prevent researchers from causing greater stress in HD nests, due to the fact that there are more nest boxes in a smaller area, we only captured 1 or 2 females each day of the total 6 nest boxes in the HD groups.

The experiment was carried out during 2015 and 2016 for both first and second

clutches. The rate of occupation of the nest boxes was high and did not differ between the HD and LD treatments: first clutches 99.0% *versus* 98.9% (LD vs. HD;  $X^2_1 = 0.001, P = 0.97$ ); second clutches: 81.0% *versus* 74.8% ( $X^2_1 = 1.113, P = 0.29$ ).

### **Data analysis**

We compared nests from the HD and LD treatments to investigate the effect of breeding density on the amount of green plant material, the number of feathers at hatching and breeding productivity (both log-transformed) using general linear mixed-effect models. We considered the spatial cluster and its interaction with the experimental treatment as 2 random factors to prevent spatial pseudo-replication (Fig. 1). Additionally, the nest box identity nested within the spatial cluster (Nest ID) was considered as an additional random factor to control for successive broods in the same nest. The treatment (HD *vs.* LD), laying date (number of days since April 1), and year (2015 *vs.* 2016) were included as linear predictors in the models. To represent the increase in the number of feathers in HD and LD nests during the laying and incubation periods graphically, we fitted local polynomial regressions to a subset of daily observations obtained from 48 nest boxes (24 HD nests from 4 complete groups *vs.* 24 LD nests). These data were only used to represent the variations in the number of feathers; for the analyses of the effect of treatment on number of feathers, we considered only the number of feathers at hatching.

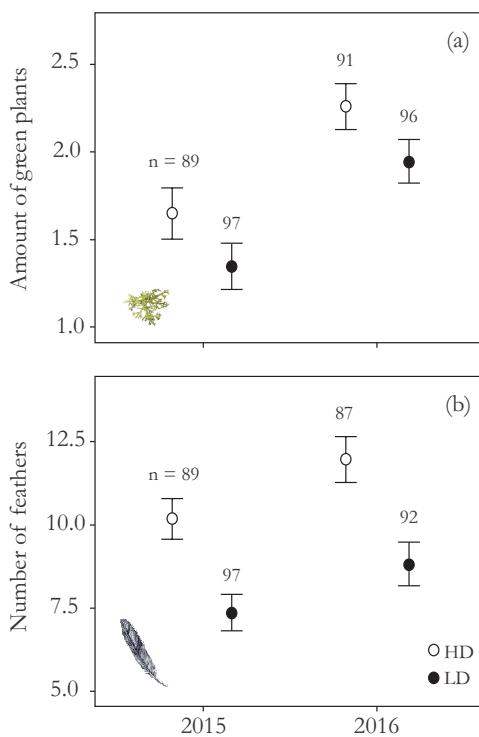
We also examined the effect of treatment on breeding success by comparing clutch size, fledgling survival (i.e. number of fledglings in relation to the number of hatched eggs) and the total number of fledglings in HD *versus* LD nests. The clutch size was log transformed and included as a response variable in a general linear mixed-effect model using the random factors and linear predictors outlined above. Fledgling survival was analyzed using generalized linear mixed-effect models assuming binomial error distribution and using a logit link. Moreover, we compared the age of mothers breeding in HD and LD nests to

explore the potential segregation of young and experienced mothers, which might explain differences in their breeding outputs and feather-carrying activity (Polo and Veiga 2006). Mixed models were fitted using the statistical package lme4 (Bates *et al.* 2015) in R 3.3.2 (R Core Team 2016).

## Results

### Nest ornaments and breeding density

The amount of green nesting material, recorded before the beginning of egg-laying, was significantly higher in HD than in LD nests. Besides, the number of ornamental feathers at hatching was also higher in HD nests than in LD nests (Fig. 2; Table 1a and b). During



**Figure 2.** (a) Amount of green plant material and (b) number of feathers at hatching mean  $\pm$  SE recorded in the low-density LD and high-density treatments HD. Numbers indicate the sample size: number of clutches by treatment and year.

the laying and incubation periods, the number of feathers in the nests increased along a sigmoid curve (Fig. 3). The rate of increase in the number of feathers per day increased after the fourth egg has been laid (i.e. when the incubation begins; personal observation) and finally reached higher values in the HD than LD nests (Fig. 3).

The amount of plant material recorded in the nests increased in relation to the date of the beginning of egg-laying in accordance with previous observations

(Veiga *et al.* 2006). By contrast, the number of feathers was not significantly related to the date of the beginning of egg-laying

(Table 1). Additionally, we found greater amounts of green plant material and more feathers in the second year of the experiment compared to the first; nonetheless, the differences between HD and LD nests were present in both years (Fig. 2).

### **Reproductive success and breeding density**

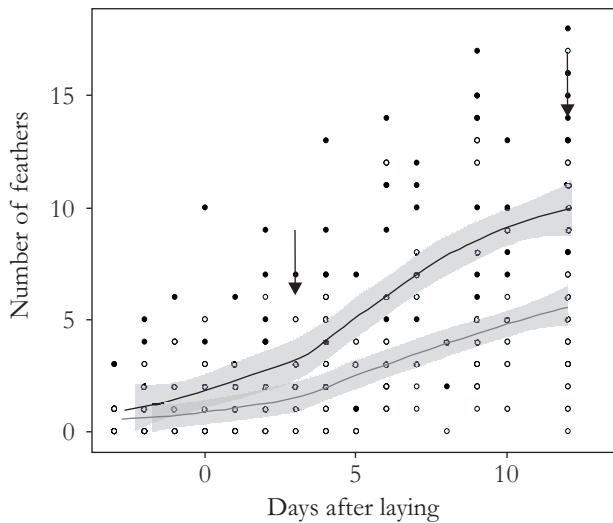
The mean clutch size did not differ between HD and LD nests and did not vary in relation to the date of the beginning of egg-laying. However, the probability of fledgling survival was lower in HD nests and decreased in relation to the laying date (Table 1c and d). The negative effect of breeding density on the production of fledglings was also significant when considering the total number of fledglings ( $F_{1,99.6} = 5.50, P = 0.020$ ). The lower reproductive

**Table 1.** Results of the mixed-effect models analyzing the effect of treatment on the amount of green plant material, the number of ornamental feathers, clutch size, and reproductive success, that is, fledgling survival generalized (binomial) mixed model

	Coefficient ± SE	F	df	P
<b>(a) Green plants</b>				
Treatment	0.42 ± 0.17	6.11	1, 25.4	<b>0.02</b>
Hatching date	0.02 ± 0.004	33.5	1, 316.1	<b>&lt;0.001</b>
Year	0.75 ± 0.16	22.2	1, 307.2	<b>&lt;0.001</b>
Nest ID (R)	0.23			
Cluster (R)	0.08			
Cluster × Treatment (R)	0.15			
<b>(b) Ornamental feathers</b>				
Treatment	0.88 ± 0.33	7.02	1, 8.8	<b>0.026</b>
Hatching date	0.001 ± 0.19	0.13	1, 288.7	0.722
Year	0.43 ± 0.03	4.74	1, 277.1	<b>0.03</b>
Nest ID (R)	0.60			
Cluster (R)	0.63			
Cluster × Treatment (R)	0.71			
<b>(c) Clutch size</b>				
Treatment	-0.08 ± 0.22	0.14	1, 80.8	0.714
Hatching date	-0.004 ± 0.004	0.44	1, 285.4	0.375
Year	0.11 ± 0.18	0.79	1, 268.4	0.534
Nest ID (R)	0.63			
Cluster (R)	0.20			
Cluster × Treatment (R)	0.16			
<b>(d) Fledgling survival</b>				
	Coefficient ± SE	$\chi^2$	df	P
Treatment	-0.28 ± 0.11	4.88	1	<b>0.027</b>
Hatching date	-0.15 ± 0.05	10.32	1	<b>0.001</b>
Year	-0.03 ± 0.09	0.11	1	0.742
Nest ID (R)	0.01			
Cluster (R)	0.01			
Cluster × Treatment (R)	0.20			

The random factors of each model (R) represent the standard deviation in the intercepts among nest boxes, and the standard deviation in intercepts and slopes among spatial clusters. Bold values indicate significant predictor variables.

success in the HD nests was unlikely due to differences in the age of breeding females (mean age  $\pm$  SE:  $2.22 \pm 0.13$  vs.  $2.39 \pm 0.15$  years (HD vs. LD);  $F_{1,155.5} = 0.48$ ;  $P = 0.49$ ).



**Figure 3.** Daily increase in the number of feathers in nests from 3 days before the onset of laying until hatching in the high-density black dots, black line and the low-density treatments white dots, grey line. The arrows represent, respectively, the beginning of incubation and the day of the first hatching. The smooth lines were fitted using local polynomial regressions.

## Discussion

We found that individuals breeding in nest boxes at higher density had lower reproductive success and carried greater amounts of ornamental green plants and more feathers during the pre-laying and incubation period, respectively (Table 1), and the effects were consistent in both years of the experiment (Fig. 2). The aggregation of individuals typically increases the number of agonistic interactions and the competition for breeding resources, which reduce different parameters of their reproductive success (Alatalo and Lundberg 1984; Both 1998; Both *et al.* 1999; Rodenhouse *et al.* 2003; Sillett *et al.* 2004; Nevoux *et al.* 2011). In starlings, both males and females are aggressive towards conspecifics intruding on their territories, which can be either other territorial birds or floaters searching for mates or nests to brood parasitize (Veiga *et al.* 2012). Agonistic interactions among competing females affect their physiology during the breeding period, reducing the amount of care that they devote to, and the fitness of, their offspring (Veiga and Polo 2008; Polo *et al.* 2010, 2015). In this context, the use of green plants and feathers as nest ornaments may play a role as

conspecific signals of territoriality of males and females, respectively. The amount of green nesting material and feathers are related to the condition of males and females, respectively, and they may reflect their competitive abilities or willingness to defend their territory against conspecific competitors (Veiga *et al.* 2006; Polo and Veiga 2006). Such nest-building behaviour, incorporating non-structural nesting materials, may have become ritualized into signals of territory-ownership in several starling species (Brouwer and Komdeur 2004; Veiga and Polo 2005; Veiga *et al.* 2006). In species that often breed in dense colonies occupying all available nesting sites, the density of conspecifics may be an important factor modulating the signalling function of ritualized behaviours in both sexes.

Previous evidence in both European species of starlings suggests that females prefer to mate with males that add greater amounts of green material to their nests (Veiga *et al.* 2006; Polo *et al.* 2010 in the spotless starling; Brouwer and Komdeur 2004 in the European starling). The dense aggregation of nest boxes may have attracted females trying to collect public information of the breeding status of males and the quality of their territories, which may facilitate the comparison of the attractiveness of different potential mates (Parejo *et al.* 2008; Veiga *et al.* 2013). In this sense, the presence of other males and females in adjacent territories may stimulate their sexual displays. For example, experiments with European starlings showed that males carry green plants more frequently when a caged female is placed adjacent to their nest box (Pinxten *et al.* 2003; Brouwer and Komdeur 2004). In the Eurasian Eagle Owl (*Bubo bubo*), conspecific density has been shown to affect the duration of male calls and their honesty as signals of male and/or territory quality (Penteriani 2003).

The greater level of competition in areas of higher density could induce the segregation of males in better condition, more aggressive or bolder, which are more successful at competing for mating opportunities in dense areas, from those less aggressive or shyer that avoid the costs associated with high-density areas and occupy more isolated nest boxes.

In such a case, the greater ornamentation of nests in areas with higher density may be the consequence of the non-random segregation of individuals with different qualities or different personalities between the 2 treatments. For example, fluctuations in population density have been shown to favour individuals with different personalities under low and high densities in the great tit (*Parus major*; Nicolaus *et al.* 2016). It is possible that males in better condition and more attractive preferred to breed in areas with higher density of nests if, for example, they increase their chances to breed with several females. Thus, they could compensate the lower reproductive success per breeding attempt in HD nests by increasing the number of mates or extrapair copulations. Further research is necessary to understand whether individuals with different attributes benefit from breeding in areas with different density of nests and whether they select their territories accordingly.

Different morphological and behavioural traits of females in birds may act as badges of status (Griggio *et al.* 2010; Crowhurst *et al.* 2012; García-Navas *et al.* 2015; López-Idiáquez *et al.* 2016). For example, it has been shown that female rock sparrows (*Petronia petronia*) with a relatively larger yellow patch had earlier access to food than those with small patches (Griggio *et al.* 2010). In some cases, the same plumage ornament seems to have a different function between the sexes as a signal of social status (Crowhurst *et al.* 2012). Among the badges of status conducted during the breeding period, female rock sparrows decorate their nest with ornamental feathers and thus reduce the number of intrusions by floater individuals (García-Navas *et al.* 2015). Female starlings compete for attractive males and have aggressive encounters that often result in the partial or complete destruction of the brood of the opponent. The competitive abilities of females may depend on their aggressiveness and the level of testosterone during the breeding period. Thus, the experimental addition of green plants to nests increased their level of circulating testosterone (Polo *et al.* 2010), and the experimental administration of testosterone increased the number of years breeding

with attractive males (Veiga and Polo 2008). However, high levels of circulating testosterone are costly for the female as it reduces parental care and subsequently the fitness of their offspring. Besides, the experimental addition of green plants reduced the female nest-owner's fitness (Polo *et al.* 2015), and stimulated the female nest-owner to add more ornamental feathers to the nest during the laying and incubation periods (Polo and Veiga 2006). Taking all of this information together, we expected to find a positive relationship between the amount of green plant material and feathers in a nest (Fig. 2 and see Polo and Veiga 2006) as a way to prevent future competition between neighbours or floating females to frustrate attempts of aggressions or brood sabotages (Polo and Veiga 2006).

We cannot discard that the use of feathers by female starlings also played a role in the communication with her partner, for example, to elicit male assistance. In previous studies, the experimental addition of feathers to nests of spotless starling increased fitness to twice the number of recruits per brood, suggesting that females obtain fitness benefits from adding feathers to their nests (Polo V, Rubalcaba JG and Veiga JP, unpublished data). Although we did not find evidence that the addition of feathers increased feeding rates or nest sanitation by the male (Veiga and Polo 2011), it is possible that it affected other male behaviours, such as the time invested into brood protection. For example, by carrying ornamental feathers to their nests, female rock sparrows stimulate the male to spend more time guarding the brood and reduce the number of intrusions (García-Navas *et al.* 2015). Similarly, conspecific density could stimulate female starlings to add more ornamental feathers, consequently reducing competition with neighbouring females or with those attracted by the attractive males in HD nests.

One may speculate that green plants or feathers were added to prevent an increased load of ectoparasites in areas with higher density of nesting sites. For several bird species, the addition of green plants to the nests has been shown to protect chicks from bacteria and

other ectoparasites (e.g. blue tit *Cyanistes caeruleus* Mennerat *et al.* 2009). Similarly, chemical compounds in feathers may reduce bacteria, fungi or ectoparasites in avian nests. For example, white feathers that were carried to the nest and used as lining material by swallows reduced the bacterial density on egg shells at the end of the incubation period (Peralta-Sánchez *et al.* 2010). Most studies failed to provide evidence for the insecticidal function of green plants in starling nests and support the idea that they play a role as sexually selected signals (see review in Scott-Baumann and Morgan 2015). However, recent studies have found antibacterial properties mainly in the chemical compounds of feathers but also in plants (Ruiz-Castellano *et al.* 2016), which can aid in preventing the detrimental effects of bacteria on nestlings (Soler *et al.* 2017). The effect of the social environment on nestling condition, parasite loads and parental behaviour is a promising area for investigation.

This study, to our knowledge, represents the first evidence that breeding density can affect the expression of 2 sex-specific signalling behaviours. The social environment may be a key factor modulating the expression of signalling behaviours involved in the defence of breeding territories and mate attraction. Recent evidence is giving consistence to the idea that females, like males, obtain benefits from using ornaments to signal their condition or social status to males or to other females.

## **Acknowledgements**

This work was supported the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (project number CGL2014-59670-P). J.G.R. and D.F. were both supported by PhD grants by the Spanish Government.

We thank Christina Meier for kindly revising the writing style and 2 anonymous referees for their comments on this manuscript.

## References

- Alatalo RV, Lundberg A. 1984. Density-dependence in breeding success of the pied flycatcher *Ficedula hypoleuca*. - J Anim Ecol. 53:969–977.
- Amundsen T. 2000. Why are female birds ornamented? - Trends Ecol Evol. 15:149–155.
- Andersson MB. 1994. Sexual selection. Princeton (NJ): Princeton University Press.
- Bates D, Maechler M, Bolker B, Walker S. 2015. Fitting Linear Mixed- Effects Models. Using lme4. J Stat Software. 67:1–48.
- Birkhead TR. 1978. Behavioural adaptations to high density nesting in the common guillemot *Uria aalge*. - Anim Behav. 26:321–331.
- Borgia G, Gore MA. 1986. Feather stealing in the satin bowerbird *Ptilonorhynchus violaceus*: male competition and the quality of display. - Anim Behav. 34:727–738.
- Both C. 1998. Experimental evidence for density dependence of reproduction in great tits. - J Anim Ecol. 67:667–674.
- Both C, Visser ME, Verboven N. 1999. Density-dependent recruitment rates in great tits: the importance of being heavier. - Proc R Soc Lond B. 266:465–469.
- Brouwer L, Komdeur J. 2004. Green nesting material has a function in mate attraction in the European starling. - Anim Behav. 67:539–548.
- Clutton-Brock T. 2007. Sexual selection in males and females. - Science. 318:1882–1885.
- Clutton-Brock TH. 2009. Sexual selection in females. - Anim Behav. 77:3–11.
- Clutton-Brock TH, Huchard E. 2013. Social competition and selection in males and females. - Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 368:20130074.
- Cramp S, Perrins CM. 1994. Handbook of the birds of Europe, the Middle East and North Africa. Vol. VIII. Oxford: Oxford University Press.
- Crowhurst CJ, Zanollo V, Griggio M, Robertson J, Kleindorfer S. 2012. White flank spots signal feeding dominance in female diamond firetails, *Stagonopleura guttata*. - Ethology. 118: 63–75.
- Fugle GN, Rothstein SI. 1987. Experiments on the control of deceptive signals of status in white-crowned sparrows. - Auk. 104:188–197.
- García-López de Hierro L, Moleón M, Ryan PG. 2013. Is carrying feathers a sexually selected trait in house sparrows? - Ethology. 119:199–211.
- García-Navas V, Valera F, Griggio M. 2015. Nest decorations: an ‘extended’ female badge of status? - Anim Behav. 99:95–107.
- Griggio M, Zanollo V, Hoi H. 2010. Female ornamentation, parental quality, and competitive ability

- in the rock sparrow. - J Etol. 28: 455–462.
- Kraaijeveld K, Kraaijeveld-Smit FJ, Komdeur J. 2007. The evolution of mutual ornamentation. - Anim Behav. 74:657–677.
- López-Idiáquez D, Vergara P, Fargallo JA, Martínez-Padilla J. 2016. Female plumage coloration signals status to conspecifics. - Anim Behav. 121:101–106.
- Mennерат A, Mirleau P, Blondel J, Perret P, Lambrechts MM, Heeb P. 2009. Aromatic plants in nests of the blue tit *Cyanistes caeruleus* protect chicks from bacteria. - Oecologia. 161:849–855.
- Moreno J. 2012. Avian nests and nest-building as signals. - Avian Biology Research. 5: 238–251.
- Nevoux M, Gimenez O, Arlt D, Nicoll M, Jones C, Norris K. 2011. Population regulation of territorial species: both site dependence and interference mechanisms matter. - Proc Biol Sci. 278:2173–2181.
- Nicolaus M, Tinbergen JM, Ubels R, Both C, Dingemanse NJ. 2016. Density fluctuations represent a key process maintaining personality variation in a wild passerine bird. - Ecol Lett. 19:478–486.
- Parejo D, Pérez-Contreras T, Navarro C, Soler JJ, Avilés JM. 2008. Spotless starlings rely on public information while visiting conspecific nests: an experiment. - Anim Behav. 75:483–488.
- Peralta-Sánchez JM, Møller AP, Martin-Platero AM, Soler JJ. 2010. Number and colour composition of nest lining feathers predict eggshell bacterial community in barn swallow nests: an experimental study. - Funct Ecol. 24:426–433.
- Penteriani V. 2003. Breeding density affects the honesty of bird vocal displays as possible indicators of male/territory quality. - Ibis. 145:E127–E135.
- Pinxten R, de Ridder E, Eens M. 2003. Female presence affects male behavior and testosterone levels in the European starling (*Sturnus vulgaris*). - Horm Behav. 44:103–109.
- Polo V, Veiga JP. 2006. Nest ornamentation by female spotless starlings in response to a male display: an experimental study. - J Anim Ecol. 75:942–947.
- Polo V, López-Rull I, Gil D, Veiga JP. 2010. Experimental addition of green plants to the nest increases testosterone levels in female spotless starlings. - Ethology. 116:129–137.
- Polo V, Rubalcaba JG, Veiga JP. 2015. Green plants in nests reduce offspring recruitment rates in the spotless starling. - Behav Ecol. 26:1131–1137.
- R Core Team 2016. R: A language and environment for statistical computing. Vienna (Austria): R Foundation for Statistical Computing.
- Robinson MR, Kruuk LE. 2007. Function of weaponry in females: the use of horns in intrasexual competition for resources in female Soay sheep. - Biol Lett. 3:651–654.
- Rodenhouse NL, Sillett TS, Doran PJ, Holmes RT. 2003. Multiple densitydependence mechanisms

- regulate a migratory bird population during the breeding season. - *Proc Biol Sci.* 270:2105–2110.
- Rohwer S. 1977. Status signaling in Harris sparrows: Some experiments in deception. - *Behaviour.* 61:107–129.
- Rosvall KA. 2008. Sexual selection on aggressiveness in females: evidence from an experimental test with tree swallows. - *Anim Behav.* 75:1603–1610.
- Rosvall KA. 2011. Intrasexual competition in females: evidence for sexual selection? - *Behav Ecol.* 22:1131–1140.
- Rubalcaba JG, Fuentes D, Veiga JP, Polo V. 2017. Nest decoration as social signals by males and females: greenery and feathers in starling colonies. - *Behav. Ecol.* 28:1369–1375.
- Rubenstein DR, Lovette IJ. 2009. Reproductive skew and selection on female ornamentation in social species. - *Nature.* 462:786–789.
- Ruiz-Castellano C, Tomás G, Ruiz-Rodríguez M, Martín-Gálvez D, Soler JJ. 2016. Nest Material Shapes Eggs Bacterial Environment. - *PLoS One.* 11:e0148894.
- Scott-Baumann JF, Morgan ER. 2015. A review of the nest protection hypothesis: does inclusion of fresh green plant material in birds' nests reduce parasite infestation? - *Parasitology,* 142:1016–1023.
- Sillett TS, Rodenhouse NL, Holmes RT. 2004. Experimentally reducing neighbour density affects reproduction and behavior of a migratory songbird. - *Ecology.* 85:2467–2477.
- Soler JJ, Cuervo JJ, Møller AP, De lope F. 1998. Nest building is a sexually selected behaviour in the barn swallow. - *Anim Behav.* 56:1435–1442.
- Soler JJ, Ruiz-Castellano C, Figuerola J, Martín-Vivaldi M, Martínez-de la Puente J, Ruiz-Rodríguez M, Tomás G. 2017. Telomere length and dynamics of spotless starling nestlings depend on nest-building materials used by parents. - *Anim Behav.* 126:89–100.
- Stamps JA, Losos JB, Andrews RM. 1997. A comparative study of population density and sexual size dimorphism in lizards. - *Am Nat.* 149:64–90.
- Tarjuelo R, Vergara P, Martínez-Padilla J. 2016. Intra-sexual competition modulates calling behavior and its association with secondary sexual traits. - *Behav Ecol Sociobiol.* 70:1633–1641.
- Tobias JA, Montgomerie R, Lyon BE. 2012. The evolution of female ornaments and weaponry: social selection, sexual selection and ecological competition. - *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 367:2274–2293.
- Tomás G, Merino S, Martínez-de la Puente J, Moreno J, Morales J, Rivero-de Aguilar J. 2013. Nest size and aromatic plants in the nest as sexually selected female traits in blue tits. - *Behav Ecol.* 24:926–934.

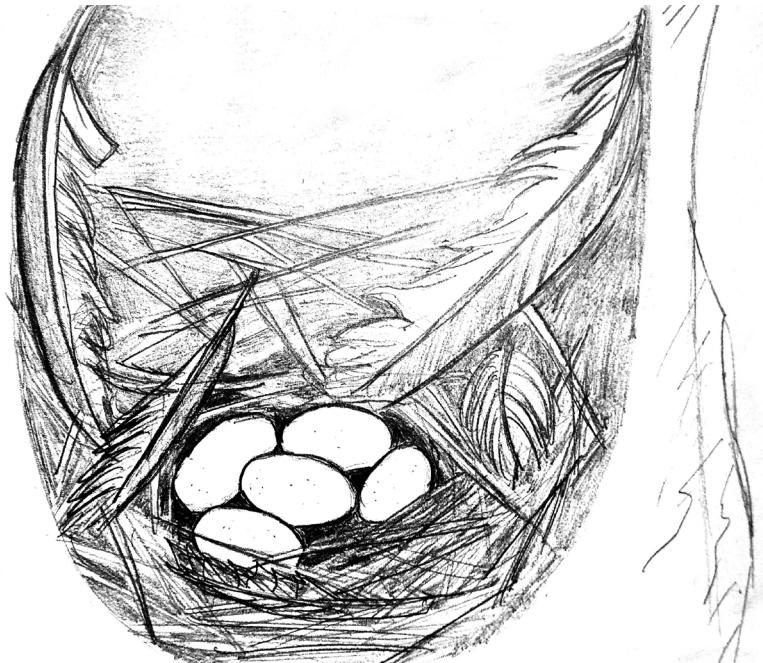
- Veiga JP, Moreno J, Cordero PJ, Mínguez E. 2001. Territory size and polygyny in the spotless starling: resource-holding potential or social inertia? - Can J Zool. 79:1951–1956.
- Veiga JP, Polo V, Arenas M, Sánchez S. 2012. Intruders in nests of the spotless starling: prospecting for public information or for immediate nesting resources? - Ethology. 118:917–924.
- Veiga JP, Polo V. 2005. Feathers at nests are potential female signals in the spotless starling. - Biol Lett. 1:334–337.
- Veiga JP, Polo V, Viñuela J. 2006. Nest Green plants as a male status signal and courtship display in the spotless starling. - Ethology. 112:196–204.
- Veiga JP, Polo V. 2008. Fitness consequences of increased testosterone levels in female spotless starlings. - Am Nat. 172:42–53.
- Veiga JP, Polo V. 2011. Feathers in the spotless starling nests: a sexually selected trait? - Behaviour. 148:1355–1371.
- Veiga JP, Polo V. 2016. Estornino Negro – *Sturnus unicolor* Temminck. En: Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles. In: Salvador A., Morales MB, editors. Madrid: Museo Nacional de Ciencias Naturales. Available from: <http://www.vertebradosibericos.org/>.





## *Capítulo 3 / Chapter 3*

# *Is primary sex ratio related with breeding density? Life-history strategies of the semi-colonial Spotless starling*



---

Daniel Fuentes, Juan G. Rubalcaba, Vicente Polo

*Manuscrito inédito*

## **Abstract**

Density dependence is a general ecological process and one of the most relevant to understand how animal populations are regulated. Life-history theory states that individuals adjust their breeding strategy to maximize fitness benefits while minimizing the cost of reproduction. Yet, the effects of density on breeding strategies are scarcely studied. Here, we present an experimental manipulation of breeding density to investigate whether social environment experienced by mothers influences offspring sex ratio. We studied a wild population of spotless starling (*Sturnus unicolor*), in which, we manipulated the distance between nest boxes to examine the effects of breeding density on offspring sex ratio at hatching. Given the assumptions of Trivers and Willard Hypothesis, we predicted that settlement females in high breeding density produced more daughters than sons. We demonstrated that breeding density influenced the offspring sex ratio of a passerine wild population. Females increased the proportion of sons when they bred apart from other nests, with low density of nest-boxes. In contrast females in high breeding density bias towards daughters as we expected. However, the bias in high density context does not differ from natural sex ratio in the colony, which suggests than one factor may act simultaneously. Our results demonstrated that breeding density can influence the offspring sex ratio of a passerine wild population.

*Key words:* breeding density, sex ratio, sex allocation, Trivers-Willard hypothesis, *Sturnus unicolor*.

## Introduction

Density dependence is a general ecological process and one of the most relevant to understand how animal populations are regulated (Sinclair 1989, Murdoch 1994, Newton 1998, Jetz *et al.* 2012). However, the influence of population density on life-history traits such as the sex-allocation strategy remains poorly understood. Life-history theory states that individuals adjust their breeding strategy to maximize fitness benefits while minimizing the cost of reproduction (Lessells 1991, Fokkema *et al.* 2018). When the relative fitness of sons and daughters is different, parents are therefore expected to adjust offspring sex ratio overproducing the sex that maximizes their own fitness (i.e., Trivers-Willard hypothesis; Trivers and Willard, 1973; Cockburn *et al.* 2002, Komdeur 2012). The impacts of density on fitness can affect males and females in a different way if the intensity of conspecific competition differs between them. Drawing from the Trivers-Willard hypothesis, parents breeding in high density areas are expected to bias offspring sex ratio towards the lower costly sex.

In birds, female is the heterogametic sex (ZW) and sex determination might be under direct control of the conditions experienced by mother. The evidence for biases in offspring sex ratio has shown that it is related to maternal condition (Nager *et al.* 1999), male attractiveness or phenotypic quality (Griffith *et al.* 2003, Polo *et al.* 2004), food availability (Merkling *et al.* 2012), habitat quality (Hjernquist *et al.* 2009) and time of year (Andersson *et al.* 2003). Given that high breeding density increases the intensity of conspecific competition for breeding resources and mates (Sutherland 1996, Newton 1998, Sillett *et al.* 2004) sex ratio could be biased towards the less costly sex. While the relation between mammals and density have been demonstrated in mammals (Kruuk *et al.* 1999, Bryja *et al.* 2005, Servany *et al.* 2007), it has been scarcely investigated in birds (Komdeur *et al.* 2002).

Here, we present an experimental manipulation of breeding density to investigate,

whether social environment experienced by mothers influences offspring sex ratio. We studied with a wild population of spotless starling (*Sturnus unicolor*), where we manipulated the distance between nest boxes to examine the effects of breeding density on offspring sex ratio at hatching. Previous studies in this species showed that female biases sex ratio towards males according to their testosterone levels (Veiga *et al.* 2004) and when mating with attractive males. Furthermore, breeding females is less costly than males (Rubalcaba and Polo 2018) and the high density conditions increase competitive interactions between breeders (Rubalcaba *et al.* 2017). Hence, in the context of Trivers and Willard hypothesis, we expect that settlement females in high breeding density would produce more daughters than sons.

## ***Material and methods***

### ***Species and study area***

The spotless starling is a passerine bird distributed naturally in western Mediterranean (Cramp and Perrins 1994). It is a facultative colonial species that shows territorial behaviour during the breeding season. This species presents a facultative polygynous mating system where males can breed with more than one female and control several nests simultaneously during the breeding period. Females generally lay two clutches each breeding season and the average size of the clutch are five eggs in a range of 3-6 eggs (Cramp and Perrins 1994). This species shows a sexual dimorphism both in fledglings and adults (Veiga *et al.* 2002).

We studied a colony of spotless starling breeding in Manzanares el Real (40° 45' N; 3° 50' W, Madrid province, Central Spain). The colony has been studied continuously from 2001. The habitat is a homogenous pastureland with scattered trees that include narrow-leaved ash (*Fraxinus angustifolia*), holm oak (*Quercus ilex*) and Pyrenean oak (*Quercus pyrenaica*) where starlings settle their natural nest (see Fig.8 *general introduction*). In the study area, the

closest natural distance range between nest cavities is around 10 m and the sex ratio observed in the colony is slightly lower than 50:50 towards female (Veiga and Polo 2016).

### ***Experimental design and data collection***

The breeding-density experiment was established in 2014, distributing 98 nest boxes (see Fig 8 *general introduction*) in two density treatments: high (HD) vs low (LD) treatments. For the HD, we distributed 8 groups of 6 nest-boxes placed, on average 10m ( $\pm$  5m) apart. For the LD, nest-boxes were each nest-box placed on average 58m ( $\pm$  13m) apart from each other. With these density treatments, we aimed to mimic the natural range of breeding densities suitable for starling breeding (Cramp and Perrins 1994).

### ***Sex ratio determination***

From April of 2015 to July of 2018 we revised each nest-box every day until the first egg was laid. A total of 931 individuals were sexed from 1056 eggs (we excluded 125 unhatched or disappeared eggs) from 234 clutches available in the present study (Table 1). Females laid one egg daily until clutch size was completed, followed by 11 days of incubation until hatching. We determined the sex of nestlings at hatching by using PCR amplification of two homologous genes (CHD1-W and CHD1-Z) following Griffiths *et al.* (1998). We collected blood samples from the jugular vein (0.1 ml) of 7-8 days-old-nestlings and tissue samples from nestlings that died before that age. Blood and tissue samples were stored in Eppendorf tubes with absolute ethanol and kept at 4°C until the DNA extraction. Furthermore, we captured the mothers during that period to determine the identity and quantify weight, tarsus length and age.

**Table 1.** Number of clutches recorder per year.

Year	2015	2016	2017	2018
clutches	58	54	51	77

### Statistical analyses

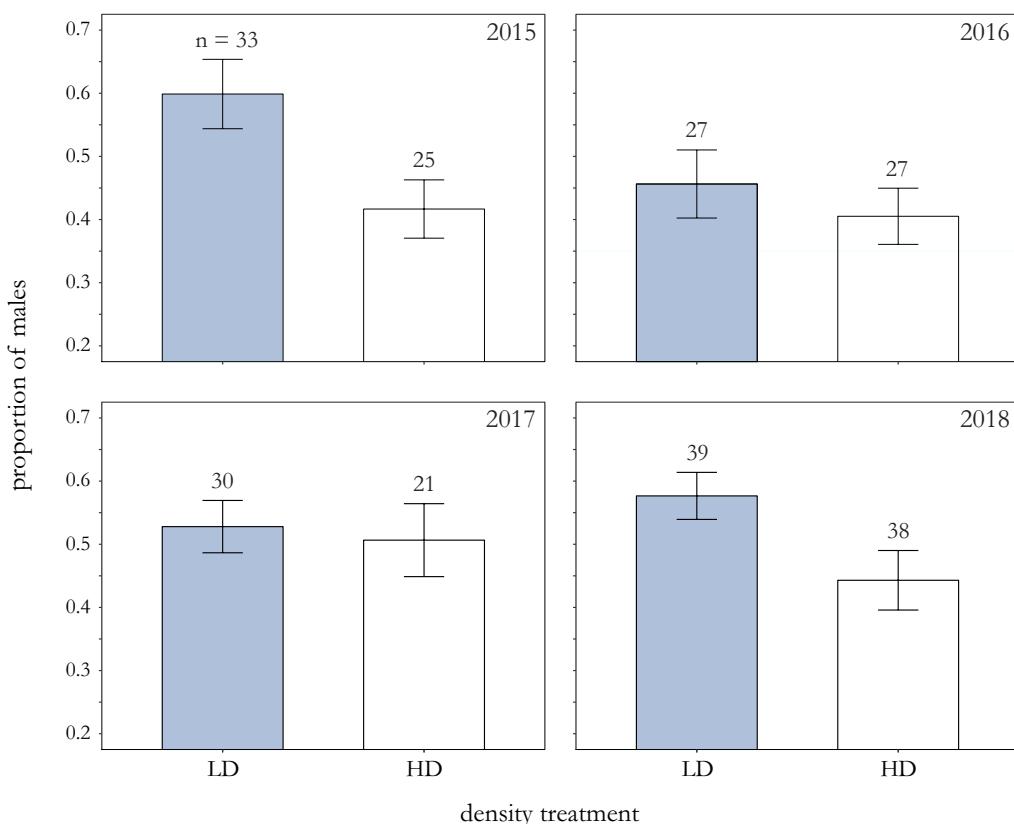
Sex ratio was calculated as the proportion male offspring in each brood. We analysed sex ratio at hatching, weighted by the total number of sexed offspring within each brood, using a generalized linear mixed model (GLMM, Krackow and Tkadlec 2001) with a binomial error distribution. We used treatment (HD *vs* LD), clutch order (first *vs* second) and their interaction as a fixed factor in the model. To assess whether sex ratio varied with maternal condition we included the weight and age of the mother as a covariate. Finally, we included the year to control for climatic effects as random factors. All statistical tests were analysed using the package lme4 (Bates *et al.* 2015) in R 3.3.2 (R Core Team 2016).

## Results

Breeding density significantly influenced the sex ratio of spotless starling nestlings (Table 2). The proportion of male offspring was significantly higher in clutches from the LD treatment than the HD one (Fig. 1; mean  $\pm$  SD:  $0.55 \pm 0.02$  *vs*  $0.43 \pm 0.02$  (LD *vs* HD);  $X^2 = 4.019$ ;  $P = 0.044$ ). There was no difference in sex ratio between first and second clutches (Table 1), although there was a tendency in both LD and HD nest-boxes towards a lower male proportion in the second clutches. The interaction between density treatment and clutch order was no significant (Table 2). The proportion of sons did not significantly differ with

**Table 2.** Summary results of logistic GLMM. The sex ratio at hatching was examined as a function of treatment, clutch order and mother's variables. Year of the study was included as a random variable.

Variables	Estimate $\pm$ SE	$\chi^2$	d.f.	p-value
Intercept	-1.711 $\pm$ 1.476			
Density treatment <sub>low density</sub>	0.213 $\pm$ 0.088	5.752	1	<b>0.016</b>
Clutch order <sub>first clutch</sub>	0.109 $\pm$ 0.089	1.507	1	0.219
Female age	0.009 $\pm$ 0.053	0.031	1	0.858
Female weight	0.018 $\pm$ 0.017	1.167	1	0.279
Density treatment x Clutch order	0.002 $\pm$ 0.088	0.001	1	0.975
Year (R)	0.010			



**Figure 2.** The proportion of males in broods of spotless starling related to density treatment. Bars depict mean  $\pm$  SE. in LD treatment (grey) and HD treatment (white).

variation in maternal weight (mean weight  $\pm$  SD:  $85.77 \pm 0.39$  vs.  $85.68 \pm 0.37$  g (LD vs. HD);  $F_{1,208} = 0.022$ ;  $P = 0.882$ ) or the age of breeding females (mean age  $\pm$  SD:  $2.42 \pm 0.13$  vs.  $2.50 \pm 0.15$  years (LD vs. HD);  $F_{1,220} = 0.145$ ;  $P = 0.703$ ).

## Discussion

In this study, we showed that breeding density can influence the offspring sex ratio of a passerine wild population. Our experiment verified that females responded to the proximity of nest-boxes, consistently with growing evidence that birds are able to modify sex ratio related to social environment (Suorsa *et al.* 2003, Hjernquist *et al.* 2009, Prior *et al.* 2011, Komdeur 2012). However, we found a partial support to the Trivers and Willard hypothesis. That is, while the sex ratio was biased towards males in low density environment, in high

density the sex ratio does not differ from average sex ratio in the colony.

There are two described mechanisms that may induce females to bias sex ratio towards sons in spotless starling (Polo *et al.* 2004, Veiga *et al.* 2004). Firstly, physiological conditions of the mother, such as the amount of circulated testosterone in females that is thought to produce such bias towards males (Veiga *et al.* 2004). This suggests a possible parallelism between hormonal levels and biased sex ratio found in low density environment. Another possibility is that females in good condition or experienced females are able to avoid high density areas, where the cost of reproduction might be higher. Thus, if females settle in a nest apart from others they would expend more energetic resources to bias sex ratio towards the costly sex (males in this species). Although our results showed no effects of maternal condition or age (related to previous breeding experience) on male biased sex ratio, we cannot discard the role of alternatively females' phenotype or physiological conditions not considered here. Secondly, besides maternal conditions, male signalling behaviour might also be behind male biased sex ratios. Specifically, a previous study showed that the carrying of green plants into the nest produced bias sex ratio towards males (Polo *et al.* 2004). High density areas showed a high amount of green plants in the nests (Rubalcaba *et al.* 2017). However, this variation in adult male's behaviour did not occur in low density environment, which would diminish the potential role of these mechanisms undelaying our results.

Also intriguing is the fact that the sex ratio in the high density treatment is close to the one found in natural conditions (unpublished data V. Polo and J. P. Veiga). This is in contrast with the Trivers and Willard predictions, suggesting that there should be mechanisms that outweigh the potential reductions in fitness due to overproduced daughters. There are two plausible mechanisms behind the lack of female biased sex ratios in high density conditions. On the one hand, amount of green plants in the nests is high in dense environments (Rubalcaba *et al.* 2017). As previously mentioned, this can bias sex ratios towards males, and

thus, counterbalance the expected female biased sex ratio. On the other hand, there should be consider not only early stages of breeding to assess sex ratio in natural populations, but also taking into account the development of the chicks or the future offspring survival. For example, the competition between siblings might increase the differences between sibling in worse or better condition (Saino *et al.* 2006, Uller 2006) or, even more, promote selective mortality of less competitive sex. In starlings, male offspring are bigger than their sisters before leaving the nest (Veiga *et al.* 2002), which suggests a possible advantage in competition for feeding resources. Supporting evidences of these hypotheses have been showed in other passerines such as great tits (Nicolaus *et al.* 2012) and eastern bluebirds (Siefferman and Hill 2008). Moreover, in a previous study in the same colony we showed that high density decrease offspring recruitment rate (Fuentes *et al.* 2019). Interestingly, this pattern mainly occurs in female offspring, while the recruitment rate in males is practically the same at different densities. Thus, if male offspring are the sex with higher fitness benefit in facultative polygynous birds in the long term, the final consequence is that the number of males reported in a given density context is similar.

The discrepancy between theoretical predictions and empirical evidences in sex allocation have raised reasonably debate (Hardy 2002, Schindler *et al.* 2015, Navara 2018). One of the main reasons is that, so far, the current knowledge on the topic ignores the actual physiological mechanisms determining sex allocation in birds (see review of potential mechanism of sex allocation in Navara 2018).

In conclusion, our results show that breeding density can modulate sex ratio in a complex way due to several mechanisms that could act at the same time. We are aware of the necessity of testing that sex ratio could adjust in different stages, and assume that measuring only the sex ratio at hatching to assess the consequences in the population dynamics could be too simplistic, because more than one factor may act simultaneously to render a higher

fitness (Hasselquist and Kempenaers 2002, West *et al.* 2005). A question that arises, then, is whether there is a balance between sex ratio produced by mothers in dense populations and which is the final sex ratio individuals recruited from breeding density treatment, despite the apparent costs associated with overproducing sons in early stages. Further experiment might focus on testing these differences and their relationship with bird population dynamics.

## **References**

- Andersson, M., Wallander, J., Oring, L., Akst, E., Reed, J. M. and Fleischer, R. C. 2003. Adaptive seasonal trend in brood sex ratio: Test in two sister species with contrasting breeding systems. - *J. Evol. Biol.* 16: 510–515.
- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B. M. and Walker, S. C. 2015. Fitting linear mixed-effects models using lme4. - *J. Stat. Softw.* 67: 1–48.
- Bowers, E. K., Thompson, C. F. and Sakaluk, S. K. 2017. Maternal Natal Environment and Breeding Territory Predict the Condition and Sex Ratio of Offspring. - *Evol. Biol.* 44: 11–20.
- Brown, C. R. and Brown, M. B. 1986. Ectoparasitism as a Cost of Coloniality in Cliff Swallows (*Hirundo Pyrrhonota*). - *Ecology* 67: 1206–1218.
- Bryja, J., Nesvadbová, J., Heroldová, M., Jánová, E., Losík, J., Trebatická, L. and Tkadlec, E. 2005. Common vole (*Microtus arvalis*) population sex ratio: Biases and process variation. - *Can. J. Zool.* 83: 1391–1399.
- Clutton-Brock, T. H., Major, M. and Guinness, F. E. 1985. Population Regulation in Male and Female Red Deer. - *J. Anim. Ecol.* 54: 831–846.
- Cockburn, A., Legge, S. and Double, M. C. 2002. Sex ratios in birds and mammals : can the hypotheses be disentangled ? - In: Hardy, I. C. W. (ed), *Sex Ratios: Concepts and Research Methods*. Cambridge, pp. 266–286.
- Cramp, S. and Perrins, C. 1994. *Handbook of the birds of Europe, the Middle East and North Africa*. - Oxford University Press.
- De Heij, M. E., Van Den Hout, P. J. and Tinbergen, J. M. 2006. Fitness cost of incubation in great tits (*Parus major*) is related to clutch size. - *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 273: 2353–2361.
- Ellegren, H., Gustafsson, L. and Sheldon, B. C. 1996. Sex ratio adjustment in relation to paternal attractiveness in a wild bird population. - *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93: 11723–11728.
- Fokkema, R. W., Ubels, R., Both, C., de Felici, L. and Tinbergen, J. M. 2018. Reproductive effort and future parental competitive ability: A nest box removal experiment. - *Ecol. Evol.*: 1–15.
- Fuentes, D., Rubalcaba, J. G., Veiga, J. P. and Polo, V. 2019. Long - term fitness consequences of breeding density in starling colonies : an observational approach. - *J. Ornithol.* in press.
- Griffith, S. C., Örnborg, J., Russell, A. F., Andersson, S. and Sheldon, B. C. 2003. Correlations between ultraviolet coloration, overwinter survival and offspring sex ratio in the blue tit. - *J. Evol. Biol.* 16: 1045–1054.
- Griffiths, R., Double, M. C., Orr, K. and Dawson, R. J. G. 1998. A DNA test to sex most birds. - *Mol. Ecol. Ecol.* 7: 1071–1075.
- Hardy, I. 2002. *Sex Ratios Concepts and Research Methods*. Cambridge University Press.

- Hasselquist, D. and Kempenaers, B. 2002. Parental care and adaptive brood sex ratio manipulation in birds. - *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 357: 363–372.
- Hjernquist, M. B., Thuman Hjernquist, K. A., Forsman, J. T. and Gustafsson, L. 2009. Sex allocation in response to local resource competition over breeding territories. - *Behav. Ecol.* 20: 335–339.
- Jetz, W., Thomas, G. H., Joy, J. B., Hartmann, K. and Mooers, A. O. 2012. The global diversity of birds in space and time. - *Nature* 491: 444–448.
- Komdeur, J. 2012. Sex allocation. - In: Royle, N. et al. (eds), *The Evolution of Parental Care*. Oxford University Press, pp. 171–188.
- Komdeur, J., Magrath, M. J. L. and Krackow, S. 2002. Pre-ovulation control of hatchling sex ratio in the Seychelles warbler. - *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 269: 1067–1072.
- Krackow, R. S. and Tkadlec, E. 2001. Analysis of brood sex ratios : implications of offspring clustering. - *Behav Ecol Sociobiol*: 293–301.
- Kruuk, L. E. B., Clutton-Brock, T. H., Albon, S. D., Pemberton, J. M. and Guinness, F. E. 1999. Population density affects sex ratio variation in red deer. - *Nature* 399: 459–461.
- Lessells, C. M. 1991. The evolution of life histories. In J. R. Krebs & N. B. Davies (Eds.),: 32–68.
- Merkling, T., Leclaire, S., Danchin, E., Lhuillier, E., Wagner, R. H., White, J., Hatch, S. A. and Blanchard, P. 2012. Food availability and offspring sex in a monogamous seabird: Insights from an experimental approach. - *Behav. Ecol.* 23: 751–758.
- Murdoch, W. W. 1994. Population regulation in theory and practice. - *Ecology* 75: 271–287.
- Nager, R. G., Monaghan, P., Griffiths, R., Houston, D. C. and Dawson, R. 1999. Experimental demonstration that offspring sex ratio varies with maternal condition. - *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 570–573.
- Navara, K. J. 2018. Choosing Sexes. Mechanisms and Adaptive Patterns of Sex Allocation in Vertebrates. - Springer.
- Newton, I. 1998. Population limitation in birds. - Elsevier.
- Nicolaus, M., Michler, S. P. M., Ubels, R., van der Velde, M., Bouwman, K. M., Both, C. and Tinbergen, J. M. 2012. Local sex ratio affects the cost of reproduction. - *J. Anim. Ecol.* 81: 564–572.
- Péron, G., Lebreton, J. D. and Crochet, P. A. 2010. Costs and benefits of colony size vary during the breeding cycle in Black-headed Gulls *Chroicocephalus ridibundus*. - *J. Ornithol.* 151: 881–888.
- Polo, V., Veiga, J. P., Cordero, P. J., Vinuela, J. and Monaghan, P. 2004. Female starlings adjust primary sex ratio in response to aromatic plants in the nest. - *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 271: 1929–1933.
- Prior, G. L., Evans, D. M., Redpath, S., Thirgood, S. J. and Monaghan, P. 2011. Birds bias offspring sex ratio in response to livestock grazing. - *Biol. Lett.* 7: 958–960.

- R Core Team 2016. R: A Language and Environment for Statistical Computing (RF for S Computing, Ed.). - R Fondation for Statistical Computing.
- Rubalcaba, J. G., Fuentes, D., Veiga, J. P. and Polo, V. 2017. Nest decoration as social signals by males and females: Greenery and feathers in starling colonies. - *Behav. Ecol.* 28: 1369–1375.
- Schindler, S., Gaillard, J. M., Grüning, A., Neuhaus, P., Traill, L. W., Tuljapurkar, S. and Coulson, T. 2015. Sex-specific demography and generalization of the Trivers-Willard theory. - *Nature* 526: 249–252.
- Servanty, S., Gaillard, J. M., Allainé, D., Brandt, S. and Baubet, E. 2007. Litter size and fetal sex ratio adjustment in a highly polytocous species: The wild boar. - *Behav. Ecol.* 18: 427–432.
- Siefferman, L. and Hill, G. E. 2008. Sex-specific costs of reproduction in Eastern Bluebirds *Sialia sialis*. - *Ibis*. 150: 32–39.
- Sillett, T. S., Rodenhouse, N. L. and Holmes, R. T. 2004. Experimentally Reducing Neighbor Density Affects Reproduction and Behavior of a Migratory Songbird. - *Ecology* 85: 2467–2477.
- Sinclair, A. R. E. 1989. Population regulation in animals. - In: Cherret, J. M. (ed), *Ecological Concepts. The contribution of Ecology to an Understanding of the Natural World*. Blackwell Science, pp. 197–241.
- Suorsa, P., Helle, H., Huhta, E., Jäntti, A., Nikula, A. and Hakkarainen, H. 2003. Forest fragmentation is associated with primary brood sex ratio in the treecreeper (*Certhia familiaris*). - *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 270: 2215–2222.
- Sutherland, W. J. 1996. From individual behaviour to population ecology. - Oxford University Press.
- Veiga, J. P. and Polo, V. 2016. Estornino negro – *Sturnus unicolor* Temminck. - In: Salvador, A. and Morales, M. B. (eds), *Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles*. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Available from: <http://www.vertebradosibericos.org/>.
- Veiga, J. P., Moreno, J., Arenas, M. and Sanchez, S. 2002. Reproductive consequences for males of paternal vs territorial strategies in the polygynous Spotless starling under variable ecological and social conditions. - *Behaviour* 139: 677–693.
- Veiga, J. P., Viñuela, J., Cordero, P. J., Aparicio, J. M. and Polo, V. 2004. Experimentally increased testosterone affects social rank and primary sex ratio in the spotless starling. - *Horm. Behav.* 46: 47–53.
- West, S. A., Shuker, D. M. and Sheldon, B. C. 2005. Sex-Ratio Adjustment When Relatives Interact : A Test of Constraints on Adaptation. - *Evolution*. 59: 1211–1228.



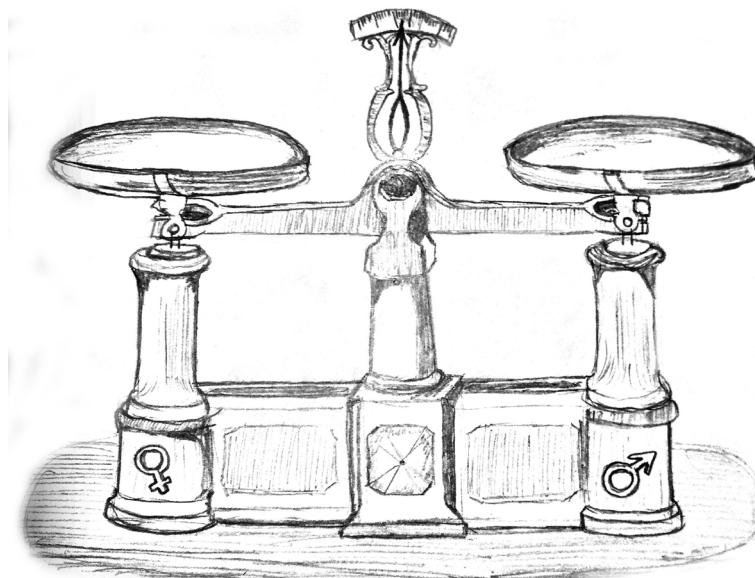




## *Capítulo 4 / Chapter 4*

*Early mechanisms of density dependence  
differ between sexes in a colonial bird:  
a cross-fostering experiment*

---



---

Daniel Fuentes, Juan G. Rubalcaba, Winnie Boner, Pat Monaghan, Vicente Polo

*Manuscrito inédito*

## Abstract

Density dependence of survival and breeding success is a fundamental driver of population dynamics. Environmental and social conditions experienced by breeders are important mediators of offspring phenotype via maternal effects. This transgenerational influence of the parental environment can have different consequences for offspring. Here we investigate the early consequences of breeding density for female and male offspring development, survival and telomere length in a wild colony of spotless starlings (*Sturnus unicolor*). Understanding whether this early influence of breeding density on offspring condition takes place either via maternal effects (environment experienced by parents), rearing conditions (early development of offspring) or both, requires an experimental approach capable of segregating the relative influence of the parental and the rearing environment. To do this, we manipulated breeding density creating two density treatments, high density (HD) and low density (LD) and performed a partial cross fostering experiment to separate natal and rearing conditions. Our results showed that breeding density experienced by parents influenced offspring phenotype and survival in a sex-specific way. HD conditions had a negative effect on body mass of female nestlings. However, the experimental decoupling (via cross-fostering) of the natal and rearing conditions had a positive effect, increasing body mass of female nestlings from HD nests when they were raised in LD nests. However, breeding density did not have a significant effect on body mass of male nestlings. Furthermore, we found a negative effect of density on nestling's survival and lower telomere length in HD conditions than those raised in LD condition. Our study presents experimental evidence for early effects of breeding density on body condition, survival and telomere length of nestlings. These results suggest that birds adjust their investment according to the experienced social environment and this suggests a differential allocation of resources in nestling related to sex.

**Keywords:** breeding density, maternal effects, environmental effects, sex allocation, sibling competition, telomere length, spotless starling, *Sturnus unicolor*



## Introduction

Density dependence of survival and breeding success is one of the cornerstones of population dynamics and a fundamental driver of life history evolution (Lack 1966, Sinclair 1989, Newton 1998, Sibly *et al.* 2005, Jetz *et al.* 2012). However, the scarce information coming from experimental studies in wild populations has limited the understanding of a general pattern on density dependence (e.g., Jetz *et al.* 2012). Conspecific aggregation increases competition for food and breeding resources (Sibly *et al.* 2005, Kokko and Rankin 2006). Moreover, in species with parental care, competition influences offspring condition, development and ultimately survival and recruitment (Newton 1998, Matthysen 2005). Therefore, the early consequences of conspecific competition for young development and survival may be important determining density-dependent patterns in populations (Clutton-Brock *et al.* 1987, Fuentes *et al.* 2019). So far, the early consequences of breeding density for offspring development, body condition and survival remain vastly unexplored and experimental studies in wild populations are lacking.

Environmental and social conditions experienced by breeders are important mediators of offspring phenotype and body condition (Lindström 1999, Sheldon 2000, Monaghan 2008). This transgenerational influence of the parental environment, via maternal effects (Mousseau and Fox 1998) can have different consequences for offspring. For example, individuals breeding in favourable conditions can produce offspring with high-quality phenotypes that further provide an advantage in harsh conditions ('silver spoon' effect, Grafen 1988). By contrast, the match-mismatch hypothesis (Cushing 1990) states that the environmental conditions experienced by mothers prepare offspring to cope with similar environmental challenges (Metcalfe and Monaghan 2001, Marshall and Uller 2007, Burgess and Marshall 2014). Therefore, social conditions and conspecific competition experienced by breeders can influence the phenotype of their offspring and prepare them to cope with

increased levels of breeding density in the future (see, e.g., Gil *et al.* 2007, Bentz *et al.* 2016).

Another important consideration to understand density dependence in populations is the differential resource allocation in relation to offspring sex, where maternal effects and resources are differentially allocated to sons or daughters (Uller 2006). This differential allocation can occur when there are different costs and benefits of rearing females and males offspring (Trivers and Willard 1973, Santoro *et al.* 2015). In turn, sibling competition is a component that can influence early development of offspring (Charmantier and Perret 2004). Accruing evidences have shown that conditions experienced by mothers can determine the amount of resources in eggs and chicks (Tscherren *et al.* 2007, Giordano *et al.* 2014, Groothuis *et al.* 2019), and sex-related abilities can be more or less pronounced under given environmental conditions (Chin *et al.* 2005, Vedder *et al.* 2005, Rowland *et al.* 2007).

In the last decade, telomere length and telomere dynamics have emerged as a key indicators of early stress, individual health and prospected development (Monaghan and Haussmann 2006, Young 2018). Although telomere length has a significant heritable component (Asghar *et al.* 2015), they are shortened in each cell division and one of the most active cell replication stages occurs during early development of individuals. The rate at which telomeres are shortened and their final length depend on the level of stress experienced by individuals during early development (Monaghan 2010, Noguera *et al.* 2012, Nettle *et al.* 2015). For instance, recent studies have reported correlations between telomere length and different rearing environments (Angelier *et al.* 2013, Meillère *et al.* 2015, Salmón *et al.* 2016), showing that differential allocation of food rewards and increased brood size reduce telomere length and accelerate attrition rates (Bateson *et al.* 2015, Nettle *et al.* 2016). Thus, the quantification of telomere length can allow predicting stressful conditions in early life that play a fundamental role in phenotypic development (Monaghan 2008). Therefore, we hypothesize that increasing conspecific competition induced by breeding density could

influence early development and offspring fitness by reducing their telomere length. To the best of our knowledge, the influence of breeding density on offspring telomere length has not yet been investigated in wild animal populations.

Here we investigate the early consequences of breeding density for offspring development, survival and telomere length in a wild colony of spotless starlings (*Sturnus unicolor*). A previous 13-years observational study in the same colony revealed long-term consequences of density for offspring recruitment rates (Fuentes *et al.* 2019), suggesting that social conditions experienced by parents determine offspring survival later in life. Understanding whether this early influence of breeding density on offspring condition takes place either via maternal effects (environment experienced by parents), rearing conditions (early development of offspring) or both, requires an experimental approach capable of segregating the relative influence of the parental and the rearing environment. Here, we perform a cross fostering experiment to investigate whether breeding density experienced by parents influence offspring body size and telomere length. Ultimately, we investigate the early effects of density on offspring development and condition and whether they provide a proximate mechanism for density-dependent processes in bird populations.

## **Material and methods**

### **Study area and species**

This study was conducted in a breeding colony of spotless starlings from 2014 to 2018 breeding seasons in Manzanares el Real (40°45'N; 3°50'W, Madrid province, central Spain). The dominant habitat is pastureland with scattered trees such as holm oaks, *Quercus ilex*, narrow-leaved ash, *Fraxinus angustifolia* and Pyrenean oaks, *Quercus pyrenaica*. Furthermore, the study area is combined with extensive livestock management which ensures food availability during the breeding season (i.e. rotation of swamped areas to keep fresh pastures that favour

optimal areas to find food for starlings, personal observation.).

The spotless starling is a facultatively colonial and polygynous passerine distributed naturally in the western Mediterranean (Cramp and Perrins 1994). They breed in a wide range of natural and anthropic habitats whereby the distance between nests vary between 70m, in open woodland areas, and 2-10m, in roofs and buildings of anthropogenic areas, linked to the availability of breeding cavities (Polo and Veiga 2011). In the study area, the closest natural distance range between nest cavities was approximately 10m (Polo and Veiga 2011). Spotless starling males are facultative polygynous and females generally lay two clutches per breeding season, the first starting mid to late April and the second at the end of May and the average size of clutches are near to 5 eggs within a range of 3 to 6 eggs (Cramp and Perrins 1994).

### ***Experimental design and data collection***

We manipulated breeding density creating two density treatments, high density (HD) and low density (LD). In the HD treatment, 48 nest-boxes were distributed in 8 groups of 6 boxes. The nest-boxes in each HD group were separated 10m ( $\pm$  5m), which corresponds to the maximum density levels observed in natural conditions. In the LD treatment, 50 nest-boxes were placed at a minimum distance of 58m ( $\pm$  13m) apart (see details of nest-boxes configuration in Fig.8 *general introduction*). The position of all nest-boxes was maintained over the 5 years of the experiment.

We revised the nest-boxes when males started to acquire their breeding territories, during the beginning of the breeding season. Then, we revised each nest-box every day while females were building their nests to know the day on which the first egg was laid. Females lay one egg each day until the clutch is completed and later incubate them for 11 days until hatching. When chicks hatched, we performed a partial cross-fostering experiment by switching 2 randomly-selected nestlings from a HD nest with another 2 same-aged nestling

from the LD treatment. In the case of broods with less than 3 nestlings, we only cross-fostered 1 individual between nest-boxes. The maximum age that we considered for the partial cross-fostering experiment was 2 days after hatching. During the transportation of nestlings between nest-boxes, we kept them warm in a textile bag to minimize conditional stress. After manipulation, nestlings were individually identified by removing the down from the wings and flanks or by painting the back feathers with a green colour. Mothers of each nest were captured with a trap placed into the nest-box when they were feeding their nestlings. When nestlings were approximately 7-8 days old, we marked them with individually-numbered rings and collected a blood sample from the jugular vein (0.2 ml) to determine their sex (Griffiths *et al.* 1998). Blood samples were centrifuged in the nearest two hours after sample collection to separate the serum and cell components. Cell components were stored in Eppendorf tubes with absolute ethanol and maintained at 4°C until the DNA extraction and serum components were maintained at -23° for other analyses. We registered nestling mortality and variations in secondary sex ratio between the age of 8 days and until fledgling (sex-specific mortality could not be assessed before sex determination at 8 days old). Before fledglings leave the nest, we measured the body mass and tarsus length of each individual on day 16. At this time body size of starlings offspring varies little between day 16 and until their leave the nest (author's unpublished data, but see also Ricklefs and Peters 1979, Rowland *et al.* 2007 for the relative common starling). The procedure outlined above was carried out both during first and second clutches every breeding season. A total of 1,282 (survive 1256, sexed 1282, total in database 1451) individuals were measured from 494 broods cross-fostered.

In addition, we used a subset of our data to explore the possible effect of cross-fostering manipulation in nestling condition and survival not only between HD *vs.* LD treatments, but also within treatments of same density (nestling status: non-foster or foster nestlings). We performed a partial cross-fostering within treatments in 28 nest-boxes between 2014-

2016: 14 broods crossed from LD to LD nest-box, and 14 from HD to HD nest-boxes. There were no significant differences in nestling condition and survival between foster and non-foster nestlings ( $F_{1,11.68} = 2.725, P = 0.125$  and  $X^2 = 3.109, P = 0.077$  respectively; see Supplementary material, Tables S1 and S2).

### ***Relative telomere length measurement***

Telomeres are short repetitive sequences of DNA at the end of eukaryote chromosomes (TTAGGG in all vertebrates), which protect genetic material during cell division (Blackburn 1991). In 2018 breeding season, we extracted blood samples from nestlings and were stored in a heparinised Eppendorf tube. The red blood cells were conserved with absolute ethanol and maintained refrigerated at 4°C until DNA extraction (4 months later). We used the DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) to extract genomic DNA (gDNA) from the red blood cells following the manufacturer's protocol. gDNA quantification was performed using Nanodrop 1000 spectrophotometer (ThermoScientific) and it was frozen -80°C until telomere length measurement (TL). An important consideration is that telomere tandem repeats of DNA sequence (base pairs) is not unique of ending chromosomes. In fact, there are interstitial part of genome with the same sequence and it depends on each species even each individual (Foote *et al.* 2013). Thus, quantifying interstitial areas in chromosomes/gDNA should be accounted to apply appropriate telomere estimate method (Nussey *et al.* 2014). There are several methods to analyse TL, however only Telomere Restriction Fragment Assay (TRF) provides reliable quantification of TLs and interstitial fragments in kb units (and Haussmann and Mauck 2008, see details in Kimura *et al.* 2010 for full methodological steps). In our case, we used a pooled set of data with TRF assay (a total of two assays with 25 samples each) for assessing whether the use of other methods could bias result of TL. We followed the steps described in Nussey *et al.* 2014 to compare results between denatured blots and non-denaturing gDNA in gel-hybridization TRF techniques

to calculate interstitial fragments and TL respectively (see Haussmann and Mauck 2008 for details). Software *ImageJ* was used to compare between denatured and non-denatured TRF gel hybridization method (National Institute for Health, Bethesda, MA, USA). We found a highly significant correlation (*Pearson correlation*;  $r = 0.62$ ,  $n = 50$ ,  $P = 0.003$ ). Based on TRF results, we can ensure that use other method did not overestimate or bias TL measurement (Foote *et al.* 2013) and, moreover it reduced large amount of resources that TRF assay consumes as time, expert requirement and financial cost.

TL was measured using quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) assay adapted for birds (Criscuolo *et al.* 2009). This method provides a relative measure of TL that carries out a comparison between individuals (Nussey *et al.* 2014). TL was measured as the ratio (T/S) between the telomere repeat copy number (T) to control, single gene copies number (S), relative to a reference sample (Cawthon 2002). We used the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as a single control gen. The specific primers at concentrations optimized of 200nM/200nM were used to amplify the Telomere and GAPDH sequences respectively. The qPCR for both telomere and GAPDH was performed using 5ng of DNA and the final volume was 25 $\mu$ l containing 12.5 $\mu$ l of Brilliant SYBER Green master-mix (Invitrogen, CA, USA). Telomere conditions were 15 min at 95° followed by 27 cycles of 15 s at 95°, 30 s at 58° and 30 s at 72°, and final cycle of 60 s at T 95°, 30 s at 58 and 30 s at 95. For the GAPDH were 15 min at 95° followed by 40 cycles of 30 s at 95° and 30 s at 60°, and final cycle of 60 s at 95°, 30 s at 55° and 30 s at 95° to achieve enough signal. Samples for telomeres and GAPDH were performed in separate plates and there were clustered for pair nest-boxes crossed. All samples were run in triplicate and each plate (Telomere and GAPDH) included a serial dilution (20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 ng) of a reference DNA (mixed DNA of 25 random samples of nestling were used as a reference DNA) to produce a standard curve and a blank control with no DNA. Amplification efficiencies of the

reference curve for telomeres and GAPDH were within the recommended range (Mean  $\pm$  SD, telomeres:  $89.8 \pm 1.23$ , GAPDH:  $90.51 \pm 0.94$ , see (Bustin *et al.* 2009). To adjust for the differences in amplification efficiencies between telomere and GAPDH we applied the proposing formula in (Pfaffl 2001) to calculate T/S ratio:  $((1 + \text{Telomere efficiency})^{\Delta Ct_{\text{telomere}}(\text{control} - \text{sample})} / (1 + \text{GAPDH efficiency})^{\Delta Ct_{\text{GAPDH}}(\text{control} - \text{sample})})$ ; where  $\Delta Ct$  Telomere is the crossing point deviation of control – sample of target gene transcript and whereas  $\Delta Ct$  GAPDH is crossing point deviation of control – sample of reference gene. Furthermore, we analysed T/S ratio using deldelCt (Criscuolo *et al.* 2009) and the results were consistent ( $r^2 = 0.99$ ). The mean inter-plate coefficient variation of Ct was 8 % for the telomere amplifications and 3 % for the GAPDH amplifications calculated on a ‘golden sample’ repeated in all plates. The mean intra-plate coefficient variation of C<sub>t</sub> was 4 % and 3 % respectively. In total, we measured 290 samples of starling nestlings. These included individuals from 86 nest-boxes cross-fostered. We ran 32 plates (16 plates for each primer set) to obtain telomere length (T/S ratio).

### **Statistical analysis**

We analysed the effect of the experimental manipulation of rearing conditions using mixed-effect models including natal (pre HD or pre LD) and rearing (post HD or post LD) density treatments and their interactions as fixed factors. We used the identity of the natal and the foster nests as random factors to account for non-independence of siblings. Besides, the year of the experiment was included as a random factor. We also included laying date (a Julian day from first of April each year) and total number of nestlings in the rearing brood as covariates to control availability of food resources during season and sibling competition respectively.

We used the structure of fixed and random factors described above to analyse the effects of the cross-fostering experiment on body mass and telomere length using linear mixed

models (LMM) fitted with restricted maximum likelihood. The response variable body mass in models were *Box-Cox* transformed and telomere length (T/S ratio) was log transformed for statistical analysis to normalize the residuals of the models. Both sets of data were tested for normality with Shapiro-Wilk test. Additionally, we tested whether these effects differ between sons and daughters doing separate analysis for each sex. When the interaction terms were non-significant, they were removed and the final model was recalculated to avoid the risk of model overparametrization (Engqvist 2005). Post-hoc contrasts were performed to test the significance of treatment interactions with sex (by Tukey's test). In the case of the telomere-length model, we included extra factors in the model based on previous studies with birds, which have proved that telomere length is related age at sample collection, body condition of nestlings (body mass) and maternal age (Asghar *et al.* 2015). Besides, we included the plate number as a random factor to account for pipetting and other experimental variation performing qPCR assay (Brown *et al.* 2012).

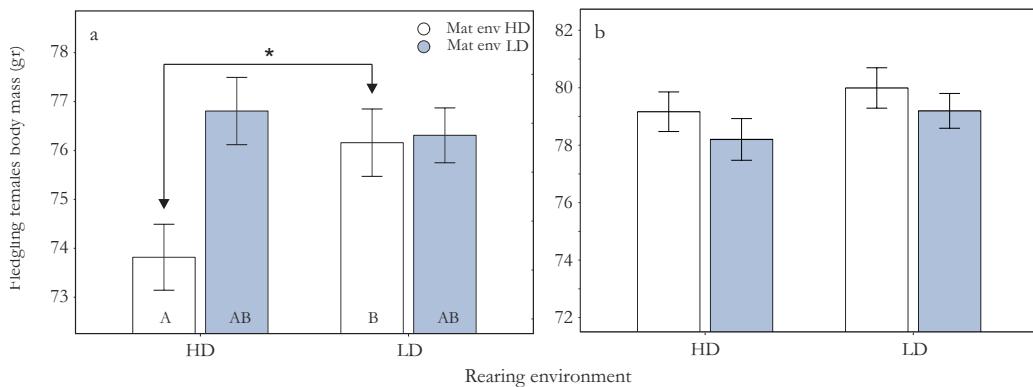
Finally, for each breeding attempt, we analysed fledgling survival (number of chicks measure at 16 day per hatchings eggs) with generalized linear mixed model (GLMM) assuming binomial distribution and logit link function. The same structure of fixed, covariates and random factors was included except sex and their interactions with density treatments because of we unknown the sex of died nestling before blood sample.

All statistical models were conducted in R 3.3.2 (R Core Team 2017) with the package lme4 (Bates *et al.* 2015).

## **Results**

### **Body mass in density treatment**

Because natal density influenced body mass of 16-days-old-fledglings in a sex-specific way, as shown by the significant interaction ( $F_{1,1106.93} = 4.903, P = 0.027$ , Table 1), we performed



**Figure 1.** Effects of the maternal and rearing environment density treatment on nestling body mass. (a)  $\text{Mean} \pm \text{S.E.}$  at 16 days of LD and HD female nestlings. (b)  $\text{Mean} \pm \text{S.E.}$  at 16 days of LD and HD female nestlings. \*The different letters in the bars show significant differences in post-hoc tests.

**Table 1.** Summary results of the linear mixed-effect model analysing the effect of density treatment on the body mass of fledglings before leaving the nest (average 16 days of live). For final model, model estimates for fixed effects and variance for random effects are shown, test statistic is  $F$  for fixed effects,  $X^2$  for random effects.  $SE$  = standard error,  $d.f.$  = degrees of freedom,  $R_m^2$  = marginal R-squared,  $R_c^2$  = conditional R-squared. Statistical significance at 0.05 or below is indicated in bold.

Variables	Estimate $\pm$ SE (*) / variance	$F / X^2$	d.f.	p-value
Final model ( $R_m^2 = 0.19$ ; $R_c^2 = 0.43$ )				
Intercept	57.396 $\pm$ 2.425*			
Natal density low density	0.431 $\pm$ 0.456*	0.889	1, 69.78	0.348
Rearing density low density	0.781 $\pm$ 0.610*	1.641	1, 79.33	0.203
Sex females	-2.863 $\pm$ 0.303*	88.771	1, 1100.89	<0.001
Hatching date	-0.239 $\pm$ 0.016	219.288	1, 1109.10	<0.001
Rearing brood size	-1.035 $\pm$ 0.418*	6.120	1, 1169.97	0.013
Natal density x Sex	0.673 $\pm$ 0.304*	4.903	1, 1106.93	0.027
<i>Random factors</i>				
natal nest	$1.115 \times 10^6$	22.455	1	<0.001
rearing nest	$2.517 \times 10^6$	66.986	1	<0.001
year	$5.992 \times 10^5$	39.340	1	<0.001
residual	$9.794 \times 10^6$			
<i>Dropped variables</i>				
Natal density x Rearing density		2.265	1, 1060.28	0.132
Rearing density x Sex		0.440	1, 1105.35	0.507

\*  $\times 10^5$

**Table 2.** Summary results of the linear mixed-effect model analysing the effect of density treatment on the body mass of *female fledglings* before leaving the nest (average 16 days of live). Statistical significance at 0.05 or below is indicated in bold.

Variables	Estimate $\pm$ SE (*) / variance	F / $X^2$	d.f.	p-value
Final model ( $R_m^2 = 0.16$ ; $R_c^2 = 0.41$ )				
Intercept	73.659 $\pm$ 4.122*			
Natal density low density	1.614 $\pm$ 0.762*	4.448	1, 65.87	<b>0.038</b>
Rearing density low density	0.824 $\pm$ 0.909*	0.816	1, 72.57	0.369
Natal density x Sex	- 0.309 $\pm$ 0.030*	102.609	1, 530.25	<b>&lt;0.001</b>
Hatching date	-1.214 $\pm$ 0.798*	2.502	1, 576.42	0.114
Rearing brood size	-1.723 $\pm$ 0.566*	9.207	1, 507.45	<b>0.002</b>
<i>Random factors</i>				
natal nest	2.328 $\times 10^{11}$	12.056	1	<b>&lt;0.001</b>
rearing nest	4.329 $\times 10^{11}$	24.490	1	<b>&lt;0.001</b>
year	6.638 $\times 10^{10}$	6.976	1	<b>0.008</b>
residual	1.657 $\times 10^{12}$			

\*  $\times 10^5$ **Table 3.** Summary results of the linear mixed-effect model analysing the effect of density treatment on the body mass of *male fledglings* before leaving the nest (average 16 days of live). Statistical significance at 0.05 or below is indicated in bold.

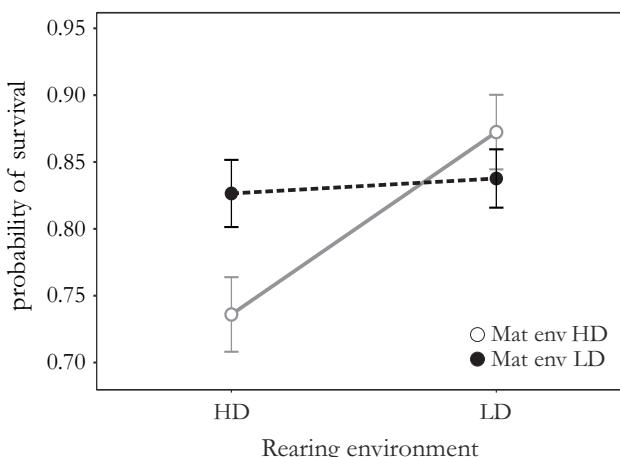
Variables	Estimate $\pm$ SE (*) / variance	F / $X^2$	d.f.	p-value
Final model ( $R_m^2 = 0.15$ ; $R_c^2 = 0.39$ )				
Intercept	$1.882 \times 10^2 \pm 10.510^*$			
Natal density low density	-0.573 $\pm$ 1.776*	0.103	1, 63.28	0.748
Rearing density low density	2.793 $\pm$ 2.142*	1.690	1, 74.29	0.197
Hatching date	- 0.817 $\pm$ 0.075*	114.805	1, 562.84	<b>&lt;0.001</b>
Rearing brood size	-4.919 $\pm$ 1.914*	6.497	1, 580.24	<b>0.011</b>
<i>Random factors</i>				
natal nest	1.077 $\times 10^{12}$	6.202	1	<b>0.012</b>
rearing nest	2.285 $\times 10^{12}$	21.418	1	<b>&lt;0.001</b>
year	8.052 $\times 10^{11}$	23.532	1	<b>&lt;0.001</b>
residual	1.024 $\times 10^{13}$			
<i>Dropped variables</i>				
Natal density x Rearing density		0.469	1, 533.33	0.493

\*  $\times 10^5$

separate analyses for each sex. In females, there was a significant interaction between natal and rearing density ( $F_{1,507.4} = 9.207, P = 0.002$ , Table 2), suggesting that body mass differed between foster and non-foster sisters. Specifically, the post-hoc contrasts indicate that HD females reared in LD nests were heavier than their sisters reared in their natal HD nests (post-hoc contrast HD natal/LD rearing (foster) *vs.* HD natal/HD rearing (non-foster): p-value:  $P = < 0.01$ , Fig. 1). By contrast, body mass of LD females reared in HD nest was not significant different from that of their sisters reared in their natal LD nest (p-value:  $P > 0.05$ , see Fig 1 a). Body mass of foster males did not significantly differ from that of their non-foster brothers, and the only significant factor affecting body mass of males was brood size ( $F_{1,580.2} = 6.497, P = 0.011$ , Table 3 and Fig 1 b). The remaining factors or interactions in female nestlings model (rearing density and rearing brood size) and male nestlings model (natal density, rearing density and interaction between treatments) did not reveal significant effects (see Table 2 and 3).

### ***Fledglings survival in density treatments***

There was a significant interaction between the natal and rearing environments on fledgling survival ( $X^2 = 11.689, P = <0.001$ ). We found that non-foster fledglings from HD nest-



**Figure 2.** Effects of the maternal and rearing environment (HD: high density, LD: low density treatment) on survival (until day 16). White circles: HD maternal environment; black circles: LD maternal environment.

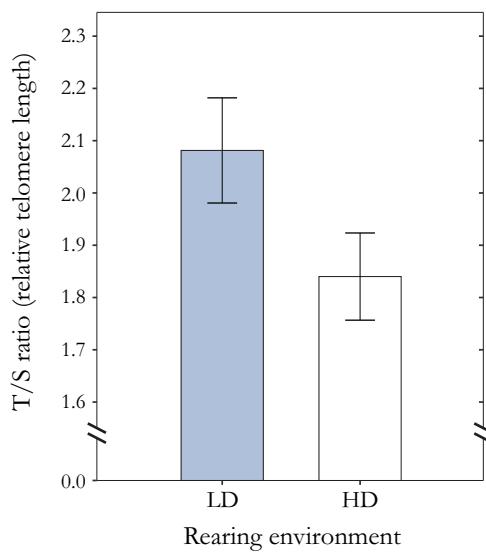
Variables	Estimate ± SE	$X^2$	d.f.	p-value
Final model ( $R_m^2 = 0.06$ ; $R_c^2 = 0.19$ )				
Intercept	2.582 ± 0.485			
Natal density low density	0.085 ± 0.073	1.343	1	0.246
Rearing density low density	0.215 ± 0.107	4.005	1	<b>0.045</b>
Hatching date	-0.018 ± 0.003	24.723	1	<0.001
Rearing brood size	0.043 ± 0.091	0.221	1	0.637
Natal density x Rearing density	-0.254 ± 0.074	11.689	1	<0.001

**Table 4.** Summary results of the generalized mixed-effect model (binomial distribution) analysing the effect of density treatment on the survival of nestlings. Statistical significance at 0.05 or below is indicated in bold.

boxes had ca. 15% lower survival probability than HD fledglings reared in LD nest-boxes (see Fig 2). Furthermore, offspring survival was significantly influenced by rearing density ( $X^2_1 = 4.005, P = 0.045$ ). In addition, as expected, the probability of nestling survival in nests decreased as season progressed ( $X^2_1 = 24.723, P = <0.001$ ). The rest of the factors (natal density and rearing brood size) did not show significant effects (Table 4).

#### ***Relationship between density treatments and telomere length (TL)***

We found a significant, negative effect of rearing density on T/S ratio, TL, of nestlings ( $F_{1,31.79} = 10.562, P = 0.002$ , Fig 3). Overall, TL differed by 11.6% between LD and HD treatments in the rearing environment, irrespectively of nestlings' origin. However, nestlings from HD nests reared in LD nests had longer T/S ratio than non-foster nestlings from HD nest (Fig 3), although T/S ratio was no significantly influenced by natal density ( $F_{1,53.20} = 2.020, P = 0.161$ ). We did not find an effect of sex or hatching date on telomere length (respectively,  $F_{1,214.13} = 0.502, P = 0.479$  and  $F_{1,89.94} = 0.002, P = 0.964$ ). Nestling age, body condition (body mass), maternal age and any interaction effect were not significant in this model (Table 5). However, the random effect revealed that natal nest explained a three times higher proportion of variance than rearing nest (variance in natal nest = 14% vs. random variance in foster nest = 4.9%, Table 5).



**Figure 3.** Relative telomere length over the experimental manipulation of rearing density. Mean T/S at 8 days. Error bars represent  $\pm 1$  S.E.

**Table 5.** Summary results of the linear mixed-effect model analysing the effect of density treatment on the telomere length measured from blood samples on nestlings. Statistical significance at 0.05 or below is indicated in bold.

Variables	Estimate $\pm$ SE (*)/variance	F / $X^2$	d.f.	p-value
<i>Final model (R<sub>m</sub><sup>2</sup> = 0.01 ; R<sub>c</sub><sup>2</sup> = 0.86 )</i>				
Intercept	0.659 $\pm$ 0.423			
Natal density <sub>low density</sub>	0.033 $\pm$ 0.023	2.020	1, 53.20	0.161
Rearing density <sub>low density</sub>	0.068 $\pm$ 0.020	10.562	1, 31.79	<b>0.002</b>
Sex <sub>females</sub>	0.012 $\pm$ 0.018	0.502	1, 214.23	0.479
Hatching date	-1.911 $\pm$ 41.90 *	0.002	1, 89.94	0.964
Rearing brood size	-0.031 $\pm$ 0.024	1.629	1, 111.06	0.204
Nestling weight	2.330 $\pm$ 0.364 *	0.004	1, 214.26	0.945
Age mother	-0.020 $\pm$ 0.019	1.055	1, 82.42	0.307
Days	0.001 $\pm$ 0.017	0.003	1, 84.51	0.954
<i>Random factors</i>				
natal nest	0.019	8.898	1	<b>0.002</b>
rearing nest	0.003	0.483	1	0.487
assay plate	3.353	219.32	1	<0.001
residual	0.061			
<i>Dropped variables</i>				
Natal density x Rearing density		0.040	1, 197.23	0.841
Natal density x Sex		0.022	1, 222.33	0.881
Rearing density x Sex		0.914	1, 216.11	0.340

\*  $\times 10^{-4}$

## Discussion

Breeding density experienced by parents influenced offspring phenotype and survival in a sex-specific way. We found that a high breeding density conditions had a negative effect on body mass of female nestlings, however, the experimental decoupling (via cross-fostering) of the natal and rearing conditions had a positive effect, increasing body mass of female nestlings from HD nests when they were raised in LD nests (Fig. 1a). On the other hand, breeding density did not have a significant effect on body mass of male nestlings, which were, instead, primarily affected by the number of siblings in the nest (Fig. 1b). Consistently with these results, we found a negative effect of density on nestling's survival. Finally, nestlings from HD condition showed lower T/S ratio than those raised in LD condition. Given that telomere length is linked to environmental stress and with individual lifespan (Monaghan *et al.* 2018, Tricola *et al.* 2018), breeding density experienced during early development of nestlings can affect their fitness in the long term.

Previous studies have shown that breeding density affects fledgling body mass (Both 1998, Wilkin *et al.* 2006, Serrano-Davies *et al.* 2017). Interestingly, we found that the body mass of female offspring was sensitive to changes in breeding density (Fig. 1a, Table 2). In a previous study in the same colony of spotless starlings, we found that high breeding density reduce recruitment rates (Fuentes *et al.* 2019), but we found no evidence that density reduces body condition or nestling survival. Although, evidence of density-dependent mechanisms in vertebrates is still scarce, the interference hypothesis suggests that high breeding density increases the number of agonistic encounters between breeders. (Lack 1954, Fernandez *et al.* 1998, Newton 1998). Negative correlations between conspecific density and territory size have been reported for territorial birds (Arcese and Smith 1988, Stamps 1990). In a facultative polygynous mating system like that of the spotless starling (Polo and Veiga 2011), high breeding density could be advantageous for one sex (breeder males) because

it is easier for this sex to get another couple in the appropriate reproductive state (Trivers 1972, Kokko and Rankin 2006). However, female breeders might reduce their mating opportunities and engage their costs of producing specific offspring phenotypes (Monaghan 2008) or, alternatively, adjust provisioning rates to ensure offspring survival in a competitive environment (Kokko and Jennions 2008).

The sex-allocation theory proposes that the larger sex is more sensitive to harsh conditions during early development because of its greater energetic requirements (Trivers and Willard 1973, Clutton-Brock *et al.* 1982). However, the interpretation of these argument is not trivial and requires deep understanding of how sex differences modulate demographic processes in vertebrate populations (*e.g.*, Schindler *et al.* 2015). In spotless starlings, male nestlings are larger than females before leaving the nest. A recent study showed that the fitness of males depends more on their body mass at fledging than that of females (Rubalcaba and Polo 2018). Because body mass of female fledglings has little influence on their future survival and breeding success, they are more likely to exhibit variability and sensitivity to changes in rearing conditions that may not influence their future fitness. A possible interpretation for the lower variability and sensitivity of male body mass to the rearing conditions is that underlying physiological and behavioral mechanisms (*e.g.*, increased ability to compete for parental resources, increased growth rates) have emerged to minimize variations in the body mass. For example, males could increase their testosterone to compete better and avoid losing body mass before leaving the nest because their fitness depends on their ability to increase body mass more than that of their sisters. Thus, the body mass of males could be interpreted as a “canalised” trait (*sensu* Boonekamp *et al.* 2018). In the case of females this canalization might not take place, because the fitness of females is not affected by body mass like we have found in our experiment, where high breeding density, probably with lower resources related to devoted parental care or higher sibling competition, females

might not become competitive with their brothers in the nest. Understanding sex-specific response to the prenatal density environment will be the focus of future work.

Our results suggest that increased breeding density reduces offspring condition and this may be disadvantageous from individuals raised in HD areas. In fact, breeding density reduces the rate of survival of fledglings (Table 4). Moreover, we found that HD nestling had shorter telomere length (measured as T/S ratio) showing a strong effect of early development on both foster and non-foster nestlings. In the case of the spotless starling we found that natal nest has a larger influenced in telomere length, (see Table 5 for details, random effects) and this result is in keeping with other studies, which have showed inherit effects in telomere length (Asghar *et al.* 2015). In addition, previous studies have found that telomere length was not related to sex in fledglings (Gil *et al.* 2018). Unexpectedly, we found a tendency of the T/S ratio telomere length to be shorter in males from HD nest and raised in LD nest (mean  $\pm$  SE; HD-LD males:  $1.67 \pm 0.19$ ,  $n = 34$ ; HD-HD males:  $1.88 \pm 0.19$ ,  $n = 34$ , see Fig S1), although this effect was not significant, it might suggest similar interpretation that we did above. Focusing on the lower variance of male fledgling on body mass, if the weight gain could be canalised, other traits would pay the consequences of its. This suggest throughout potentially areas for further research.

There is a discussion in the literature about which measurement of telomeres is more related with survival prospects, either a single telomere length or a measurement of telomere attrition per se (Boonekamp *et al.* 2014). A previous study in the close common starling (*Sturnus vulgaris*) showed that both approaches are directly related with rearing conditions in nestlings (Nettle *et al.* 2015). However, we cannot exclude the possibility that both processes determine the results of our experiment. Nestlings from high breeding density could have shorter telomeres mediated by maternal effect and suffer a higher shortening when they are growing in a competitive environment. This hypothesis suggests a framework where density-

dependent processes may trade-off between reduced variability of traits with higher fitness (body mass) at the expense of other traits (like telomere length) as the canalization theory proposes (Waddington 1942, Boonekamp *et al.* 2018). It could incur a variation in future cost on life span (Monaghan 2010). Further experimental and comparative work is needed to understand how and why environmental density would give rise to a delayed effect on population dynamics.

To summarise, our study presents experimental evidence for early effects of breeding density on body condition, survival and telomere length of nestlings. These results suggest that breeding females adjust their investment according to the experienced social environment and this suggests a differential allocation of resources in nestling female to favour males. Further research should focus on underlying mechanism in order to understand the ultimate causes of density-dependence regulation of animal populations.

## References

- Angelier, F., Vleck, C. M., Holberton, R. L. and Marra, P. P. 2013. Telomere length, non-breeding habitat and return rate in male American redstarts. - *Funct. Ecol.* 27: 342–350.
- Arcese, P. and Smith, J. N. M. 1988. Effects of Population Density and Supplemental Food on Reproduction in Song Sparrows. - *J. Anim. Ecol.* 57: 119–136.
- Asghar, M., Bensch, S., Tarka, M., Hansson, B. and Hasselquist, D. 2015. Maternal and genetic factors determine early life telomere length. - *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 282: 20142263–20142263.
- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B. M. and Walker, S. C. 2015. Fitting linear mixed-effects models using lme4. - *J. Stat. Softw.* 67: 1–48.
- Bateson, M., Brilot, B. O., Gillespie, R., Monaghan, P., Nettle, D. and Bateson, M. 2015. Developmental telomere attrition predicts impulsive decision-making in adult starlings. - *Proc. R. Soc. B* 282: 20142140.
- Bentz, A. B., Becker, D. J. and Navara, K. J. 2016. Evolutionary implications of interspecific variation in a maternal effect: A meta-analysis of yolk testosterone response to competition. - *R. Soc. Open Sci.* 3: 160499.
- Blackburn, E. 1991. Structure and function of telomeres. - *Nature* 350: 569–73.
- Boonekamp, J. J., Mulder, G., Salomons, H. M. and Verhulst, S. 2014. Nestling telomere shortening , but not telomere length , reflects developmental stress and predicts survival in wild birds. - *Proc. R. Soc. B* 281: 20133287.
- Boonekamp, J. J., Mulder, E. and Verhulst, S. 2018. Canalisation in the wild: effects of developmental conditions on physiological traits are inversely linked to their association with fitness. - *Ecol. Lett.* 21: 857–864.
- Both, C. 1998. Density Dependence of Clutch Size: Habitat Heterogeneity or Individual Adjustment ? - *J. Anim. Ecol.* 67: 659–666.
- Brown, D. E., Harvatine, K. J., Ott, T. L., Dechow, C. D. and Liu, W. S. 2012. Hot topic: Association of telomere length with age, herd, and culling in lactating Holsteins. - *J. Dairy Sci.* 95: 6384–6387.
- Burgess, S. C. and Marshall, D. J. 2014. Adaptive parental effects: The importance of estimating environmental predictability and offspring fitness appropriately. - *Oikos* 123: 769–776.
- Bustin, S. A., Hellemans, J., Pfaffl, M. W., Wittwer, C. T., Garson, J. A., Huggett, J., Benes, V., Vandesompele, J., Kubista, M., Shipley, G. L., Mueller, R. and Nolan, T. 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. - *Clin. Chem.* 55: 611–622.
- Cawthon, R. M. 2002. Telomere measurement by quantitative PCR. - *Nucleic Acids Res.* 30: e47.
- Charmantier, A. and Perret, P. 2004. Manipulation of nest-box density affects extra-pair paternity in a population of blue tits (*Parus caeruleus*). - *Behav. Ecol. Sociobiol.* 56: 360–365.

- Chin, E. H., Love, O. P., Clark, A. M. and Williams, T. D. 2005. Brood size and environmental conditions sex-specifically affect nestling immune response in the European starling *Sturnus vulgaris*. - J. Avian Biol. 36: 549–554.
- Clutton-Brock, T. H., Guinness, F. E. . and Albon, S. D. 1982. Red Deer: Behaviour and Ecology of Two Sexes. University of Chicago Press, Chicago. - University of Chicago Press.
- Clutton-Brock, T. H., Major, S. D., Albon, S. D. and Guiness, F. E. 1987. Early Development and Population Dynamics in Red Deer . I . Density-Dependent Effects on Juvenile Survival. - J. Anim. Ecol. 56: 53–67.
- Cramp, S. and Perrins, C. 1994. Handbook of the birds of Europe, the Middle East and North Africa. - Oxford University Press.
- Criscuolo, F., Bize, P., Nasir, L., Metcalfe, N. B., Foote, C. G., Griffiths, K., Gault, E. A. and Monaghan, P. 2009. Real-time quantitative PCR assay for measurement of avian telomeres. - J. Avian Biol. 40: 342–347.
- Cushing, D. H. 1990. Plankton production and year-class strength in fish populations: An update of the match/mismatch hypothesis. - Academic press.
- Engqvist, L. 2005. The mistreatment of covariate interaction terms in linear model analyses of behavioural and evolutionary ecology studies. - Anim. Behav. 70: 967–971.
- Fernandez, C., Azkona, P. a Z. and Donazar, J. a 1998. Density-dependent effects on productivity in the Griffon Vulture *Gyps fulvus*: the role of interference and habitat heterogeneity. - Ibis. 140: 64–69.
- Foote, C. G., Vleck, D. and Vleck, C. M. 2013. Extent and variability of interstitial telomeric sequences and their effects on estimates of telomere length. - Mol. Ecol. Resour. 13: 417–428.
- Fuentes, D., Rubalcaba, J. G., Veiga, J. P. and Polo, V. 2019. Long - term fitness consequences of breeding density in starling colonies : an observational approach. - J. Ornithol. in press.
- Gil, D., Biard, C., Lacroix, A., Spottiswoode, C. N., Saino, N., Puerta, M. and Møller, A. P. 2007. Evolution of Yolk Androgens in Birds: Development, Coloniality, and Sexual Dichromatism. - Am. Nat. 169: 802–819.
- Gil, D., Alfonso-Íñiguez, S., Pérez-Rodríguez, L., Muriel, J. and Monclús, R. 2018. Harsh conditions during early development influence telomere length in an altricial passerine: links with oxidative stress and corticosteroids. - J. Evol. Biol.: 1–16.
- Giordano, M., Groothuis, T. G. G. and Tscharren, B. 2014. Interactions between prenatal maternal effects and posthatching conditions in a wild bird population. - Behav. Ecol. 25: 1459–1466.
- Grafen, A. 1988. On the Uses of DAta on Lifetime Reproductive Success. - In: Clutton-Brock, T. H. (ed), Reproductive success. Studies of individual variation in contrasting breeding systems. University of Chicago Press, pp. 454–471.

- Griffiths, R., Double, M. C., Orr, K. and Dawson, R. J. G. 1998. A DNA test to sex most birds. - Mol. Ecol. Ecol. 7: 1071–1075.
- Groothuis, T. G. G., Hsu, B.-Y., Kumar, N. and Tscharren, B. 2018. Revisiting mechanisms and functions of prenatal hormone-mediated maternal effects using avian species as a model. - Philos. Trans. R. Soc. B 374: 20180115.
- Haussmann, M. F. and Mauck, R. A. 2008. New strategies for telomere-based age estimation. - Mol. Ecol. Resour. 8: 264–274.
- Jetz, W., Thomas, G. H., Joy, J. B., Hartmann, K. and Mooers, A. O. 2012. The global diversity of birds in space and time. - Nature 491: 444–448.
- Kimura, M., Stone, R. C., Hunt, S. C., Skurnick, J., Lu, X., Cao, X., Harley, C. B. and Aviv, A. 2010. Measurement of telomere length by the southern blot analysis of terminal restriction fragment lengths. - Nat. Protoc. 5: 1596–1607.
- Kokko, H. and Rankin, D. J. 2006. Lonely hearts or sex in the city? Density-dependent effects in mating systems. - Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 361: 319–334.
- Kokko, H. and Jennions, M. D. 2008. Parental investment, sexual selection and sex ratios. 21: 919–948.
- Lack, D. 1954. The natural regulation of animal numbers. - Oxford University Press.
- Lack, D. 1966. Population studies of birds. - Oxford University Press.
- Lindström, J. 1999. Early development and fitness in birds and mammals. - Trends Ecol. Evol. 14: 343–348.
- Marshall, D. J. and Uller, T. 2007. When is a maternal effect adaptive? - Oikos: 1957–1963.
- Matthysen, E. 2005. Density-Dependent Dispersal in Birds and Mammals. - Ecography. 28: 403–416.
- Meillère, A., Brischoux, F., Ribout, C. and Angelier, F. 2015. Traffic noise exposure affects telomere length in nestling house sparrows. - Biol. Lett. 11: 20150559.
- Metcalf, N. B. and Monaghan, P. 2001. Compensation for a bad start- grow now, pay later? - Trends Ecol. Evol. 16: 254–260.
- Monaghan, P. 2008. Early growth conditions, phenotypic development and environmental change. - Philos. Trans. R. Soc. London B Biol. Sci. 363: 1635–1645.
- Monaghan, P. 2010. Telomeres and life histories: The long and the short of it. - Ann. N. Y. Acad. Sci. 1206: 130–142.
- Monaghan, P. and Haussmann, M. F. 2006. Do telomere dynamics link lifestyle and lifespan? - Trends Ecol. Evol. 21: 47–53.
- Monaghan, P., Eisenberg, D. T. A., Harrington, L. and Nussey, D. 2018. Understanding diversity in

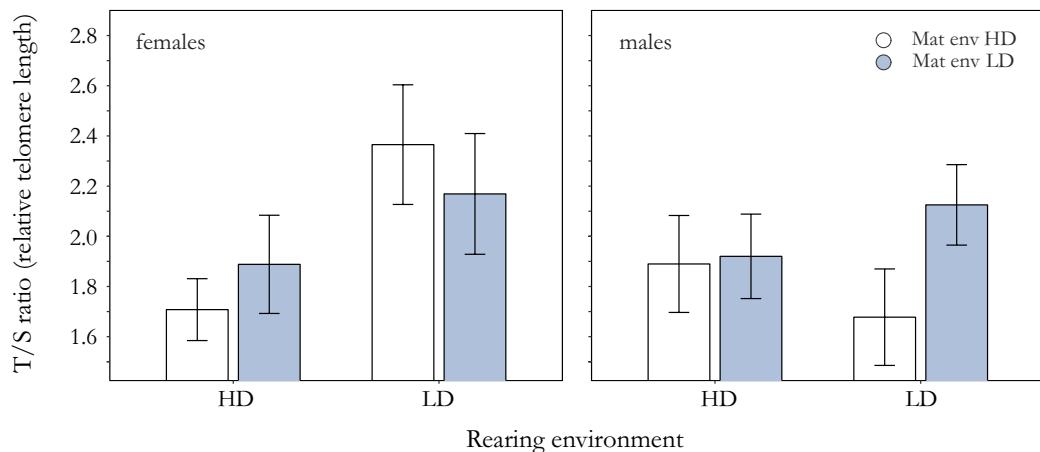
- telomere dynamics. - Phil. Trans. R. Soc. B 373: 20160435.
- Mousseau, T. A. and Fox, C. W. 1998. Maternal Effects as Adaptations. - Oxford University Press.
- Nettle, D., Monaghan, P., Gillespie, R., Brilot, B., Bedford, T., Bateson, M. and Nettle, D. 2015. An experimental demonstration that early-life competitive disadvantage accelerates telomere loss. - Proc. Biol. Sci. 282: 20141610.
- Nettle, D., Andrews, C., Reichert, S., Bedford, T., Gott, A., Parker, C., Kolenda, C., Martin-Ruiz, C., Monaghan, P. and Bateson, M. 2016. Brood size moderates associations between relative size, telomere length, and immune development in European starling nestlings. - Ecol. Evol. 6: 8138–8148.
- Newton, I. 1998. Population limitation in birds. - Elsevier.
- Noguera, J. C., Kim, S.-Y. and Velando, A. 2012. Pre-fledgling oxidative damage predicts recruitment in a long-lived bird. - Biol. Lett. 8: 61–63.
- Nussey, D. H., Baird, D., Barrett, E., Boner, W., Fairlie, J., Gemmell, N., Hartmann, N., Horn, T., Haussmann, M., Olsson, M., Turbill, C., Verhulst, S., Zahn, S. and Monaghan, P. 2014. Measuring telomere length and telomere dynamics in evolutionary biology and ecology. - Methods Ecol. Evol. 5: 299–310.
- Pfaffl, M. W. 2001. The Molecular Biology of Cytokines. - Nucleic Acids Res. 29: 16–21.
- R Core Team 2016. R: A Language and Environment for Statistical Computing (RF for S Computing, Ed.). - R Fondation for Statistical Computing.
- Ricklefs, R. E. and Peters, S. 1979. Intraspecific variation in the growth rate of nestling European starlings. - Bird Band 50: 338–348.
- Rowland, E., Love, O. P., Verspoor, J. J., Sheldon, L. and Williams, T. D. 2007. Manipulating rearing conditions reveals developmental sensitivity in the smaller sex of a passerine bird, the European starling *Sturnus vulgaris*. - J. Avian Biol. 38: 612–618.
- Rubalcaba, J. G. and Polo, V. 2018. Sex differences in early determinants of lifetime reproductive success in a polygynous bird : Should mothers adjust offspring sex ratios? - Auk 135: 400–408.
- Salmón, P., Nilsson, J. F., Nord, A., Bensch, S. and Isaksson, C. 2016. Urban environment shortens telomere length in nestling great tits, *Parus major*. - Biol. Lett. 12: 20160155.
- Santoro, S., Green, A. J., Speakman, J. R. and Figuerola, J. 2015. Facultative and non-facultative sex ratio adjustments in a dimorphic bird species. - Oikos 124: 1215–1224.
- Schindler, S., Gaillard, J. M., Grüning, A., Neuhaus, P., Traill, L. W., Tuljapurkar, S. and Coulson, T. 2015. Sex-specific demography and generalization of the Trivers-Willard theory. - Nature 526: 249–252.
- Serrano-Davies, E., Barrientos, R. and Sanz, J. J. 2017. The role of nest-box density and placement

- on occupation rates and breeding performance: A case study with Eurasian Blue Tits. - *Ornis Fenn.* 94: 21–32.
- Sheldon, B. C. 2000. Differential allocation: Tests, mechanisms and implications. - *Trends Ecol. Evol.* 15: 397–402.
- Sibly, R. M., Barker, D., Denham, M. C., Hone, J. and Pagel, M. 2005. Ecology: On the regulation of populations of mammals, birds, fish, and insects. - *Science.* 309: 607–610.
- Sinclair, A. R. E. 1989. Population regulation in animals. - In: Cherret, J. M. (ed), *Ecological Concepts. The contribution of Ecology to an Understanding of the Natural World.* Blackwell Science, pp. 197–241.
- Stamps, J. A. 1990. The Effect of Contender Pressure on Territory Size and Overlap in Seasonally Territorial Species. - *Am. Nat.* 135: 614–632.
- Tricola, G. M., Simons, M. J. P., Atema, E., Boughton, R. K., Brown, J. L., Dearborn, D. C., Divoky, G., Eimes, J. a., Huntington, C. E., Kitaysky, A. S., Juola, F. a., Lank, D. B., Litwa, H. P., Mulder, E. G. a., Nisbet, I. C. T., Okanoya, K., Safran, R. J., Schoech, S. J., Schreiber, E. a., Thompson, P. M., Verhulst, S., Wheelwright, N. T., Winkler, D. W., Young, R., Vleck, C. M. and Haussmann, M. F. 2018. The rate of telomere loss is related to maximum lifespan in birds. - *Phil. Trans. R. Soc. B* 373: 20160445.
- Trivers, R. L. 1972. Parental investment and sexual selection. *Sexual Selection & the Descent of Man* (B Campbell, Ed.). - Aldinc: Chicago.
- Trivers, R. L. and Willard, D. E. 1973. Natural Selection of Parental Ability to Vary the Sex Ratio of Offspring. - *Science.* 179: 90–92.
- Tschirren, B., Fitze, P. S. and Richner, H. 2007. Maternal modulation of natal dispersal in a passerine bird: an adaptive strategy to cope with parasitism? - *Am. Nat.* 169: 87–93.
- Uller, T. 2006. Sex-specific sibling interactions and offspring fitness in vertebrates: Patterns and implications for maternal sex ratios. - *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 81: 207–217.
- Vedder, O., Dekker, A. L., Visser, G. H. and Dijkstra, C. 2005. Sex-specific energy requirements in nestlings of an extremely sexually size dimorphic bird, the European sparrowhawk (*Accipiter nisus*). - *Behav. Ecol. Sociobiol.* 58: 429–436.
- Veiga, J. P. and Polo, V. 2016. Estornino negro – *Sturnus unicolor* Temminck. - In: Salvador, A. and Morales, M. B. (eds), *Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles.* Museo Nacional de Ciencias Naturales. Available from: <http://www.vertebradosibericos.org/>.
- Waddington, C. H. 1942. Canalization of development and the inheritance of acquired characters. - *Nature* 150: 563–565.
- Wilkin, T., Garant, D., Gosler, A. and Sheldon, B. C. 2006. Density Effects on Life-History Traits in a Wild Population of the Great Tit *Parus major*: Analyses of Long-Term Data with GIS Techniques. - *J. Anim. Ecol.* 75: 0–3.

Young, A. J. 2018. The role of telomeres in the mechanisms and evolution of life-history trade-offs and ageing. - *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 373: 20160452.

## Supplementary Data

To test the influence of cross-fostering itself, we crossed chicks within treatment and analysed cross-fostered state of nestling in other LMM and GLMM including manipulation (natal or fostered nestling), rearing density treatment and their interactions with the same structure of covariates and random factors (see experimental design). A total of 28 broods were used (14 broods crossed from LD to LD nest-box, and 14 from HD to HD nest-boxes).



**Figure S1.** Effects of the maternal and rearing environment density treatment on telomere length. Left: Mean  $\pm$  S.E. at 8 days of LD and HD female nestlings. Right: Mean  $\pm$  S.E. at 8 days of LD and HD female nestlings.

**Table S1.** Summary results of the linear mixed-effect model analysing the effect of density within treatment on the body mass of fledglings before leave the nest (average 16 days of live). For final model, model estimates for fixed effects and variance for random effects is showed, test statistic is  $F$  for fixed effects,  $X^2$  for random effects. SE = standard error, d.f. = degrees of freedom,  $R_m^2$  = marginal R-squared,  $R_c^2$  = conditional R-squared. Bold type indicate statistical significance at or below 0.05.

Variables	Estimate $\pm$ SE / variance	$F / X^2$	d.f.	p-value
Final model ( $R_m^2 = 0.20$ ; $R_c^2 = 0.38$ )				
Intercept	79.772 $\pm$ 8.616			
Rearing density low density	2.517 $\pm$ 1.479	2.725	1, 11.68	0.125
Status non-cross-fostered	-0.104 $\pm$ 1.124	0.007	1, 48.29	0.930
Sex females	-1.603 $\pm$ 1.049	2.105	1, 50.44	0.153
Hatching date	-0.141 $\pm$ 0.066	3.863	1, 31.25	0.058*
Year		0.310	1, 24.45	0.735
2014	0.312 $\pm$ 1.540			
2015	1.403 $\pm$ 2.288			
Rearing brood size	0.315 $\pm$ 1.272	0.053	1, 12.14	0.820
Status x Rearing density	-0.505 $\pm$ 1.086	0.192	1, 49.22	0.663
Sex x Rearing density	-1.248 $\pm$ 1.044	1.289	1, 50.63	0.261
<i>Random factors</i>				
natal nest	0.000 <sup>a</sup>	0.000 <sup>a</sup>	1	1.000
rearing nest	16.980	4.120	1	0.107
residual	57.149			

<sup>a</sup> Parameter estimate was bound to 0

**Table S2.** Summary results of the generalized mixed-effect model (binomial distribution) analysing the effect of density within treatment on the survival of nestlings. Bold type indicate statistical significance at or below 0.05.

Variables	Estimate $\pm$ SE / variance	$X^2$	d.f.	p-value
Final model ( $R_m^2 = 0.25$ ; $R_c^2 = 0.61$ )				
Intercept	2092.11 $\pm$ 87.688			
Rearing density low density	1.160 $\pm$ 0.681	3.109	1	0.077
Status non-cross-fostered	-0.274 $\pm$ 0.427	0.465	1	0.495
Hatching date	-0.227 $\pm$ 0.619	0.135	1	0.713
Year	-1.036 $\pm$ 0.043	570.259	1	<0.001
Rearing brood size	-0.291 $\pm$ 0.478	0.370	1	0.542
Status x Rearing density	0.052 $\pm$ 0.418	0.015	1	0.900





---

## *Discusión general*

---





## Discusión general

Esta Tesis aborda los efectos de la denso-dependencia en el comportamiento y éxito reproductivo; así como en las estrategias reproductivas de una población de estornino negro. Por otro lado, también estudia los mecanismos que actúan sobre la descendencia y su patrón dispersivo. En concreto, los resultados obtenidos en esta Tesis evidencian que el incremento experimental del número de cajas nido y la reducción de la distancia entre ellas produjo variaciones de las conductas de señalización tanto en machos, aumentando el uso de plantas verdes, como en hembras, aumentando el acarreo de plumas foráneas durante la incubación (**capítulo 2**). En el **capítulo 3** encontramos un sesgo en la proporción de sexos en las puestas hacia macho en baja densidad, (LD, condiciones favorables *a priori*); como cabría esperar según las presunciones de los modelos de ‘*sex allocation*’ y nuestra aproximación experimental. En cambio, en alta densidad (HD) demostramos un sesgo a hembra durante los cuatro años del experimento. Sin embargo, y en aparente contradicción con lo anterior, algunos de los resultados fundamentales acerca de los mecanismos a corto y medio plazo del tratamiento experimental de aproximación de cajas nido sobre los pollos parece evidenciar un efecto más negativo de la densidad reproductiva en las hijas que en los hijos. Esto sugiere una posible paradoja adaptativa al contradecir las presunciones teóricas esperadas o bien que la denso-dependencia es un proceso multifactorial que opera a muy distintos niveles y con efectos tanto positivos como negativos. En cuanto a los mecanismos próximos que explicarían los procesos denso-dependientes, hemos demostrado la importancia del efecto materno sobre el efecto ambiental en la descendencia. Las hembras nacidas en HD tuvieron menor condición física, incluso cuando se criaron en LD, en cambio en los machos no hemos encontrado diferencias directas vía efectos maternos sobre la condición física. Además, hemos encontrado un efecto ambiental sobre la longitud de los telómeros de todos los individuos criados en alta densidad (**capítulo 4**). Por último, con una aproximación observacional hemos demostrado

que la densidad también influye a largo plazo en las tasas de reclutamiento (**capítulo 1**). Cabe destacar que la reducción del reclutamiento se debe principalmente a un descenso en el número de hembras reclutadas. A continuación, discutimos cómo los cuatro capítulos de esta Tesis han contribuido a responder a las preguntas formuladas en la introducción general.

### **¿Es la densidad reproductiva un proceso denso-dependiente positivo o negativo en la especie modelo?**

Todos los resultados obtenidos en la presente Tesis apuntan en la misma dirección, el incremento de la densidad reproductiva conlleva costes y/o efectos negativos en el estornino negro. En poblaciones salvajes, considerando sólo estudios con aves que anidan estrictamente en cavidades, el número de evidencias experimentales (manipulación de cajas nido) se reducen a unos pocos estudios (Tabla 1). Uno de los aspectos más llamativos de la breve revisión mostrada en la Tabla 1 es que cada estudio se ha llevado a cabo con aproximaciones distintas y enfocadas a diferentes objetivos. En siete de los nueve casos sólo se observan los efectos a corto plazo, y en parte no se controló la influencia ambiental (*e.g.* Alatalo y Lundberg 1984, Torok y Toth 1988), en un sólo caso se muestra las consecuencias a largo plazo de la densidad (Both y Visser 2000), o contemplan los efectos maternos pero sin conocer las consecuencias a largo plazo (Bentz *et al.* 2013). En contraposición a estos estudios, la presente Tesis enriquece el campo estudiado abordando con una visión global de cómo actúan los procesos denso-dependientes. Las evidencias obtenidas nos han permitido corroborar hipótesis previas sobre el efecto negativo, pero ¿es suficiente para afirmar un efecto negativo de la densidad?.

En nuestro caso, hay que destacar que los machos de estornino negro son facultativamente políginos. Esto significa que pueden controlar más de una caja nido por evento reproductivo (Veiga *et al.* 2001, Veiga y Polo 2016). Un incremento del número

**Tabla 1.** Revisión de estudios de denso-dependencia con aproximaciones experimentales en especies de aves paseriformes que anidan estrictamente en cavidades. En la columna tercera se incluyen los símbolos (+, incremento) y (-, disminución) de una variable en relación al incremento de la densidad. Subrayada aparecen las variables que apoyan nuestros resultados.

Especie	Referencia	Variable afectada (incremento densidad)
Papamoscas cerrojillo ( <i>Ficedula hypoleuca</i> )	Tompa 1967	(-) tamaño de puesta (+) puestas fracasadas <u>(+)</u> mortalidad crías
Papamoscas cerrojillo ( <i>Ficedula hypoleuca</i> )	Alatalo y Lundberg 1984	<u>(+)</u> mortalidad de volantones (-) peso y tarso de las crías
Papamoscas collarino ( <i>Ficedula albicollis</i> )	Török y Toth 1988	variaciones fecha de puesta <u>(-)</u> peso y tarso de las crías
Herrerillo común ( <i>Cyanistes caeruleus</i> )	Dhondt <i>et al.</i> 1992	(-) tamaño de puesta
Carbonero común ( <i>Cyanistes caeruleus</i> )	Both 1998	(-) tamaño de puesta
Carbonero común ( <i>Cyanistes caeruleus</i> )	Both y Visser 2000	(-) tamaño de puesta <u>(-)</u> peso de pollos <u>(-)</u> reclutamiento
Chipe azulnegro ( <i>Setophaga caerulescens</i> )	Sillett <i>et al.</i> 2004	(-) tamaño del territorio (+) mortalidad por territorio (-) cuidado paterno
Golondrina bicolor ( <i>Tachycineta bicolor</i> )	Bentz <i>et al.</i> 2013	(+) crecimiento rápido (+) agresividad pollos (+) tasa metabólica
Herrerillo común ( <i>Cyanistes caeruleus</i> )	Serrano-Davies <i>et al.</i> 2017	<u>(-)</u> peso de pollos
Estornino negro ( <i>Sturnus unicolor</i> )	Tesis doctoral	<u>(-)</u> longitud telomérica <u>ajustes de la sex ratio</u> <u>primaria</u>

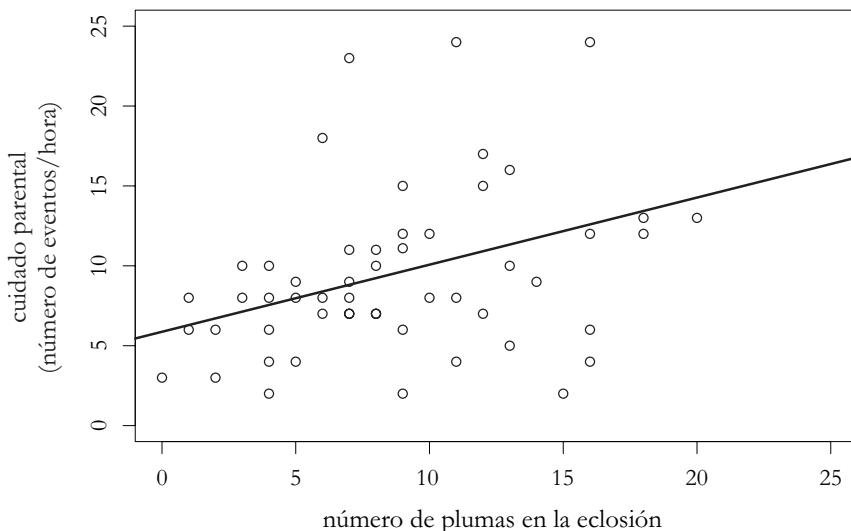
de lugares de nidificación puede favorecer dos escenarios posibles: (a) una reducción del tamaño territorial de los machos, o bien, el efecto opuesto, (b) acaparar más de un nido en el mismo territorio. En una especie con un comportamiento territorial tan marcado como el estornino negro sugerimos una segregación de individuos competitivos, que preferirían áreas de alta densidad ya que pueden soportar los costes de la competencia intraespecífica. Los machos disminuirían su productividad por caja nido, pero incrementarían sus posibilidades de emparejarse con varias hembras, compensando así las pérdidas individuales por la suma

global de descendientes producidos por temporada reproductiva. Esta situación ocurre en otras especies de paseriformes, como en el arrocero norteño, *Spiza americana*, (Sousa y Westneat 2013). Sin embargo, esto puede no ser cierto si en ambientes densos hay un aumento de las cópulas extra-pareja de las hembras, y por tanto una reducción de la fidelidad de la paternidad. Resultaría muy interesante comprobar en futuros trabajos si existe un incremento o descenso de la eficacia biológica en machos en relación a las conductas de apareamiento en hembras.

En el caso de las hembras, las posibilidades de producir descendencia dependen de uno o dos intentos reproductivos por temporada. Este contexto sugiere una alta competencia intraespecífica por acceder a la reproducción asociada a la disponibilidad de cavidades aún a costa de una disminución del éxito reproductivo. Las hembras podrían ajustar su esfuerzo reproductivo en diferentes direcciones para compensar el aumento de los costes en zonas densas, como por ejemplo variando sus conductas que abarcan desde señales visuales (plumas ornamentales en nido) hasta el esfuerzo invertido en el cuidado de la prole. Durante el experimento llevado a cabo en esta Tesis (**capítulo 2**) hemos observado que las hembras incrementan el número de plumas foráneas en nidos de zonas densas. El acarreo de plumas supone dedicación y un gasto energético considerable para las aves (Hansell 2000, Mainwaring y Hartley 2013). Las hembras de estornino negro disponen plumas foráneas con la parte más visible en el rango del ultravioleta hacia el exterior del nido durante la puesta e incubación, favoreciendo la conspicuidad del nido en una cavidad oscura y sugiriendo un papel en la comunicación con otros congéneres (Veiga y Polo 2005). A su vez, hemos encontrado una correlación positiva entre el cuidado parental global posterior a la eclosión y el número de plumas colocadas en el nido (Fig. 1; correlación de Pearson = 0.32, n = 51, p-value:  $P = 0.019$ ). La obtención de información directa de la calidad y estatus de un individuo o bien, de un lugar óptimo para reproducirse por adelantado es menos costoso que llevar a cabo un

intentó y fracasar (Dall *et al.* 2005). Por ello, el aumento de plumas sugiere una comunicación social en la competencia con otras hembras por la atención del macho, o alternativamente, una jerarquización de puestas dentro de los ambientes de alta densidad.

La evaluación del éxito reproductivo de conespecíficos se ha demostrado como una



**Figura 1.** Correlación entre los eventos relacionados con el cuidado parental (cebas de ambos progenitores, aporte de calor y apoyos de reclamo en caja nido) y el número de plumas en el momento de la eclosión de la puesta.

estrategia beneficiosa de forma teórica (Boulinier y Danchin 1997, Doligez *et al.* 2003). En este sentido, los resultados obtenidos en el **capítulo 2** sugieren una fuerte presión selectiva sobre los individuos para acceder a lugares de reproducción ligado al uso de la información social proporcionada por otros individuos (Newton 1998, Wiebe 2011, Tobias *et al.* 2012). Trabajos previos muestran que las hembras de estornino negro aumentan el número de plumas acarreadas en función de su experiencia reproductiva (Polo y Veiga 2006). Por ejemplo, planteamos la posibilidad de que hembras expertas que conocen el lugar de cría requieran en menor medida la información social para establecerse en un área, pero en caso de individuos nuevos que entran en la población, las señales sociales de otros pueden jugar

un papel importante para la modificación de sus conductas (bien sea por potenciales parejas o lugares para nidificar). Por ejemplo, como en el caso de la gaviota tridáctila, *Rissa tridactyla*, o la collalba gris, *Oenanthe oenanthe*, entre otros (Boulinier *et al.* 1996, 2008, Arlt y Pärt 2007, ver revisión en Schmidt *et al.* 2010) donde el establecimiento de individuos en un parche de hábitat se produce en función de la información percibida de otros congéneres. Sin embargo, no hemos detectado una segregación de hembras por peso (como subrogado de mejor condición física) o en la edad (mayor o menor experiencia reproductiva) entre tratamientos de densidad. Aun así, no podemos descartar otros rasgos fisiológicos o conductuales que estén actuando. Por ejemplo, los niveles circulantes de hormonas esteroides (Hau *et al.* 2010) o rasgos heredados de personalidad (Nicolaus *et al.* 2016).

La literatura muestra desventajas ecológicas y evolutivas de vivir agrupados (Brown y Brown 1986, Péron *et al.* 2010, Araya-Ajoy *et al.* 2016, Wright *et al.* 2019). Pese a ello, observamos que el estornino negro los individuos continúan agregándose. Las tasas de ocupación de cajas nido en la colonia durante el experimento de densidad se sitúan por encima del 95% desde el primer año. La rápida ocupación de los territorios vacantes debe indicar la presencia de numerosos individuos flotantes en la población, que en otras circunstancias no podrían reproducirse por la limitación de lugares (Newton 1998, Vili *et al.* 2013). La agregación de individuos debe suponer un equilibrio entre ventajas de la propia agregación con respecto a los costes encontrados en esta Tesis. Cabe la posibilidad de que la aproximación experimental planteada forzara en exceso la situación de densidad y la especie estuviera fuera de un rango tolerable (DeWitt *et al.* 1998), aunque es poco probable, ya que en ese caso deberíamos de observar una reducción de la ocupación (Wiebe 2011). No hay consenso en la literatura sobre cómo evolucionan las poblaciones animales hacia la colonialidad o la territorialidad (Rolland *et al.* 1998, Danchin *et al.* 2008). Vivir en grupos es un puzzle evolutivo (Danchin y Wagner 1997) y los beneficios de agregarse con otros

conespecíficos se han evidenciado en distintos aspectos como diluir la presión depredatoria o la facilidad para encontrar lugares de alimentación (Danchin *et al.* 1998, Sachs *et al.* 2007, Ležalová-Piálková 2011).

La mayoría de resultados obtenidos en la tesis muestran efectos negativos de la densidad, pero si hay efectos negativos de la densidad ¿por qué los individuos se agrupan durante los eventos reproductivos? un balance positivo entre costes y beneficios es la única explicación plausible como argumentan otros autores (Stearns 1992, Travis *et al.* 1999, Kim *et al.* 2009, Rodrigues y Johnstone 2014). ¿Hay un límite donde los efectos negativos de la densidad son tan elevados que el éxito reproductivo se desploma por completo? Los individuos están bajo fuertes presiones selectivas para la toma de decisiones óptimas de un lugar de reproducción (Stearns 1992, Kokko y Lundberg 2001, Doligez *et al.* 2003). Este óptimo tiene que estar influenciado por multitud de factores que actúan al mismo tiempo y más en especies de vertebrados, donde la variabilidad de sistemas de emparejamiento y cuidados parentales abarcan múltiples estrategias, además de otros factores limitantes (Newton 1998). Aunque haya beneficios y costes de la densidad dependiendo del rasgo observado, la biología evolutiva se focaliza en la eficacia biológica, al integrar todos los factores implicados (Danchin y Wagner 1997). Nuestra aproximación experimental, con únicamente dos niveles de densidad (*i.e.*, alta *vs* baja densidad), no nos permite identificar un valor óptimo de densidad. Esto supone de nuevo una paradoja con dos interpretaciones posibles. Por un lado, es probable que al aumentar el número de nidos se favorezca el establecimiento de individuos flotantes, que de otra forma no accederían a la reproducción, y de ahí los efectos negativos observados, por otro lado, que los efectos denso-dependientes observados sea el estado natural en una especie colonial. Por tanto, el tratamiento de baja densidad podría ser una situación anómala en un conjunto global denso, es decir, observamos el beneficio de criar sin competencia directa destacando la importancia de la escala espacial considerada.

## ¿Cuáles son los posibles mecanismos que generan los procesos denso-dependientes?

El experimento de *cross-fostering* (**capítulo 4**) ha evidenciado que el ambiente experimentado por las hembras reproductoras (alta o baja densidad reproductiva) produce diferentes efectos en el fenotipo de hijos e hijas vía efectos maternos. Las hembras que nacen en nidos de alta densidad parecen estar más desfavorecidas que los machos, sin embargo, cuando se intercambian a un ambiente de baja densidad la condición física retorna a la esperada. Este escenario plantea la importancia del ambiente previo experimentado por la madre como causa moduladora de las variaciones observadas entre sexos en la progenie. Las hembras reproductoras deben experimentar alguna situación de coste en ambientes densos como consecuencia de la competencia con otros individuos. Por ejemplo, cambios fisiológicos asociados al incremento de interacciones con otros conespecíficos, que repercutan en la cantidad de hormonas tales como andrógenos o corticoides implicadas en la respuesta al estrés o en los antioxidantes depositados en los huevos (Gil *et al.* 1999, Royle *et al.* 2001, Groothuis y Schwabl 2002).

Estudios previos donde se ha manipulado la cantidad de plantas verdes en nidos de estornino negro muestran que la variación de este rasgo del comportamiento de los machos aumenta el nivel de testosterona en las hembras (Polo *et al.* 2010). Si extrapolamos a los resultados encontrados en esta Tesis, la interpretación más probable es un aumento de la competencia entre hembras por acceder a nidos con alta cantidad de plantas verdes (HD). Esta situación implicaría cambios fisiológicos en las hembras. Evidencias previas muestran que las hembras aumentan sus niveles de testosterona para mantener su estatus cuando están emparejadas con machos polígnicos (mayor cantidad de verde), pero este aumento de la testosterona reduce su esfuerzo maternal, empeorando la condición física y la tasa de

supervivencia de sus hijos (Veiga y Polo 2008). En otras palabras, la competencia con otras hembras por acceder a los nidos podría activar mecanismos fisiológicos clave para mantener el estatus de emparejamiento con los machos preferidos, pero que implica efectos colaterales en la descendencia (vía efecto materno). Por otro lado, la relación directa entre el incremento de hormonas en hembras y en sus huevos ha sido demostrada empíricamente (Gil *et al.* 1999, 2007, Schwabl 2006). El conocimiento de esta posible relación como consecuencia de la densidad en la especie modelo aportaría pistas sobre los mecanismos próximos que actúan en la descendencia. Varios estudios muestran una relación positiva entre la competencia intraespecífica de los reproductores (directa o simulada) y la concentración de hormonas depositadas en los huevos por parte de las hembras, como por ejemplo, canarios (Schwabl 1996, Groothuis y Schwabl 2008), en el gorrión común (Mazuc *et al.* 2003), o en la golondrina común, *Hirundo rustica*, (Saino *et al.* 2006). En el caso de la golondrina común, los efectos de la cantidad de hormonas depositadas en los huevos además mostraron diferentes respuestas de la progenie en función del sexo (incremento del tamaño corporal y masa en machos) como podría estar ocurriendo en el caso del estornino negro (**capítulo 4**). La relación entre hormonas depositadas por las hembras reproductoras en huevos y la densidad, hasta donde alcanza nuestro conocimiento sólo se ha evidenciado en el estornino pinto (Pilz y Smith 2004) y en la golondrina bicolor (Bentz *et al.* 2013). En este último, además, se observaron las consecuencias para la descendencia. Los pollos de golondrina bicolor tuvieron crecimientos rápidos y comportamientos agresivos en ambientes densos durante las fases tempranas del desarrollo, aunque no encontraron diferencias entre sexos. Nuevas investigaciones en esta línea podrían corroborar o descartar nuestras hipótesis acerca de los mecanismos implicados en los procesos denso-dependientes.

Hasta este punto hemos tratado el efecto materno como mecanismo denso-dependiente, y a su vez, también hemos demostrado que el efecto ambiental influye en la descendencia

(capítulo 4). Los resultados obtenidos apuntan a que las condiciones de desarrollo temprano experimentadas por las hijas difieren de las experimentadas por los hijos. Si esta situación se traduce en un aumento de la competencia entre hermanos dentro de una misma puesta, el sexo menos competitivo podría sufrir con respecto al sexo dominante si hay, por ejemplo, cambios en las tasas de cebas debido al incremento de las interacciones sociales, o disminuyan los cuidados parentales. Sin embargo, las tasas de cebas no difieren entre los tratamientos de nuestro experimento (cebas/h por nido  $\pm$  SE:  $4.85 \pm 0.72$  (LD) vs.  $4.88 \pm 0.78$  (HD);  $F_{1,51} = 0.001$ ;  $P = 0.974$ ). A pesar de ello, hay que destacar que las crías machos tienen un ligero dimorfismo en el peso a su favor antes de abandonar el nido (peso  $\pm$  SE:  $81.89 \pm 0.79$  (machos) vs.  $77.03 \pm 0.94$  (hembras);  $F_{1,185} = 14.689$ ;  $P = <0.001$ ). Si los hijos son más grandes que sus hermanas es posible que consigan su condición física óptima antes durante el desarrollo (ver Fig. 1, capítulo 4). El peso corporal en las crías machos es una variable fundamental para su futuro como reproductores al aumentar su eficacia biológica (Rubalcaba y Polo 2018). Desde un punto de vista evolutivo se puede especular con la existencia de un balance entre rasgos, es decir, rasgos con grandes efectos en la eficacia biológica que podrían estar canalizados, como el peso corporal en los machos, dando lugar a un incremento de la competencia desigual entre hermanos. En cambio, otros rasgos con menor implicación en la eficacia biológica podrían experimentar el efecto contrario para compensar (*'theory of canalization'*, ver discusión capítulo 4; Waddington 1942, Boonekamp *et al.* 2018). En conjunto estas interpretaciones sugieren la existencia de mecanismos que compensen los beneficios encontrados sobre un rasgo determinado, aunque existan costes en otros rasgos en función de la densidad reproductiva experimentada.

Desconocemos la existencia del mecanismo o el balance que puede existir en las crías machos y hembras de estorninos. Con los resultados obtenidos en esta Tesis (capítulo 4), aportamos una línea a explorar con respecto a la longitud de los telómeros. Varios estudios

apoyan la importancia de ambientes adversos de cría con la “salud” de los telómeros de los cromosomas al relacionar negativamente su longitud con el estrés oxidativo a nivel celular y con la longevidad de los individuos como medida de efectos a largo plazo (Tricola *et al.* 2018). Por ejemplo, estudios con el cormorán europeo (*Phalacrocorax carbo*) o en el carbonero común (*Parus major*) encontraron que la exposición a condiciones estresantes o hábitats de menor calidad en etapas tempranas del desarrollo incrementa la pérdida de longitud de los telómeros (Herborn *et al.* 2014, Salmón *et al.* 2016). Los resultados de la presente Tesis muestran que la variación en la densidad de reproductores es un factor desencadenante de condiciones limitantes para el desarrollo de los pollos. Corroborando así la influencia del ambiente social en el desarrollo temprano como evidencian otros estudios. Aunque no podemos descartar ninguna otra posibilidad, como por ejemplo cambios en la capacidad inmune (Chin *et al.* 2005, Rowland *et al.* 2007) o termorreguladora (Andreasson *et al.* 2016). Desde nuestro punto de vista se trata de una línea muy interesante para explorar un balance diferencial entre rasgos canalizados o no y sus futuras consecuencias en función del sexo del individuo en un contexto de denso-dependencia.

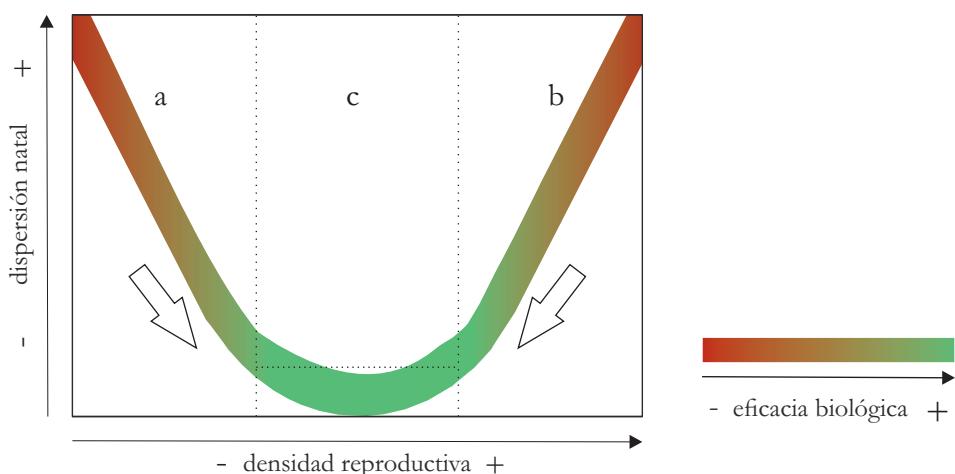
Por último, otro aspecto que consideramos relevante en este apartado es la determinación del sexo de la progenie en función de la densidad reproductiva. Estudios previos han demostrado que los estorninos ajustan la sex ratio en las puestas en función del atractivo del macho y directamente relacionado con la condición o estatus de la hembra (Polo *et al.* 2004, Veiga *et al.* 2004). En nuestra zona de estudio, la colonia de estorninos de media muestra que la sex ratio está sesgada hacia el sexo menos costoso, en concreto 0.47 machos por puesta de media (años 2001 a 2013, datos no publicados, V. Polo y J.P. Veiga). Con el experimento de densidad observamos un sesgo en los nidos LD hacia machos, cuando debería estar levemente por debajo de 0,5. Siguiendo las predicciones de Trivers y Willard esto sucede por una mejor condición de las hembras. Puede que haya reasignación de

hembras en función del ambiente, sin embargo, no hemos encontrado diferencias en el peso o en la edad de las hembras reproductoras (ver **capítulo 4**). Aun así, no podemos descartar cualquier otro efecto compensatorio que incremente la producción de machos en las zonas de baja densidad.

Como esperábamos, el efecto de la densidad reproductiva en la sex ratio produjo un ligero sesgo hacia el sexo menos costoso en ambientes de alta densidad. Sin embargo, este resultado evidencia la complejidad y la multifactorialidad de los procesos denso-dependientes. Por un lado, se produce el sexo menos costoso, i.e. hembras, en alta densidad según la hipótesis de Trivers y Willard (1973), pero a la vez las hembras producidas son el sexo que evidencia efectos negativos de la densidad (capítulos 1 y 4). Estos resultados sugieren que, contrario a lo esperado, la desviación de la equidad en la proporción de sexos producida no sería relevante al inicio de la puesta, sino en etapas posteriores como en el momento de abandonar el nido o en el reclutamiento futuro bajo determinadas condiciones iniciales de desarrollo. Una vez más, los resultados permiten desarrollar nuevas líneas de investigación sobre qué estamos observando realmente con las variaciones de la sex ratio por evento reproductivo, si los ajustes de la sex ratio son adaptativos, o bien se trata de variaciones fisiológicas que desvían la proporción de sexos del 50:50 pero sin implicaciones en la eficacia biológica. Un punto de vista interesante a considerar es que las presiones selectivas no son las mismas para ambos性es en función de las condiciones experimentadas. Varios autores destacan la importancia de comprender cómo la competencia por recursos varía la eficacia biológica de los individuos en diferentes condiciones (Sutherland 1996, Kokko y Rankin 2006, Dobbs *et al.* 2007). Esta incertidumbre nos lleva al último bloque tratado en la discusión general.

## ¿Es la denso-dependencia un motor adaptativo de las estrategias vitales en aves? Cuáles son los factores clave donde actúa la densidad.

Con los resultados obtenidos a largo plazo en base a la aproximación observacional ([capítulo 1](#)) nos planteamos diferentes escenarios para especular sobre el potencial adaptativo de los procesos denso-dependientes en el estornino negro. En una reciente revisión publicada por Wright *et al.* en 2019 sobre la evolución de estrategias vitales modulada por procesos denso-dependientes, propone la co-variación fenotípica en rasgos fisiológicos, morfológicos y de comportamiento como un continuo de posibilidades de selección en función de la densidad. Los resultados que aportamos en esta Tesis sugieren diferentes escenarios que exponemos a continuación (ver Fig. 2).



**Figura 2.** El efecto de la densidad reproductiva en la eficacia biológica/esperanza de vida y la dispersión natal. (a) La agregación de individuos mejora la eficacia biológica/esperanza de vida por medio de una dispersión mayor. (b) El aumento desmesurado de la densidad invierte los patrones de dispersión. (c) Llegado a un rango intermedio de densidad u óptimo la población se encuentra en un balance entre costes y beneficios. Las flechas indican la dirección de las presiones selectivas sugeridas.

Las condiciones de baja densidad provocan una presión selectiva de individuos de condición promedio (Fig. 2, sección a). No hay presión selectiva de individuos preparados para soportar condiciones de alta densidad. Los individuos se desarrollan en condiciones favorables y frecuentemente es beneficioso para el resto de su vida.

En este escenario entrarían en juego los beneficios de la agregación. Por ejemplo, el uso de la información social de presencia de otros individuos facilita encontrar lugares de alimentación, además de diluir la presión depredatoria individual y encontrar pareja, entre otros beneficios. Las parejas reproductivas aisladas estarían en nidos más vulnerables, por tanto debe existir una presión selectiva positiva sobre aquellas parejas propensas a la agregación (Varela *et al.* 2007, Evans *et al.* 2016). Basándonos en las ideas de dispersión de Greenwood (1980) y revisadas por Li y Kokko (2019), un escenario de baja densidad favorecería el incremento de la eficacia biológica de los individuos si son dispersivos. En el caso de las hembras, siendo el sexo más dispersivo generalmente en aves, el principal argumento de dispersar es evitar la endogamia (Perrin y Mazalov 1999, Mabry *et al.* 2013). En los machos desplazarse les ayuda a tener más oportunidades de reproducirse con varias hembras (esto obviamente requiere un sistema de emparejamiento poligínico), y este movimiento adicional finalmente conduce a un aumento de la dispersión en machos (Li y Kokko 2019).

Los resultados del **capítulo 1** muestran que la distancia de reclutamiento aumenta al disminuir la densidad tanto en hembras como en machos. En base a este resultado encontramos que la longitud de los telómeros de individuos criados en baja densidad es mayor (**capítulo 3**). Si esto se traduce en un incremento en la esperanza de vida (Tricola *et al.* 2018), las oportunidades de reproducirse aumentarían, aunque tengan que dispersar a mayores distancias. Este hipotético escenario es interesante ya que la viabilidad de la población se basaría en la heterogeneidad de los individuos (flujo entre individuos).

Las condiciones de alta densidad provocan una presión selectiva de individuos competitivos (Fig. 2, sección b). El ambiente prenatal experimentado por las hembras activarían mecanismos que preparan a la descendencia para un futuro ambiente reproductor similar

al experimentado por la madre (Tscherren *et al.* 2007, Bentz *et al.* 2016, Groothuis *et al.* 2018). Esto derivaría en una selección de los individuos que pueden superar los costes de competición. La producción de individuos con fenotipos “capacitados” para la densidad favorecerá su supervivencia y serán capaces de establecerse en la colonia.

Parte de los resultados del **capítulo 1** apoyan esta idea ya que muestran una reducción de las distancias de dispersión natal de los individuos con origen denso. Además, las tasas de reclutamiento son iguales para los machos tanto en alta como en baja densidad, aunque no en el caso de las hembras. Si los machos en sociedades poligínicas es el sexo que repercute en una mayor eficacia biológica. A nivel poblacional podría compensarse este descenso del reclutamiento en hembras al producir machos competitivos capaces de establecerse en alta densidad. Por otra parte, hemos demostrado con la aproximación experimental que la longitud de los telómeros es menor en ambientes densos. Es necesario rescatar de nuevo el concepto de ‘*silver spoon*’ (Grafen 1988) enunciado en el **capítulo 4**, o el ‘*grow now; pay later*’ (Metcalfe y Monaghan 2001). La densidad llevada a un extremo implicaría costes desde un punto de vista fisiológico a largo plazo. Por tanto, los individuos capaces de superar los umbrales impuestos por la densidad serían capaces de reproducirse bajo esas condiciones, pero los fenotipos competitivos podrían tener un hándicap al reducir su tiempo útil como reproductores en la colonia (asociado a la longitud de los telómeros). Esto nos sugiere una presión selectiva en sentido opuesto al explicado en el escenario (a), ver Figura 2.

Aquellos individuos que no son capaces de acceder a un ambiente altamente competitivo reducirían sus oportunidades de reproducirse en la población, y aumentarían su distancia de dispersión encontrando nuevas oportunidades reproductivas. Por tanto, una reducción del éxito reproductivo a corto y largo plazo (**capítulo 4** reducción supervivencia, **capítulo 1** reducción del reclutamiento en alta densidad), podría no ser tan relevante a nivel poblacional, ya que solo determinados individuos competitivos entrarían como nuevos reproductores.

Sugiriendo una regulación poblacional por medio de aumentar la capacidad de carga (Duckworth, Belloni y Anderson, 2015).

Regulación poblacional mediante procesos denso-dependientes. La densidad poblacional es un factor tan fundamental en la biología de las especies que la evolución de las poblaciones debe regularse por medio de los procesos denso-dependientes (Fig. 2, c).

Es necesario que existan mecanismos que permitan beneficiarse de la densidad. La mayoría de autores sugieren la existencia de un óptimo (Clutton-Brock *et al.* 1985, Travis *et al.* 1999, Sheldon y West 2004, Rodrigues y Johnstone 2014). Obviamente, el rango de las diferentes opciones planteadas en los puntos (a) y (b) serían situaciones extremas. Sin embargo, la amplitud en un hipotético balance entre costes y beneficios podría estar asociado a multitud de factores que actúan a la vez en un contexto denso-dependiente. Una interesante línea de investigación futura es realizar un estudio con un gradiente de densidades para localizar donde se encuentra el óptimo sugerido.

Somos conscientes de las limitaciones que tenemos para responder con un criterio objetivo a la pregunta planteada en esta sección con una aproximación experimental de tan sólo 4 años. Necesitaríamos conocer el reclutamiento completo en la zona de estudio como medida real de la eficacia biológica de las generaciones de estorninos producidas durante el experimento. Por ahora, aunque hemos acumulado datos continúa siendo una incógnita el patrón de reclutamiento y dispersivo en los individuos producidos durante el experimento.

Como anunciamos en las primeras líneas de esta Tesis, abordar los procesos denso-dependientes en vertebrados es un tema complejo por las características intrínsecas de los propios organismos. Hemos evidenciado cambios en el comportamiento de los reproductores, en la respuesta de la descendencia al ambiente experimentado por los

progenitores, en la influencia sobre la dispersión natal y hemos especulado con las posibles estrategias reproductivas que explican nuestros resultados. Las respuestas a las hipótesis planteadas de partida en esta Tesis nos abren nuevas líneas de investigación. Tan sólo hemos rascado la superficie de los procesos denso-dependientes con las aproximaciones planteadas. En las líneas anteriores no se pretende desalentar por las evidencias encontradas, sino todo lo contrario. La conclusión general que extraemos es la necesidad de dirigir el foco de futuros trabajos a preguntas básicas en Ecología. Continuamos lejos de contestar por completo a una pregunta tan fundamental e inherente a las poblaciones animales como su regulación poblacional suscitando un gran interés por avanzar en el conocimiento y predecir las dinámicas de cambio a las que se enfrentan.



## Referencias

- Alatalo, R. V. and Lundberg, A. 1984. Density-Dependence in Breeding Success of the Pied Flycatcher (*Ficedula hypoleuca*). - J. Anim. Ecol. 49: 666–685.
- Andreasson, F., Nord, A. and Nilsson, J. Å. 2016. Brood size constrains the development of endothermy in blue tits. - J. Exp. Biol. 219: 2212–2219.
- Araya-Ajoy, Y. G., Dingemanse, N. J. and Kempenaers, B. 2016. Timing of extrapair fertilizations: Within-pair fertilization trade-offs or pair synchrony spillovers? - Behav. Ecol. 27: 377–384.
- Arlt, D. and Pärt, T. 2007. Nonideal breeding habitat selection: A mismatch between preference and fitness. - Ecology 88: 792–801.
- Bentz, A. B., Navara, K. J. and Siefferman, L. 2013. Phenotypic plasticity in response to breeding density in tree swallows: An adaptive maternal effect? - Horm. Behav. 64: 729–736.
- Bentz, A. B., Becker, D. J. and Navara, K. J. 2016. Evolutionary implications of interspecific variation in a maternal effect: A meta-analysis of yolk testosterone response to competition. - R. Soc. Open Sci. 3: 160499.
- Boonekamp, J. J., Mulder, E. and Verhulst, S. 2018. Canalisation in the wild: effects of developmental conditions on physiological traits are inversely linked to their association with fitness. - Ecol. Lett. 21: 857–864.
- Both, C. 1998. Experimental evidence for density dependence of reproduction in great tits. - J. Anim. Ecol. 67: 667–674.
- Both, C. and Visser, M. E. 2000. Breeding territory size affects fitness: an experimental study on competition at the individual level. - J. Anim. Ecol. 69: 1021–1030.
- Boulinier, T. and Danchin, E. 1997. The use of conspecific reproductive success for breeding patch selection in terrestrial migratory species. - Evol. Ecol. 11: 505–517.
- Boulinier, T., Danchin, E., Monnat, J.-Y., Doutrelant, C. and Cadiou, B. 1996. Timing of Prospecting and the Value of Information in a Colonial Breeding Bird. - J. Avian Biol. 27: 252.
- Boulinier, T., McCoy, K. D., Yoccoz, N. G., Gasparini, J. and Tveraa, T. 2008. Public information affects breeding dispersal in a colonial bird: Kittiwakes cue on neighbours. - Biol. Lett. 4: 538–540.
- Brown, C. R. and Brown, M. B. 1986. Ectoparasitism as a Cost of Coloniality in Cliff Swallows (*Hirundo Pyrrhonota*). - Ecology 67: 1206–1218.
- Chin, E. H., Love, O. P., Clark, A. M. and Williams, T. D. 2005. Brood size and environmental conditions sex-specifically affect nestling immune response in the European starling *Sturnus vulgaris*. - J. Avian Biol. 36: 549–554.
- Clutton-Brock, T. H., Major, M. and Guinness, F. E. 1985. Population Regulation in Male and Female Red Deer. - J. Anim. Ecol. 54: 831–846.

- Dall, S. R. X., Giraldeau, L. A., Olsson, O., McNamara, J. M. and Stephens, D. W. 2005. Information and its use by animals in evolutionary ecology. - *Trends Ecol. Evol.* 20: 187–193.
- Danchin, E. and Wagner, R. H. 1997. The evolution of coloniality: The emergence of new perspectives. - *Trends Ecol. Evol.* 12: 342–347.
- Danchin, E., Boulinier, T. and Massot, M. 1998. Conspecific reproductive success and breeding habitat selection: implication for the study of coloniality. - *Ecology* 79: 2415–2428.
- Danchin, É., Giraldeau, L. A. and Cézilly, F. 2008. Behavioural Ecology. - Oxford University Press.
- DeWitt, T. J., Sih, A. and Wilson, D. S. 1998. Cost and limits of phenotypic plasticity. - *Trends Ecol. Evol.* 13: 77–81.
- Dhondt, A. a., Kempenaers, B. and Adriaensen, F. 1992. Density-Dependent Clutch Size Caused by Habitat Heterogeneity. - *J. Anim. Ecol.* 61: 643–648.
- Dobbs, R. C., Sillett, T. S., Rodenhouse, N. L. and Holmes, R. T. 2007. Population density affects foraging behavior of male Black-throated Blue Warblers during the breeding season. - *J. F. Ornithol.* 78: 133–139.
- Doligez, B., Cadet, C., Danchin, E. and Boulinier, T. 2003. When to use public information for breeding habitat selection? The role of environmental predictability and density dependence. - *Anim Behav* 66: 973–988.
- Evans, J. C., Votier, S. C. and Dall, S. R. X. 2016. Information use in colonial living. - *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 91: 658–672.
- Gil, D., Graves, J. A., Hazon, N. and Wells, A. 1999. Male Attractiveness and Differential Testosterone Investment in Zebra Finch Eggs. - *Science*. 286: 126–128.
- Gil, D., Biard, C., Lacroix, A., Spottiswoode, C. N., Saino, N., Puerta, M. and Möller, A. P. 2007. Evolution of Yolk Androgens in Birds: Development, Coloniality, and Sexual Dichromatism. - *Am. Nat.* 169: 802–819.
- Grafen, A. 1988. On the Uses of DAta on Lifetime Reproductive Success. - In: Clutton-Brock, T. H. (ed), Reproductive success. Studies of individual variation in contrasting breeding systems. University of Chicago Press, pp. 454–471.
- Greenwood, P. J. 1980. Mating systems, philopatry and dispersal in birds and mammals. - *Anim. Behav.* 28: 1140–1162.
- Groothuis, T. G. G. and Schwabl, H. 2002. Determinants of within- and among-clutch variation in levels of maternal hormones in Black-Headed Gull eggs. - *Funct. Ecol.* 16: 281–289.
- Groothuis, T. G. G. and Schwabl, H. 2008. Hormone-mediated maternal effects in birds: Mechanisms matter but what do we know of them? - *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 363: 1647–1661.
- Groothuis, T. G. G., Hsu, B.-Y., Kumar, N. and Tscharren, B. 2018. Revisiting mechanisms and

- functions of prenatal hormone-mediated maternal effects using avian species as a model. - Philos. Trans. R. Soc. B 374: 20180115.
- Hansell, M. 2000. Bird Nests and Construction Behaviour (Cambridge: Cambridge University Press., Ed.).
- Hau, M., Ricklefs, R. E., Wikelski, M., Lee, K. A. and Brawn, J. D. 2010. Corticosterone, testosterone and life-history strategies of birds. - Proc. R. Soc. B Biol. Sci. 277: 3203–3212.
- Herborn, K. A., Heidinger, B. J., Boner, W., Noguera, J. C., Adam, A., Daunt, F., Monaghan, P. and Monaghan, P. 2014. Stress exposure in early post-natal life reduces telomere length : an experimental demonstration in a long-lived seabird. - Proc. R. Soc. B in press.
- Kim, S. Y., Torres, R. and Drummond, H. 2009. Simultaneous positive and negative density-dependent dispersal in a colonial bird species. - Ecology 90: 230–239.
- Kokko, H. and Lundberg, P. 2001. Dispersal, migration, and offspring retention in saturated habitats. - Am. Nat. 157: 188–202.
- Kokko, H. and Rankin, D. J. 2006. Lonely hearts or sex in the city? Density-dependent effects in mating systems. - Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 361: 319–334.
- Ležálová-Piálková, R. 2011. Molecular evidence for extra-pair paternity and intraspecific brood parasitism in the Black-headed Gull. - J. Ornithol. 152: 291–295.
- Li, X. Y. and Kokko, H. 2019. Sex-biased dispersal: a review of the theory. - Biol. Rev. 94: 721–736.
- Mabry, K. E., Shelley, E. L., Davis, K. E., Blumstein, D. T. and van Vuren, D. H. 2013. Social Mating System and Sex-Biased Dispersal in Mammals and Birds: A Phylogenetic Analysis. - PLoS One 8: 1–9.
- Mainwaring, M. C. and Hartley, I. R. 2013. The energetic costs of nest building in birds. - Avian Biol. Res. 6: 12–17.
- Mazuc, J., Bonneaud, C., Chastel, O. and Sorci, G. 2003. Social environment affects female and egg testosterone levels in the house sparrow (*Passer domesticus*). - Ecol. Lett. 6: 1084–1090.
- Metcalfe, N. B. and Monaghan, P. 2001. Compensation for a bad start- grow now, pay later? - Trends Ecol. Evol. 16: 254–260.
- Newton, I. 1998. Population limitation in birds. - Elsevier.
- Nicolaus, M., Tinbergen, J. M., Ubels, R., Both, C. and Dingemanse, N. J. 2016. Density fluctuations represent a key process maintaining personality variation in a wild passerine bird. - Ecol. Lett. 19: 478–486.
- Péron, G., Lebreton, J. D. and Crochet, P. A. 2010. Costs and benefits of colony size vary during the breeding cycle in Black-headed Gulls *Chroicocephalus ridibundus*. - J. Ornithol. 151: 881–888.

- Perrin, N. and Mazalov, V. 1999. Local Competition, Inbreeding, and the Evolution of Sex-Biased Dispersal. - Am. Nat. 155: 116–127.
- Pilz, K. M. and Smith, H. G. 2004. Egg yolk androgen levels increase with breeding density in the European Starling, *Sturnus vulgaris*. - Funct. Ecol. 18: 58–66.
- Polo, V. and Veiga, J. P. 2006. Nest ornamentation by female spotless starlings in response to a male display: An experimental study. - J. Anim. Ecol. 75: 942–947.
- Polo, V., Veiga, J. P., Cordero, P. J., Vinuela, J. and Monaghan, P. 2004. Female starlings adjust primary sex ratio in response to aromatic plants in the nest. - Proc. R. Soc. B Biol. Sci. 271: 1929–1933.
- Polo, V., López-Rull, I., Gil, D. and Veiga, J. P. 2010. Experimental addition of green plants to the nest increases testosterone levels in female spotless starlings. - Ethology 116: 129–137.
- Rodrigues, A. M. M. and Johnstone, R. A. 2014. Evolution of positive and negative density-dependent dispersal. - Proc. R. Soc. B Biol. Sci. in press.
- Rolland, C., Danchin, E. and de Fraipont, M. 1998. The evolution of coloniality in birds in relation to food, habitat, predation, and life-history traits: a comparative analysis. - Am. Nat. 151: 514–529.
- Rowland, E., Love, O. P., Verspoor, J. J., Sheldon, L. and Williams, T. D. 2007. Manipulating rearing conditions reveals developmental sensitivity in the smaller sex of a passerine bird, the European satrling *Sturnus vulgaris*. - J. Avian Biol. 38: 612–618.
- Royle, N. J., Surai, P. F. and Hartley, I. R. 2001. Maternally derived androgens and antioxidants in bird eggs: complementary but opposing effects? - Behav. Ecol. 12: 381–385.
- Rubalcaba, J. G. and Polo, V. 2018. Sex differences in early determinants of lifetime reproductive success in a polygynous bird : Should mothers adjust offspring sex ratios? - Auk 135: 400–408.
- Sachs, J. L., Hughes, C. R., Nuechterlein, G. L. and Buitron, D. 2007. Evolution of Coloniality in Birds: A Test of Hypotheses With the Red-Necked Grebe (*Podiceps Griseogenus*). - Auk 124: 628–642.
- Saino, N., Ferrari, R. P., Romano, M., Martinelli, R., Lacroix, A., Gil, D. and Möller, A. P. 2006. Maternal allocation of androgens and antagonistic effects of yolk androgens on sons and daughters. - Behav. Ecol. 17: 172–181.
- Salmón, P., Nilsson, J. F., Nord, A., Bensch, S. and Isaksson, C. 2016. Urban environment shortens telomere length in nestling great tits, *Parus major*. - Biol. Lett. 12: 20160155.
- Schmidt, K. A., Dall, S. R. X. and van Gils, J. A. 2010. The ecology of information: An overview on the ecological significance of making informed decisions. - Oikos 119: 304–316.
- Schwabl, H. 1996. Maternal testosterone in the avian egg enhances postnatal growth. - Comp. Biochem. Physiol. - A Physiol. 114: 271–276.
- Schwabl, H. 2006. Yolk is a source of maternal testosterone for developing birds. - Proc. Natl. Acad.

Sci. 90: 11446–11450.

Serrano-Davies, E., Barrientos, R. and Sanz, J. J. 2017. The role of nest-box density and placement on occupation rates and breeding performance: A case study with Eurasian Blue Tits. - *Ornis Fenn.* 94: 21–32.

Sheldon, B. C. and West, S. A. 2004. Maternal Dominance, Maternal Condition, and Offspring Sex Ratio in Ungulate Mammals. - *Am. Nat.* 163: 40–54.

Sillett TS, Rodenhouse NL, Holmes RT. 2004. Experimentally reducing neighbour density affects reproduction and behavior of a migratory songbird. - *Ecology.* 85:2467–2477.

Sousa, B. F. and Westneat, D. F. 2013. Positive association between social and extra-pair mating in a polygynous songbird, the dickcissel (*Spiza americana*). - *Behav. Ecol. Sociobiol.* 67: 243–255.

Stearns, S. C. 1992. The evolution of life histories. - Oxford University Press.

Sutherland, W. J. 1996. From individual behaviour to population ecology. - Oxford University Press.

Tobias, J. A., Montgomerie, R. and Lyon, B. E. 2012. The evolution of female ornaments and weaponry: Social selection, sexual selection and ecological competition. - *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 367: 2274–2293.

Tompa, F.S. 1964. Factors determining the numbers of song sparrows *Melospiza melodia* (Wilson) on Mandarte island, B.C. - Canada. *Acta Zoologica Fennica.* 109: 3–73.

Torok, B. Y. J. and Toth, L. 1988. Density Dependence in Reproduction of the Collared Flycatcher (*Ficedula albicollis*) at High Population Levels. - *J. Anim. Ecol.* 57: 251–258.

Travis, J. M. J., Murrell, D. J. and Dytham, C. 1999. The evolution of density-dependent dispersal. - *Proc. R. Soc. London B Biol. Sci.*: 1837–1842.

Tricola, G. M., Simons, M. J. P., Atema, E., Boughton, R. K., Brown, J. L., Dearborn, D. C., Divoky, G., Eimes, J. a., Huntington, C. E., Kitaysky, A. S., Juola, F. a., Lank, D. B., Litwa, H. P., Mulder, E. G. a., Nisbet, I. C. T., Okanoya, K., Safran, R. J., Schoech, S. J., Schreiber, E. a., Thompson, P. M., Verhulst, S., Wheelwright, N. T., Winkler, D. W., Young, R., Vleck, C. M. and Haussmann, M. F. 2018. The rate of telomere loss is related to maximum lifespan in birds. - *Phil. Trans. R. Soc. B* 373: 20160445.

Trivers, R. L. and Willard, D. E. 1973. Natural Selection of Parental Ability to Vary the Sex Ratio of Offspring. - *Science.* 179: 90–92.

Tschirren, B., Fitze, P. S. and Richner, H. 2007. Maternal modulation of natal dispersal in a passerine bird: an adaptive strategy to cope with parasitism? - *Am. Nat.* 169: 87–93.

Varela, S. A. M., Danchin, É. and Wagner, R. H. 2007. Does predation select for or against avian coloniality? A comparative analysis. - *J. Evol. Biol.* 20: 1490–1503.

- Veiga, J. P. and Polo, V. 2005. Feathers at nests are potential female signals in the spotless starling. - Biol. Lett. 1: 334–7.
- Veiga, J. P. and Polo, V. 2008. Fitness consequences of increased testosterone levels in female spotless starlings. - Am. Nat. 172: 42–53.
- Veiga, J. P. and Polo, V. 2016. Estornino negro – *Sturnus unicolor* Temminck. - In: Salvador, A. and Morales, M. B. (eds), Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles. Museo Nacional de Ciencias Naturales. Available from: <http://www.vertebradosibericos.org/>.
- Veiga, J., Moreno, J., Cordero, P. and Minguez, E. 2001. Territory size and polygyny in the spotless starling: resource-holding potential or social inertia? - Can. J. Zool. Can. Zool. 79: 1951–1956.
- Veiga, J. P., Viñuela, J., Cordero, P. J., Aparicio, J. M. and Polo, V. 2004. Experimentally increased testosterone affects social rank and primary sex ratio in the spotless starling. - Horm. Behav. 46: 47–53.
- Vili, N., Szabó, K., Kovács, S., Kabai, P., Kalmár, L. and Horváth, M. 2013. High Turnover Rate Revealed By Non-Invasive Genetic Analyses in an Expanding Eastern Imperial Eagle Population. - Acta Zool. Acad. Sci. Hungaricae 59: 279–295.
- Waddington, C. H. 1942. Canalization of development and the inheritance of acquired characters. - Nature 150: 563–565.
- Wiebe, K. L. 2011. Nest sites as limiting resources for cavity-nesting birds in mature forest ecosystems : a review of the evidence. - J. F. Ornithol. 82: 239–248.
- Wright, J., Bolstad, G. H., Araya-Ajoy, Y. G. and Dingemanse, N. J. 2019. Life-history evolution under fluctuating density-dependent selection and the adaptive alignment of pace-of-life syndromes. - Biol. Rev. 94: 230–247.

---

*Conclusiones*

---



## Conclusiones

A la vista de los resultados obtenidos, las principales conclusiones que se extraen de esta Tesis son:

1. La densidad de reproductores produce cambios en las conductas de señalización tanto en machos (uso de plantas verdes) como en hembras (acarreo de plumas foráneas) incrementando en alta densidad ambas conductas del fenotipo extendido. Estos resultados sugieren un papel clave en la atracción de potenciales parejas reproductivas (plantas verdes) y en la competencia intra-sexual en hembras (plumas foráneas) para establecer vínculos con los machos o como medida de estatus o calidad entre hembras. Esta conclusión no es excluyente con el resto de funciones descritas para ambos rasgos.
2. La proximidad de parejas reproductoras reduce el éxito reproductivo. A corto plazo disminuye la producción de individuos que abandonan el nido. A largo plazo se reduce el número de individuos reclutados como reproductores en la colonia. La denso-dependencia negativa resultaría de la mortalidad de individuos en peor condición física y con limitada capacidad para competir por la disponibilidad de vacantes en zonas de alta densidad.
3. La densidad favorece la filopatria tanto en machos como en hembras, es decir, el comportamiento dispersivo de los individuos se relaciona negativamente con la densidad reproductiva. Por tanto, la densidad reproductiva podría actuar como filtro severo a nivel poblacional ya que las limitaciones impuestas resultan en individuos capaces de establecerse en ambientes altamente competitivos.
4. La densidad reproductiva experimentada por las hembras influye en el fenotipo expresado por la descendencia en el estornino negro vía efectos maternos. En el estornino se ha demostrado una reducción del peso en las hembras frente al mantenimiento de peso de los machos. Estos resultados sugieren que las aves ajustan

su inversión reproductiva en relación al ambiente social experimentado con efectos diferenciales para cada sexo.

5. La densidad de reproductores produce ajustes en la proporción de sexos en las puestas, sin embargo, el efecto encontrado contradice en parte los modelos teóricos. En base a las conclusiones anteriores, si el aumento de densidad reproductiva produce efectos negativos principalmente en las hembras de la descendencia, producir sesgo en las puestas hacia el sexo femenino en alta densidad no sería evolutivamente estable.
6. El incremento experimental de cajas nido redujo la longitud de los telómeros de los individuos producidos. Este resultado sugiere un posible mecanismo relacionado con el ambiente social experimentado por la progenie con futuras implicaciones a largo plazo (esperanza de vida de los individuos). Además, abre la posibilidad a balances entre rasgos que aumentan la eficacia biológica en el corto-medio plazo (peso corporal en machos) frente a otros rasgos con menor importancia en la eficacia biológica.





## ***Financiación***

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos: CGL2014-59670-P y BFU2017-86000-P del Ministerio de Economía y Competitividad. Daniel fuentes Romero recibió la ayuda FPI (BES-2015-075699) del Ministerio de Economía y Competitividad.