

Coloraciones de los huevos y del pico
del estornino negro (*Sturnus unicolor*)
en un contexto de selección sexual

Carlos Navarro Puig

Estación Experimental de Zonas Áridas
Consejo Superior de Investigaciones Científicas

TESIS DOCTORAL

2011

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Carlos Navarro Puig
D.L.: GR 3142-2011
ISBN: 978-84-694-2929-7



CONSEJO SUPERIOR
DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS



Carlos Navarro Puig
Estación Experimental de Zonas Áridas
Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Carretera de Sacramento, s/n, Cañada de San Urbano
E-04120, Almería, Spain
cnavarro@eeza.csic.es
carlos.navarro.puig@gmail.com

Portada diseñada por: Carlos Navarro Puig

Financiada por:

Beca predoctoral FPI: (BES-2005-8619)

Proyectos: (CGL2004-01777/BOS)
(CGL2007-61251)





Departamento de Biología Animal
Facultad de Ciencias
UNIVERSIDAD DE GRANADA

**Coloraciones de los huevos y del pico del estornino negro
(*Sturnus unicolor*) en un contexto de selección sexual**

Memoria presentada por D. Carlos Navarro Puig
para optar al Grado de Doctor en Ciencias Biológicas
por la Universidad de Granada.

Esta tesis ha sido dirigida por el Dr. Juan José Soler Cruz, profesor
de investigación de la Estación Experimental de Zonas Áridas (CSIC),
y tutelada por el Dr. Manuel Soler Cruz, catedrático
de la Universidad de Granada.

En Granada, a de Febrero de 2011

VºBº del director

El Doctorando

Fdo. Juan J. Soler Cruz

Fdo: Carlos Navarro Puig

A Raquel y a Carlos

*Por su cariño, comprensión,
apoyo y aliento*

**Coloraciones de los huevos
y del pico del estornino negro
(*Sturnus unicolor*) en un
contexto de selección sexual**

ÍNDICE

1. RESUMEN	5
2. INTRODUCCIÓN	7
3. OBJETIVOS	17
4. MÉTODOS	21
4.1. Especie modelo y área de estudio	21
4.2. Protocolo de manipulación de la condición corporal de las hembras	23
4.3. Metodología para la creación de huevos artificiales de estornino coloreados	26
4.4. Manipulación del color de la puesta	27
4.5. Estimación de la tasa de ceba parental	28
4.6. Manipulación de la condición nutricional de los pollos	28
4.7. Test de la fitohemaglutinina (PHA)	30
4.8. Medición del color	31
4.9. Método de estimación del contenido de carotenoides y vitaminas en huevos y plasma	35
4.10. Métodos estadísticos	37
5. RESULTADOS	41
5.1. Objetivo 1. Condición corporal de las hembras y coloración verde azulada de los huevos	41
5.2. Objetivo 2. Manipulación experimental de la coloración de los huevos y tasa de ceba parental	42
5.3. Objetivo 3. Coloración de los huevos y condición nutricional de los pollos	44

5.4. Objetivo 4. Coloración de los huevos y contenido de carotenoides y vitaminas A y E en la yema	46
5.5. Objetivo 5. Coloración del pico como señal indicadora del contenido de carotenoides y vitaminas A y E en plasma...	47
6. DISCUSIÓN	53
7. CONCLUSIONES	63
8. BIBLIOGRAFÍA	65
TABLAS	83
ARTÍCULOS DE LA TESIS PUBLICADOS	89
AGRADECIMIENTOS	131

1. RESUMEN

*Lo peor no es cometer un error,
sino tratar de justificarlo, en vez de
aprovecharlo como aviso providencial de
nuestra ligereza o ignorancia.*

Santiago Ramón y Cajal

Recientemente se ha sugerido que la coloración verde azulada de los huevos de algunas especies de aves podría funcionar como una señal sexual después del emparejamiento que reflejaría la condición fisiológica de las hembras en el momento de la puesta, y que los machos utilizarían para ajustar su esfuerzo parental en la crianza de los pollos (hipótesis SSEC). Esta hipótesis se basa en que la biliverdina, que es el pigmento responsable de esta coloración verde azulada de la cáscara del huevo, es un potente antioxidante; por ello, sólo aquellas hembras en buenas condiciones físicas y con reservas suficientes de antioxidantes serían capaces de usar una mayor cantidad de pigmentos para exagerar dicha señal. Además estas hembras, más resistentes al estrés oxidativo, también podrían depositar mayor cantidad de antioxidantes en la yema del huevo. Estos elementos son fundamentales para el correcto desarrollo del embrión y afectan a la calidad fenotípica de los pollos. Además, algunos antioxidantes pigmentarios participan también en la expresión de otros caracteres de las aves, como es el color de las plumas y de los tejidos frescos; en este caso, la intensidad de esta coloración indicaría su condición fisiológica. En este contexto teórico, usando al estornino negro (*Sturnus unicolor*) como modelo, esta tesis doctoral trata de comprobar,

por un lado, la hipótesis SSEC y, por otro, de explorar la posibilidad de que la coloración del pico de este ave refleje la concentración de antioxidantes en su sangre.

Para comprobar la hipótesis SSEC hemos realizado tres aproximaciones experimentales. En un primer experimento aumentamos la carga alar de las hembras unas semanas antes de la puesta. Esta manipulación afectó a su condición física durante la puesta y a la intensidad de la coloración de los huevos. En un segundo experimento utilizamos huevos artificiales coloreados con dos intensidades de coloración verde azulada que sustituyeron a los huevos naturales y demostramos un efecto de la intensidad de la coloración en la tasa de cebas de los machos que se mantuvo a distintas edades de los pollos. En la última aproximación experimental manipulamos el ambiente nutricional de algunos pollos de los nidos experimentales mediante una alimentación suplementaria y encontramos que las diferencias en la respuesta inmunitaria entre los pollos alimentados y los no alimentados era menor en los nidos donde se habían incubado huevos de color verde azulado más intenso. También analizamos el contenido en antioxidantes (carotenoides y vitamina A) de la yema de los huevos y hemos podido poner de manifiesto una relación entre la coloración de éstos y la concentración de antioxidantes (inversión maternal). Estos resultados indican que el color verde azulado de los huevos de esta especie es una señal sexual de las hembras con la que indican a los machos su condición fisiológica y la inversión maternal realizada en los huevos.

También encontramos evidencias de que la coloración del pico de los machos y de las hembras de estornino puede ser utilizado para señalar-conocer su estado fisiológico. El pico de los estorninos es de color amarillo intenso durante el comienzo de la estación reproductora y se va oscureciendo a medida que ésta avanza y hemos constatado la existencia de diferencias sexuales tanto en su coloración como en su variación estacional. Además, el análisis de la concentración de antioxidantes en el plasma sanguíneo puso de manifiesto diferencias sexuales en el contenido de antioxidantes en plasma. Por tanto, la coloración del pico en los machos y en las hembras podría estar funcionando también como una señal indicadora de la calidad antioxidativa de los individuos. Todos estos resultados apoyan la existencia de caracteres sexuales secundarios (CSS) en las hembras de estornino negro. Los estudios de CSS en hembras son bastante escasos y los resultados de esta tesis sugieren que el color del pico en hembras de estornino negro es un rasgo candidato para jugar un papel en los procesos de selección sexual.

2. INTRODUCCIÓN GENERAL

Y cuanto más aprendemos de la naturaleza de las cosas, más evidente es que lo que llamamos descanso es solo actividad desapercibida; que lo que llamamos la paz no es sino una batalla extenuante.

Thomas Henry Huxley

Cuando Darwin publicó su libro "*The Origin of Species*" (1859) se tuvo que enfrentar a un hecho controvertido acerca de su *Selección Natural*. Darwin sugería que aquellos caracteres que aumentan la eficacia biológica de los individuos incrementando su supervivencia, y por tanto el éxito reproductor de su poseedor, serían seleccionados y verían aumentada su frecuencia en la población en sucesivas generaciones. Pero el problema, en muchos casos, es que los individuos son portadores de caracteres ostentosos que, aparentemente, reducen la capacidad de supervivencia del su portador. Él mismo dio solución a esta controversia poco después, en 1871, en su libro "*The descent of Man and the Selection in Relation to Sex*", mediante la consideración de un tipo de proceso selectivo que denominó *Selección Sexual*. Definió la selección sexual como una variante de la selección natural que actúa sobre los rasgos asociados al éxito del emparejamiento de tal forma que estos caracteres ostentosos, a los que denominó *Caracteres Sexuales Secundarios* (CSS), se seleccionarían gracias al incremento del éxito reproductor de sus poseedores, a través de la preferencia por individuos del otro sexo, a pesar incluso de influir negativamente en su supervivencia. Zahavi (1975) propuso que estas señales

sexuales, además, deberían indicar de forma fiable la calidad fenotípica de los individuos portadores gracias a que los costes de producir y mantener las señales serían relativamente menores para aquellos individuos de mejor calidad. En este escenario, solamente los individuos de alta calidad podrían permitirse tales gastos, por lo que la posesión de costosos hornamentos indicaría honestamente su calidad gracias al handicap que suponen los CSS. Estas señales honestas pueden actuar en contextos intra-sexuales (v.g., Møller, 1987, McGraw y Hill, 2000) o inter-sexuales (v.g., Møller, 1988, Petrie, 1994).

Muchos de los CSS consisten en llamativas coloraciones (de plumas, de piel, etc.) que son dependientes de pigmentos que, como los carotenoides, tienen importantes funciones fisiológicas. Los carotenoides son pigmentos orgánicos del grupo de los terpenos que engloban a más de seiscientas moléculas diferentes y que se sintetizan en los cloroplastos y en los cromoplastos de las plantas y en otros organismos fotosintéticos como algas, hongos y algunas bacterias. Los carotenoides absorben energía de la luz azul para la fotosíntesis y protegen a la clorofila del daño solar (Armstrong y Hearst, 1996). No pueden ser sintetizados *de novo* por los animales —excepto, al menos, en una especie de pulgón que sí puede sintetizarlo por sí mismo como consecuencia de la transmisión horizontal de los genes (Moran and Jarvik, 2010)— y por lo tanto los animales deben adquirirlos a partir de plantas y herbívoros en su dieta (Kodric-Brown, 1989; Hill, 1991; Olson y Owens, 1998). En consecuencia, la intensidad de su coloración estaría vinculada a la capacidad de un individuo para adquirir alimentos ricos en estos pigmentos (Endler, 1980; Hill, 1999). Los carotenoides, en general, tienen un importante papel en el estado de salud de los individuos gracias a sus acciones de inhibición de radicales libres (Burton e Ingold 1984; Møller et al., 2000; Chew y Park, 2004; Martínez et al., 2008; pero v.et. Costantini y Møller, 2008) y de estimulación del sistema inmune (Møller et al. 2000), por lo que su utilización como CSS revelaría honestamente la calidad de los señalizadores. Algunos estudios, en los que se ha manipulado la dieta (Blount et al., 2003; McGraw y Ardia, 2003) y la inmunocompetencia (Faivre et al., 2003; Alonso-Alvarez et al., 2004) de algunas aves, han producido resultados consistentes con esta hipótesis. Las madres transfieren carotenoides a los embriones que son importantes para la calidad de los hijos y para la regulación de su desarrollo embrionario (v.g. la expresión génica y la actividad de factores de crecimiento y hormonas; Hofmann y Eichele, 1994), y que, en el caso de los huevos de las aves, afectan al desarrollo y a la expresión de algunos componentes del sistema inmune relacionados con la probabilidad de supervivencia de las

crías (Saino et al., 2003; Blount et al., 2003; McGraw y Ardia, 2003), así como también proporcionan al embrión importantes defensas frente al estrés oxidativo durante la maduración de las células y de los tejidos (Surai y Speake, 1998). Además de los carotenoides existen también otros antioxidantes de naturaleza no pigmentaria (v.g. vitaminas C, E y A) que, por su relación fisiológica con ellos, podrían ser señalizados a través de las coloraciones dependientes de carotenoides como caracteres sexuales secundarios (Hartley y Kennedy, 2004). Así, por ejemplo, varios estudios experimentales han mostrado una relación positiva entre la concentración en sangre de antioxidantes no pigmentarios (v.g., vitamina E) y la coloración de las aves y de los peces (v.g. Bertrand et al., 2006; Pérez et al., 2007; v.et. Karu et al., 2008). A pesar de las evidencias de la relación entre antioxidantes pigmentarios y no pigmentarios, no se conoce si ésto ocurre para todos los tipos de vitaminas incoloras: el sistema integrado antioxidante de los animales es bastante complejo (Surai, 2002) y diferentes tipos de carotenoides (v.g. β -carotenos, hydroxycarotenoids y ketocarotenoids) pueden tener diferente actividad antioxidante e interactuar de forma distinta con diferentes vitaminas o con otros componentes antioxidantes (Catoni et al., 2008). Además, distintos factores ecológicos y genéticos podrían afectar a la concentración de distintos antioxidantes en la sangre y en distintos caracteres sexuales secundarios (Tella et al., 2004, Cohen et al., 2009), por lo que la hipotética señalización de la capacidad antioxidante tendría un componente ecológico y filogenético. Por ello, para comprender el funcionamiento de estas señales es imprescindible su estudio en distintos contextos ecológicos y filogenéticos.

Los CSS se han estudiado principalmente en los machos, en los que en general éstos suelen ser más extravagantes que en las hembras. Las aves han sido muy utilizadas para estos estudios y en ellas se ha puesto de manifiesto que las coloraciones vistosas de las hembras han evolucionado frecuentemente en la historia evolutiva de este grupo y que, en la mayoría de los casos, deben de ser fruto de procesos de selección sexual (v.g. Irwin, 1994; Price y Birch, 1996; Omland, 1997; Burns, 1998; Amundsen, 2000). Como en el caso de los machos, los caracteres sexuales secundarios de las hembras pueden funcionar en contextos inter- (v.g. Bernet et al, 1998; *Charadrius morinellus* (Owens et al., 1994) o intra-sexuales (v.g. Langmore, 1998; Bleiweiss, 1992; Heinsohn et al., 2005). Dentro del contexto inter-sexual, son generalmente las hembras las que realizan mayor inversión en la reproducción y, por tanto, es el sexo que elige a la pareja. Los estudios teóricos, sin embargo, sugieren que la selección de la pareja puede ser un proceso bidireccional, en el

que no es solamente uno de los sexos el que elige actuando el otro de forma pasiva, sino que dicho emparejamiento puede ocurrir mediante una selección mutua (Anderson, 1994; Parker, 1983). En estos casos de selección mutua de pareja, los procesos de selección sexual podrían estar ocurriendo en los machos y en las hembras sobre los mismos (v.g. Jones y Hunter, 1993, 1999), o sobre distintos CSS de los dos sexos (ver Amundsen, 2000).

Teniendo en cuenta el desequilibrio existente entre machos y hembras respecto a la inversión en reproducción, Trivers (1972) ha llamado la atención sobre la existencia de conflictos sexuales a la hora de que machos y hembras decidan la inversión en un determinado suceso reproductivo. Posteriormente, Burley (1986) ha propuesto la hipótesis sobre la inversión parental diferencial como una posible solución al conflicto sexual sobre la inversión en reproducción. Esta hipótesis propone que cada uno de los miembros de la pareja podrían usar los caracteres sexuales secundarios del otro (si existiesen en los dos), junto con otras señales de calidad reproductora (v.g. edad, salud, etc.), para ajustar la inversión óptima en reproducción. Las hembras y los machos que invirtieran diferencialmente en función del atractivo (o de la inversión) de su pareja, tendrían mayor eficacia biológica que los que no lo hicieran y, por tanto, los CSS, al menos en parte, se seleccionarían gracias a las inversiones diferenciales de aquella.

La inversión diferencial en función de CSS de la pareja puede ocurrir después del emparejamiento incluso en especies monógamas, por lo que es un mecanismo de selección sexual que tendría lugar después de formarse la pareja. Otros procesos de selección sexual después del emparejamiento o cópula tienen lugar cuando, por ejemplo, se da la competencia espermática (entre espermatozoides de distintos machos) o selección críptica de esperma por la hembra (v.g. Birkhead and Møller, 1998). Estos mecanismos explican que en muchas especies de aves las exhibiciones de cortejo se mantenga hasta después de la cópula (Eberhard, 1996). Al igual que ocurre con la selección sexual relacionada con el emparejamiento, la selección sexual post-emparejamiento también puede influir en la evolución de los CSS de la pareja (v.g. Soler et al., 1996; Soler et al., 1998; Moreno y Osorno, 2003). Si bien son muchos los estudios experimentales que han puesto de manifiesto la existencia de una relación entre los CSS de los machos y la inversión diferencial de las hembras (ver revisión en Sheldon, 2000), son bastantes escasos los estudios que han abordado experimentalmente la posibilidad de una inversión diferencial del macho en función del atractivo de la hembra.

Sheldon (2000) propone una serie de requerimientos que sería necesario tenerlos en cuenta a la hora de llevar a cabo un estudio sobre inversión diferencial. Destaca la importancia de utilizar una aproximación experimental. En este sentido, el sistema de estudio tendría que permitir la manipulación del atractivo de la pareja, experimento que se podría realizar bien manipulando el fenotipo o bien mediante el cambio experimental de pareja. Una simple correlación entre la inversión y la calidad de la pareja podría explicarse de diferentes formas que no tiene por qué ser causadas por la hipótesis de inversión diferencial, además, de ser necesario que las parejas pudieran ser distribuidas aleatoriamente entre los tratamientos. Así, si por ejemplo se manipula la apariencia del individuo antes de que la pareja esté formada, esta manipulación no solo podría afectar a la inversión diferencial sino también a la elección de pareja y, en este caso, no sería posible distinguir entre los efectos debidos a los procesos acontecidos antes y después del emparejamiento. Todo ello hace que, aunque existen numerosas aproximaciones correlacionales que apuntan a la existencia de una inversión diferencial, pocas son las que tratan de abordar experimentalmente esta inversión diferencial de los machos y su efecto sobre el desarrollo de los CSS de las hembras.

Las señales indicadoras de la calidad fenotípica de los individuos no se reducen exclusivamente a la parte visual externa del propio individuo como son el tamaño, la coloración de las plumas, el color del pico o el color de las patas, sino que esta calidad fenotípica puede también expresarse con rasgos externos, del tipo fenotipo extendido (*sensu* Dawkin, 1982), que son resultado de la actividad de los individuos y que actúan de forma independiente a otras señales. Estos rasgos de fenotipo extendido, en el caso de las aves, incluirían por ejemplo los nidos, los huevos, etc.; rasgos que, al tener un fuerte componente genético y estar relacionados con la eficacia biológica, habrían evolucionado mediante procesos de selección. El ejemplo clásico de fenotipo extendido en las aves es la construcción del nido, el cual se ha demostrado en varias especies que es un carácter que funciona como una señal honesta de la calidad del macho, que es seleccionado por las hembras afectando a su inversión parental (Evans, 1997; Moreno et al., 1994; Soler et al., 1998; ver revisión en Hansell, 2000). Estos caracteres sexuales extendidos podrían seguir funcionando incluso después del emparejamiento, afectando a la inversión parental de los padres (ver revisión en Schaedelin y Taborsky, 2009). En el caso de que el carácter extendido fuera el de las hembras y estuviera relacionado con su calidad fenotípica, los machos podrían utilizarlo y, en función de la expresión de este carácter, ajustar su esfuerzo reproductor, como puede ser el caso de la coloración de los huevos de las aves (Moreno y Osorno, 2003).

La coloración de los huevos de las aves es muy variable, y aunque existen patrones comunes a distintos niveles taxonómicos, la función o el valor adaptativo de ella no están claros. Hasta el momento se han sugerido distintas hipótesis funcionales que intentan explicar la variación en esta coloración tanto entre distintas especies como dentro de una misma (ver revisiones en (Underwood and Sealy 2002)). Dichas posibles funciones pueden estar relacionadas con características físicas de los pigmentos (v.g. filtrado de radiaciones y proporcionar resistencia a la cáscara del huevo), directamente con el color de los mismos (mimetismo con el medio que los rodea, disminuyendo el riesgo de depredación; reconocimiento de los propios huevos y, por tanto, de los huevos parásitos) o, también, con los costos de producción de los pigmentos que han dado lugar a la coloración de los huevos (señalización de la condición de la hembra; Moreno y Osorno, 2003). Una de las hipótesis más antiguas relacionada directamente con la coloración del huevo sugiere que las distintas coloraciones de los huevos se han de interpretar como el resultado de presiones selectivas de depredación, ya que los huevos más crípticos en el ambiente serán también los más difícilmente detectados por los depredadores. Esta función se ha intentado comprobar en distintas especies con resultados dispares (v.g. (Weidinger 2001)). La interpretación más generalizada para estos resultados es que esta función puede ser más importante para las especies que nidifican en el suelo (v.g. Timbergen et al., 1961; Solís y de Lope, 1995), ya que la importancia del mimetismo debe de ser menor para las especies que nidifican en arbustos o entre vegetación (Götmark 1992), y menor aun para las especies que nidifican en agujeros con poca luminosidad. En este tipo de nidos, los depredadores podrían localizar los nidos solamente detectando la actividad parental de los adultos (Martin et al. 2000) o, directamente, buscando nidos conspicuos (Møller 1990).

Otra hipótesis que explica la coloración de los huevos en las aves que nidifican en el suelo, aunque enfocada en este caso a las aves con marcado carácter colonial, como es el caso de las gaviotas, sugiere que la coloración del huevo y sus diferentes patrones podrían ser utilizados para el reconocimiento de los huevos propios por parte de los adultos (Birkhead, 1978). Igualmente centrado en la detectabilidad de los huevos, aunque en este caso para especies que anidan en cavidades o construyen nidos cerrados, Avilés y colaboradores (2006) propusieron que la coloración UV de los huevos de algunas especies de aves que nidifican en ambientes con poca luminosidad podría favorecer su detectabilidad. El parasitismo de cría también podría influir en la evolución de la coloración de los huevos de las aves: los parásitos de cría ponen sus huevos en nidos de otros individuos, bien de su misma especie (parasitismo intraespecífico) o bien

de otras (parasitismo interespecífico), provocando en la mayoría de los casos una drástica reducción del éxito reproductor de sus hospedadores. Esta reducción del éxito reproductor favorece la aparición de defensas en los hospedadores frente a los parásitos de cría, de las cuales el reconocimiento y la expulsión de huevos es la más importante (Rothstein 1990). En este sentido, se ha propuesto que las variaciones en los patrones de coloración a nivel individual y específico es lo que permite a los hospedadores distinguir más fácilmente los huevos propios de los huevos parásitos (Øien et al., 1995; Soler y Møller, 1996) (Stokke et al. 2002; Petrie and Møller 1991). Así, por ejemplo, una disminución en la variación intrapuesta favorecería el reconocimiento de huevos extraños y provocaría, además, un aumento de la variación inter-puesta, dificultando el mimetismo de los huevos parásitos respecto a los de la especie hospedadora (Soler y Møller, 1996). Por tanto, aunque esta función no explicara por sí sola la variación en la coloración de los huevos entre distintas especies, sí que podría explicar la variación existente entre individuos de la misma especie.

Otras hipótesis se centran en las propiedades físico-químicas de los pigmentos que dan coloración a los huevos. Así Gosler et al. (2005) propusieron que las cualidades térmicas y mecánicas de las protoporfirinas que dan color a las manchas ocre de los huevos de muchas especies de aves tendrían una función térmica y afectarían a la dureza de los huevos. En relación a éstos y otros compuestos pigmentarios de las cáscaras de los huevos y a sus propiedades químicas, Moreno y Osorno (2003) lanzaron la hipótesis de la "Selección Sexual de la Coloración de los Huevos" (SSEC). En esta hipótesis proponen que, en especies de aves con cuidado biparental que ponen huevos de color verde azulado, la intensidad de esta coloración podría estar funcionando como un carácter sexual post-copula, de forma que indicaría al macho la calidad de la hembra y/o la inversión realizada en la progenie, lo que le permitiría ajustar así su esfuerzo reproductor. Esta hipótesis está basada en el hecho de que el pigmento responsable de esta coloración verde azulada de la cáscara de los huevos, la biliverdina (Kennedy and Vevers 1976), es un potente antioxidante y de que, por tanto, su uso en la cáscara de los mismos sería costoso para la hembra, pero indicaría a su pareja su calidad fenotípica.

La biliverdina se encuentra en la cáscara de los huevos en forma de biliverdina-IX y biliverdina quilato de zinc. La biliverdina-IX es un derivado de la desintegración del grupo hemo de la hemoglobina en aves, peces, anfibios y animales herbívoros, y es transformada en bilirrubina en los animales carnívoros y omnívoros (Hudson y Smith, 1975; Ponka, 1997). Ambos

pigmentos cumplen una función fisiológica importante en el organismo ya que poseen importantes propiedades antimutagénicas y antioxidantes en condiciones naturales, habiendo demostrado ser unos potentes eliminadores de radicales peróxido, e inhibiendo los efectos perjudiciales de los hidrocarburos policíclicos aromáticos, aminos heterocíclicos y otros oxidantes de alto poder mutagénico (Stocker et al., 1987; Ohruí et al., 2003). La biliverdina causante de la coloración verde azulada de los huevos es sintetizada directamente por la glándula responsable de la formación de la cáscara de éste (Zhao et al., 2006), estando controlada genéticamente la producción de dicho pigmento por el locus dominante *O* situado en el brazo p del cromosoma 1 (Crawford, 1990). Por lo tanto, dada la importancia como antioxidante de la biliverdina, y puesto que las hembras durante la puesta están sometidas a altos niveles de estrés oxidativo (e.g., Von Schantz et al. 1999; Alonso-Alvarez et al. 2004), sólo aquellas hembras poseedoras de altas reservas de antioxidantes y en buenas condiciones fisiológicas podrían ser capaces de destinar altas cantidades de biliverdina a la exageración de la coloración verde azulada de la cáscara (Moreno and Osorno 2003). De ahí se desprende el valor informativo que para los machos tendría la intensidad del color verde-azulado de los huevos de sus parejas, y las ventajas que les conllevaría ajustar su esfuerzo reproductor a la señal de las hembras.

De esta SSEC se pueden desprender tres predicciones principales. (i) La primera es que la coloración verde azulada de los huevos debería reflejar la condición de la hembra en el momento de la puesta: esta predicción ha recibido algunos apoyos empíricos en los que se ha mostrado que la condición corporal de las hembras, medida como los residuos de la regresión del peso y del tarso durante la reproducción, está positivamente relacionada con la intensidad de la coloración verde azulada de los huevos en diferentes especies, como es el caso del papamoscas cerrojillo (*Ficedula hypoleuca*) (Moreno et al., 2005), el azulejo gorjicanelo (*Sialia sialis*) (Siefferman et al., 2006), el papamoscas collarino (*Ficedula albicollis*) (Krist y Grim, 2007) y la gaviota de Delaware (*Larus delawarensis*) (Hanley et al., 2008). (ii) La segunda predicción sugiere que los machos deberían ajustar su comportamiento parental, como son la incubación, la defensa del nido, la alimentación de los pollos, etc., en función de la intensidad de la coloración verde azulada de la cáscara de los huevos; así, algunos estudios empíricos han mostrado que los machos suministran más alimentos a los pollos cuando éstos han nacido en nidos donde los huevos mostraban una coloración más verde azulada (Moreno et al., 2004; Hanley et al., 2008; Morales et al., 2010), aunque en otros casos no ha llegado a detectarse esta relación (Krist y Grim, 2007; Hanley y Doucet, 2009; ver revisión en Reynolds et al., 2009). (iii) La tercera predicción es que los cambios producidos en el es-

fuerzo paternal a consecuencia de la coloración de los huevos deberían verse reflejados en la condición de los pollos, y además que, como reflejo de la señalización de la calidad fisiológica de las hembras, la coloración verde azulada de los huevos debería reflejar la inversión materna en diferentes moléculas de la yema de los huevos y, por tanto, en la calidad de éstos. En este caso, el color de los huevos no solo reflejaría la calidad de la hembra, sino también la inversión que ha realizado en la producción de los mismos, en términos de concentración de productos químicos esenciales para el desarrollo de los embriones (Morales et al., 2006). Esta posibilidad, por tanto, predeciría (iv) una relación positiva entre intensidad de coloración y concentración de productos esenciales (v.g. anticuerpos, antioxidantes, etc.) en los huevos. De acuerdo con esta hipótesis, se ha encontrado que la coloración verde azulada de los huevos refleja la concentración de inmunoglobulinas en la yema de los huevos de papamoscas cerrojillo (Morales et al., 2006), la concentración de testosterona en el estornino negro (*Sturnus unicolor*), o la concentración de carotenoides en el cuco europeo (*Cuculus canorus*) y en el carricero tordal (*Acrocephalus arundinaceus*) (Hargitai et al., 2010) [como resultado negativo, ver el caso de dos especies de mirlos introducidas en Nueva Zelanda (*Turdus merula* y *Turdus philomelos*) estudiado por Cassey et al., 2008].

La importancia de esta hipótesis radica en que plantea una función general de la coloración de los huevos de las aves, sobre todo de las coloraciones azuladas o verdosas causadas por la biliverdina. Así, por ejemplo, (Underwood and Sealy 2002) concluyen, en su revisión sobre el valor adaptativo de la coloración de los huevos, que "para la mayoría de las especies el significado adaptativo de los huevos azules es un misterio". Además, y en este mismo sentido, esta hipótesis sugiere un mecanismo que permitiría, en mayor o menor medida, una resolución del conflicto sexual existente entre machos y hembras a la hora de decidir su inversión parental, buscar cópulas extra-pareja, etc. (Andersson 1994), así como también propone la existencia de un ornamento en las hembras que, en caso de demostrarse su importancia en distintas especies de aves, permitiría el estudio de un CSS más o menos generalizado. Otra ventaja de la utilización de este carácter en los estudios de selección sexual es que no se expresa en los machos y, por tanto, que no se podría explicar como una mala adaptación de las hembras debido a una correlación genética con los caracteres seleccionados sexualmente en los machos (Lande, 1980; Muma y Weatherhead, 1989; Cuervo et al., 1996). Por ello, la hipótesis SSEC, además de proponer la coloración de los huevos como un ornamento fácil de estudiar, podría permitir el esclarecimiento de la importancia de los procesos de selección sexual en las hembras.

Los objetivos de esta tesis se encuadran dentro de este contexto teórico de los procesos de selección sexual mutua de los caracteres de los machos y de las hembras y, en especial, de aquellos relacionados con la coloración de los huevos, en una especie poligínica con huevos verde azulados como es el estornino negro.

3. OBJETIVOS

*Aquel que duda y no investiga,
se torna no sólo infeliz,
sino también injusto.*

Blaise Pascal

En esta tesis doctoral nos hemos planteado abordar las principales predicciones que se desprenden de la hipótesis propuesta por Moreno y Osorno (2003) sobre la SSEC que, como hemos expuesto anteriormente, sugiere que la coloración de los huevos de las aves puede ser un carácter sexual secundario por el cual las hembras muestran su calidad fenotípica o genética a su pareja, y que los machos la utilizan ajustando a ella su inversión en reproducción. Para comprobar dichas predicciones, hemos utilizado como especie modelo el estornino negro, que es un ave en el que el cuidado de la progenie es de carácter biparental y cuyos huevos presentan una coloración típicamente verde azulada (ver **Métodos**), lo que lo convierte en un modelo tipo para la hipótesis de SSEC.

Como primer objetivo de la tesis (**Objetivo 1**) nos hemos propuesto abordar experimentalmente si, como predice la SSEC, la coloración de los huevos está influenciada por la condición corporal de las hembras, como cabría esperar si realmente la deposición de pigmentos (biliverdina) en la cáscara fuese costoso para ella en el momento de la puesta. Para ello, hemos manipulado experimentalmente la condición física de aquellas antes de la puesta, mediante la imposición de un hándicap (ver **Métodos**), y posteriormente hemos medido y analizado si, como predice la SSEC, la

coloración de los huevos puestos por estas hembras experimentales es menos intensa que la de los huevos de otras hembras control. La detección de un efecto experimental indicaría que la coloración verde azulada de estos huevos es una señal honesta que indicaría la calidad fisiológica las hembras. Sólo aquellas en óptima condición fisiológica serían capaces de invertir suficiente cantidad de pigmentos en exagerar la intensidad de esta señal (Zahavi 1975).

Como segundo objetivo de esta tesis (**Objetivo 2**) nos hemos propuesto testar si la intensidad de la coloración verde azulada de la cáscara de los huevos del estornino afecta a la inversión parental de los machos. Esta es la principal predicción de la hipótesis, ya que su corroboración indicaría la función adaptativa de la, en principio, costosa coloración verde azulada de los huevos. Como medida de la inversión paterna de los machos en el cuidado de la progenie hemos utilizado el suministro de alimento que aportaban los machos a los pollos en sus nidos, nidos que previamente se había manipulado mediante la colocación en ellos de huevos experimentales de diferente intensidad de coloración verde azulada (ver **Métodos**).

Como tercer objetivo (**Objetivo 3**) nos hemos planteado comprobar si realmente la coloración verde azulada de los huevos predice el ambiente nutricional que experimentan los pollos durante su desarrollo. Para ello hemos manipulado el ambiente nutricional de algunos pollos en el nido mediante una alimentación suplementaria, dejando a los demás como control en el mismo nido. Después hemos estimado la respuesta inmune a la fitohemaglutinina (PHA; ver **Métodos**), la cual ha demostrado ser un buen indicador de la condición nutricional de los pollos durante su desarrollo (Alonso-Álvarez y Tella 2001). Nuestra predicción es que si el color de los huevos predice el ambiente nutricional de los nidos, las diferencias entre los pollos con y sin alimento extra tendría que ser menor en aquellos nidos con huevos más azulados.

Otra posibilidad, que podría explicar también esta mejor condición de los pollos procedentes de nidos con huevos más intensamente verde azulados, y que además se relacionaría directamente con la esperada mejor condición fisiológica de las hembras que ponen huevos de coloración más intensa, es que la intensidad de coloración verde azulada esté positivamente relacionada con una mayor inversión maternal (al incluir en sus huevos una mayor cantidad de nutrientes, hormonas, anticuerpos y/o antioxidantes), importante para el desarrollo del embrión (Surai et al., 2001a,b; Saino et al., 2003). En este escenario, nos planteamos el cuarto

objetivo (**Objetivo 4**), para el cual hemos estimado la concentración de algunos tipos de antioxidantes, como son los carotenoides y las vitaminas A y E (ver **Métodos**) presentes en la yema de los huevos, y la hemos relacionado con la intensidad de coloración verde azulada de la cáscara de los mismos. Dichos antioxidantes (carotenoides y vitaminas A y E) no pueden ser sintetizados por los vertebrados y son un recurso limitado para las hembras a la hora de incluirlos en la yema del huevo. Por tanto, las evidencias de esa asociación sugerirían que el color de los huevos no solo indicaría al macho la calidad de la hembra sino, también, la inversión materna realizada por ésta.

Como quinto objetivo (**Objetivo 5**) nos hemos planteado el estudio de los caracteres morfológicos de los estorninos negros que pudieran indicar la calidad fenotípica de los machos y de las hembras y que, por tanto, pudieran estar implicados en procesos de selección sexual mutua. En concreto, nos hemos propuesto comprobar si la coloración amarillento anaranjada que durante la época de cría presenta el pico de los estorninos, tanto machos como hembras (ver **Métodos**), podría reflejar la concentración en sangre de algunos antioxidantes presentes en el plasma sanguíneo (carotenoides y vitamina A). Al contrario de lo que ocurre con la coloración de otros ornamentos, como son las plumas y otros tejidos inertes, los pigmentos responsables de la coloración de tejidos vivos, como la piel y el pico, son movilizados continuamente (Lozano, 1994) y, por tanto, podrían señalar la condición fisiológica a corto plazo, tanto de las hembras como de los machos. Para ello (i) tendríamos que estudiar posibles diferencias sexuales en la coloración amarilla del pico de los estorninos, (ii) investigar las relaciones entre la coloración del pico y los niveles plasmáticos de carotenoides y de vitaminas, así como con la condición corporal de los machos y hembras, y (iii) examinar los cambios en la relación entre la coloración del pico y los carotenoides y vitamina A presentes en el plasma y la condición corporal en la época de reproducción. Nuestras predicciones iniciales han sido que (i) la coloración del pico debe de estar positivamente relacionada con el estado fisiológico en machos y hembras, y que, (ii) puesto que machos y hembras están expuestos a diferentes demandas fisiológicas durante las diferentes etapas reproductivas (v.g. defensa del nido, puesta de huevos, incubación, alimentación), la asociación prevista entre la coloración del pico y el estado fisiológico debe depender del sexo.

4. MÉTODOS

*Lo importante no es cuanto hacemos,
sino cuanto amor, cuanta honestidad y
cuanta fe ponemos en lo que hacemos.*

Madre Teresa de Calcuta

4.1. Especie modelo y área de estudio

Los estudios fueron realizados en la Hoya de Guadix, España (37°18'N, 3°11'W), durante la estaciones reproductoras del 2005 al 2008, mediante la utilización de cajas nido de reciente instalación (2005-2006), las cuales se colocaron cerca, o dentro, de colonias previamente establecidas de estornino negro (*Sturnus unicolor*) en edificios viejos de la zona. Los adultos fueron capturados utilizando trampas instaladas dentro de las cajas nido durante el periodo de construcción de nidos y formación de parejas. Una vez iniciada la puesta no se volvían a capturar hasta una vez eclosionados los huevos. Los individuos capturados fueron sexados visualmente siguiendo a Svensson (1992), se les tomo diferentes medidas anatómicas (peso, tarso, ala y pico) y se les extrajo sangre para futuros análisis. Por último, todos los individuos capturados fueron marcados con una anilla metálica numerada y una combinación única de anillas de colores para su posterior identificación.

El estornino negro es un ave paseriforme de la familia Sturnidae, sexualmente dimórfica, de plumaje negro brillante en los machos y más apagado en las hembras. En el periodo nupcial la punta del pico es de color amarillento, con la mandíbula inferior y la base del pico de los machos

de un color grisáceo azulado, que en las hembras se torna de un color amarillento rosáceo (**Figura 8**). El pico se torna negruzco en el periodo post nupcial (Veiga et al., 2001). Las plumas del cuello de los machos parecen ser un CSS ya que son notablemente más alargadas y estrechas que las de las hembras y los juveniles, y están relacionadas con la probabilidad de reproducirse (Aparicio et al., 2001). Realizan una muda post nupcial completa entre los meses de septiembre y octubre. Sus huevos son immaculados, de color verde azulado (Cramp, 1998), y con un pico de coloración en la franja del UV (300-400nm; **Figura 3**).



Figura 1. Mapa de situación de Guadix (arriba izqda); imagen de una colonia de estornino negro en un escenario de cine abandonado (Estación de la Calahorra) (arriba dcha). Macho de estornino negro (abajo izqda.); hembra de estornino negro (abajo dcha.) (Fotografía: Carlos Navarro)

Las hembras ponen un huevo al día, habitualmente por la mañana, y generalmente comienzan la incubación con el penúltimo huevo de la puesta, lo que determina una eclosión asincrónica (Cramp, 1998). En

la población de estudio el tamaño típico de puesta fué entre 4-5 huevos (datos combinados del 2005-2006; $N = 159$; media = 4.55; $SD = 0.97$; rango = 2-7) y, salvo en raras ocasiones, la incubación era una tarea exclusiva de la hembra (datos no publicados). Los pollos son alimentados principalmente con insectos (Motis et al., 1997), tanto por la hembra como por el macho (Cramp 1998; Veiga et al. 2002). Los machos participaban de la alimentación de los pollos principalmente durante la primera mitad del tiempo de estancia de los pollos en el nido.

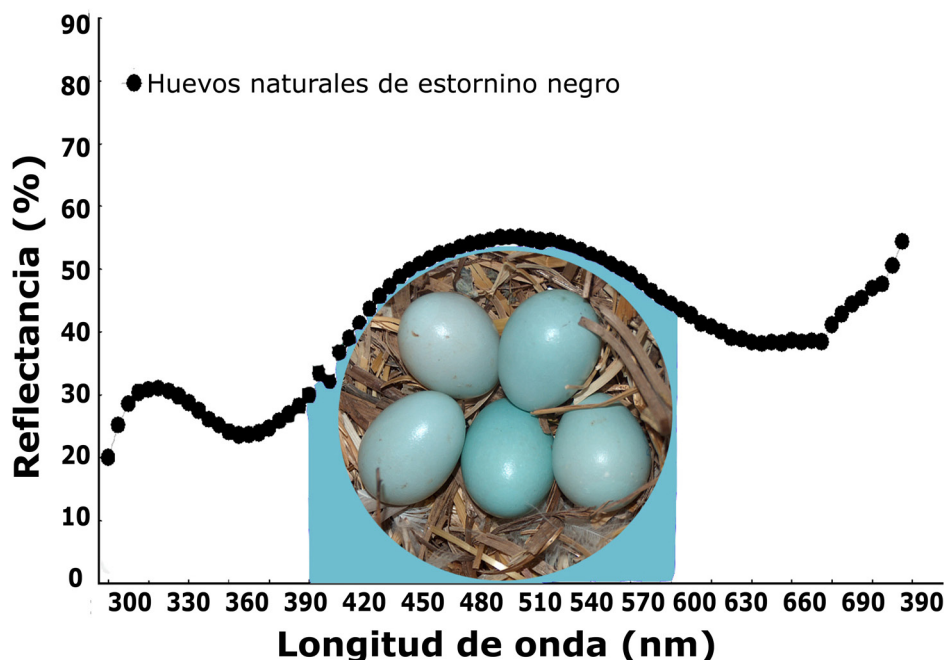


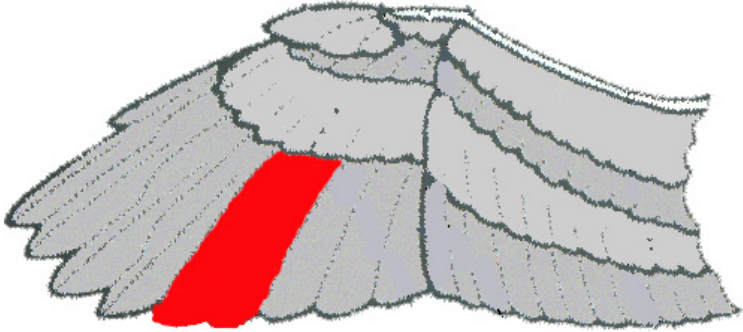
Figura 2. Espectro de reflectancia típico de los huevos de estornino negro, con un pico de coloración UV. En azul el rango de absorción de la biliverdina. En el interior de la figura; nido de estornino negro donde se pueden observar los huevos con la característica coloración verde azulada

4.2. Protocolo de manipulación de la condición corporal de las hembras

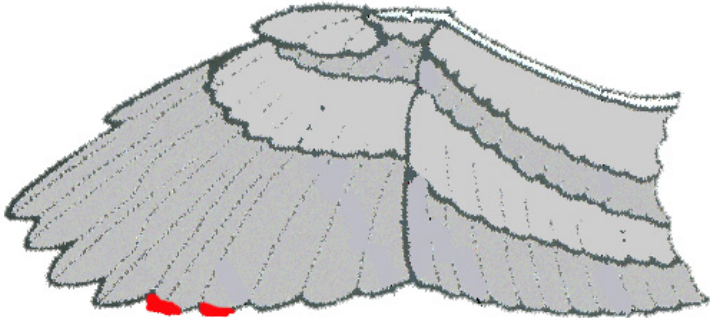
Aproximadamente un mes antes de la puesta de huevos (media = 32.0 días, $SD = 17.8$, $N = 32$), capturamos los individuos que dormían dentro de las cajas nido tapando las entradas antes del amanecer, y a otros que visitaron los nidos por la mañana mediante trampas de caída en el nido. La manipulación de la carga alar de las hembras de estorninos la realizamos siguiendo el protocolo establecido en Møller (1995). Así, durante las tem-

poradas de campo de 2005 y 2006, todas las hembras capturadas semanas antes de comenzar la puesta fueron pesadas, medidas, y asignadas aleatoriamente a uno de los tres siguientes tratamientos:

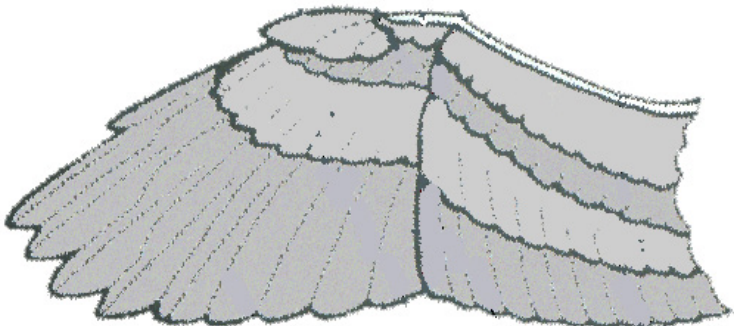
- Grupo Experimental: Las plumas primarias número cuatro y cinco de ambas alas fueron cortadas por la base del raquis. (N = 33)



- Grupo control de manipulación: De las puntas de las plumas primarias número cuatro y cinco se cortó 1mm. (N = 21)



- Grupo control: La hembra fue capturada y las alas manejadas como en los tratamientos 1 y 2, dejando las plumas primarias cuatro y cinco intactas. (N = 28)



Este experimento reduce la superficie alar de las hembras experimentales alrededor del 5%. El experimento no afectó a la probabilidad de reproducción, ya que el porcentaje de hembras a las que se detectó reproduciéndose en la colonia no varió para los diferentes tratamientos [experimentales: 42.9%, de manipulación simulada: 42.9%, el control: 42.4%; Modelo Lineal Generalizado (GLZ) con error binomial y función logística, Wald = 0.11, $p = 0.95$]. Así, después de quitar los nidos de dos de las hembras control y uno de una hembra experimental, de las cuales perdimos los datos de medición del color de los huevos, se recopiló información de la coloración de los huevos de 11 hembras experimentales, 9 de manipulación simulada, y 12 hembras control. No encontramos diferencias entre los diferentes años (2005-2006) en la coloración de los huevos ($F_{1,26} = 0.08$, $p = 0.78$) ni en el efecto de nuestro experimento (interacción entre el año y el tratamiento experimental; $F_{2,26} = 0.04$; $p = 0.96$), por lo que pudimos juntar los datos de ambos años.

La intensidad del color azul verdoso de los huevos (ver **Métodos 4.8.3**) de las hembras control capturadas antes de la reproducción [R(400-575)/R(300-700), media = 55.32, SD = 2.47, N = 12] no difirió significativamente del color de los huevos de las hembras que fueron capturadas después de la puesta [R(400-575)/R(300-700); media = 55.87, SD = 2.89, N = 7; $t_{18} = 0.43$, $p = 0.66$], lo que sugiere que la captura y manipulación de las hembras no afectó a la intensidad del color verde azulado de los huevos. La comparación entre la variación en las masas corporales de las hembras que fueron capturadas dos veces, antes de la puesta de los huevos, en relación con el tratamiento experimental reveló que, la eliminación experimental de las plumas de las alas tuvo un efecto perjudicial sobre la condición corporal de las hembras [ANOVA de medidas repetidas, la masa corporal de las hembras en la captura en diferentes fechas, efecto dentro (para el mismo individuo), y el tratamiento experimental, como efecto entre tratamientos; interacción: $F_{1,11} = 8.56$, $p = 0.014$]. Mientras que la masa corporal de las hembras experimentales disminuyó entre la primera y la segunda [media (SD) = 84.4 (4.7) g, vs 80.7 (3.1) g; $n = 6$], la de las hembras control tendió a aumentar [media (SD) = 81.1 (3.5) g, vs 86.6 (8.0) g, N = 7]. Este efecto fue independiente de la diferencia de tiempo entre las capturas [tiempo entre la primera y la segunda captura: media (SD) = 8.6 (3.0) días], ya que cuando esta información se incluyó como covariable en el modelo anterior, el término de interacción entre el cambio de masa corporal y tratamiento experimental permaneció siendo estadísticamente significativa ($F_{1,10} = 6.53$, $p = 0.029$). Por lo tanto, la eliminación experimental de plumas de las alas provocó una reducción efectiva de la condición corporal en las hembras experimentales.

4.3. Creación de huevos de estornino coloreados artificiales

Los huevos artificiales fueron hechos de escayola, utilizando moldes de látex realizados a partir de 12 huevos naturales de estornino negro. Más tarde, los huevos artificiales fueron pintados con pinturas acrílicas intentando reproducir un color similar al de los huevos naturales de mayor y menor pigmentación de nuestra población. Todos los huevos artificiales de color claros y oscuros se pintaron con el mismo tipos de pintura (Natural Color System, Scandinavian Colour Institute: Color: huevos oscuros: 2030-B90G; huevos claro: 10% de los huevos de pintura oscura y el 90% de blanco puro). La coloración de los huevos experimentales estaba dentro de la variación natural en color ya que, en promedio, la coloración de los huevos naturales de estornino negro coincidió con el rango entre los huevos claros y oscuros, tanto en el brillo cromático como en la parte azul (400-475 nm) y verde (475-550 nm) del espectro de reflectancia (**Figura 3-4**).

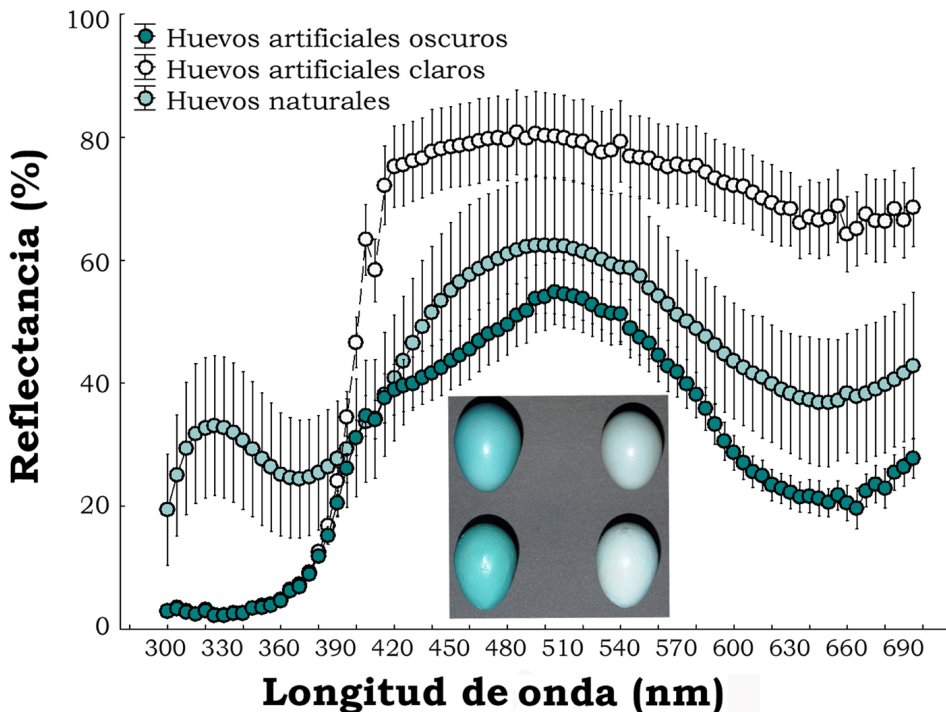


Figura 3. Espectros de reflectancia media (\pm SD) para los huevos naturales de estornino negro. También se muestran los espectros de reflectancia de los huevos artificiales (claros y oscuros). Los huevos claros (derecha) y oscuros (izquierda) utilizados en el experimento se muestran en la parte inferior de la imagen, mientras que los huevos naturales de coloración similar se muestran en la parte superior.

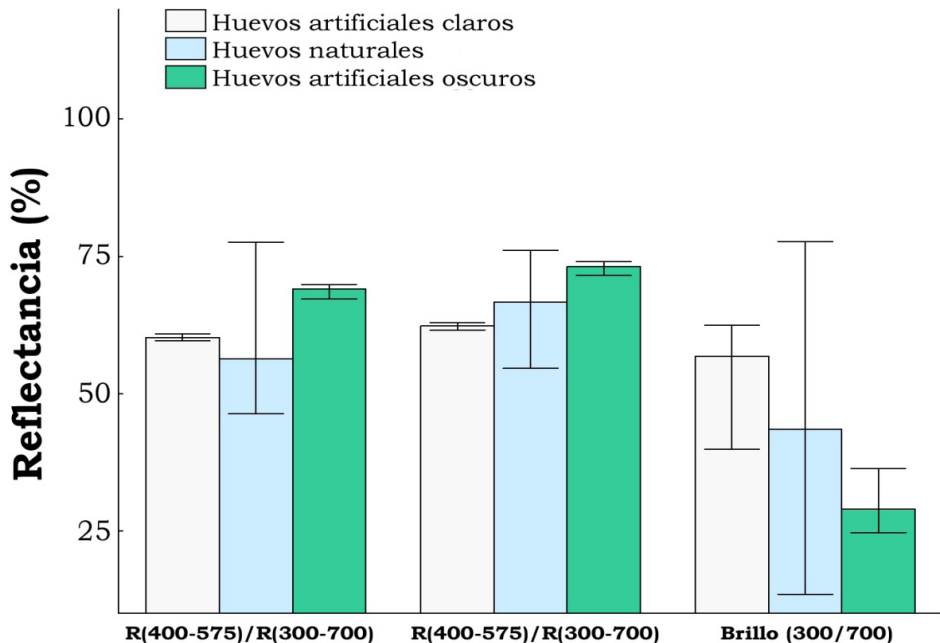


Figure 4. Media, máximo y mínimo del porcentaje de reflectancia de longitudes de onda verde azuladas (400-575nm) en relación con el total (300-700nm) o el espectro de visión humano (400-700nm) para los huevos artificiales (claros: N=20, oscuros: N=20) y naturales (N=814) de estornino negro. Los valores medios de la reflectancia total (brillo) de los huevos naturales y experimentales también se muestran.

4.4. Manipulación del color de la puesta

Durante el período de nidificación de 2006, visitamos los nidos todos los días hasta el comienzo de la puesta. Una vez que el primer huevo fue detectado, visitamos los nidos varias veces durante la mañana hasta detectar el nuevo huevo; visitas que se repitieron diariamente hasta el término de la puesta. Cada nuevo huevo se intercambiaba inmediatamente por un huevo verde azulado artificial de color claro (N=11 nidos) o de color oscuro (N=11 nidos; **Figura 3**). Los huevos experimentales de un mismo nido siempre fueron del mismo tipo, con los que conseguimos puestas de color claro u oscuro; siendo el tratamiento asignado aleatoriamente. Asumimos que los machos detectaron los huevos experimentales de sus nidos naturales ya que los huevos fueron retirados por la mañana temprano y, por tanto, tan solo permanecieron unas pocas horas en el nido original. Además, para asegurarse de que el esfuerzo de aprovisionamiento en los nidos experimentales estuvo dentro del rango natural de variación, algunos nidos (N=29) se mantuvieron como controles para

compararlos con los nidos experimentales. Dos semanas después de la puesta del primer huevo, lo que corresponde al periodo de incubación típico para la especie (Cramp, 1998), los huevos experimentales fueron reemplazados por 2-3 pollos recién eclosionados de nidos no incluidos en el experimento y seleccionados al azar. En consecuencia, los pollos de los nidos experimentales nunca estuvieron relacionados genéticamente con los adultos que cuidaron de ellos.

4.5. Estimación de la tasa de ceba parental

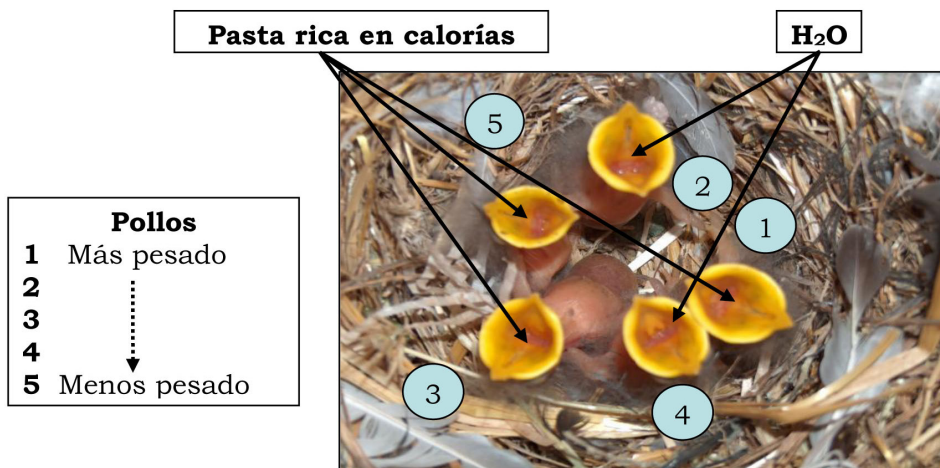
Comportamiento de aprovisionamiento de los adultos se observó tres veces en el curso del período de crianza de los pollos, específicamente cuando los pollos cumplieron 4 [media (SD)=4.0 (1.5) días, N=48 (22 nidos experimentales)], 9 [media (SD)=8.6 (2.1) días, N=43 (20 nidos experimentales)], y 15 (media (SD)=14.8 (1.6) días, N=37 (19 nidos experimentales)) días de edad. Las visitas de los padres se registraron por la mañana mediante observación directa de los nidos con un telescopio (desde un hide o un coche) durante periodos de aproximadamente una hora [media (SD)=59.8 (3.37) min., N=127]. Cuando el número de nidos que se observó fue grande, algunos nidos (elegidos al azar en relación con el tratamiento experimental) fueron grabados con una cámara de video colocada a varios metros de distancia de la caja nido. Las observaciones y las grabaciones en la que no se detectaron las visitas de los padres con alimentación no se incluyeron en los análisis. Las tasas de aprovisionamiento se han corregido a períodos de una hora resultado de dividir el número de visitas por el número de minutos grabados y multiplicando por sesenta. Para cada visita se identificaba el sexo, y si los adultos llevaban comida para alimentar a las crías (es decir, visitas de alimentación).

4.6. Manipulación de la condición nutricional de los pollos

Durante la temporada de cría de 2005, tres días después de la eclosión de los huevos, los pollos se pesaron, y fueron marcados con rotuladores de colores resistentes al agua, con un código individualizado, en el tarso, y se ordenaron jerárquicamente de acuerdo a la masa corporal dentro de cada nido. Al más pesado de los pollos se le asignó aleatoriamente un tratamiento de alimentación suplementaria o bien se le suministró la misma cantidad de agua como control; a los siguientes en la jerarquía de peso se les alternaron los tratamientos. El tratamiento de

alimentación suplementaria consistió en la administración de 0.2ml de pasta rica en calorías, con micronutrientes esenciales (minerales, vitaminas y aminoácidos; 5 calorías por gramo, Nutri-Calorias, Shering-Plough Animal Health). Posteriormente, revisamos los nidos cada dos días (cinco veces durante el período de estancia de los pollos en el nido), para volver a remarcar los tarsos de todos los pollos y suministrarle el tratamiento asignado en la primera visita a cada uno de ellos (**Figura 5**).

Los pollos fueron anillados unos cuatro días antes de abandonar el nido; a los 13 o 14 días de edad. En ese momento también se pesaron (con un dinamómetro (Pesola) de precisión 0.5g) y se midieron (el tarso con un calibre digital, con una precisión de 0.01mm, y la longitud del ala con una regla con una precisión de 0.1cm). El índice de condición corporal se estimó como los residuos de la regresión de masa corporal sobre la longitud del tarso (Schulte-Hostedde et al., 2005). Por otra parte, como una variable relacionada con la condición nutricional de los polluelos también se utilizaron los valores de respuesta inmunitaria al test de la fitohemaglutinina (PHA; ver **Métodos 4.7**).



$$\text{Índice nutricional} = \text{PHA (pollos experimentales)} - \text{PHA (pollos control)}$$

(De Neve et al. 2004c)

Figura 5. Esquema del tratamiento de manipulación de la condición nutricional de los pollos dentro de la nidada. Fotografía: Carlos Navarro

Los análisis de medidas repetidas mostraron que los pollos suplementados con alimento enriquecido experimentaron un incremento significativo en la respuesta a la PHA, pero no detectamos efectos en la longitud de su tarso, masa corporal, o en el índice de condición (**Tabla I**). Por ello, dentro de cada

nido, las diferencias en la respuesta a la PHA entre los pollos a los que se le suministró alimento suplementario y los pollos control fueron utilizadas como un índice relacionado con las condiciones nutricionales que los pollos experimentaron durante su desarrollo (en adelante, el estado nutricional de los pollos; para un enfoque similar véase De Neve et al., 2004c).

4.7. Test de la fitohemaglutinina (PHA)

La Fitohemaglutinina (PHA) es una lectina ampliamente distribuida entre la legumbres y en algunas oleaginosas incluida la soja *Glycine max.* Las lectinas son proteínas que reconocen carbohidratos y se caracterizan por su habilidad para combinarse con receptores de membrana de carbohidratos. Estructuralmente están formadas por un dominio tipo lectinas y otro globular que es el que reconoce a los carbohidratos (Sharma y Surolia, 1997). La PHA fue reconocida por su capacidad para aglutinar eritrocitos y leucocitos. Además estimula inespecíficamente la proliferación de células T (Hernandez y Leavitt, 1984; Buhning et al., 1999), y es esta característica mitogénica lo que le da su principal aplicación en ecología evolutiva para estimar el grado de respuesta inmunitaria mediada por células T (Kennedy y Nager, 2006), aunque también refleje otros componentes del sistema inmunológico, como las moléculas de MHC (v.g. Goto et al., 1978; Martin et al., 2006). Además, es bien sabido que esta respuesta refleja las condiciones nutricionales que los pollos han experimentado durante el desarrollo (v.g. Alonso-Álvarez y Tella, 2001; Jovani et al., 2004).

El test de la PHA consiste en la estimación de la hinchazón de la piel provocada por la inyección de este mitógeno. Para ello, en primer lugar se marca con un rotulador resistente al agua el punto donde se habrá de inyectar, y se tomarán las medidas (**Figura 6**). Seguidamente, se mide el espesor de los patagios de ambas alas del ave mediante el uso de un espesímetro (Mitutoyo, CI012 ID-, con una precisión de 0.01mm). Posteriormente los pollos son inyectados por vía subcutánea en el patagio derecho con 0.2 mg de PHA (Sigma Chemical Co.) disuelto en 0.04ml de solución salina fisiológica (PBS, Bausch y Lomb Co.). En el patagio izquierdo se le inyectó 0.04 ml de solución salina fisiológica (**Figura 6**). 24 horas después de la inyección los patagios son nuevamente medidos (**Figura 6**). La respuesta inmune se estima como el cambio en el grosor del patagio del ala derecha (inyección de PHA) menos el cambio en el espesor del patagio del ala izquierda (PBS) (Smits et al. 1999). Las mediciones de cada patagio se repitieron tres veces, usándose la media de estas medidas en los análisis posteriores.

$Respuesta\ a\ la\ PHA = (PHA\ 24h - PHA\ 0h) - (PBS\ 24h - PBS\ 0h)$
(Smits et al. 1999)



Figura 6.- Arriba izq.: Patagio de de un pollo de rabilargo (*Cyanopica Cyanus*). Arriba dcha.: Inyección con fitohematoglutinina (PHA) a un pollo de rabilargo. Abajo izq.: Medición de la respuesta a la PHA. Imágenes cedidas por Juliana Valencia

4.8. Medición del color

4.8.1. Protocolo en los objetivos 1, 2 y 3

La medición de la coloración de los huevos se realizó dos días después del final de la puesta. Para estandarizar las condiciones ambientales de luz, todas las medidas fueron tomadas dentro de un hide portátil, con paredes opacas, situado en las cercanías de los nidos. Para evitar la deserción en los nidos por parte de los padres, las entradas de los nidos fueron bloqueadas mediante el uso de un trapo durante el tiempo que duró la medición del espectro de reflectancia del color de los huevos. Los huevos fueron devueltos a su nido no más tarde de 15min. después de la

retirada de los mismos. Visitas posteriores a estos nidos nos confirmó que ninguno de ellos había sido abandonado como consecuencia de nuestra manipulación.

4.8.2. Protocolo en el objetivo 4

Dos días después del final de la puesta, y aleatoriamente respecto a la secuencia de puesta, se recolectaron 38 huevos, dos huevos en 16 nidos y un solo huevo en 6 nidos adicionales. Los nidos de los que hemos recogido uno o dos huevos no se diferenciaron en el color de sus huevos ($t_{20} = 0.44$, $p = 0.66$). Además, para reducir la posible influencia de fechas de puesta en nuestros análisis, limitamos la recogida de muestras a los nidos que se iniciaron en un período de 6 días ($N = 22$, $SD = 1.59$ días), coincidiendo con el pico de las primeras puestas. Los huevos fueron transportados inmediatamente al laboratorio en una nevera portátil en donde de inmediato se midió el color del cascarón en una habitación oscura (es decir, para estandarizar las condiciones de luz ambiente). Seguidamente los huevos fueron guardados en cajas oscuras, individualizados en bolsas herméticas en un congelador a -20°C .

4.8.3. Protocolo de medición del color del huevo

El color de los huevos fue medido en cinco áreas seleccionadas aleatoriamente a lo largo del eje longitudinal de la superficie del huevo (Avilés et al., 2006a, b). El espectro de reflectancia (300-700nm) fue obtenido usando un espectrofotómetro Ocean Optic (Espectrofotómetro S2000 conectado a una lámpara alógena de deuterio (D2-W, mini) apto para una reflectancia coaxial (QR-400-7-UV-vis) y el software OOIBase32TM (Ocean Optics, Inc., Dunedin, FL, USA). La reflectancia fue siempre medida mediante el uso de una sonda a una distancia constante y a un ángulo de 45° de la superficie del huevo. Las medidas fueron tomadas de forma referenciada a un color blanco estándar (WS-2) y a uno negro. La calibración se realizó antes de la medición en cada huevo.

Aunque la percepción visual de las aves puede ser parcialmente modelada de forma compleja en relación con la sensibilidad de la retina de las aves y la luz ambiental (Endler et al., 2005; Avilés et al., 2008), nosotros utilizamos las variables obtenidas a partir de los datos del espectrofotómetro, asumiendo que, al ser todas las cajas nido iguales, las condiciones de luminosidad dentro de las cajas nido eran similares, y que no existen diferencias significativas en la percepción del color por parte de los indivi-

duos de la misma especie. Como variable indicadora de la intensidad de la coloración verde azulada se utilizó el porcentaje de reflectancia en la región azul y verde del espectro (R400-575/R300-700) (Siefferman et al., 2006), siendo ésta la región donde la biliverdina muestra el menor grado absorción (Falchuk et al., 2002) y donde la reflexión de los huevos de estornino alcanza su máximo (**Figura 2**). Esta medida ha resultado relacionada con la de la calidad de los individuos en trabajos anteriores (Siefferman et al., 2006). La estimación de esta variable en las cinco áreas medidas de la cáscara de los huevos mostraron una repetibilidad alta (datos del año 2005, $r=0.87$, $F_{205,824}=6.7$, $p < 0.0001$). Además, la variación entre los nidos fue significativamente mayor que la variación dentro de cada nido ($r=0.85$, $F_{48,158}=17.4$, $p < 0.0001$). Esto nos permitió utilizar los valores medios de cada puesta calculados sobre los valores promedios por huevo.

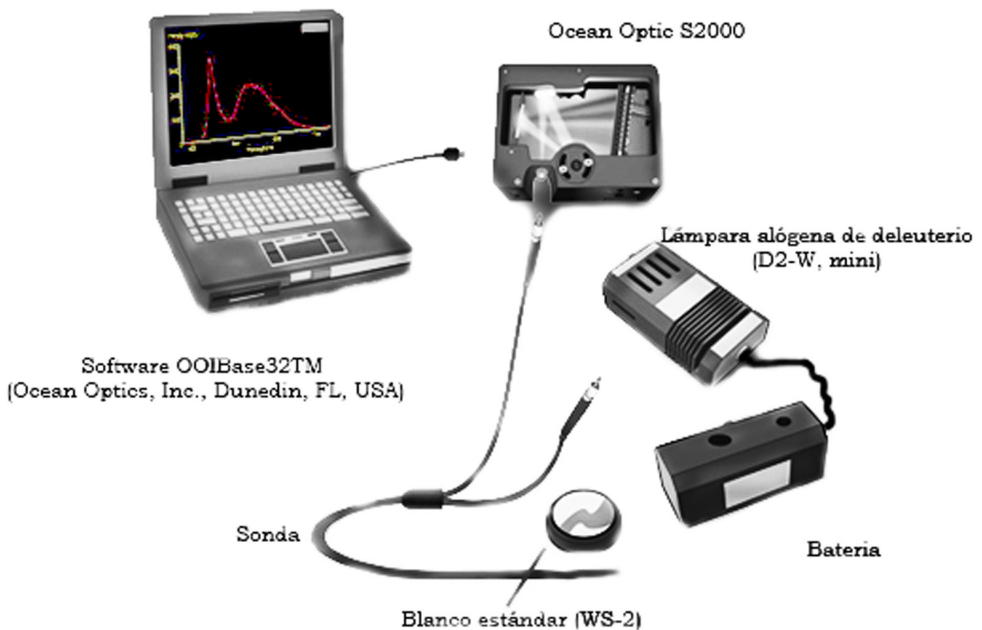


Figura 7. Esquema del espectrofotómetro usado para la medición del color.

4.8.4. Protocolo de medición del color del pico

El color del pico se midió tres veces (con excepción de un ave al que sólo se le midió dos veces) en la parte apical amarilla. Los espectros de reflectancia se obtuvieron entre 360 y 700nm para todas las aves, justo después de tomar muestras de sangre usando un colorímetro [Konica Minolta Sensing (Seúl, Corea del Sur), CM-2600d], lo cual da estimaciones de los valores de

reflectancia a intervalos de 10nm. Los picos se iluminaron con un ángulo de 90° de la superficie de medición con una fuente de luz de xenón, y la luz reflejada fue capturada en el mismo ángulo. Las mediciones fueron tomadas en relación con un blanco estándar (CM-A145, Konica Minolta Sensing) y las referencias oscuras (CM-A32, Konica Minolta Sensing). El colorímetro se calibró antes de la medición de cada ave. A partir de los datos espectrales se calculó el brillo como la reflectancia media de cada intervalo de 10nm entre 360 y 700nm. El espectro de reflectancia del pico de las hembras muestra dos picos (**Figura 8**). El primero se corresponde con parte de la gama de la absorbencia de los carotenoides (desde 450 hasta 570nm; Britton et al., 1995), mientras que el segundo (570-700nm) coincide con la típica forma en aumento gradual del espectro de feomelaninas (Prota, 1992; Riley, 1997). Este segundo pico, sin embargo, no aparece en el espectro de los machos.

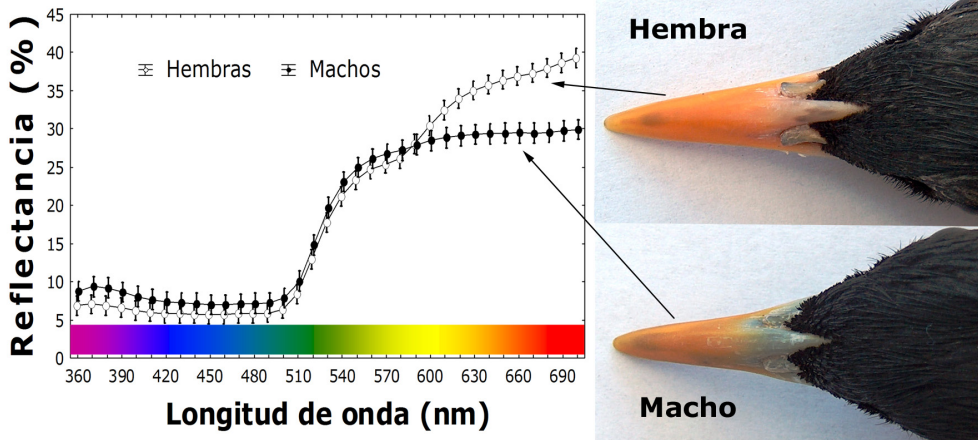


Figura 8. Representación del espectro de reflectancia de la punta del pico de los machos y de las hembras de estornino. En la imagen, detalle del pico de un macho y una hembra de estornino negro.

Debido a que nuestro objetivo era estudiar las diferencias sexuales en la banda de frecuencias de carotenoides, se estimaron valores tonales y cromáticos en la bandas de frecuencia 450-570nm para machos y hembras. El tono fue calculado como la longitud de onda en el punto de inflexión del espectro dentro de los intervalos de las diferentes longitudes de onda obtenidas (Keyser y Hill, 1999). El tono es un buen indicador de la concentración del carotenoides pigmentarios del tegumento en algunas especies (Saks et al., 2003). El croma de los carotenoides se definió como el porcentaje de reflectancia en la banda de los carotenoides (450-570nm; Peters et al., 2004) en relación con la reflectancia total (360-700nm). Las

aves que presentaron valores altos de saturación para el intervalo de 450-570nm presentaron valores bajos de croma para el intervalo de 570-700nm (**Figura 8**), por lo que las estimaciones de croma de longitud de onda baja (450 a 570) no fueron utilizadas en nuestro análisis.

Las tres medidas de la coloración del pico tomadas en cada individuo (véase más arriba) fueron repetibles tanto en las hembras (brillo: $r=0.75$, $F_{82,165}=7.03$, $p < 0.0001$; tono (450-570nm): $r=0.63$, $F_{82,165}=4.45$, $p < 0.0001$; croma (450 570 nm): $r=0.94$, $F_{82,165}=35.77$, $p < 0.0001$) como en los machos (brillo: $r=0.70$, $F_{58,118}=5.85$, $p < 0.0001$; tono (450-570nm) : $r=0.47$, $F_{58,118}=2.77$, $p < 0.0001$; croma (450-570nm): $r=0.94$, $F_{58,118}=29.56$, $p < 0.0001$). Por lo tanto, hemos utilizado los valores promedio por individuo para los análisis estadísticos (Sokal y Rohlf 1981; Zar, 1984).

4.9. Método de estimación del contenido de carotenoides y vitaminas en huevos y plasma

4.9.1. Medición y peso de huevos y yemas

Los huevos se pesaron con una balanza digital (precisión = 0.001g) y, antes de que fueran congelados, se midió el largo y el ancho con un calibre (precisión de 0.01mm). El volumen de los huevos fue calculado usando la formula de Hoyt (1979).

$$\text{Volumen de huevo: } \text{Volumen} = 0.515 (\text{largo}) \times (\text{ancho})^2$$

Hoyt (1979)

Siguiendo el protocolo usado en estudios previos (v.g. Borttoloti et al., 2003), los huevos fueron almacenados en un congelador a -20°C . En días posteriores, la yema y albúmina de los huevos congelados fueron separadas con un bisturí y papel secante para realizar posteriormente los análisis de antioxidantes. Las muestras de la yema fueron pesadas y de nuevo congeladas (-20°C) en criotubos, que se almacenaron en cajas de cartón negro durante 165 días, momento en el cual las muestras se almacenaron en un congelador de -80°C hasta que se realizaron los análisis de antioxidantes finales que se llevaron a cabo 109 días después.

Las variaciones entre nidos en la masa de los huevos, en los volúmenes, y en el peso de las yemas fue significativamente más alta que la variación dentro de cada nido (volumen de los huevos: $r=0.65$, $F_{15,16}=4.71$,

$p=0.001$; masa de los huevos: $r=0,51$, $F_{15,16}=3.08$, $p=0.01$, el peso de las yemas: $r=0.46$, $F_{15,16}=2.70$, $p=0.02$). Así que utilizamos los valores medios para cada nido en los análisis estadísticos.

4.9.2. Obtención del plasma sanguíneo

Los estorninos utilizados para estimar la concentración de carotenoides en plasma se capturaron al comienzo de la temporada de reproducción (del 14 de marzo al 14 Abril de 2007), durante el periodo de emparejamiento y construcción de nidos. Además, al comienzo de la etapa de pollos (dos o tres días después de la eclosión), capturamos 41 hembras reproductoras y 20 machos reproductores. Entre ellos 13 machos y 9 hembras ya había sido capturados y muestreados al principio de la temporada de cría. Se determinó la masa corporal (Pesola, precisión de 0.5g) y la longitud del tarso (precisión 0.01cm) para todas las aves. La condición corporal se calculó como residuos de la regresión del peso sobre el tarso. Por último, mediante una punción en la vena braquial, se recogieron 50 μ l de sangre en tubos heparinizados, siempre durante los dos primeros minutos después de su captura lo que reduce el efecto del estrés sobre los antioxidantes en plasma (Romero y Reed, 2005; Chastel et al., 2005). Las muestras de sangre se colocaron en un refrigerador portátil (4-5°C) hasta la centrifugación (12000 r.p.m. x 5min.) y separación del plasma unas horas después en el laboratorio. El plasma se congeló inmediatamente después (-20°C).

4.9.3. Extracción y cuantificación de carotenoides y vitaminas

Se cuantificó la concentración de retinol (vitamina A) y de carotenoides en plasma. Los niveles de retinol, tocoferol (vitamina E) y carotenoides en la yema del huevo se estimaron siguiendo el protocolo descrito en McGraw et al. (2008). Las muestras se descongelaron y se agregó 15 μ l de plasma/yema a un tubo de microcentrífuga, al que se le añadió 100 μ l de etanol y se agitó en un vortex durante 5seg. Posteriormente, se añadieron 100 μ l de MTBE (Metil tert-butil éter) y se agitó de nuevo durante 5seg. A continuación, los tubos se centrifugaron durante 3min. a 12000 r.p.m. y el sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf de tapa de rosca donde se evaporaron en una campana de extracción mediante un evaporador de nitrógeno. A continuación, el sobrenadante se resuspendió en 200 μ l de fase móvil (metanol: acetonitrilo: diclorometano; 42:42:16, v/v/v), se agitó mediante un vortex durante 5 segundos, y se inyectaron 50 μ l en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC; Waters

Alliance Instrument, Waters Corporation, Milford, MA). Se utilizaron 5µm en una columna Waters Carotenoid C-30 (4.6 x 250mm de diámetro) para determinar los tipos y cantidades de los distintos compuestos presentes. Las concentraciones de pigmentos fueron calculados en base a curvas patrón construidas usando como referencia cantidades conocidas de los compuestos a cuantificar purificados. Para determinar los niveles totales de carotenoides en el plasma se sumaron las concentraciones estimadas para cada uno de ellos. Los totales de los compuestos en el huevo se calcularon multiplicando la concentración total de compuestos por la masa total de la yema.

Todas las mediciones en plasma fueron realizadas por C. Navarro y las de yema por K.J. McGraw, lo que redujo la varianza debido a la variabilidad inter-observador. Los análisis se realizaron a ciegas con respecto al individuo y el huevo. Sobre la base de comparación con los compuestos de referencia, se estimaron concentraciones en plasma de cis-luteína, trans-luteína, zeaxantina, β-caroteno, y los carotenoides esterificados (**Tabla II**). En la yema se detectó, retinol (vitamina A), tocoferol (vitamina E), cis-luteína, trans-luteína, zeaxantina, dos keto-carotenos no identificados (lambda-max = 473 y 474nm), y β-caroteno (**Tabla III**). Encontramos una repetitividad moderada dentro de los nidos de las concentraciones en yema de la mayoría de estos compuestos (vitamina E: $r=0.76$; $F_{15,16}=7.23$, $p=0.0001$; trans-luteína: $r=0.68$; $F_{15,16}=5.30$, $p=0.0009$; cis-luteína: $r=0.62$; $F_{15,16}=4.27$, $p=0.0032$; zeaxantina: $r=0.70$; $F_{15,16}=5.56$, $p=0.0007$; ketocarotenos: $r=0,86$; $F_{15,16}=13.30$, $p < 0.00001$; y β-caroteno: $r=0,66$; $F_{15,16}=4.84$, $p=0.0016$), con la excepción de la vitamina A ($r=0.03$; $F_{15,16}=1.07$, $p=0.44$). Por lo tanto, se utilizó el valor medio por nido para las variables repetibles, mientras que para la vitamina A se utilizó el valor obtenido en un huevo seleccionados al azar.

4.10. Métodos estadísticos

Todas las variables, excepto el tono de la coloración del pico de los machos, siguieron aproximadamente una distribución normal (test de Kolmogorov-Smirnov para las variables continuas, $p > 0.2$) y, consecuentemente, utilizamos pruebas estadísticas paramétricas para analizar los datos. Además, se encontró un valor atípico para la coloración del pico de una hembra (brillo = 469.82) (más de dos veces la desviación estándar [media = 670.02; SD = 95.78]) que fue eliminado de nuestro conjunto de datos.

Para probar los efectos de la eliminación de las plumas del ala de las hembras en la pérdida de masa corporal y en la coloración de los huevos de la puesta (**Objetivo 1**) se utilizaron análisis de regresión, ANOVAs de una vía y ANOVAs de medidas repetidas.

Para probar el efecto de los modelos de huevos artificiales de colores (azul verdoso claros y oscuros) en las tasas de ceba de los machos (**Objetivo 2**), se utilizó un Modelo Lineal General (GLM) usando el tratamiento experimental (puestas claras u oscuras) y la fase del desarrollo de los pollos (es decir, 1ª: 4 días, 2ª: 9 días, 3ª: 15 días después de la eclosión) como efectos fijos. Para tener en cuenta la falta de independencia de las distintas observaciones en el mismo nido, las edades de los pollos y la identidad del nido, anidadas dentro del tratamiento experimental, se incluyeron en el modelo como un factor aleatorio. Además, dado que la tasa de cebas de los machos podía depender de la tasa de ceba de las hembras, del tamaño de la nidada, la fecha de eclosión, y de la edad de los pollos en el momento de la observación, todas estas variables se incluyeron en un primer modelo como covariables. Después de probar el modelo que incluía todos los factores mencionados y las covariables, así como la interacción entre factores fijos (en adelante, el modelo completo), la variable asociada con el mayor valor de p fué eliminada sistemáticamente hasta llegar a un modelo donde todos los factores y covariables se asociaron a valores de p inferiores a 0.1 (en adelante, el modelo final). Los residuos de los modelos estadísticos se aproximaron a una distribución normal (test de Kolmogorov-Smirnov, $p > 0.2$) y las variaciones en el porcentaje de cebas de los diferentes grupos fueron homogéneos (prueba de Levene de homogeneidad de varianzas, $F_{5,54} = 1.09$, $p = 0.37$), validando el uso de las pruebas paramétricas. Dado que algunos nidos que participaron en el experimento fueron depredados durante el período de permanencia de los pollos, los tamaños de muestra de las tasa de cebas difirieron para las diferentes edades.

Para probar el efecto de nuestro experimento de suministro de alimentación suplementaria en la hipotética relación entre la coloración de los huevos y el fenotipo de los pollos (**Objetivo 3**), exploramos la relación entre estas variables para los pollos control y experimentales mediante un análisis de covarianza de medidas repetidas (tratamiento como factor repetido dentro del nido y las variables relacionadas con la coloración de huevos como covariables). Los análisis de regresión se utilizaron para probar la relación entre los tamaños del efecto dentro de los nidos en nuestro experimento de alimentación suplementaria.

Para analizar la posible relación entre la coloración verde azulada del huevo y su contenido en carotenoides y vitamina A y E (**Objetivo 4**) realizamos un Análisis de Componentes Principales (PCA) con el que redujimos el número de variables independientes y los problemas de colinealidad. Las cantidades y las concentraciones de carotenoides totales y yema de vitaminas aparecieron altamente correlacionadas de forma positiva (ANOVA de una vía, $F_{1,36} = 526.95$, $p < 0.00001$, $r > 0.96$) y, por tanto, se utilizó el PCA sobre todas las cantidades y los valores de concentración de carotenoides y vitaminas analizadas. El PCA resumió las catorce variables en tres ejes. El primer componente principal (PC1) explicó el 57% de la variación y describió la variación en las concentraciones y las cantidades de vitamina E, luteína, cis-trans-luteína y zeaxantina en yema. El segundo componente principal (PC2) explicó el 22% de la variación y se relacionó con la concentración y la cantidad de vitamina A (negativamente) y β -caroteno (positiva) en yema. El tercer componente principal (PC3) explicó el 13% de la varianza y se asoció positivamente con la concentración y la cantidad de ketocarotenos en yema (**Tabla III**). La intensidad del color azul verdoso del huevo se utilizó como variable dependiente y las concentraciones y la cantidad de vitaminas y carotenoides (PC1, PC2 y PC3) como variables independientes en los Modelos de Regresión General (GRM).

Las diferencias intersexuales en las medidas de color del pico, condición corporal y niveles plasmáticos de retinol y carotenoides en estorninos adultos (**Objetivo 5**) se analizaron utilizando medidas obtenidas en la primera captura (emparejamiento; 30 machos y 33 hembras). Se utilizó la fecha de captura y la fecha de captura al cuadrado como covariables en los análisis estadísticos ya que los niveles plasmáticos de vitamina A y carotenoides cambiaron durante la temporada siguiendo una función cuadrática [MANOVA; fecha de captura: $F_{2,95} = 3.32$, $p = 0.04$; (fecha de captura)², $F_{2,95} = 4.96$, $p = 0.008$; véase Ninni et al., 2004]. El test de la MANOVA se utilizó para evaluar las relaciones entre la coloración del pico (variables dependientes) y las variables relacionadas con los antioxidantes del plasma (nivel totales de carotenoides en plasma (TPCL) y nivel de vitamina A) y la condición corporal como variables continuas independientes. El sexo se incluyó como un factor fijo independiente en los análisis. Después de estimar los parámetros estadísticos asociados a los factores antes mencionados, se incluyeron en el modelo las interacciones entre el sexo y las variables continuas independientes para explorar las diferencias sexuales en las relaciones entre el color del pico y los niveles de carotenoides y vitamina A en plasma (ver Quinn y Keough, 2002). La asociación entre las variables de color del pico y los antioxidantes del plasma y la condición corporal se exploraron también en los individuos

capturados dos o tres días después de la eclosión de los huevos. En este análisis se incluyó, la fecha de eclosión como covariable adicional para corregir los posibles efectos estacionales. Por último, para los individuos capturados dos veces (es decir, durante la fase de construcción de nido y, posteriormente, después de la eclosión), se analizaron las diferencias dentro de la temporada en la asociación entre la coloración del pico y los antioxidantes del plasma. En este análisis utilizamos la diferencia entre la fecha promedio de eclosión en nuestra población y la fecha de captura para corregir las posibles tendencias de temporada.

Todos los análisis se realizaron con el software Statistica 6 (Statsoft, 2001) y se estableció un valor alfa de 0.05 en la inferencia estadística para los valores de p de dos colas.

5. RESULTADOS

*La casualidad no es, ni puede ser
más que una causa ignorada
de un efecto desconocido.*

François Marie Arouet (Voltaire)

5.1. Objetivo 1: condición corporal de las hembras y coloración verde azulada de los huevos

Los huevos puestos por las hembras de estornino no experimentales (v.g. de los grupos control y control de la manipulación) fueron de coloración más verde azulada que los huevos puestos por las hembras experimentales ($F_{2,29} = 2.98$, $p = 0.067$; comparaciones post-hoc, del test-LSD: control vs experimentales: $p = 0.049$; experimental vs manipulación simulada: $p = 0.040$). Además, dado que la intensidad del color verde azulado de los huevos puestos por las hembras en los dos grupos control no se diferenciaba (comparación post-hoc, test-LSD: control vs manipulación simulada, $p = 0.81$), se combinaron los datos de los dos grupos control para aumentar la potencia estadística de la comparación de la coloración de los huevos entre los de las hembras control y los de las hembras experimentales ($F_{1,30} = 6.08$, $p = 0.020$). Este resultado no cambió cualitativamente, incluso después de incluir aquellas hembras del grupo control que no fueron capturadas antes de la puesta ($F_{1,37} = 6.19$, $p = 0.018$, **Figura 9**).

Además, nuestro experimento de aumentar la carga alar no afectó al tamaño de la puesta (el efecto del tratamiento: $F_{2,29} = 1.30$, $p = 0.29$; comparaciones post-hoc, test-LSD: $p \geq 0.12$) ni al tamaño del huevo (el efecto del tratamiento: $F_{2,29} = 0.02$, $p = 0.98$; comparaciones post-hoc, test-LSD: $p \geq 0.83$). Todos estos resultados, en conjunto, sugieren que el color verde azulado de los huevos se vio afectado por la manipulación experimental sobre la condición corporal de las hembras.

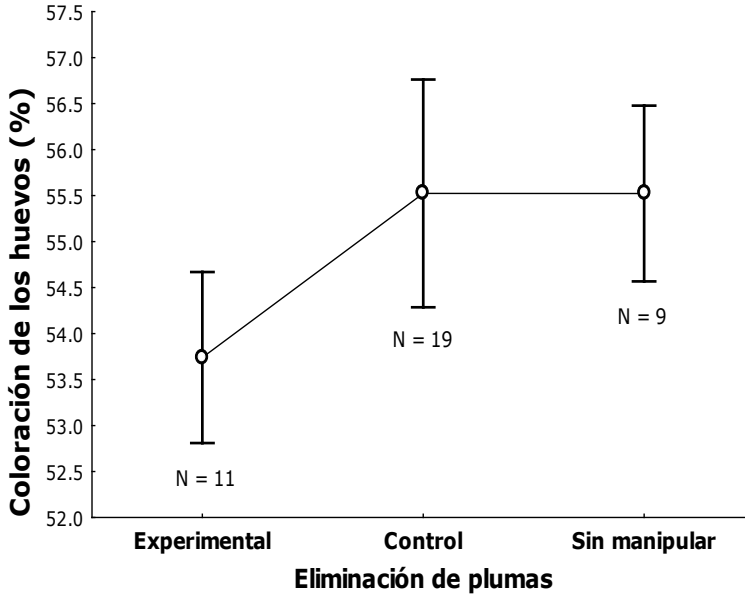


Figura 9: Medias ponderadas (\pm 95% de intervalo de confianza) de la coloración verde azulada [R (400-575 nm) / R (300-700 nm)] de los huevos puestos por las hembras: (i) experimentales; (ii) las de manipulación simulada; (iii) las control.

5.2. Objetivo 2: manipulación experimental de la coloración de los huevos y tasa de ceba parental

Las tasas de ceba de los machos de estornino en los nidos donde los huevos no se quitaron [huevos naturales; tasa promedio de alimentación por hora (SE) = 1.94 (0.24)] no difirieron significativamente de la registradas en los nidos experimentales [media tasa de alimentación por hora (SE) = 1.57 (0.23); $F_{1,70.8} = 1.40$, $p = 0.24$], después de tener en cuenta el efecto de la edad de los pollos ($F_{1,69} = 32.7$, $p < 0.0001$), y controlar por el número de pollos ($F_{1,69} = 0.004$, $p > 0.9$), fecha de eclosión ($F_{1,69} = 1.66$, $p = 0.2$), porcentaje de aprovisionamiento dado por las hembras ($F_{1,69} = 0.46$, $p = 0.5$) y la variación en la edad de la nidada dentro de cada etapa de desarrollo de los pollos ($F_{1,69} = 0.72$, $p = 0.40$). Este resultado no varió después de que fueran retirados del modelo todos los términos no significativos (efecto del experimento, $F_{1,50.5} = 0.14$, $p > 0.7$). Por lo tanto, la tasa de cebas observada en los nidos experimentales (es decir, los que incuban huevos artificiales) están dentro de la variación natural en la tasa de ceba de la población.

El color verde azulado de los huevos no se relacionó significativamente con la tasa de cebas de las hembras (1ª observación: $r = 0.13$, $N = 44$, $p = 0.4$; 2ª observación: $r = 0.08$, $N = 40$, $p = 0.6$; 3ª observación: $r = -0.01$,

$N = 34$, $p = 0.96$), tamaño de la nidada ($r = -0.06$, $N = 44$, $p = 0.7$) o tamaño del huevo ($r = -0.25$, $N = 42$, $p = 0.1$). Sin embargo, los machos de los nidos con huevos artificiales oscuros alimentaron a los pollos con más frecuencia que los de los nidos con huevos artificiales claros (**Figura 10**; modelo final: $F_{1,44.4} = 7.75$, $p = 0.008$; modelo completo: $F_{1,49.7} = 4.10$, $p = 0.048$) y, ni el número de pollos del nido (modelo completo: $F_{1,30} = 0.02$, $p > 0.9$), ni la variación de edad de la pollada dentro de cada observación (modelo completo: $F_{1,30} = 0.32$, $p = 0.58$), o la tasa de cebas de las hembras (modelo completo: $F_{1,30} = 1.56$, $p = 0.22$) explicaron una proporción significativa de la variación en la tasa de ceba de los machos.

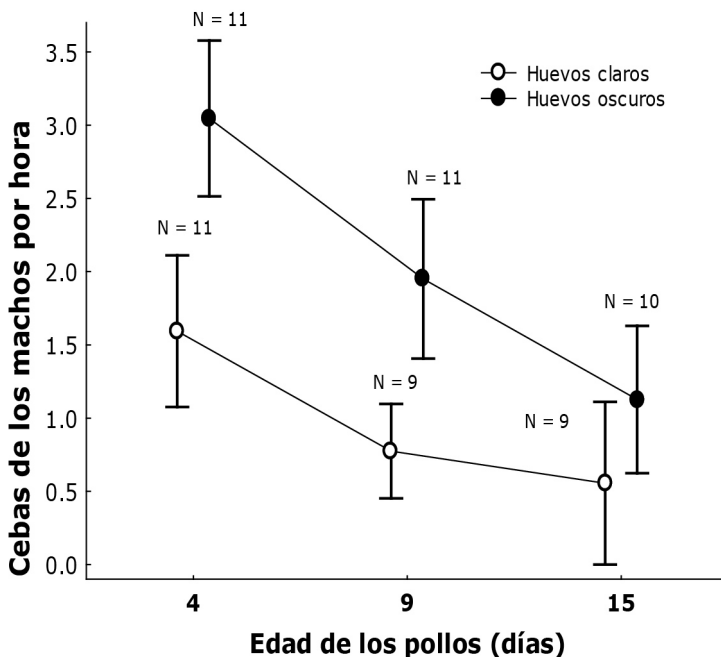


Figura 10: Medias (\pm SE) de visitas de ceba por hora realizadas por los machos en los nidos experimentales con huevos artificiales de color verde azulado claros y oscuros en tres diferentes etapas de desarrollo de los pollos. Se muestra el tamaño de muestra (N).

Aparte del tratamiento experimental (véase más arriba), sólo la fase de desarrollo de los pollos ($F_{2,35} = 7.83$, $p = 0.0015$), la identidad nido ($F_{20,35} = 2.67$, $p = 0.005$) y la fecha de eclosión (modelo final: $F_{1,35} = 3.17$, $p = 0.008$) se mantuvieron en el modelo final. Así, aunque las hembras tendieron a alimentar a sus crías con mayor frecuencia en los nidos con huevos oscuros experimentales [media tasa de alimentación por hora (SE) = 5.35 (0.32) vs 4.12 (0.47)], las diferencias no alcanzaron significación estadística ($F_{1,45.8} = 3.62$, $p = 0.06$) después de controlarse por su

efecto la tasa de ceba de los machos ($F_{1,36} = 0.47$, $p = 0.50$), la fecha de puesta ($F_{1,36} = 2.93$, $p = 0.096$), la variación de edad de la nidada dentro de cada observación ($F_{1,36} = 3.01$, $p = 0.091$), el tiempo de observación ($F_{1,36} = 0.94$, $p = 0.40$) y la identidad del nido ($F_{20,36} = 3.08$, $p = 0.002$). Como consecuencia de ello, el número total de episodios de alimentación fue mayor en los nidos con huevos oscuros [media tasa de alimentación por hora (SE) = 5.05 (0.53)] que en los nidos con huevos claros [tasa promedio de alimentación por hora (SE) = 7.36 (0.51); modelo completo, el efecto del tratamiento: $F_{1,53} = 10.10$, $p = 0.002$].

5.3. Objetivo 3: coloración de los huevos y condición nutricional de los pollos

El efecto de nuestro experimento de alimentación suplementaria sobre la respuesta inmunitaria de los pollos a la PHA fue mayor en nidos donde se incubaron huevos con una menor intensidad de coloración verde azulada [$R(400-575)/R(300-700)$: $r = -0.61$, $p = 0.001$, $N = 25$; **Figura 11**]. Esta relación negativa no se debió a un efecto negativo del experimento de alimentación suplementaria sobre la respuesta a la PHA, detectada en algunos nidos (es decir, la respuesta PHA de los pollos control resultó mayor que el de los pollos experimentales), ya que sólo cuando utilizamos aquellos nidos donde los efectos fueron positivos, la relación siguió siendo negativa y significativa ($r = -0.53$, $N = 17$, $p = 0.029$).

Por otra parte, cuando se añade al modelo la fecha de la puesta (Beta parcial (SE) = 0.358 (0.151), $t_{22} = 2.37$, $p = 0.027$), ésta explica una parte significativa de la variación observada en la diferencia de la respuesta a la PHA, distinta a la varianza explicada por la intensidad del color verde azulado del huevo (Beta parcial (SE) = -0.610 (0.151), $t_{22} = 4.04$, $p = 0.0006$), aunque esto no ocurrió con el tamaño de la puesta ($p = 0.8$) o con el número de pollos ($p = 0.8$). Por lo tanto, el efecto del experimento de alimentación suplementaria varió en función de la intensidad del color verde azulado de los huevos.

Por último, también se detectó que la relación entre el grado de respuesta inmune a la PHA y la coloración de los huevos fue diferente entre los pollos experimentales y los controles (ANCOVA, $F_{1,23} = 13.9$, $p = 0.0011$; la interacción entre la intensidad de color verde azulado y el tratamiento experimental: $F_{1,23} = 13.5$, $p = 0.0013$). La respuesta inmune de los pollos en nidos con huevos de colores claros tendieron a ser más bajas para los pollos control que para los experimentales, ocurriendo lo contrario en los nidos con huevos de coloración verde azulada más intensa (**Figura 12**).

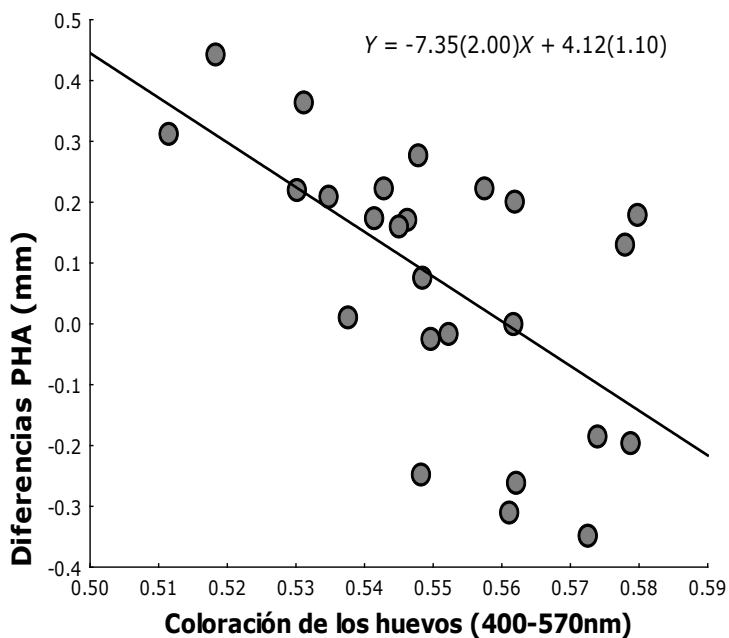


Figura 11: Relación entre la coloración verde azulada [R(400-575nm) / R(300-700nm)] de los huevos y diferencia en la respuesta PHA de los pollos suplementados y los pollos control del mismo nido. La ecuación y la línea de regresión también se muestran.

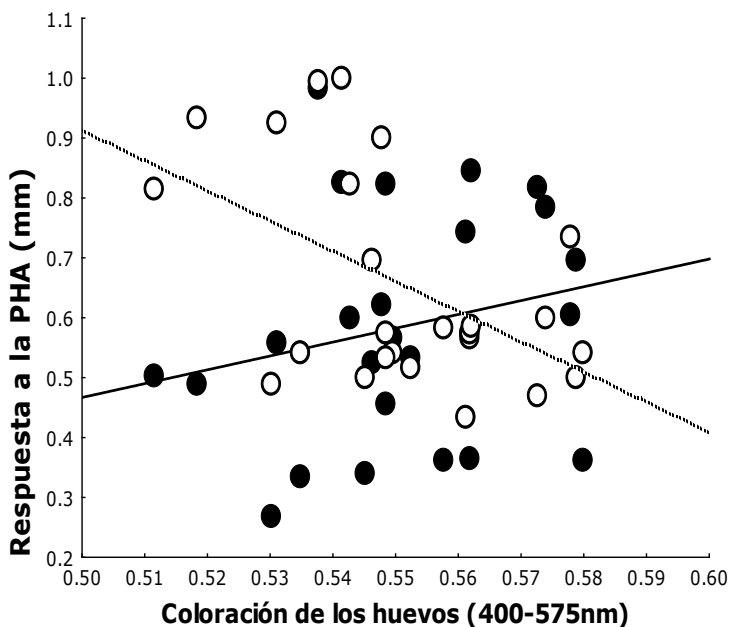


Figura 12. Relación entre la coloración verde azulada [R(400-575 nm)/R(300-700 nm)] de los huevos y la respuesta a la PHA de los pollos con alimentación suplementaria (círculos y línea de regresión de puntos) y de los pollos control (círculos negros y línea continua) en el nido.

5.4. Objetivo 4: coloración de los huevos y contenido de carotenoides y vitaminas A y E en la yema

Figura 13 A

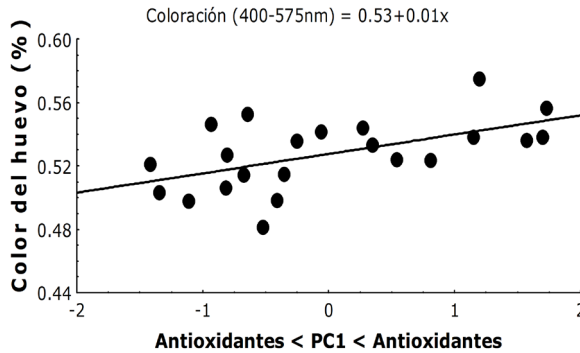


Figura 13 B

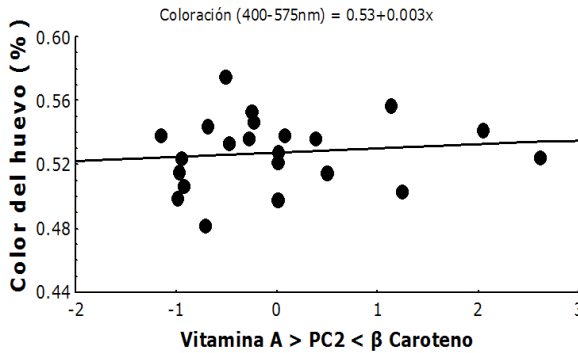


Figura 13 C

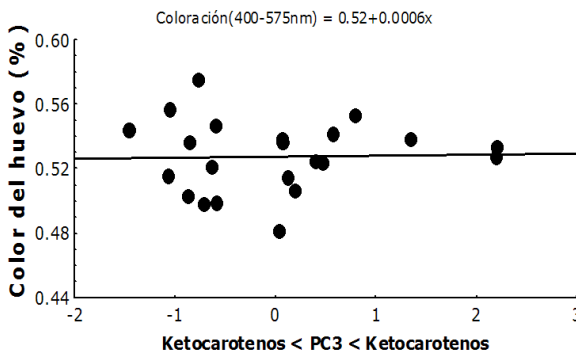


Figura 13. Relación entre la intensidad de la coloración verde azulada de los huevos [(R400–575) / (R300–700)] de estornino negro y el valor de **(A)** PC1 (que se encuentra positivamente relacionada con la concentración y el total de vitamina E, cis-luteína, trans-luteína and zeaxantina), **(B)** PC2 (que se encuentra positivamente relacionado con la concentración de β-carotenos y negativamente con la concentración de vitamina A) y **(C)** PC3 (que se encuentra positivamente relacionado con la concentración de ketocarotenos) en la yema. En cada caso, se muestra la línea de regresión. N=23 nidos

Los carotenoides y las vitaminas encontrados en las yema de los huevos de estornino negro fueron similares a las encontrados en otras especies (Cassey et al., 2005). En unidades de $\mu\text{g/g}$, las vitaminas A y E representaron el 2% y 49%, respectivamente, del total de los antioxidantes estudiados en las yemas de huevo de los estorninos, mientras los carotenoides comprendieron el 49% restante de los antioxidantes totales analizados en las yemas de huevo, con la luteína y la xantofila como la forma dominante (**Tabla III**).

Encontramos una relación significativa y positiva entre la intensidad de la coloración azul verdosa de la cáscaras de huevo de estorninos y la concentración y la cantidad de algunos [PC1: $F_{1,18} = 8.10$, $p = 0.011$, Beta (SE) = 0.55 (0.19); **Figura 13**], pero no de otros antioxidantes de la yema [PC2: $F_{1,18} = 0.35$, $p = 0.56$, beta (SE) = 0.12 (0.19); PC3: $F_{1,18} = 0.02$, $p = 0.89$, Beta (SE) = 0.03 (0.19); **Figura 13**].

El modelo completo explicó el 21% de la varianza en la intensidad de la coloración de los huevos ($r^2 = 0.21$, $F_{3,18} = 2.82$ $p = 0.068$). Estos resultados no cambiaron cuando se utilizó un huevo seleccionado al azar por nido [PC1: $F_{1,18} = 8.17$, $p = 0.010$, Beta(SE) = 0.55(0.19); PC2: $F_{1,18} = 0.59$, $p = 0.45$, Beta(SE) = 0.15(0.19); PC3: $F_{1,18} = 0.09$, $p = 0.77$, Beta(SE) = 0.05(0.19)], o se incluyó el efecto no significativo de la fecha de puesta [$F_{1,17} = 0.013$, $p = 0.91$, Beta(SE) = 0.02(0.20)] en el modelo [PC1: $F_{1,17} = 7.64$, $p = 0.013$, Beta(SE) = 0.55(0.20)]. La inclusión del efecto no significativo del volumen de los huevos [$F_{1,17} = 4.38$, $p = 0.052$, Beta (SE) = 0.40 (0.18)] en el modelo tampoco afectó a la significación de la relación detectada [PC1: $F_{1,17} = 6.76$, $p = 0.019$, Beta (SE) = 0.47 (0.18)]. Por lo tanto, la intensidad de la coloración verde azulada de los huevos de estornino negro refleja la cantidad y concentración de los antioxidantes más abundantes en la yema del huevo (luteína, zeaxantina y vitamina E).

5.5. Objetivo 5: coloración del pico como señal indicadora del contenido de carotenoides y de vitamina A y E en plasma

5.5.1. Diferencias sexuales en la coloración del pico de los estorninos

Se detectaron diferencias sexuales en la coloración de la punta del pico dentro de la banda de frecuencias de los carotenoides (entre 450 y 570nm; MANOVA: $F_{3,57} = 48.14$, $p < 0.0001$), después de controlar por el efecto de la fecha de captura (MANOVA: $F_{3,57} = 11.69$, $p < 0.0001$) y

de la fecha de captura al cuadrado (MANOVA: $F_{3,57} = 12.05$, $p < 0.0001$). Los picos de las hembras mostraron una coloración más saturada ($F_{1,59} = 67.57$, $p < 0.0001$) y una tendencia no significativa a ser más brillante ($F_{1,59} = 3.32$, $p = 0.051$) que los de los machos en la banda de longitudes de onda de los carotenoides (450-570nm; Figura 14). El tono estimado dentro de la banda de longitudes de onda de carotenoides no varió con el sexo ($F_{1,59} = 0.26$, $p = 0.61$). Por otra parte, los machos tuvieron una menor concentración total de carotenoides circulantes en el plasma que las hembras (MANOVA para las diferencias en la concentración total de carotenoides entre machos y hembras, incluyendo la fecha de captura y la fecha de captura al cuadrado como covariables y el efecto del sexo: $F_{5,56} = 2.58$, $p = 0.036$, (ver resultados univariantes de la prueba en el Tabla IV). Por último, no se detectaron diferencias entre los sexos en la concentración de vitamina A en plasma ($F_{1,60} = 0.15$, $p = 0.69$).

Figura 14A

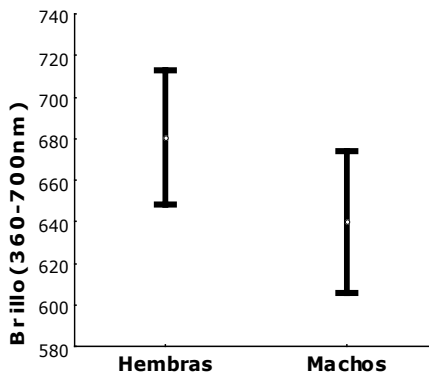


Figura 14B

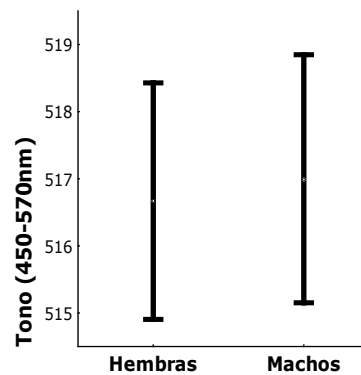


Figura 14C

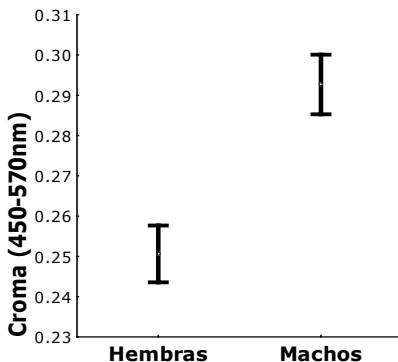


Figura 14. Medias \pm SE estimadas para los parámetros de coloración del pico de los estornino, en hembras (N=33) y machos (N=30), (A) de brillo, (B) tono (450-570nm) y (C) cromina.

5.5.2. Correlación entre condición corporal, niveles de antioxidantes en plasma y coloración del pico durante el emparejamiento

Durante la temporada de apareamiento se encontró una relación positiva significativa entre el tono de la punta del pico y la concentración total de carotenoides en plasma (TPCL) en ambos sexos (**Tabla IV**). También detectamos una asociación negativa entre el TPCL y el croma y el brillo de los picos de los estorninos, después de controlar por el efecto del sexo, la fecha de captura, y la fecha de captura al cuadrado (MANOVA: $F_{3,53} = 19.56$, $P < 0.0001$; ver el resultado de la pruebas univariantes en el **Tabla IV**; **Figura 15**). El nivel de vitamina A en plasma también explica una porción adicional de la variación en color del pico (croma; MANOVA: $F_{3,53} = 2.90$, $p = 0.04$; ver los resultados de las pruebas univariantes en el **Tabla IV**; **Figura 15**).

Figura 15A

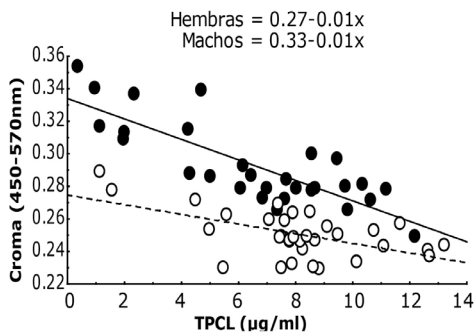


Figura 15B

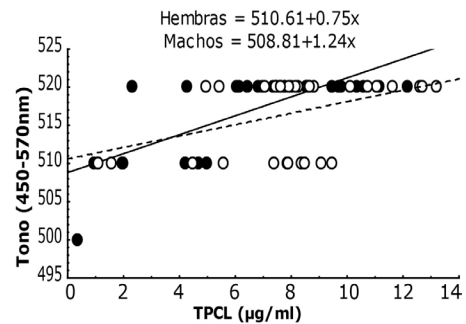


Figura 15C

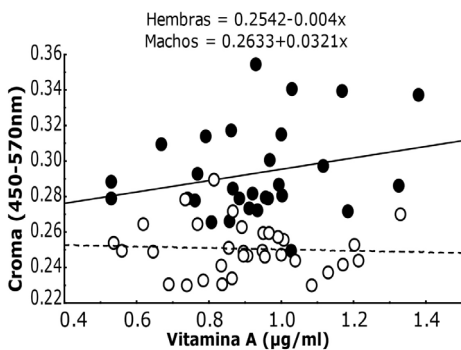


Figura 15. Se muestran las relaciones entre las concentraciones plasmáticas de carotenoides en plasma (TPCL) y (A) croma del pico y (B) el tono y las relaciones entre (C) entre la concentración de vitamina A en el plasma y el croma del pico de machos (símbolos rellenos) y para las hembras (símbolos vacíos). Se muestran las líneas de regresión.

Por otra parte, las relaciones entre el color del pico y el TPCL difirieron para machos y hembras durante la época de apareamiento. Esta diferencia no aparece entre las relaciones del color del pico y la condición corporal o la vitamina A, (MANOVA: Sexo x TPCL: $F_{3,52} = 3.71$, $p < 0.017$; Sexo x vitamina A: $F_{3,52} = 0.92$, $p < 0.43$; Sexo x condición corporal: $F_{3,52} = 2.23$, $p < 0.09$; ver los resultados de las pruebas univariantes en el **Tabla IV**). La relación entre el brillo del pico y el TPCL fue positiva en las hembras y negativa en los machos (**Tabla IV**).

También se encontró que la pendiente de la relación entre el tono y el TPCL fue mayor en los machos que en las hembras (**Figura 15B**; ver las estadísticas asociadas a la interacción en el **Tabla IV**), y que tanto machos como hembras mostraron una relación negativa entre el TPCL y croma asociado a carotenoides. Los niveles plasmáticos de vitamina A no se relacionaron con el TPCL ($F_{1,61} = 2.00$, $p = 0.16$). Además, no hubo una relación significativa entre la condición corporal y el TPCL ($F_{1,59} = 0.38$, $p = 0.13$) o la concentración plasmática de vitamina A ($F_{1,59} = 0.40$, $p = 0.52$) después de controlar por sexo, fecha de captura, y fecha de captura al cuadrado.

5.5.3. Correlación entre condición corporal, niveles de antioxidantes en plasma y coloración del pico después de la eclosión

Ni la condición corporal, ni el TPCL, ni la concentración de vitamina A en el plasma explicaron ninguna de las variables de color estudiadas en la punta del pico de los individuos capturados unos días después de la eclosión (croma (450-570nm), tono (450-570nm) y brillo; MANOVA: Condición corporal $F_{3,46} = 0.35$, $p = 0.79$; TPCL $F_{3,46} = 0.25$, $p = 0.86$; vitamina A $F_{3,46} = 0.71$, $p = 0.55$) después de controlar por el efecto del sexo (MANOVA: $F_{3,46} = 8.88$, $p < 0.001$), la fecha de eclosión (MANOVA: $F_{3,46} = 0.67$, $p = 0.57$) y la fecha de eclosión al cuadrado (MANOVA: $F_{3,46} = 0.90$, $p = 0.45$). Los términos de interacción entre el sexo y TPCL (MANOVA: $F_{3,45} = 2.05$, $p = 0.12$), el sexo y la vitamina A (MANOVA: $F_{3,45} = 1.25$, $p = 0.30$), y el sexo y la condición corporal (MANOVA: $F_{3,45} = 0.45$, $p = 0.71$) no explicaron una proporción significativa de la variación en la coloración del pico dos o tres días después de la eclosión. Sólo la interacción entre el sexo y la fecha al cuadrado resultó estadísticamente significativa (MANOVA: $F_{3,45} = 2.72$, $p = 0.05$). Las pruebas univariantes mostraron que la relación entre la fecha de eclosión y el croma (450-570nm) varió con el sexo ($F_{1,47} = 8.05$, $p = 0.007$), aunque esto no ocurrió con el tono (450-570nm) ($F_{1,47} = 3.33$, $p = 0.07$) o el brillo

($F_{1,47} = 0.06$, $p = 0.80$). El croma (450-570nm) en las hembras aumentó conforme avanzaba la temporada ($F_{1,35} = 35.61$, $p < 0.0001$, $r = 0.71$), y esta tendencia no se detectó en los machos ($F_{1,16} = 0.09$, $p = 0.76$, $r = -0.08$).

5.5.4. Cambio temporal de la coloración del pico y de los niveles de antioxidantes

El análisis de la coloración del pico en las aves capturadas reveló que la coloración del pico variaba a lo largo de la estación reproductora; tanto en los machos (MANOVA, $F_{4,45} = 8.90$, $p = 0.00002$) como en las hembras (MANOVA $F_{4,69} = 8.70$, $p = 0.00001$) de estornino negro. Los picos de las hembras, en el período de incubación, fueron menos brillantes, tenían menos matices, y eran más saturados en la banda de frecuencias de los carotenoides en comparación con los valores de color estimados en el período de apareamiento. Picos de los machos capturados dos días después de la eclosión tuvieron menor brillo y croma (450-570nm), pero más coloración verde amarillenta (tono a 450-570nm) que los capturados durante el período de apareamiento (ver **Tabla V**).

En los machos, los niveles de TPCL ($F_{1,48} = 8.74$, $p = 0.005$) y de vitamina A en plasma ($F_{1,48} = 7.36$, $p = 0.009$) fueron más altos durante el periodo posterior a la eclosión de los pollos [TPCL, media (SE) = 9.20 (0.64)]; Vitamina A: media (SE) = 1.09 (0.05)] que durante la etapa de apareamiento [TPCL, media (SE) = 6.43 (0.58), Vitamina A: media (SE) = 0.93 (0.04)]. Del mismo modo, las hembras mostraron un aumento de la concentración de vitamina A [$F_{1,68} = 6.99$, $p = 0.01$; etapa de apareamiento: media (SE) = 0.90 (0.03), etapa posterior a la eclosión: media (SE) = 1.03 (0.04)], aunque mostraron una reducción de los niveles plasmáticos de carotenoides (TPCL) entre la etapa de apareamiento y la de eclosión de los huevos [$F_{1,68} = 11.96$, $p = 0.0009$; etapa de apareamiento: media (SE) = 7.83 (0.48), etapa de eclosión: media (SE) = 5.22 (0.47)].

6. DISCUSIÓN

Al principio vienen necesariamente a la mente la fantasía y la fábula. Desfilan después los cálculos matemáticos, y solo al final la realización corona el pensamiento.

Konstantin Tsiolkovsky

En esta tesis se aportan varias evidencias experimentales que apoyan la hipótesis de que la intensidad del color verde azulado de los huevos de estornino negro es un carácter seleccionado sexualmente que los machos utilizan para ajustar su esfuerzo parental (SSEC). Además, se aportan resultados que sugieren que la coloración del pico de esta especie es un rasgo plástico, indicador de la capacidad antioxidativa de los individuos, y que por tanto podría estar siendo seleccionado sexualmente en esta especie. A continuación se discuten algunos aspectos relacionados con los métodos experimentales utilizados y los resultados obtenidos, así como otras hipótesis alternativas que podrían explicar los hallazgos más significativos de esta tesis.

El tratamiento experimental de corte de plumas del ala, que acarrea un gasto de energía asociado a las actividades de vuelo (Møller et al. 1995), se reflejó en una mayor tasa de pérdida de masa corporal de las hembras experimentales en comparación con las hembras control (ver **Métodos 4.2**). El experimento se realizó semanas antes de la puesta de huevos, por lo que conseguimos manipular experimentalmente la condición de las hembras a la hora de realizar la puesta. Moreno y Osorno (2003)

habían predicho una relación positiva entre la condición de las hembras y la intensidad de la coloración verde azulada del huevo (**Objetivo 1**). Si las hembras reflejasen sus niveles de estrés oxidativo en la intensidad de la coloración de los huevos gracias a las propiedades antioxidantes de la biliverdina, deberíamos encontrar una relación positiva entre la condición corporal de las hembras y la intensidad del color verde azulado de los huevos. Esta relación ha sido empíricamente demostrada en diferentes especies (ver **Introducción**). Además, en un experimento de alimentación suplementaria, Moreno et al. (2006a) demostraron que las hembras alimentadas suplementariamente ponían huevos de coloración verde azulada más intensa que las hembras controles. En nuestro estudio manipulamos la condición corporal de las hembras aumentando la carga alar, lo que les provocó un mayor esfuerzo en sus actividades de vuelo. El efecto que detectamos únicamente puede ser explicado por una asociación entre color y esfuerzo físico realizado antes de la puesta del huevo; esfuerzo que debe de estar relacionado con el estrés oxidativo, tal y como predice la hipótesis SSEC. Al no manipular las condiciones nutricionales de las hembras directamente, las diferencias encontradas en la coloración de los huevos entre las hembras experimentales y de control no se puede explicar por un efecto directo de los pigmentos adquiridos en la dieta.

En nuestro segundo experimento (**Objetivo 2**) se investigó el efecto del color del huevo *per se* en el esfuerzo de alimentación de los padres. Tal y como ocurre con otros caracteres sexuales secundarios seleccionados después del apareamiento (Burley, 1988; Sheldon, 2000), se esperaría una inversión diferencial en reproducción de los machos que, en nuestro caso, se ajustaría a la intensidad de la coloración verde azulada de los huevos del estornino. Según la SSEC, la intensidad de la coloración verde azulada de los huevos en el estornino negro señalaría la condición corporal de las hembras, y los machos deberían invertir diferencialmente en la reproducción en función de la intensidad de dicha señal (Moreno y Osorno, 2003). El macho, sin embargo, podría seguir cualquier carácter de la hembra asociado con la coloración de los huevos (v.g., condición física o de vuelo) por lo que, para demostrar que el color de los huevos es el responsable directo de la hipotética asociación con el esfuerzo reproductor, sería necesario romper la asociación entre el color de los huevos y la condición corporal de las hembras con un experimento. Para ello, recurrimos al uso de huevos artificiales con distinta intensidad de color verde azulado. Estos huevos artificiales, pese a no reflejar las longitudes de onda ultravioletas (UV), presentan un croma verde azulado que se encuentra dentro de los límites de los huevos naturales (**Figura 4**) y las

curvas de reflectancia de los dos tipos de huevos modelo usados (oscuros y pálidos) fue similar a la de la curva estimada para los huevos naturales (en el visible) (**Figura 3**). Los resultados de este experimento se ajustaron a la predicción de la SSEC, ya que se detectó que los machos que se encontraron con huevos artificiales de intensa coloración verde azulada en sus nidos alimentaban a sus pollos con más frecuencia que los machos que en sus nidos tuvieron huevos artificiales claros (**Figura 10**).

La asociación entre el color de los huevos experimentales y la tasa de ceba de los machos no se puede explicar por la coloración de los huevos naturales ya que los tratamientos experimentales fueron asignados al azar y los huevos naturales fueron retirados de los nidos poco después de haber sido puestos por la hembra. Además, los pollos criados en los nidos experimentales no estaban emparentados con los adultos, por lo que la posible relación entre la coloración verde azulada de los huevos naturales y la calidad fenotípica de los pollos (v.g., inmunocompetencia, ver **Introducción**) se rompió con nuestro diseño experimental. Actualmente no tenemos conocimiento de ninguna otra hipótesis que pudiese explicar el efecto de los huevos artificiales en el esfuerzo parental de los machos; efecto que solamente predice la hipótesis de que la intensidad del color verde azulado de los huevos es una señal sexual de las hembras de estornino negro que afecta al esfuerzo parental de su pareja (SSEC) (Moreno y Osorno, 2003). Existen otros apoyos experimentales de la relación entre el color verde azulado del huevo y el esfuerzo parental del macho. Moreno et al. (2006b), en un experimento de intercambio de huevos entre nidos, detectaron que la coloración del huevo experimental se relacionaba con el esfuerzo parental de los machos del papamoscas cerrojillo. Sin embargo, Krist y Grim (2007) no encontraron esta relación en un estudio similar realizado en una especie cercana. En estos experimentos los machos habían alimentado a pollos procedentes de los mismos huevos que habían visto y, debido a que el color del huevo se asocia con la inversión maternal realizada (v.g. calidad de los embriones; anticuerpos y antioxidantes; Morales et al. 2006; ver **Resultados 5.4**), la calidad de los pollos (relacionada con el color de los huevos), y el ajuste parental a la misma, podrían explicar de forma indirecta la asociación entre coloración de huevos y cebas de los padres en estos experimentos.

La hipótesis de que la pigmentación de los huevos podría funcionar como una señal sexual postcopulatoria, predice también unas mejores condiciones ambientales para el crecimiento de los pollos en los nidos con huevos de color verde azulado más intenso. En nuestro experimento con huevos artificiales hemos detectado un efecto, consecuencia de la coloración de los huevos, en el esfuerzo de alimentación parental. Por

otra parte, las hembras también tendieron a alimentar sus crías con mayor frecuencia en los nidos con huevos artificiales oscuros, aunque esta tendencia no fue estadísticamente significativa, lo que puede sugerir que las hembras utilizan el esfuerzo parental de alimentación de sus compañeros para ajustar su propio esfuerzo de alimentación. De acuerdo con esta posibilidad, se encontró que los esfuerzos de alimentación de machos y de hembras se relacionaban de forma significativa ($r=0,52$, $N=20$, $P=0.019$), pero sólo durante la primera etapa del desarrollo de los pollos. En cualquier caso, aunque nuestros resultados sugieren un mejor ambiente nutricional para los pollos criados en nidos con huevos oscuros, no hemos encontrado ningún efecto significativo del experimento en la calidad fenotípica de estos pollos, medida ésta al final del período de anidación (es decir, respuesta PHA, masa corporal y condición corporal; comparaciones entre pollos criados en nidos con huevos experimentales claros y oscuro: $t_{16} \leq 1.08$, $p \geq 0,29$). Sin embargo, el tamaño de la muestra fue muy pequeño (ver **Figura 10**) y, por tanto, el riesgo de no rechazar la hipótesis nula cuando ésta es falsa es bastante grande. Otro aspecto de nuestro diseño experimental que disminuiría las probabilidades de encontrar un efecto en calidad fenotípica de los pollos fue que ajustamos el tamaño de la nidada de todos los nidos experimentales a dos o tres crías con el fin de reducir la mortalidad de los polluelos, y que se mantuvo homogéneo el número de pollos por nido en los distintos tipos de tratamiento. Sin embargo, el tener un tamaño de pollada bajo en los dos tratamientos hizo muy difícil poder encontrar diferencias significativas en la calidad fenotípica de los pollos de nidos con puestas experimentales claras y oscuras puesto que los efectos derivados de la competencia entre hermanos se minimizan.

Teniendo en cuenta todos estos problemas, y para poner a prueba la hipótesis de que la intensidad del color verde azulado de los huevos de estornino negro predice el ambiente nutricional que experimentan los pollos durante su desarrollo, realizamos un experimento de alimentación suplementaria en una submuestra de los nidos (**Objetivo 3**). En concordancia con los experimentos anteriores de alimentación suplementaria realizados en otros paseriformes (v.g., las urracas: De Neve et al., 2004b; De Neve et al., 2004c; golondrinas: Saino et al., 1997), encontramos que la respuesta inmunitaria a la PHA de los polluelos se asociaba al alimento extra y, por tanto, usamos las diferencias en respuesta inmunitaria entre pollos experimentales y controles del mismo nido como índice del ambiente nutricional del nido. A menores diferencias, mejor ambiente. De acuerdo con esta interpretación encontramos que la fecha de puesta (una variable relacionada con las condiciones nutricionales que experimentan

los pollos en sus nidos) estaba positivamente relacionada con la diferencia en la respuesta a la PHA entre los hermanos experimentales y de control (ver **Resultados**). Nuestro experimento de alimentación suplementaria provocó mayores efectos positivos en los nidos en los que los huevos reflejaban menos en las longitudes de onda verde azules (400-575nm) (**Figura 12**), como predice la SSEC. Una explicación alternativa para este resultado podría ser que la coloración de los huevos y la calidad de las crías (v.g. su inmunocompetencia) se relacionasen positivamente como consecuencia de la correlación entre la inversión maternal en el huevo, y/o la calidad genética de la hembra, y la coloración de éste huevo (Morales et al., 2006). Sin embargo, los resultados de nuestro experimento con huevos artificiales coloreados mostraron que el color de los huevos *per se* tiene un efecto en el esfuerzo reproductor de los machos que, al menos parcialmente, tendría que explicar la relación entre el color de los huevos y el ambiente nutricional de los nidos.

Curiosamente nuestro experimento de la alimentación suplementaria tuvo efectos negativos en los nidos donde los huevos eran de coloración más verde azulada, ya que las crías experimentales mostraron una menor respuesta inmune que sus hermanos control (ver **Figura 12**). Este resultado se debió principalmente a la relación negativa encontrada entre la respuesta PHA y la coloración verde azulada del huevo para los pollos experimentales, mientras que fue positiva para los pollos de control (**Figura 12**). No tenemos datos sobre el comportamiento petitorio de los pollos experimentales y de control, ni de la calidad de los alimentos proporcionados por los adultos, y, por tanto, los posibles escenarios que podrían explicar este resultado son meramente especulativos (Ver **Tabla I**).

Analizando el contenido en antioxidantes de los huevos de estornino (**Objetivo 4**) encontramos que la intensidad del color azul verdoso de la cáscaras de los huevos de estorninos negros se relacionaba positivamente con la concentración y la cantidad de vitamina E y de dos hydroxycarotenos comunes en la yema del huevo, la luteína y la zeaxantina. Los carotenoides y las vitaminas liposolubles son valiosos micronutrientes para el desarrollo de embriones que pueden afectar el éxito de eclosión (Surai et al., 2001a; Møller et al., 2008), el sistema inmune de los pollos (Saino et al., 2003), y la supervivencia de las aves adultas (McGraw et al., 2005). Hemos demostrado previamente que el esfuerzo paterno de los estorninos aumenta en los nidos con huevos de coloración más verde azulada (**Objetivo 2**), interpretándolo como el ajuste de los machos a la condición de las hembras (v.g., su estado oxidativo, inmunológico, hormonal)

(Moreno y Osorno, 2003). Los resultados de composición de los huevos sugieren que este ajuste puede estar también relacionado con la inversión maternal en la yema del huevo (Morales et al., 2006).

La biliverdina, el pigmento responsable del color azul verdoso de la cáscara del huevo, es un potente antioxidante sintetizado por las hembras durante la formación del huevo, que puede combatir el estrés oxidativo (Stocker et al., 1987, Zhao et al., 2006). Otros antioxidantes como los carotenoides y las vitaminas A y E no pueden ser sintetizados *de novo* por los vertebrados, y se obtienen de los alimentos. Los carotenoides limitan los recursos de las hembras a la hora de incluirlos en los huevos (Blount et al., 2004). Los carotenoides, sin embargo, no siempre presentan actividad antioxidante *in vitro* (Costantini y Møller, 2008), aunque pueden trabajar en conjunto con otros antioxidantes no pigmentados, como algunas enzimas y vitaminas y mejorar la salud (Hartley y Kennedy, 2004). Por ello, algunos autores han sugerido que los carotenoides pueden actuar como señales para revelar la disponibilidad de antioxidantes no pigmentados en el cuerpo (o en los huevos en el caso de las aves) (Bertrand et al., 2006; Pike et al., 2007; Pérez et al., 2008). Así pues, parece que sólo las hembras con un equilibrio oxidativo óptimo, y capaces de poner huevos de color azul verdoso intenso, podrán incluir concentraciones elevadas de carotenoides y vitaminas en la yema del huevo (ver **Introducción**). Las asociaciones entre los antioxidantes pigmentarios y no pigmentarios, sin embargo, no siempre se detectan. En un estudio realizado en noventa y nueve especies de aves, Cohen y McGraw (2009) no encontraron asociaciones entre los niveles de vitamina E y carotenoides en el plasma. Aquí hemos encontrado que la intensidad del color azul verdoso se asocia con la vitamina E y los carotenoides, aunque no medimos directamente el contenido de biliverdina en la cáscara del huevo, un estudio previo había demostrado esta asociación para nuestra especie (López Rull et al., 2008). Por otra parte, se sabe que la asignación de pigmento en los huevos reduce los niveles de antioxidantes en el plasma de las hembras del papamoscas (Morales et al., 2008). Así, la relación entre la intensidad de color de la cáscara del huevo y los niveles de vitamina E en la yema podría ser un ejemplo de la utilización de antioxidantes pigmentarios en las cáscaras del huevo para la señalización de la disponibilidad de las moléculas de antioxidantes no pigmentarios y pigmentarios.

Hasta donde sabemos, sólo Cassey et al. (2009) y Hargitai et al. (2010) han testado previamente la relación entre los antioxidantes de la yema del huevo y la coloración de la cáscara del mismo, ambos con resultados contradictorios. Cassey et al. (2009) no encontraron relación entre los niveles totales de antioxidantes y la coloración del huevo en dos

especies de zorzales, mientras que Hargitai et al. (2010) encontraron una relación entre el croma azul verdoso de las cáscaras de los huevos del cuco europeo y del carricero tordal y los niveles de antioxidantes en las yemas. En esta tesis, presentamos resultados que confirman la relación entre los carotenoides y la coloración de los huevos en el estornino negro. La intensidad de la coloración verde azulada de la cáscara del huevo de los estorninos está relacionada positivamente con la concentración y la cantidad de vitamina E, luteína-trans, cis-luteína y zeaxantina (PC1) en la yema, pero no con otros carotenoides (**Figura 13**). Una posible razón para esta asociación entre la vitamina E, la luteína-trans, cis-luteína y zeaxantina (PC1) podría ser que la zeaxantina es un estereoisómero de la luteína y ambos se acumulan en niveles similares en los tejidos. Además, se ha sugerido que estos dos carotenoides pueden desempeñar funciones análogas a la vitamina E (α -tocoferol) en el hígado de los embriones, siendo posteriormente la zeaxantina y la luteína reemplazadas gradualmente en esta función por la vitamina E, a medida que avanza el desarrollo del embrión (ver revisión en Surai et al., 2001c).

En esta tesis también estudiamos si la coloración del pico en machos y hembras de estornino negro podría señalar los niveles circulantes de carotenoides y/o vitamina A (retinol) en plasma a corto plazo (**Objetivo 5**). Encontramos diferencias sexuales pero, contrariamente a lo que ocurre en otras especies de aves en las que los machos tienen caracteres dependientes de carotenoides más coloridos que las hembras (Price y Burley, 1993; McGraw et al., 2003; Faivre et al., 2003, McGraw y Ardia, 2005), las hembras del estornino tienen mayores niveles de carotenoides circulantes que los machos (**Tabla II**). Esta diferencia entre sexos no se puede atribuir a diferencias en la proporción celular y plasmática de la sangre, ya que los machos y las hembras no difirieron en el hematocrito en 2005 [machos ($n = 61$), media = 52.9%, SD = 3.2; hembras ($n = 41$), media = 52.2%, SD = 2.7] y en 2006 [machos ($n = 35$), media = 52.4%, SD = 3.1; hembras ($n = 48$), media = 52.1%, SD = 2.8; $F_{1,183} = 1.77$, $p = 0.18$], incluso después de controlar por la fecha ($F_{1,182} = 0.017$, $p = 0.90$) y la fecha al cuadrado ($F_{1,81} = 0.074$, $p = 0.79$) de captura. La punta del pico de los estorninos negros no difieren entre machos y hembras en el tono para longitudes de onda del rango de los carotenoides (**Figura 14**). Sin embargo, la punta del pico de las hembras muestra una cresta adicional en las longitudes de onda comprendidas entre 570 y 700 nm (**Figura 8**) y, por tanto, las puntas de pico de las hembras son más coloridas que las de los machos (**Figura 8**). Esta diferencia sexual detectada podría sugerir que este carácter está sujeto a una selección más intensa en las hembras que en los machos.

Por otro lado, independientemente de si la selección sexual es más fuerte sobre la coloración del pico en los machos que en las hembras, la selección por parte de los machos de hembras con picos más coloreados es generalmente la causa más probable de la evolución de una coloración exagerada basada en carotenoides en los picos de las hembras (Amundsen y Pärn, 2006; pero ver Rubenstein y Lovette, 2009 para la cría cooperativa en aves). Se sabe que las hembras transfieren micronutrientes esenciales, incluidos los carotenoides y vitaminas A y E, así como factores inmunológicos (ver **Objetivo 4**) a la descendencia, y que la cantidad de dichas sustancias deben estar relacionada con el fenotipo de las hembras y con las capacidades fisiológicas de éstas (Morales et al., 2006; Biard et al., 2007). Si este fuera el caso, los machos de estornino podrían seleccionar aquellas hembras con picos más coloreados que señalizasen mayores niveles de concentración en plasma de carotenoides y vitamina A. Se esperaría entonces que estas hembras más coloreadas transfirieran a los huevos mayores cantidades de estas sustancias que otras de menor coloración. Recíprocamente, mediante la evaluación de la intensidad del color del pico de los machos, las hembras también podrían obtener una estimación de la salud y la calidad de éste, ya que la relación entre la coloración del pico y los niveles plasmáticos de carotenoides y vitamina A se han encontrado en ambos sexos (ver **Figura 15, Tabla II**).

La relación entre el color del pico y la concentración plasmática de carotenoides durante la fase de apareamiento se ha detectado en otras especies de aves (v.g., Faivre et al., 2003, McGraw et al., 2003). Mecánicamente, esta relación podría explicarse por la absorción de carotenoides en los queratinocitos ranfotocales a través de la sangre circulante en los tejidos (Lucas y Stettenheim, 1972). Además, debido a las posibles influencias de las hormonas sexuales esteroideas sobre la disponibilidad de carotenoides y sobre la coloración, tal relación puede ser diferente para machos y para hembras (Alonso-Alvarez et al., 2004), lo que explicaría las diferencias detectadas entre el color del pico y la concentración plasmática de carotenoides entre machos y hembras (**Tabla V**). Aparte del hecho de que el estado fisiológico influye en la expresión de las señales sexuales, no podemos descartar la posibilidad, en nuestro estudio correlacional, de que en la expresión de la coloración del pico en sí misma (y la respuesta comportamentales de los receptores de la señal) pueda existir un proceso de retroalimentación que afecte a estos parámetros fisiológicos (Safran et al., 2008).

En esta tesis presentamos por primera vez una relación estadística entre el retinol y una coloración tegumentaria. Hasta la fecha, el esfuerzo de las investigaciones se ha venido centrando en el estudio de las asociaciones

entre las vitaminas E y C, y los caracteres sexuales secundarios. Sin embargo, la vitamina A está metabólicamente vinculada a los carotenoides (Devier y Laroundelle, 2005) y puede afectar tanto a la actividad sexual (Gaál y Csaba, 1998) como al desarrollo de los tegumentos (ver revisión en Debier y LaRondelle, 2005). Por lo tanto la vitamina A podría estar involucrada en la expresión de los caracteres sexuales secundarios por lo que serían necesarios estudios experimentales para poder conocer si la vitamina A es la causa o no de la coloración debida a los carotenoides del pico de las aves.

Las concentraciones plasmáticas de vitamina A y carotenoides no se encuentran interrelacionadas, lo que sugiere la existencia de diferentes mecanismos, nutricionales o metabólicos, subyacentes a la acumulación de estos dos compuestos. La concentración plasmática de carotenoides está relacionada con la cantidad de carotenoides que se consume en la dieta y los cambios en la ingesta de ésta puede dar lugar rápidamente a cambios en los carotenoides del plasma (revisión en Thurnham y Northrop-Clewes, 1999; ver Horak et al., 2004). Consumir una dieta rica en carotenoides puede producir un aumento de retinol en plasma, ya que aproximadamente el 10% de los carotenoides son consumidos como pro-vitamina A (es decir, β -caroteno) que se transforma en retinol en la mucosa intestinal (Ganguly et., 1953; Surai, 2002). Las concentraciones plasmáticas de retinol, sin embargo, están homeostáticamente reguladas, y deben permanecer relativamente constantes. Tanto altos como bajos niveles de vitamina A en plasma pueden tener graves efectos negativos. Así, el exceso de vitamina A se almacena en el hígado, siendo liberado directamente a la sangre cuando la concentración plasmática de vitamina A disminuye (Thurnham y Northrop-Clewes, 1999; Devier y LaRondelle, 2005) y, en consecuencia, la variación en los niveles plasmáticos de carotenoides y vitamina A podría estar relacionada con diferentes actividades fisiológicas. En este caso, sus concentraciones revelarían diferentes aspectos de la condición fisiológica de los individuos. Independiente de los mecanismos fisiológicos que explican la asociación entre los antioxidantes del plasma y el color del pico en el estornino negro, nuestros resultados sugieren que el color del pico de los machos y de las hembras puede ser utilizado por sus congéneres como una señal de su estado fisiológico.

Por último, hemos constatado que el color del pico de los machos y de las hembras de estornino negro cambió durante la temporada de cría, lo que sugiere que los machos o las hembras podrían, mutua y continuamente, evaluar la calidad de su compañero (ver Velando et al., 2006). A diferencia de algunos adornos dependientes de carotenoides sin actividad fisiológica, como las plumas (McGraw, 2006), los carotenoides que están presentes en el pico carnosos o en otros tipos de tegumentos (es decir,

activos fisiológicamente) pueden movilizarse, por lo que pueden indicar continuamente la actividad fisiológica de los individuos. Estos cambios en la coloración del pico fueron diferentes en machos y hembras, lo que podría indicar diferencias sexuales en la actividad hormonal (Burley et al., 1992; Negro et al., 1998), en los costos de la reproducción y/o en efectos negativos del parasitismo (Ewen et al., 2009).

Teniendo en cuenta los resultados de los estudios de antioxidantes en plasma y en huevos, en el caso de las hembras, éstas podrían anunciar a los machos sus características fisiológicas, incluyendo la vitamina A, a través del color de sus picos, mientras que a través del color de su huevos podrían señalar al macho la inversión maternal de una vitamina diferente (E) realizada por ellas en la yema. Estos ornamentos sexuales femeninos, que han sido tradicionalmente olvidados en los estudio de selección sexual (Amundsen, 2000), y que han sido estudiados generalmente en el contexto de la inversión diferencial en el apareamiento (Amundsen y Forsgren, 2001), permanecen casi inexplorados en el contexto de la selección sexual posterior a la formación de la pareja (v.et. Pilastro et al., 2003). En este sentido, la pigmentación de los huevos ofrece una buena posibilidad de estudiar estos procesos de selección sexual en las hembras.

Hasta ahora los esfuerzos de investigación se han centrado en el estudio de las predicciones de la hipótesis SSEC y en la búsqueda de apoyos empíricos, comparativos y experimentales (ver **Introducción**). En esta tesis, encontramos un soporte experimental para sus principales predicciones en los estorninos que, junto con estudios anteriores en otras especies, ratifican la posibilidad de que la coloración verde azulada de los huevos de muchas especies de aves tenga un componente sexual importante. Gracias a esta hipótesis se han conseguido evidencias experimentales fuertes de la importancia de los procesos de asignación diferencial de la inversión parental de los machos en relación con un carácter de las hembras que señala su condición fisiológica y su inversión maternal en los huevos. La información que reciben los machos por estas señales sexuales en los huevos podría además ser complementada con la información a corto plazo que la coloración de los picos de las hembras proporciona sobre su condición fisiológica, información del fenotipo de su pareja que también podrían recoger las hembras. Aunque quizás sean necesarios más experimentos para validar estas dos hipótesis, creemos que, en el caso de la coloración verde azulada de los huevos, es tiempo de explorar más intensamente la calidad de la señalización en las hembras asumiendo que este color verde azulado de los huevos que aparece en muchas especies, al menos en parte, es el resultado de la selección sexual post-cópula.

7. CONCLUSIONES

La ignorancia genera confianza más frecuentemente que el conocimiento, son aquellos que saben poco, y no esos que saben más, quienes tan positivamente afirman que este o aquel problema nunca será resuelto por la ciencia.

Charles Robert Darwin

1. La coloración verde azulada de los huevos es un carácter sexual post-temparejamiento de las hembras de estornino negro ya que:
 - a) La coloración verde azulada de los huevos indica la condición corporal de la hembra en el momento de la puesta.
 - b) La coloración verde azulada de los huevos indica la inversión maternal en antioxidantes realizada por la hembra en el huevo.
 - c) Los machos de estornino negro ajustan su inversión parental a la intensidad de la coloración verde azulada de los huevos de sus nidos.
 - d) La coloración verde azulada de los huevos de estornino negro se asocia con el ambiente nutricional experimentado por los pollos durante su crecimiento.
2. El color amarillo anaranjado que aparece en la punta del pico de los estorninos negros durante la época de cría parece ser un buen indicador de los niveles de antioxidantes en el plasma, tanto en machos como en hembras.
3. La mayor intensidad de la coloración de la punta del pico en las hembras podría indicar que esta señal estaría sometida a un proceso de selección mayor en las hembras que en los machos, o la existencia de un coste diferencial de la señal entre machos y hembras.
4. Nuestros resultados proporcionan el apoyo necesario para el uso de la coloración de los huevos y del pico como un rasgo a estudiar para profundizar en el conocimiento de los caracteres sexuales secundarios de las hembras.

BIBLIOGRAFÍA

El que lee mucho y anda mucho, ve mucho y sabe mucho.

Miguel de Cervantes Saavedra

- Alis, S. and Ripley, S. D. 1987. Handbook of the birds of India and Pakistan, Bombay, Oxford: Oxford University Press.
- Alonso-Álvarez, C. and Tella, J. L. 2001. Effects of experimental food restriction and body-mass changes on the avian T-cell-mediated immune response. *Can. J. Zool.* 79, 101-105.
- Alonso-Álvarez, C., Bertrand, S., Devevey, G., Gaillard, M., Prost, J., Faivre, B. and Sorci, G. 2004a. An experimental test of dose-dependent effect of carotenoids and immune activation on sexual signals and antioxidant activity. *Am. Nat.* 164, 651-659.
- Alonso-Álvarez, C., Bertrand, S., Devevey, G., Prost, J., Faivre, B. and Sorci, G. 2004b. Increased susceptibility to oxidative stress as a proximate cost of reproduction. *Ecol. Letters* 7, 363-368.
- Amundsen, T. and Pärn, H. 2006. Female colouration: Review of functional and non-functional hypotheses. In: Hill GE, McGraw KJ (ed) *Bird coloration. Vol. 2, Function and evolution.* Harvard University Press, Cambridge. MA.
- Amundsen, T. 2000. Why are female ornamented? *Trend Ecol. Evol.* 15, 149-155.
- Amundsen, T. and Forsgren, E. 2001. Male mate choice selects for female coloration in a fish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 13155-13160.

- Andersson, M. 1994. Sexual selection. Princeton University Press, Princeton.
- Andersson, S., Pryke, S. R., Ornborg, J., Lawes, M. J. and Andersson, M. 2002. Multiple receivers, multiple ornaments and a trade-off between agonistic and epigamic signalling in a widowbird. *Am. Nat.* 160, 683-691.
- Aparicio, J. M., Cordero, P. J. and Veiga, J. P. 2001. A test of the hypothesis of mate choice based on heterozygosity in the spotless starling. *Anim. Behav.* 61, 1001-1006.
- Armstrong, G. A. and Hearst, J. E. 1996. Carotenoids 2: Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *Faseb J.* 10, 228-37.
- Avilés, J. M., Soler, J. J. and Pérez-Contreras, T. 2006a. Dark nests and egg colour in birds: a possible functional role of ultraviolet reflectance in egg detectability. *Proc. R. Soc. B* 273, 2821-2829.
- Avilés, J. M., Soler, J. J., Pérez-Contreras, T., Soler, M. and Møller, A.P. 2006b. Ultraviolet reflectance of great spotted cuckoo eggs and egg discrimination by magpies. *Behav. Ecol.* 17, 310-314.
- Avilés, J. M., Soler, J. J., Navarro, C. and Pérez-Contreras, T. 2008. Dark nests and nestling conspicuousness in color patterns of altricial birds. *Am. Nat.* 171, 327-338.
- Avilés, J.M., Perez-Contreras, T., Navarro, C. and Soler, J.J. (2009) Male spotless starlings adjust feeding effort based on egg spots revealing ecto-parasite load. *Anim. Behav.* 78, 993-999.
- Bernet, P., Rosenqvist, G. and Berglund, A. 1998. Female-female competition affects female ornamentation in the sex-role reversed pipefish *Syngnathus typhle*. *Behaviour* 135, 535-550.
- Bertrand, S., Faivre, B. and Sorci, G. 2006. Do carotenoid-based sexual traits signal the availability of non-pigmentary antioxidants? *J. Exp. Biol.* 209, 4414-4419.
- Biard, C., Surai, P. F. and Møller, A. P. 2007. An analysis of pre- and post-hatching maternal effects mediated by carotenoids in the blue tit. *J. Evol Biol.* 20, 326-339.
- Birkhead, T. 1978. Behavioural adaptations to high density nesting in the common guillemot, *Uria aalge*. *Anim. Behav.*, 26, 321-331.

- Birkhead, T. R. and Møller, A. P. 1998. Sperm Competition and Sexual Selection. Academic Press, London.
- Bleiweiss, R. 1992. Reversed plumage ontogeny in a female hummingbird: implications for the evolution of iridescent colours and sexual dichromatism. *Biol. J. Linn. Soc.* 47, 183–195.
- Blount, J. D.; Houston, D. C.; Surai, P. F. and Møller, A. P. 2004. Egg-laying capacity is limited by carotenoid pigment availability in wild gulls *Larus fuscus*. *Proc. R. Soc. Lond. B* 271, 79–81.
- Blount, J. D., Metcalfe, N. B., Birkhead, T. R. and Surai, P. F. 2003. Carotenoid modulation of immune function and sexual attractiveness in zebra finches. *Science* 300, 125–127.
- Borttoloti, G. R., Negro, J. J., Surai, P. F. and Prieto, P. 2003. Carotenoids in eggs and plasma of Red-Legged partridges: Effects of diet and reproductive output. *Physiol. Biochem. Zool.* 76, 367–374.
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S. and Pfander, H, 1995. Carotenoids. Volume IA: Isolation and analysis. Basel, Switzerland: Birkhäuser.
- Buhring, H. J., Simons, P. J., Pudney, M., Muller, R., Jarrossay, D. and van Aghoven, A. 1999. The monoclonal antibody 97 A6 defines a novel surface antigen expressed on human basophils and their multipotent and unipotent progenitors. *Blood* 94, 2343–56.
- Burley, N. and Coopersmith, C. B. 1987. Bill color preferences of zebra finches. *Ethology* 76, 133–151.
- Burley, N. T., Price, D. K., and Zann, R. A. 1992. Bill color, reproduction and condition effects in wild and domesticated zebra finches. *Auk* 109, 13–23.
- Burley, N. 1977 Parental investment, mate choice, and mate quality. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 3476–3479.
- Burley, N. 1986. Sexual selection for aesthetic traits in species with biparental care. *Am. Nat.* 127, 415–445.
- Burley, N. 1988. The differential-allocation hypothesis: An experimental test. *Am. Nat.* 132, 611–628.
- Burns, K. J. 1998. A phylogenetic perspective on the evolution of sexual dichromatism in tanagers (Thraupidae): the role of female versus male plumage. *Evolution* 52, 1219–1224.
- Burton, G. W. and Ingold, K. U. 1984. β -carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science* 224, 569–573.

- Calvo, J. M., Pascual, J. A., Deceunick, B. and Peris, S. J. 2000. Intraspecific nest parasitism in the Spotless starling (*Sturnus unicolor*). *Bird Study* 47, 285-294.
- Cassey, P., Ewen J. G., Blackburn, T. M., Hauber, M. E., Vorobyev, M. and Marshall, N.J. 2008. Eggshell colour does not predict measures of maternal investment in eggs of *Turdus* thrushes. *Naturwissenschaften* 95, 713-721.
- Cassey, P., Ewen, J. G., Boulton, R. L., Blackburn, T. M., Moller, A. P., Biard, C., Olson, V. A. and Karban, R. 2005. Egg carotenoids in passerine birds introduced to New Zealand: relations to ecological factors, integument coloration and phylogeny. *Funct. Ecol.* 19, 719-726.
- Cassey, P., Ewen, J. G., Marshall, N. J., Vorobyev, M., Blackburn, T. M., and Hauber, M. E. 2009. Are avian eggshell colours effective intraspecific communication signals in the Muscicapoidea? A perceptual modelling approach. *Ibis* 151, 689-698.
- Catoni, C., Peters, A. and Schaefer, H. M. 2008. Life-history trade-offs are influenced by the diversity, availability and interactions among dietary antioxidants. *Anim. Behav.* 76, 1107-1119.
- Chastel, O., Lacroix, A., Weimerskirch, H. and Gabrielsen, G. W. 2005. Modulation of prolactin but not corticosterone responses to stress in relation to parental effort in a long-lived bird. *Horm. Behav.* 47, 459-466.
- Chew, B. P. and Park, J. S. 2004. Carotenoid action on the immune response. *J. Nutr.* 134, 257S-261S.
- Cohen, A. A. and McGraw, K. J. 2009. No simple measures for antioxidant status in birds: complexity in inter- and intraspecific correlations among circulating antioxidant types. *Funct. Ecol.* 23, 310-320.
- Cohen, A. A., McGraw, K. J. and Robinson, W. D. 2009. Serum antioxidant levels in wild birds vary in relation to diet, season, life history strategy, and species. *Oecologia* 161, 673-683.
- Collias, N. E. and Collias, E. C. 1984. Nest building and bird behavior. Princeton, New Jersey: Princeton University Press.
- Costantini, D. and Møller, A. P. 2008. Carotenoids are minor antioxidants for birds. *Funct. Ecol.* 22, 367-370.
- Cramp, S. 1998. Cramp's the complete birds of the Western Palearctic. Optimedia, Oxford University Press, Oxford.

- Cuervo, J. J., de Lope, F. and Møller, A. P. 1996. The function of long tails female barn swallows (*Hirundo rustica*): an experimental study. *Behav. Ecol.* 7, 1321-1136.
- Darwin, C. 1859. On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life. London: J. Murray.
- Darwin, C. 1871.) The descent of man, and selection in relation to sex. London: J. Murray.
- Davies, N. B. 2000. Cuckoos cowbirds, and others cheats. London: T & A D Poyser.
- Davies, N. B. and Brooke M. d. L. 1988. Cuckoos versus reed warblers: adaptations and counteradaptations. *Anim. Behav.* 36, 262-284.
- Dawkins, R. 1982. The extended phenotype. Oxford and San Francisco: Freeman & Co.
- De Neve, L., Soler, J. J., Soler, M. and Pérez-Contreras, T. 2004a. Differential maternal investment counteracts for late breeding in magpies *Pica pica*: an experimental study. *J. Avian Biol.* 3,5 237-245.
- De Neve, L., Soler, J. J., Soler, M. and Pérez-Contreras, T. 2004c. Nest size predicts the effect of food supplementation to magpie nestlings on their immunocompetence: an experimental test of nest size indicating parental ability. *Behav. Ecol.* 15, 1031-1036.
- De Neve, L., Soler, J. J., Soler, M., Pérez-Contreras, T., Martin-Vivaldi, M. and Martinez, J. G. 2004b. Effects of a food supplementation experiment on reproductive investment and a post-mating sexually selected trait in magpies *Pica pica*. *J. Avian. Biol.* 35, 246-251.
- Debieer, C. and Larondelle, Y. 2005. Vitamins A and E: metabolism, role and transfer to offspring. *Br. J. Nutr.* 93, 153-174.
- Eberhard, W. G. 1996. Female control: sexual selection by cryptic female choice. Princeton: Princeton University Press.
- Endler, J. A. 1980 Natural selection on color patterns in *Poecilia reticulata*. *Evolution* 34, 76-91.
- Endler, J. A. 2000. Evolutionary implications of the interaction between animal signals and the environmental. In: Espmark Y, Amundsen T, Rosenqvist G (eds) Animal signals: Signalling and design in animal communication. Tapir Academic Press, Trondheim, Norway. Pp 11-46.

- Endler, J. A., Westcott, D. D., Madden, J. R. and Robson, T. 2005. Animal visual systems and the evolution of color patterns; sensory processing illuminates signal evolution. *Evolution* 50, 1795-1818.
- Evans, M. R. 1997. Nest building signals male condition rather than age in wrens. *Anim. Behav.* 53,749-755.
- Ewen, J. G., Thorogood, R., Brekke, P., Cassey, P., Karadas, F. and Armstrong, D. P. 2009. Maternally invested carotenoids compensate costtly ectoparasitism in the hihi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 12798-12802.
- Faivre, B., Grégoire, A., Prévault, M., Cézilly, F. and Sorci, G. 2003. Immune activation rapidly mirrored in a carotenoid-based secondary sexual trait. *Science* 300, 103.
- Falchuk, K. H., Contin, J. M., Dziedzic, T. S., Feng, Z., French, T. C., Heffron, G.J. and Montorzi, M. 2002. A role for biliverdin IX in dorsal axis development of *Xenopus laevis* embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 251-256.
- Friedman, A. and Sklan, D. 1997. Effect of dietary fatty acids on humoral immune response of turkeys. *Br. Poult. Sci.* 38, 186-195.
- Gaál, A. and Csaba, G. 1998. Testosterone and progesterone level alterations in the adult rat after retinoid (retinol or retinoic acid) treatment (imprinting) in neonatal or adolescent age. *Horm. Metab. Res.* 30, 487-489.
- Ganguly, J., Mehl, J. W. and Deuel Jr., H. J. 1953. Studies on carotenoid metabolism. XIII. The carotenoid composition of the blood, liver and ovaries of the rat, ewe, cow, and frog. *J. Nutr.* 50, 73-83.
- Gosler, A. G., Higham, J. P. and Reynolds, S. J. 2005. Why are birds' eggs speckled? *Ecol. Lett.* 8, 1105-1113.
- Götmark, F. 1992a. Anti-predator effect of conspicuous plumage in a male bird. *Anim. Behav.* 44, 51-55.
- Götmark, F. 1992b. Blue eggs do not reduce nest predation in the song thrush, *Turdus philomelos*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 30, 245-252
- Götmark, F. 1993. Conspicuous nests may select for non-cryptic eggs: a comparative study of avian families. *Ornis Fenn.* 70,102-105.
- Goto, N., H. Kodama, K. Okada, and Fujimoto, Y. 1978. Suppression of phytohemagglutinin skin-response in thymectomized chickens. *Poultry Science* 57, 246-250.

- Hanley, D. and Doucet, S. M. 2009. Egg coloration in ring-billed gulls (*Larus delawarensis*): a test of the sexual signaling hypothesis. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 63, 719–729.
- Hanley, D., Heiber, G. and Dearborn, D. C. 2008. Testing an assumption of the sexual signaling hypothesis: does blue-green egg color reflect maternal antioxidant capacity? *Condor* 110, 767–771.
- Hansell, M. 2000. Bird nests and construction behavior. Cambridge: Cambridge University Press.
- Hargitai, R., Moskát, C., Bán, M., Gil, D., López-Rull, I. and Solymos, E. 2010. Eggshell characteristics and yolk composition in the common cuckoo *Cuculus canorus*: are they adapted to brood parasitism? *J. Avian Biol.* 41, 177–185.
- Harper, D. G. C. 1994. Some comments on the repeatability of measurements. *Ringing & Migration* 15, 84–90.
- Hartley, R. C. and Kennedy, M. W. 2004. Are carotenoids a red herring in sexual display? *Trends Ecol. Evol.* 19, 353–354.
- Heinsohn, R., Legge, S. and Endler, J. A. 2005. Extreme reversed sexual dichromatism in a bird without sex role reversal. *Science* 309, 617–619.
- Hernandez, D. E. and Leavitt, R. D. 1984. Mitogenic and mitogenically defective phytohemagglutinin isolectins stimulate T-cell growth factor (interleukin 2) production and response in fresh and cultured human T lymphocytes. *Cell Immunol.* 86, 101–8.
- Hill, G. E. 1991. Plumage coloration is a sexually selected indicator of male quality. *Nature* 350, 337–339.
- Hill, G. E. 1999. Is there an immunological cost to carotenoid-based ornamental colouration? *Am. Nat.* 154, 589–595.
- Hill, G. E. 2002. A red bird in a brown bag: The function and evolution of colorful plumage in the house finch. Oxford: Oxford University Press.
- Hill, G. E. 2006. Female mate choice for ornamental coloration. In: Hill GE, McGraw KJ (eds) *Bird Coloration, Volume 2. Function and Evolution*. Harvard Univ Press, Cambridge, MA.
- Hill, G. E. and McGraw, K. J. 2006. *Bird Coloration. Volume I. Mechanisms and measurements*. Cambridge, MA : Harvard University Press.

- Hofmann, C. and Eichele, G. 1994. Retinoids in development. - In: Sporn, M. B., Roberts, A. B. and Goodman, D. S. (eds.), *The retinoids: biology, chemistry, and medicine*. New York: Raven Press, pp. 387-441.
- Hörak, P., Surai, P. F., Ots, I. and Møller, A. P. 2004. Fat soluble antioxidants in brood-rearing great tits: relations to health and appearance. *J. Avian. Biol.* 35, 63 -70.
- Hoyt, D. F. 1979. Practical methods of estimating volume and fresh weight of bird eggs. *Auk* 96, 73-77.
- Irwin, R.E. 1994. The evolution of plumage dichromatism in the New World blackbirds: social selection on female brightness? *Am. Nat.* 144, 890-907.
- Jones, I. L. and Hunter, F. M. 1993. Mutual sexual selection in a monogamous seabird. *Nature* 362, 238-239.
- Jones, I. L. and Hunter, F. M. 1999. Experimental evidence for mutual inter- and intrasexual selection favouring a crested auklet ornament. *Anim. Behav.* 57, 521-528.
- Jovani, R., Tella, J.L., Blanco, G. and Bertellotti, M. 2004. Variable inter-annual relationships between T-cell mediated immunity and individual traits in White storks? *Ardeola* 51, 357-364.
- Karu, U., Saks, L. and Horak, P. 2008. Carotenoid-based plumage coloration is not affected by vitamin E supplementation in male greenfinches. *Ecol. Research.* 23, 931-935.
- Keiser, A. J. and Hill, G. E. 1999. Condition-dependent variation in the blue ultraviolet coloration of a structurally based plumage ornament. *Proc. R. Soc. Lond. B* 266, 771-777.
- Kennedy, G. Y. and Vevers, H. G. 1976. A survey of avian eggshell pigments. *Comp. Biochem. Physiol. B* 55, 117-123.
- Kennedy, M. W. and Nager, R. G. 2006. The perils and prospects of using phytohaemagglutinin in evolutionary ecology. *Trends Ecol. Evol.* 21, 653-655.
- Kilner, R. M. 2006. The evolution of egg colour and patterning in birds. *Biol. Rev.* 81, 383-406.
- Kodric-Brown, A. 1989. Dietary carotenoids and male mating success in the guppy: an environmental component to female choice. *Am. Nat.* 124, 309-323.

- Krist, M. and Grim, T. 2007. Are blue eggs a sexually selected signal of female collared flycatchers? A cross-fostering experiment. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 61, 863-876.
- Kuenzel, W. J., Rowland, A. M., Pillai, P. B., O'Connor-Dennie, T. I., Emmert, J. L. and Wideman, R. F. 2006. The use of vitamin A-deficient diets and jugular vein ligation to increase intracranial pressure in chickens (*Gallus gallus*). *Poultry Sci.* 85, 537-545.
- Lande, R. 1980. Sexual dimorphism, sexual selection, and adaptation in polygenic characters. *Evolution* 34, 292-305.
- Langmore, N.E. 1998. Functions of duet and solo songs of female birds. *Trends Ecol. Evol.* 13, 136-140.
- LeBas, N. R. 2006. Female finery is not for males. *Trends Ecol. Evol.* 21,170-173.
- Lopez-Rull, I., Miksik, I. and Gil, D. 2008. Egg pigmentation reflects female and egg quality in the Spotless Starling *Sturnus unicolor*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 62. 1877-1884.
- Lozano, G. A. 1994. Carotenoids, parasites and sexual selection. *Oikos* 70, 309-311.
- Lucas, A. M. and Stettenheim, P. R. 1972. Avian anatomy. Integument. *Agriculture Handbook* 362, Washington, D.C.: U.S. Dept. Agric.
- Martin, L. B., Han, P., Lewittes, J., Kuhlman, J.R., Klasing, C. K. And Wikelski, M. 2006. Phytohemagglutinin-induced skin swelling in birds: histological support for a classic immunoeological technique. *Funct. Ecol.* 20, 290-299.
- Martin, T. E., Martin, P. R., Olson, C. R., Heidinger, B. J. and Fontain, J. J. 2000. Parental care and clutch sizes in North and South American birds. *Science* 287, 1482-1485.
- Martinez, A., Rodríguez-Girones, M. A., Barbosa, A. and Costas, M. 2008. Donator acceptor map for carotenoids, melatonin and vitamins. *J. Physic. Chem. A* 112, 9037-9042.
- Martinez-Padilla, J., Mougeot, F., Perez-Rodriguez, L. and Bortolotti, G. R. 2007. Nematode parasites reduce carotenoid-based signalling in male red grouse. *Biol. Letters* 3, 161-164.
- Maynard-Smith, J. and Harper, D. 2003. *Animal signals*. Oxford: Oxford University Press.

- McGraw, K. J. 2004. Colorful songbirds metabolize carotenoid at the integument. *J. Avian Biol.* 35, 471-476.
- McGraw, K. J. 2006. Mechanics of carotenoid-based coloration. In: Bird coloration. Vol. 1, Function and evolution. In: Hill GE, McGraw KJ (eds). Cambridge, MA: Harvard University Press.
- McGraw, K. J. and Ardia, D. R. 2005. Sex differences in carotenoid status and immune performance in zebra finches. *Evol. Ecol. Res.* 7, 251-262.
- McGraw, K. J., Correa, S. M., Adkins-Regan, E. 2006. Testosterone upregulates lipoprotein status to control sexual attractiveness in a colorful songbird. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 60, 117-122.
- McGraw, K. J., Gregory, A. J., Parker, R. S., Adkins-Regan, E. 2003. Diet, plasma carotenoids and sexual coloration in the zebra finch (*Taeniopygia guttata*). *Auk* 120, 400-410.
- McGraw, K. J., Hill, G. E. 2000. Carotenoid based ornamentation and status signalling in house finch. *Behav. Ecol.* 11, 520-527.
- McGraw, K. J., Tourville, E. A., Butler, M. W. 2008. A quantitative comparison of the commonly used methods for extracting carotenoids from avian plasma. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 62, 1991-2002.
- McGraw, K. J. and Ardia, D. R. 2003. Carotenoids, immunocompetence, and the information content of sexual colors: an experimental study. *Am. Nat.* 162, 704-712.
- McGraw, K. J., Adkin-Regan, E. and Parker, R. S. 2005. Maternally derived carotenoid pigments affect offspring survival, sex ratio, and sexual attractiveness in a colourful songbird. *Naturwissenschaften* 92, 375-380.
- Møller, A. P. 1987. Variation in badge size in male House Sparrows (*Passer domesticus*): Evidence for status signalling. *Anim. Behav.* 35, 1637-1644.
- Møller, A. P. 1988. Femal choice selects for male sexual tail ornaments in the monogamous swallow. *Nature* 322, 996-1005.
- Møller, A. P., Biard, C., Blount, J. D., Houston, D. C., Ninni, P., Saino, N., Surai, P. F. 2000. Carotenoid-dependent signals: indicators of foraging efficiency, immunocompetence and detoxification ability. *Avian Poult. Biol. Rev.* 11, 137-159.
- Møller, A. P. 1990. Nest predation selects for small nest size in the blackbird. *Oikos* 57, 237-240.

- Møller, A. P., Karadas, R. and Mousseau, T. 2008. Antioxidant in egg of great tits *Parus major* from Chernobyl and hatching success. *J. Comp. Psychol.* 178, 735-743.
- Møller, A. P., Linden, M. Soler, J. J. Soler, M. and Moreno, J. 1995. Morphological adaptations to an extreme sexual display, stone-carrying in the black wheatear *Oenanthe leucura*. *Behav. Ecol.* 6, 368-375.
- Morales, J., Velando, A. and Torres, R. 2009. Fecundity compromises attractiveness when pigments are scarce. *Behav. Ecol.* 20:117-123.
- Morales, J., Sanz, J. J. and Moreno, J. 2006. Egg colour reflects the amount of yolk maternal antibodies and fledging success in a songbird. *Biol. Letters* 2, 334-336.
- Morales, J., Torres, R., and Velando, A. 2010. Parental conflict and blue egg coloration in a seabird. *Naturwissenschaften* 97, 173-180.
- Morales, J., Velando, A., and Moreno, J. 2008. Pigment allocation to eggs decreases plasma antioxidants in a songbird. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 63, 227-233.
- Moran, N. A. and Tyler Jarvik, T. 2010. Lateral Transfer of genes from fungi underlies carotenoid production in Aphids. *Science* 328, 624-627.
- Moreno J, Soler M, Møller, A. P. and Linden, M. 1994. The function of stone carrying in the black wheatear, *Oenanthe leucura*. *Anim. Behav.* 47, 1297-1309.
- Moreno, J. and Osorno, J. L. 2003. Avian egg colour and sexual selection: does eggshell pigmentation reflect female condition and genetic quality? *Ecol. Letters* 6, 803-806.
- Moreno, J., Morales, J., Lobato, E., Merino, S. Tomás, S. and Martínez-de la Puente, J. 2005. Evidence for the signaling function of egg color in the pied flycatcher *Ficedula hypoleuca*. *Behav. Ecol.* 16, 931-937.
- Moreno, J., Lobato, E., Morales, J., Merino, S. Tomás, S., Martínez-de la Puente, J., Sanz, J. J. Mateo, R. and Soler, J.J. 2006a. Experimental evidence that egg color indicates female condition at laying in a songbird. *Behav. Ecol.* 17, 651-655.
- Moreno, J., Morales, J., Lobato, E., Merino, S. Tomás, S. and Martínez-de la Puente, J. 2006b. More colourful eggs induce a higher relative paternal investment in the pied flycatcher *Ficedula hypoleuca*: a cross-fostering experiment. *J. Avian Biol.* 37, 555-560.

- Moreno, J., Morales, J., Lobato, E., Merino, S. Tomás, S. and Martínez de la Puente, J. 2005. Evidence for the signaling function of egg color in the pied flycatcher *Ficedula hypoleuca*. *Behav. Ecol.* 16, 931-937.
- Moreno, J., Osorno, J. L., Morales, J., Merino, S. and Tomás, G. 2004. Egg colouration and male parental effort in the pied flycatcher *Ficedula hypoleuca*. *J. Avian Biol.* 35, 300-304.
- Motis, A., Estrada, J. and Oro, D. 1997. Nestling diet of the spotless starling *Sturnus unicolor* and the European starling *Sturnus vulgaris* in a sympatric breeding area. *Ornis Fenn.* 74, 179-185.
- Muma, K. E. and Weatherhead, P. J. 1989. Male traits expressed in females: direct or indirect sexual selection? *Behav. Ecol. Sociobiol.* 25, 23-31.
- Negro, J. J., Bortolotti, G. R., Tella, J. L., Fernie, K. J., Bird, D. M. 1998. Regulation of integumentary colour and plasma carotenoids in American Kestrels consistent with sexual selection theory. *Funct. Ecol.* 12, 307-312.
- Ninni, P., de Lope, F., Saino, N., Haussy, C. and Møller, A. P. 2004. Antioxidants and condition-dependence of arrival date in a migratory passerine. *Oikos* 105, 55-64.
- Øien, I. J., Moksnes, M. and Røskoft, E. 1995. Evolution of variation in egg color and marking pattern in European passerines: adaptations in a coevolutionary arms race with the cuckoo, *Cuculus canorus*. *Behav. Ecol.* 6, 166-174.
- Olson, V. A. and Owens, I. P. F. 1998. Costly sexual signals: are carotenoids rare, risky or required? *Trends Ecol. Evol.* 13, 510-514.
- Omland, K. E. 1997. Examining two standard assumptions of ancestral reconstructions: repeated loss of dichromatism in dabbling ducks (*Anatini*). *Evolution* 51, 1636-1646.
- Parker, G. A. 1983. Mate quality and mating decisions. In *Mate Choice*. Bateson, P., ed., pp. 141-166. Cambridge: Cambridge University Press,.
- Pérez, M. B., Galderón, N.L. and Croci, C. A. 2007 Radiation-induced enhancement of antioxidant activity in extracts of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), *Food Chem.* 104, 585-592.
- Pérez, C., Lores, M. and Velando, A. 2008. Availability of nonpigmentary antioxidant affects red coloration in gulls. *Behav. Ecol.* 19, 967-973.

- Pérez-Rodríguez, L. and Viñuela, J. 2008. Carotenoid-based bill and eye ring coloration as honest signals of condition: an experimental test in the red-legged partridge (*Alectoris rufa*). *Naturwissenschaften* 95, 821-830.
- Peters, A., Denk, A. G., Dehley, K. and Kempenaers, B. 2004. Carotenoid-based bill colour as an indicator of immunocompetence and sperm performance in male mallards. *J. Evol. Biol.* 17, 1111-1120.
- Petrie, M. 1994. Improved growth and survival of offspring of peacocks with more elaborate traits. *Nature* 371, 598-599.
- Petrie, M. and Møller, A. P. 1991. Laying eggs in others' nests: Intraspecific brood parasitism in birds. *Trends Ecol. Evol.* 6, 315-320.
- Petrie, M. 1983a. Mate choice in role-reversed species. In, P. Bateson (Ed.): *Mate Choice*, pp. 167-179. Cambridge: Cambridge University Press.
- Petrie, M. 1983b. Female moorhens compete for small fat males. *Science* 220, 413-415.
- Pike, T. W., Blount, J. D., Lindstrom, J. and Metcalfe, N. B. 2007. Availability of non-carotenoid antioxidants affects the expression of a carotenoid-based sexual ornament. *Biol. Lett.* 3, 353-356.
- Pilastro, A., Griggio, M. and Matessi, G. 2003. Male rock sparrows adjust their breeding strategy according to female ornamentation: parental or mating investment? *Anim. Behav.* 66, 265-271.
- Price, D. K. and Burley, N. T. 1993. Constraints on the evolution of attractive traits: genetic (co)variation of zebra finch bill color. *Heredity* 71, 405-412.
- Price, T. and Birch, G. L. 1996. Repeated evolution of sexual color dimorphism in passerine birds. *Auk* 113, 842-848.
- Prota, G. 1992. *Melanins and melanogenesis*. San Diego, CA: Academic Press.
- Quinn, G.P. and Keough, M. J. 2002. *Experimental design and data analysis for biologists*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Reynolds, S. J., Martin, G. R. and Cassey, P. 2009. Is sexual selection blurring the functional significance of eggshell coloration hypotheses? *Anim. Behav.* 78, 209-215.
- Riley, P. A. 1997. Melanin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29, 1235-1239.

- Romero, L. M., Reed, J. M. 2005. Collecting baseline corticosterone samples in the field: is under 3 min good enough? *Comp. Biochem. Physiol.* 140A, 73-79.
- Rothstein, S. I. 1990. A model system for coevolution: avian brood parasitism. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 21, 481-508.
- Rubenstein, D. R. and Hauber, M. E. 2008 Dynamic feedback between phenotype and physiology in sexually selected traits. *Trends Ecol. Evol.* 23, 655-658.
- Rubenstein, D. R., Lovette, I. J, 2009. Reproductive skew selection on female ornamentation in social species. *Nature* 462, 786-789.
- Safran, R. J., Adelman, J., McGraw, K. J. and Hau, M. 2008. Sexual signal elaboration affects physiological state in a social vertebrate. *Current Biol.* 18, 461-462.
- Saino, N., Ferrari, R. P., Romano, M., Martinelli, R. and Møller, A. P. 2003. Experimental manipulation of egg carotenoids affects immunity of barn swallow nestlings. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 270, 2485-2489.
- Saino, N., Calza, N. and Møller, A. P. 1997. Immunocompetence of nestling barn swallows in relation to brood size and parental effort. *J. Anim. Ecol.* 66, 827-836.
- Saks, L, McGraw, K., Horak, P. 2003. How feather colour reflect its carotenoid content. *Ecology* 17, 555-561.
- Schaedelin, F. C. and Taborsky, M. 2009. Extended phenotype as signals. *Biol. Rev.* 88, 293-313.
- Schulte-Hostedde, A. I., Zinner, B., Millar, J. S. and Hickling, G. J. 2005. Restitution of mass-size residuals: Validating body condition indices. *Ecology* 86, 155-163.
- Sharma, V. and Surolia, A. 1997. Analysis of carbohydrates recognition by legume lectins: size of the combining site loops and their primary specificity. *J. Mol. Biol.*, 267, 433-45.
- Sheldon, B. C. 2000. Differential allocation: tests, mechanisms and implications. *Trends Ecol. Evol.* 15, 397-402.
- Siefferman, L., Navara, K. and Hill, G. 2006. Egg coloration is correlated with female condition in eastern bluebirds (*Sialia sialis*). *Behav. Ecol. Sociobiol.* 59, 651-656.

- Sokal, R. R. and Rohlf, F. J. 1981 Biometry. New York: W.H.Freeman.
- Soler, J. J., Cuervo, J. J., Møller, A. P., de Lope, F., 1998. Nest building is a sexually selected behavior in the barn swallow. *Anim. Behav.* 56, 1435-1442.
- Soler, J. J. and Møller, A. P. 1996. A comparative analysis of the evolution of variation in appearance of eggs of European passerines in relation to brood parasitism. *Behav. Ecol.* 7, 89-94.
- Soler, J. J., Møller, A. P., and Soler, M. 1998. Nest building, sexual selection and parental investment. *Evol. Ecol.* 12, 427-441. 1998.
- Soler, J. J. and Soler, M. 2000. Brood-parasite interactions between great spotted cuckoos and magpies: a model system for studying coevolutionary relationships. *Oecologia* 125, 309-320.
- Soler, J. J., Moreno, J. Avilés, J. M. and Møller, A. P. 2005. Blue and green egg-color intensity is associated with parental effort and mating system in passerines: Support for the sexual selection hypothesis. *Evolution* 59, 636-644.
- Soler, M., Soler, J. J., Møller, A. P., Moreno, J., and Linden, M. 1996 .The functional significance of sexual display: stone carrying in the black wheatear. *Anim. Behav.* 51, 247-254.
- Solis, J. C. and de Lope, F. 1995. Nest and egg crypsis in the ground-nesting stone curlew *Burhinus oedicnemus*. *J. Avian Biol.* 26, 135-138.
- Statsoft, I. 2001. STATISTICA for Windows [Computer program manual] 6.0. Statsoft, Inc, Tulsa, OK.
- Stocker, R., Yamamoto, Y., McDonagh, A. F., Glazer, A. N. and Ames, B. N. 1987. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 235, 1043-1046.
- Stokke, B. G., Moksnes, A. and Røskoft, E. 2002. Obligate brood parasites as selective agents for evolution of egg appearance in passerine birds. *Evolution* 56, 199-205.
- Surai, P. F. 2000 Natural antioxidants in avian nutrition and reproduction. Nottingham: Nottingham University Press.
- Surai, P. F., Kuklenko, T. V., Ionov, I. A., Noble, R.C. and Sparks, N. H. C. 2000. Effect of Vitamin A on the antioxidant system of the chick during early postnatal development. *Brit. Poultry Sci.* 41, 454-458.

- Surai, P. F. and Speake, B. K. 1998. Distribution of carotenoids from the yolk to the tissues of the chick embryo. *J. Nutr. Biochem.* 9, 645-651.
- Surai, P. F., Speake, B. K. and Sparks, N. H. C. 2001a. Carotenoids in avian nutrition and embryonic development. 1. Absorption, availability and levels in plasma and egg yolk. *J. Poult. Sci.* 38, 1-27.
- Surai, P. F., Speake, B. K. and Sparks, N. H. C. 2001b. Carotenoids in avian nutrition and embryonic development. 2. Antioxidant properties and discrimination in embryonic tissues. *J. Poult. Sci.* 38: 117-145.
- Surai, P. F., Speake, B. K., Wood, N. A. R., Blount, J. D., Bortolotti, G. R. and Sparks, N. H. C. 2001c. Carotenoid discrimination by the avian embryo: a lesson from wild birds. *Comp. Biochem. Physiol.* B128, 743-750.
- Svensson, L. 1992. Identification Guide to European Passerines, 4th edition. Stockholm : Ed. Stockholm
- Tella, J. L., Figuerola, J., Negro, J. J., Blanco, G., Rodriguez-Estrella, R., Forero, M. G., Blazquez, M. C., Green, A. J. and Hiraldo, F. 2004. Ecological, morphological and phylogenetic correlates of interspecific variation in plasma carotenoid concentration in birds. *J. Evol. Biol.* 17, 156-164.
- Thurnham, D. I. and Northrop-Clewes, C. A. 1999 Optimal nutrition: vitamin A and the carotenoids. *Proc. Nutr. Soc.* 58, 449-457.
- Tinbergen, N., Broekhuysen, G. J., Feekes, F., Houghton, J. C. W., Khuuk, H. and Szulc, E. 1961. Egg Shell Removal by the Black-Headed Gull, *Larus ridibundus* L.; A Behaviour Component of Camouflage. *Behaviour* 19, 74-117.
- Trivers, R. L. 1972. Parental investment and sexual selection. In: *Sexual selection and the descent of man* (Campbell B, ed). Chicago: Aldine, 136-179.
- Underwood, T. J. and Sealy, S.G. 2002. Adaptive significance of egg coloration. Pages 280-289 en D. C. Deeming, ed. *Avian incubation, behaviour, environment and evolution*. Oxford: Oxford University Press.
- Veiga, J. P., Moreno, J., Cordero, P. J., Mínguez, E. 2001. Territory size and polygyny in the spotless starling: resource-holding potential or social inertia? *Can. J. Zool.* 79, 1951-1956.

- Veiga, J. P., Moreno, J., Arenas, M. and Sánchez, 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., Moreno, J., Cordero, P. J. and Mínguez, E. 2001. Territory size and polygyny in the spotless starling: resource-holding potential or social inertia? *Can. J. Zool.* 79, 1951-1956.
- Velando A, Beamonte-Barrientos R, Torres R. 2006. Pigment-based skin colour in the blue-footed booby: an honest signal of current condition used by females to adjust reproductive investment. *Oecologia* 149, 535-542.
- Von Schantz, T., Bensch, S., Grahn, M., Hasselquist, D. and Wittzell, H. 1999. Good genes, oxidative stress and condition-dependent sexual signals. *Proc. R. Soc. Lond. B* 266, 1-12.
- Wallace, R. S., Teare, J. A., Diebold, E., Michaels, M., Willis, M. 1996. Plasma tocopherol, retinol, and carotenoid concentrations in free-ranging Humboldt penguins in Chile. *Zoo. Biol.* 15, 127-134.
- Weidinger, K. 2001. Does egg colour affect predation rate on open passerine nests? *Behav. Ecol. Sociobiol.* 49, 456-464.
- West-Eberhard, M. J. 1983 Sexual selection, social competition, and speciation. *Q. Rev. Biol.* 55, 155-183.
- Zahavi, A. 1975 Mate selection - a selection for a handicap. *J. Theor. Biol.* 53, 205-214.
- Zar, J. H. 1984. *Biostatistical analysis*. Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall

TABLA I

Valores medios (SE) para la respuesta inmune mediada por células T (respuesta a la PHA), masa corporal, longitud del tarso y condición corporal en pollos control o experimentales (alimentación suplementaria), y resultados para los análisis de medidas repetidas de la varianza con el tratamiento como medida repetida.

	Pollos experimentales	Pollos control	F_{1,33}	P
Respuesta a la PHA (mm)	0.65 (0.03)	0.56 (0.03)	6.66	0.001
Masa corporal (g)	77.5 (1.2)	78.5 (1.1)	0.46	0.50
Longitud del tarso (mm)	29.7 (0.2)	30.0 (0.2)	2.11	0.16
Condición corporal	0.32 (1.1)	0.24 (1.1)	0.01	0.94

TABLA II

Medias y desviación estándar de las concentraciones plasmáticas de vitamina A y carotenoides (luteína cis-trans de luteína, zeaxantina, β -caroteno, y los carotenoides esterificados) en machos y hembras de estornino. Los resultados de las comparaciones univariadas ($F_{g.l.}$ y los valores asociados a la p) entre los sexos para todos los carotenoides y la vitamina A también se muestran.

Antioxidantes	Machos = 30 Media (SD)	Hembras = 34 Media (SD)	F_{1,60}	p
Cis-Luteína	0.729 (0.099)	0.654 (0.051)	0.18	0.67
Trans-Luteína	4.875 (0.478)	6.281 (0.412)	4.39	0.04
Zeaxantina	0.684 (0.088)	0.728 (0.040)	0.05	0.82
β -Caroteno	0.032 (0.004)	0.041 (0.003)	1.89	0.17
Carotenoides esterificados	0.161 (0.017)	0.226 (0.015)	6.81	0.01
Vitamina A	0.920 (0.197)	0.903 (0.186)	0.15	0.69

TABLA III

Medias y desviaciones estándar para la concentración y el total (*) de vitamina A, vitamina E y carotenoides (luteína cis-trans de luteína, zeaxantina, ketocarotenos no identificados y β -caroteno) (mg / g) encontrados en la yema del huevo de estornino negro. También se muestra el factor de carga del Análisis de Componentes Principales (PCs), así como las relaciones con los diferentes antioxidantes.

N= 22 Antioxidantes	Media	SD	PC 1	PC 2	PC 3
<i>Vitamina A</i>	9.52	2.18	0.13	-0.86	-0.31
<i>Vitamina A</i> *	11.88	3.13	0.16	-0.81	-0.33
<i>Vitamina E</i>	199.39	84.94	0.88	-0.27	-0.08
<i>Vitamina E</i> *	246.76	106.35	0.90	-0.25	-0.12
<i>Cis-luteína</i>	26.28	10.61	0.97	-0.08	0.04
<i>Cis-luteína</i> *	32.65	13.22	0.98	-0.05	0.00
<i>Trans-luteína</i>	135.50	51.72	0.98	-0.10	-0.06
<i>Trans-luteína</i> *	168.83	66.35	0.96	-0.06	-0.10
<i>Zeaxantina</i>	23.92	9.68	0.96	0.17	-0.03
<i>Zeaxanthin</i> *	29.78	12.51	0.95	0.19	-0.06
<i>Ketocarotenoides</i>	10.60	5.14	0.21	-0.41	0.88
<i>Ketocarotenoides</i> *	13.09	6.05	0.21	-0.41	0.88
<i>β-caroteno</i>	0.89	0.56	0.52	0.75	0.11
<i>β-caroteno</i> *	1.10	0.70	0.56	0.74	0.09
<i>Factor de carga</i>			0.57	0.22	0.13

TABLA IV

Test de MANOVA con el brillo, el hue (450-570nm) y el croma (desde 450 hasta 570nm) del pico como variables dependientes. El sexo es usado como un factor fijo y la fecha de captura, la fecha de captura al cuadrado (fecha²), la condición corporal, el nivel de vitamina A y el total de los niveles plasmáticos de carotenoides (TCPL) como variables continuas. Los efectos de los términos de interacción entre las variable sexo y las continuas se calcularon posteriormente en modelos separados que también incluyeron las variables independientes y por lo tanto los grados de libertad asociados al cambiar los valores de $F_{3,53}$: para las estimaciones de los efectos de variables independientes y F_{352} para las estimaciones de los efectos de los términos de las interacciones). También se muestran los resultados univariantes (Beta (Error estándar) y los valores de p para el brillo, el tono (desde 450 hasta 570nm) y el croma (450-570nm). Todos los resultados son consistentes y se mantiene su significación después de la eliminación de las interacciones no significativas a partir del modelo inicial.

Variables	Wilks's Values	$F_{3,53}$ $F_{3,52}^*$	p	Croma (450-570 nm)		Tono (450-570 nm)		Brillo	
				Beta (SE)	p	Beta (SE)	p	Beta (SE)	p
Sexo	0.32	37.21	<0.001	-0.56 (0.07)	<0.001	-0.22 (0.13)	<0.093	0.41 (0.14)	0.005
Fecha	0.74	6.06	0.001	-1.07 (0.46)	0.025	1.60 (0.84)	0.063	2.55 (0.93)	0.008
Fecha ²	0.72	6.78	<0.001	1.05 (0.45)	0.024	-1.57 (0.82)	0.060	-2.75 (0.90)	0.003
Condición corporal	0.96	0.63	0.596	0.03 (0.07)	0.669	-0.07 (0.13)	0.545	0.19 (0.14)	0.183
Vitamina A	0.85	2.90	0.043	0.16 (0.06)	0.010	-0.03 (0.11)	0.777	0.20 (0.12)	0.108
TPCL	0.47	19.56	<0.001	-0.49 (0.06)	<0.001	0.556 (0.12)	<0.001	-0.36 (0.13)	0.008
Sexo x Condición corporal	0.89	2.23	0.095	0.09 (0.10)	0.379	0.58 (0.12)	0.176	0.45 (0.19)	0.020
Sexo * Vitamina A	0.95	0.93	0.435	-0.17 (0.30)	0.561	0.36 (0.54)	0.504	-0.96 (0.58)	0.106
Sexo * TPCL	0.82	3.72	0.017	0.54 (0.17)	0.003	-0.56 (0.33)	0.09	0.64 (0.36)	0.082

TABLA V

Pendientes y error estándar (SE) y valores de la P asociadas al análisis de regresión entre las variables de coloración del pico (croma, tono y brillo) y la fecha, fecha al cuadrado, condición corporal, concentración de vitamina A en plasma y TPCL en machos y hembras

	Croma (450-570nm)			Tono (450-570nm)			Brillo					
	Hembra (n=33)		Macho (n=30)	Hembra (n=33)		Macho (n=30)	Hembra (n=33)		Macho (n=30)			
	Pendiente (SE)	p	Pendiente (SE)	p	Pendiente (SE)	p	Pendiente (SE)	p	Pendiente (SE)	p		
Fecha	0.0004 (5.97)	0.38	-0.002 (3.74)	0.03	-0.11 (5.98)	0.42	0.38 (3.90)	0.13	-4.06 (5.81)	0.12	-0.04 (4.08)	0.12
Fecha ²	0.91x10 ⁻⁵ (366.44)	0.18	-4.58x10 ⁻⁵ (196.90)	0.04	-0.003 (369.72)	0.27	0.01 (204.98)	0.15	-0.08 (354.29)	0.05	0.01 (213.63)	0.93
Condición corporal	-0.0008 (4.91)	0.14	-0.0006 (4.22)	0.60	0.02 (5.08)	0.90	0.24 (4.17)	0.34	5.20 (4.85)	0.09	-1.75 (4.23)	0.71
Vitamina A	-0.004 (0.19)	0.77	0.03 (0.19)	0.17	5.99 (0.19)	0.18	-3.78 (0.20)	0.46	-11.09 (0.19)	0.89	172.63 (0.19)	0.06
TCPL	-0.003 (2.28)	<0.001	-0.006 (1.95)	<0.001	0.75 (2.49)	0.01	1.23 (2.20)	>0.001	7.69 (2.67)	0.18	-14.05 (2.98)	0.01

TABLA VI

Medias y desviación estándar (SD) para las variables de coloración del pico (croma, tono, brillo) en machos (MANOVA, $F_{4,45} = 8.9$, $p = 0.00002$) y hembras (MANOVA $F_{4,69} = 8.7$, $p = 0.00001$) de estornino negro. Se muestran los resultados de la comparación univariantes ($F_{1,72}$ para hembras y $F_{1,48}$ para machos) y los valores de P asociados) para las variables de coloración del pico obtenidas en diferentes etapas reproductoras (emparejamientos y ceba).

Sexo	Variables de color	Emparejamiento		Ceba		$F_{1,72}$ $F_{1,48}^*$		P
		Media	SD	Media	SD			
Hembras	Brillo	680.01	89.52	601.97	140.26	7.70	0.007	
	Croma 450-570nm	0.25	0.02	0.27	0.02	9.54	0.002	
	Tono 450-570nm	516.67	4.78	512.68	5.49	10.8	0.001	
Machos	Brillo	640.01	99.10	520.65	122.39	17.45	<0.001	
	Croma 450-570nm	0.29	0.02	0.27	0.01	14.51	<0.001	
	Tono 450-570nm	517.00	5.35	520.50	2.23	7.60	0.008	

ARTÍCULOS DE LA TESIS PUBLICADOS

Soler, J. J., Navarro, C., Pérez-Contreras, T., Avilés, J. M. and Cuervo, J. J. 2008. Sexually selected egg coloration in spotless starlings. *The American Naturalist* 171, 183-194

Navarro, C., Pérez-Contreras, T., Avilés, J. M., McGraw, K. J and Soler, J. J. 2010. Beak color reflects circulating carotenoid levels in spotless starlings (*Sturnus unicolor*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 64, 1057-1067

Navarro, C., Pérez-Contreras, T., Avilés, J. M., McGraw, K. J and Soler, J. J. 2011. Blue-green eggshell coloration reflects yolk antioxidant content in spotless starlings (*Sturnus unicolor*). *Journal of Avian Biology* (en imprenta)

Sexually Selected Egg Coloration in Spotless Starlings

Juan J. Soler,^{*} Carlos Navarro,[†] Tomás Pérez Contreras,[‡] Jesús M. Avilés,[§] and José J. Cuervo^{||}

Departamento de Ecología Funcional y Evolutiva, Estación Experimental de Zonas Áridas (Consejo Superior de Investigaciones Científicas), E-04001 Almería, Spain

Submitted March 30, 2007; Accepted September 25, 2007;
Electronically published December 7, 2007

Online enhancements: color versions of figures 1 and 2.

ABSTRACT: It has been recently proposed that the blue-green coloration in eggs of many avian species may constitute a sexually selected female signal. Blue-green color intensity would reflect the physiological condition of females, and hence it might also affect the allocation of male parental care. In this study, we use three different experimental approaches to explore the importance of sexual selection on blue-green egg coloration of spotless starling (*Sturnus unicolor*) eggs. First, experimental deterioration of female body condition (by means of wing feather removal) negatively affected the intensity of blue-green egg coloration. Second, blue-green color intensity of artificial model eggs had a significant positive influence on paternal feeding effort. Finally, we found a negative relationship between the effect of experimental food supply on nestling immunocompetence and the intensity of blue-green coloration of eggs, suggesting that egg color predicts nutritional conditions that nestlings will experience during development. All these results taken together strongly support a role of sexual selection in the blue-green coloration of spotless starling eggs.

Keywords: blue eggs, differential allocation hypothesis, egg coloration, feeding effort, sexual selection, spotless starling.

The evolution of egg coloration, its intra- and interspecific variability, and its possible functionality are questions that have attracted evolutionary ecologists for many years, giving rise to different hypotheses (Underwood and Sealy

2002; Kilner 2006). The most traditional functional hypothesis is related to avoidance of predators, and in accordance, species that nest directly on the ground (i.e., with high risk of predation) lay more cryptic eggs (e.g., Solis and de Lope 1995). Another functional hypothesis is related to brood parasitism. In a brood parasitic scenario, it would be of selective advantage for hosts to lay eggs that differ from those laid by parasitic individuals (Davies and Brooke 1988; Petrie and Møller 1991; Soler and Møller 1996; Stokke et al. 2002). A third hypothesis is based on the mechanical and thermal properties of protoporphyrins and posits the functionality of the reddish eggshell spots as affecting eggshell strength (Gosler et al. 2005). Finally, trying to explain the typical blue-green background coloration of eggs of many species, which until recently was considered a mystery (Underwood and Sealy 2002), Moreno and Osorno (2003) proposed that the blue and green egg colors may constitute a signal of females that reflects their physiological condition. Consequently, high blue-green color intensity would induce in males a high allocation of parental effort, according to the differential allocation hypothesis (Burley 1986; Sheldon 2000).

This last hypothesis is based on the fact that the pigment responsible for blue-green coloration in the eggshell (Kennedy and Vevers 1976) is a potent antioxidant (Stocker et al. 1987). Because females are under high levels of oxidative stress while laying eggs (e.g., Von Schantz et al. 1999; Alonso-Alvarez et al. 2004), only those females with a high antioxidant capacity would be able to exaggerate the use of biliverdin as an eggshell pigment (Moreno and Osorno 2003). The hypothesis of blue-green egg coloration being a sexually selected signal of females has recently received comparative (Soler et al. 2005), empirical, and some experimental support. For instance, body condition and immunocompetence of females, and also those of nestlings, are related to egg color in some species (Moreno et al. 2005; Siefferman et al. 2006; Krist and Grim 2007). Moreover, blue-green color intensity of eggs of pied flycatchers (*Ficedula hypoleuca*) both positively correlates with biliverdin contents in the eggshell and reflects the nutritional condition of females at laying (Moreno et al. 2006a). Eggs of this species, and also those of the closely related collared flycatcher (*Ficedula albicollis*), become paler in the course

* Corresponding author; e-mail: jsoler@eeza.csic.es.

[†] E-mail: cnavarro@eeza.csic.es.

[‡] E-mail: tomaspc@eeza.csic.es.

[§] E-mail: javiles@eeza.csic.es.

^{||} E-mail: jcuervo@eeza.csic.es.

of the laying sequence, suggesting a pigment limitation (Moreno et al. 2005; Krist and Grim 2007). Moreover, blue-green color intensity was positively related to immunoglobulin concentration in the yolk and in the blood of females and offspring (Morales et al. 2006). Finally, although there is correlative evidence of the hypothetical positive effects of egg coloration on paternal effort (i.e., provisioning rate; Moreno et al. 2004), cross-fostering experiments of clutches of collared and pied flycatcher produced diverse results. While in pied flycatchers the blue-green color intensity of experimental eggs, but not that of original eggs, was positively related to the proportion of male provisioning visits (Moreno et al. 2006b), egg color of collared flycatchers did not affect male feeding rates (Krist and Grim 2007). Therefore, although the informational content of blue egg color is not in doubt, because of the association with variables related to female and offspring quality, cross-fostering experiments with eggs do not offer full support for the crucial prediction of the hypothesis that males allocate effort in relation to blue color intensity.

The hypothesis also applies to an interspecific context. Indeed, it has been shown that European passerines that lay eggs of higher intensity of blue-green coloration experience longer nestling periods after controlling for body mass, a measure of parental investment, and higher degree of polygyny (Soler et al. 2005). Moreover, hole-nesting species lay eggs of higher blue-green color intensity than open nesters, which has been suggested to reflect different selection pressures (e.g., risk of parasitism, light conditions) affecting species with the two kinds of nests (Soler et al. 2005).

In this study, we have used three different experimental approaches to explore three main predictions of the hypothesis that blue-green egg color intensity is a sexually selected signal of females (sexual selection hypothesis [SSH]) in a population of spotless starlings (*Sturnus unicolor*). Starlings are strict hole-nesting species, and experimental evidence has shown that they have the visual potential to detect subtle differences in egg coloration within their nests (Aviles et al. 2006a). These predictions are that egg color (1) indicates female condition at laying, (2) affects parental investment of males, and therefore (3) predicts nutritional conditions that nestlings experience during growth (as long as females do not change their feeding effort in response to that of their mates). Briefly, the first prediction was explored by experimental manipulation of female condition (i.e., cutting off some wing feathers of females several weeks before laying) and analyzing the effect on body mass loss and egg coloration. To test the second prediction, during laying we daily exchanged natural eggs with artificial eggs made of plaster of Paris and resembling the shape and color of natural starling eggs,

and we explored its effect on male provisioning rates. Finally, we indirectly tested the third prediction by food supplementing some nestlings in the nest while leaving the remaining siblings as controls. Because the effect of our experimental food supply would be larger in nests of poor nutritional conditions (i.e., low parental investment), we used within-nest differences between food-supplemented and control nestlings in nutritional conditioned variables (e.g., immune response) as an index of nutritional conditions experienced by nestlings during development (for a similar approach, see De Neve et al. 2004c). We therefore predicted larger differences in nutritional conditions in those nests with less blue-green egg coloration.

Material and Methods

The study was carried out in Guadix (37°18'N, 3°11'W), southeastern Spain, during the breeding seasons of 2005 and 2006 in nest boxes recently (2005–2006) installed close to or within colonies of spotless starlings already established in old buildings in the area. Adults were captured inside nest boxes during nest building, then sexed and marked with a metallic-numbered ring and a unique combination of colored plastic rings.

The spotless starling is a sexually dimorphic (Veiga et al. 2001) species that lays nonspotted blue-greenish eggs (Cramp 1998) with a small peak at the ultraviolet wavelength (fig. 1). Females lay one egg per day, mainly during the morning, and start incubation before clutch completion, which determines asynchronous hatching (see Cramp 1998). In our population, clutch size is typically four to five eggs (data from 2005 and 2006 combined; $N = 159$; mean = 4.55; SD = 0.97; range = 2–7), and except for a few exceptions, incubation is a female task (C. Navarro, T. P. Contreras, J. M. Avilés, and J. J. Soler, unpublished data). Nestlings are fed mainly insects (Motis et al. 1997) by both males and females (Cramp 1998; Veiga et al. 2002). Male feeding visits occur mainly during the first half of the nestling period, when feeding rates of males are usually higher than those of females (see “Results”).

Female Condition Manipulation

About 1 month before egg laying (mean = 32.0 days, SD = 17.8, $N = 32$), we captured individuals that slept inside nest boxes, or we visited them during the morning. We manipulated the wing area of female starlings following the protocol established by Møller et al. (1995). Briefly, during the field seasons of 2005 and 2006, all captured females were weighed, measured, and randomly assigned to one of the three following treatments: (1) primaries 4 and 5 were removed by cutting off the feathers at the base (manipulation; $N = 33$); (2) the outermost 1 mm of pri-

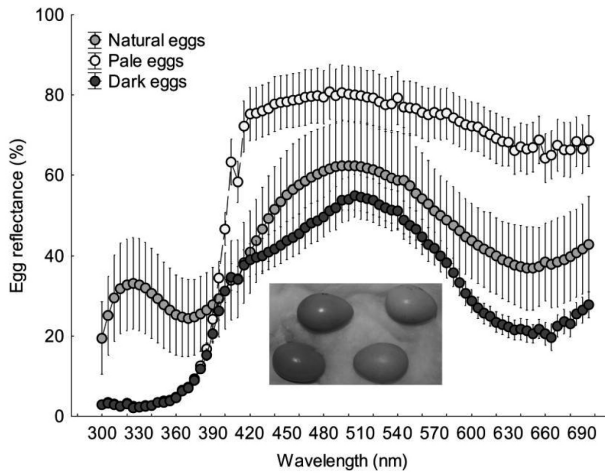


Figure 1: Mean reflectance (\pm SD) spectra of natural spotless starling (*Sturnus unicolor*) eggs. Reflectance curves for experimental model eggs (pale and dark) are also shown. Experimental pale (right) and dark (left) eggs used in the experiment are shown in the lower part of the picture, while natural eggs of similar coloration are shown in the upper part. A color version of this figure is available in the online edition of the *American Naturalist*.

maries 4 and 5 was removed (sham manipulation; $N = 21$); and (3) the female was captured and the wings handled as in treatments 1 and 2 (control; $N = 28$). This experiment reduced wing area of experimental females about 5%, and thus wing loading increased at the same rate. The experiment did not affect probability of reproduction since the percentage of females for which we detected reproduction did not vary for different treatments (experimental, 42.9%; sham manipulated, 42.9%; control, 42.4%; generalized linear model with binomial error and logistic function, Wald = 0.11, $P = .95$). Thus, after removing nests from two control and one experimental females for which we lost egg color measurements, we collected information on egg coloration for 11 experimental, 9 sham-manipulated, and 12 control females. The effect of capture and handling of females on blue-green color intensity of their eggs was assessed by comparing egg color of females captured before egg laying with that of seven females that were trapped after egg laying. In 2006, about 1 or 2 weeks after the first capture but before egg laying, we recaptured and weighed 13 females and used differences between first and second weights to validate our experiment (i.e., variation in body mass from first to second capture should be larger for experimental than for control females). We did not find between-year differences in egg coloration ($F = 0.08$, $df = 1, 26$, $P = .78$) or in the effect

of our experiment on egg color (interaction between year and experimental treatment; $F = 0.04$, $df = 2, 26$, $P = .96$). Thus, we pooled data from both years.

Egg Color Manipulation and Estimation of Parental Feeding Effort

During the nest-building period of 2006, we visited nest boxes daily until clutch completion. Once the first egg was detected and every day until clutch completion, each new laid egg was exchanged with either a pale ($N = 11$ nests) or a dark ($N = 11$ nests) blue-green model egg (see fig. 2). Original clutch size of nests with pale (mean \pm SD = 4.8 ± 1.3 eggs) and dark (mean \pm SD = 4.6 ± 0.7 eggs) artificial eggs did not differ significantly ($t = 0.40$, $df = 20$, $P = .69$). Artificial model eggs were made of plaster of Paris using latex molds from natural spotless starling eggs. Later, model eggs were painted with acrylic paints to produce colors similar to those of the least and most pigmented eggs in our population. All pale and dark artificial eggs were colored with the same two kinds of paint (Natural Color System, Scandinavian Colour Institute; dark eggs: 2030-B90G; pale eggs: 10% of dark eggs' paint and 90% of pure white). Artificial colored eggs, however, did not reflect in the UV part of the spectrum (fig. 1). Thus, although blue-green coloration (i.e., chroma) of

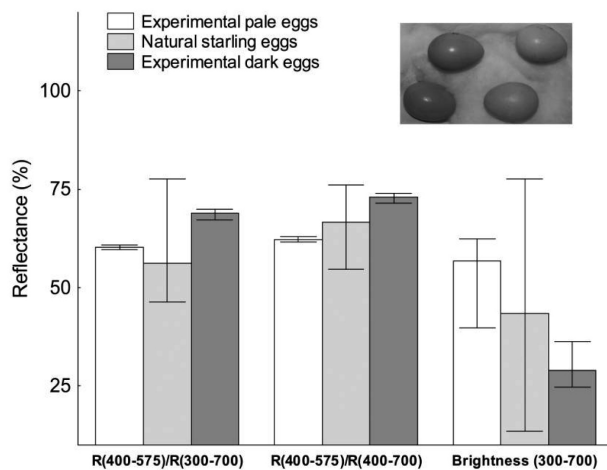


Figure 2: Mean, maximum, and minimum percentage of reflectance for blue-green (400–575 nm) colors relative to total (300–700 nm) or human visual (400–700 nm) spectrum of experimental (pale eggs, $N = 20$; dark eggs, $N = 20$) and natural ($N = 814$) spotless starling eggs. Mean values of total reflectance (i.e., brightness) for natural and experimental eggs are also shown. Experimental pale (right) and dark (left) eggs used in the experiment are shown in the lower part of the picture, while natural eggs of similar coloration are shown in the upper part. A color version of this figure is available in the online edition of the *American Naturalist*.

spotless starling eggs was intermediate between artificial pale and dark eggs for the visible part of the spectrum (400–700 nm), it showed smaller values than those estimated for artificial eggs when the complete reflectance spectrum (300–700 nm) was considered (fig. 2). In any case, coloration of experimental eggs was within the natural variation, even when UV reflectance was taken into account (see fig. 2). Model eggs colored with nonreflecting UV paints have provided biologically meaningful results in contexts in which visual detection of a receiver bird in the nest was implicated (e.g., brood parasitism; see Davies 2000). Moreover, plaster of Paris model eggs can be easily painted and, on average, do not differ from natural eggs in weight (e.g., Soler and Soler 2000).

We assume that males detected mainly experimental model eggs in their nests because natural eggs from experimental nests were in their original nests for only a few hours. Additionally, to be sure that provisioning effort in experimental nests was within the natural range of variation, some other nests ($N = 29$) were kept as controls for comparisons with experimental nests.

Two weeks after the first egg was laid, which corresponds to the typical incubation period for the species (Cramp 1998), experimental eggs were replaced by two to three hatchlings from randomly selected spotless starling nests that were not used in the experiment. Consequently, nest-

lings in these experimental nests were never related to the adults taking care of them. It should be noted that brood size in these experimental nests (two to three nestlings) was smaller than original clutch size (usually four or five eggs; see above).

Provisioning behavior of adults was observed three times in the course of the nestling period, specifically when nestlings were 4 (mean \pm SD = 4.0 ± 1.5 days, $N = 48$ [22 experimental nests]), 9 (mean \pm SD = 8.6 ± 2.1 days, $N = 43$ [20 experimental nests]), and 15 (mean \pm SD = 14.8 ± 1.6 days, $N = 37$ [19 experimental nests]) days old. All observations were performed during the morning. Parental visits were recorded by direct observation of the nests with a telescope (from a blind or a car) during periods of approximately 1 h (mean \pm SD = 59.8 ± 3.37 min, $N = 127$). When the number of nests to be observed was large, some nests (chosen blindly with regard to the experimental treatment) were recorded with a video camera placed several meters away from the nest box. Observations or recordings with no detection of parental feeding visits were not included in the analyses. Provisioning rates have been corrected to 1-h periods by dividing the number of visits by the number of minutes recorded and multiplying by 60. For each visit, we identified the sex and also whether adults carried food for feeding the offspring (i.e., feeding visits).

Table 1: Mean (SE) values and results from repeated-measures ANOVA

	Experimental nestlings	Control nestlings	F	P
PHA response (mm)	.65 (.03)	.56 (.03)	6.66	.001
Body mass (g)	77.5 (1.2)	78.5 (1.1)	.46	.50
Tarsus length (mm)	29.7 (.2)	30.0 (.2)	2.11	.16
Body condition	.32 (1.1)	.24 (1.1)	.01	.94

Note: Mean (SE) values are for T-cell-mediated immune response (PHA response), body mass, tarsus length, and body condition in control and experimental food-supplemented nestlings. For ANOVA, treatment was the repeated measure. For *F* values, *df* = 1, 33.

Manipulation of Nestlings' Nutritional Condition

During the breeding season of 2005, 3 days after the first nestling hatched, each hatchling was weighed, marked with a waterproof pen on the tarsus, and ranked according to body mass within each nest. We manipulated the nutritional condition of nestlings by means of food supplementation of some nestlings within the nest. The heaviest nestling was randomly assigned either to be food supplemented or to receive water as a control. Feeding treatment was alternated through the mass-based rank within the nest. The food treatment consisted of 0.2 mL of calorie-rich pasta loaded with essential micronutrients (minerals, vitamins, and amino acids; 5 calories per gram; Nutri-Calorias, Schering-Plough Animal Health). Subsequently, we revisited the nests every second day (five times during the nestling period), recolored the tarsi of all nestlings, and fed the nestlings assigned to control and experimental treatments during the first visit.

Nestlings were ringed about 4 days before fledging, that is, when they were 13–14 days old. At that moment, they were also weighed (with a Pesola spring balance to the nearest 0.5 g) and measured (the tarsus with a digital caliper to the nearest 0.01 mm, and wing length with a ruler to the nearest 0.1 cm). An index of body condition was estimated by regressing body mass on tarsus length and calculating the residuals (Schulte-Hostedde et al. 2005). Moreover, as a variable related to nutritional condition of nestlings, we also used values of skin swelling elicited by injection of the mitogen phytohemagglutinin (PHA; Sigma Chemical). It is well known that this response reflects nutritional conditions that nestlings have experienced during development (e.g., Alonso-Alvarez and Tella 2001). It is also commonly used in evolutionary ecology to estimate T-cell-mediated immunity (Kennedy and Nager 2006), although it also reflects other components of the immune system, such as major histocompatibility complex molecules (e.g., Goto et al. 1978; Martin et al. 2006). Fledglings were injected subcutaneously in the right wing web with 0.2 mg of PHA dissolved in 0.04 mL of physiological saline solution (Bausch and Lomb). The left wing web was injected with 0.04 mL of physiological saline solution. We measured the thickness of each wing web at

the injection site (with a Mitutoyo model ID-CI012 BS, to the nearest 0.01 mm) before and 24 h after the injection and estimated immune response as the change in thickness of the right wing web (PHA injection) minus the change in thickness of the left wing web. We repeated measurements of each wing web three times, and the mean was used in subsequent analyses.

Repeated-measures ANOVA with treatment (food supplemented vs. control) as a repeated measure revealed that food supplementation had a significant effect on nestling PHA response but not on tarsus length, body mass, or body condition index (table 1). Thus, within-nest differences between food-supplemented and control nestlings in PHA response were used as an index related to nutritional conditions that nestlings experienced during development (hereafter, nutritional condition of nestlings; for a similar approach, see De Neve et al. 2004c).

From the 36 nests with egg color information and experimental food supply, six were depredated before fledging, and only control or experimental nestlings fledged in three and two nests, respectively. Therefore, for 25 nests, we have both egg color information and the effect of our food supply experiment for control and experimental nestlings.

Egg Color Measurements

Egg coloration was measured within 2 days after the end of laying. To standardize ambient light conditions, all the measurements were taken inside a portable blind with opaque walls set up close to the nests. To prevent nest desertion by parents, nest box entrances were always blocked while measuring reflectance spectra. Eggs were returned to their nest within 15 min of removal, and subsequent visits to these nests confirmed that none of them was deserted. Color was always measured on five randomly selected areas of the surface of the egg along the long egg axis (Aviles et al. 2006a, 2006b). Reflectance spectra (300–700 nm) were recorded using an Ocean Optics S2000 spectrometer connected to a deuterium-halogen light (D2-W, mini) by a coaxial reflectance probe (QR-400-7-UV-vis) and the OOIBase32 operating software (Ocean Optics,

Dunedin, FL). Reflectances were always measured with the probe placed at a constant distance and reaching the egg at 45°. Measurements were relative and referred to a standard white reference (WS-2) and to the dark, both calibrated before the measurement of each clutch.

As a variable indicating intensity of blue-green coloration, we used the proportion of reflectance in the blue-green region of the spectrum ($R[400-575]/R[300-700]$; Siefferman et al. 2006), the region where biliverdin shows the lowest absorbance (Falchuk et al. 2002) and where reflectance of starling eggs reaches its maximum (fig. 1). Estimates of this variable at five different areas of the eggshell showed significant repeatabilities (data from 2005; $r = 0.87$, $F = 6.7$, $df = 205, 824$, $P < .0001$). Between-nest variation in this variable was significantly larger than within-nest variation ($r = 0.85$, $F = 17.4$, $df = 48, 158$, $P < .0001$), and thus mean values were used for each clutch.

Statistical Methods

All variables were approximately normally distributed (Kolmogorov-Smirnov test for continuous variables, $P > .2$), and, consequently, parametric statistics were used to analyze the data. To test the effects of female wing feather removal on body mass loss and egg color, we used regression analyses, one-way ANOVAs, and repeated-measures ANOVAs. To test the effect of our egg color experiment (i.e., dark vs. pale blue-greenish eggs) on male provisioning rates, we used a general linear model with experimental treatment (i.e., pale or dark eggs) and nestling development stage (i.e., first, 4 days; second, 9 days; third, 15 days after hatching) as fixed effects. To account for the nonindependence of observations at the same nest but at different nestling ages, nest identity, nested within experimental treatment, was included in the model as a random factor. Moreover, since male provisioning rate may depend on that of females but also on brood size, hatching date, and nestling age (i.e., variation from the typical development stage at which observations were performed), all these variables were included in a first model as covariates. After testing the model, including all mentioned factors and covariables as well as the interaction between fixed factors (hereafter, full model), we systematically removed the variable associated with the largest P value and ran the model again until we reached a model with all factors and covariables associated with two-tailed P values smaller than 0.1 (hereafter, final model). Residuals from statistical models approximately followed a normal distribution (Kolmogorov-Smirnov test, $P > .2$), and variances in provisioning rate of different groups were homogeneous (Levene's test for homogeneity of variances, $F = 1.09$, $df = 5, 54$, $P = .37$), validating the use of para-

metric tests. Since some nests involved in the egg color experiment were predated during the nestling period, sample sizes of parental provisioning behavior differ between nestling development stages.

Finally, to test the effect of our food supply experiment on the hypothetical relationship between egg coloration and nestling phenotype, we explored the relationship between these variables for control and experimental nestlings in a repeated-measures ANCOVA (i.e., treatment as a within factor and variables related to egg coloration as covariables). Regression analyses were used to test for the relationship between effect sizes within nests in our food supply experiment. All the analyses were performed with the STATISTICA 6 software (StatSoft 2001), and, conservatively, we used two-tailed P values.

Results

Removal of Wing Feathers and Egg Color

Blue-green egg color intensity of control females captured before reproduction ($R[400-575]/R[300-700]$, mean = 55.32, SD = 2.47, $N = 12$) did not differ significantly from egg color of females that were captured after laying ($R[400-575]/R[300-700]$, mean = 55.87, SD = 2.89, $N = 7$), suggesting that female capture and handling did not affect blue-green color intensity of the eggs. The comparison of body mass variation of females that were captured twice before egg laying in relation to experimental treatment revealed that the experimental removal of wing feathers had a detrimental effect on female body condition (repeated-measures ANOVA, body mass of females at different capture dates as within effect, and experimental treatment as between effect; interaction term: $F = 8.56$, $df = 1, 11$, $P = .014$). While body mass of experimental females (i.e., with wing feathers removed) decreased between first and second capture (first capture: mean body mass \pm SD = 84.4 \pm 4.7 g, $N = 6$; second capture: mean body mass \pm SD = 80.7 \pm 3.1 g, $N = 6$), that of control females tended to increase in the same period (first capture: mean body mass \pm SD = 81.1 \pm 3.5 g, $N = 7$; second capture: mean body mass \pm SD = 86.6 \pm 8.0 g, $N = 7$). This effect was independent of time variation between captures (time between first and second capture: mean \pm SD = 8.6 \pm 3.0 days) because when this information was included as a covariate in the previous model, the interaction term between body mass change and experimental treatment was still statistically significant ($F = 6.53$, $df = 1, 10$, $P = .029$). Thus, the experimental removal of wing feathers effectively provoked a reduced body condition in experimental females.

Control and sham-manipulated females laid eggs that were more blue-green than those laid by experimental fe-

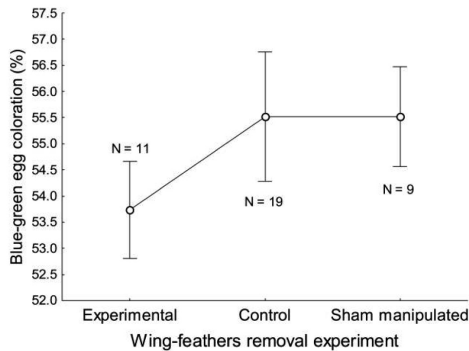


Figure 3: Weighted means (\pm 95% confidence intervals) of blue-green coloration (R[400–575 nm]/R[300–700 nm]) of eggs laid (1) by females with experimentally removed wing feathers (experimental), (2) by females with sham-manipulated feathers, and (3) by control females. Sample sizes for each group are shown.

males (treatment effect: $F = 2.98$, $df = 2, 29$, $P = .067$; post hoc comparisons, least significant difference (LSD) tests: experimental vs. control: $P = .049$; experimental vs. sham manipulated: $P = .040$). Moreover, since blue-green color intensity of eggs laid by females in the two control groups did not vary (post hoc comparison, LSD test: control vs. sham manipulated: $P = .81$), we pooled data from the two control groups and increased statistical power of the comparison of egg coloration between control and experimental females ($F = 6.08$, $df = 1, 30$, $P = .020$). This result did not change qualitatively even after including in the control group females that were not captured before laying ($F = 6.19$, $df = 1, 37$, $P = .018$; fig. 3). Furthermore, our feather removal experiment did not affect clutch size (treatment effect: $F = 1.30$, $df = 2, 29$, $P = .29$; post hoc comparisons, LSD tests: $P \geq .12$) or egg size (treatment effect: $F = 0.02$, $df = 2, 29$, $P = .98$; post hoc comparisons, LSD tests: $P \geq .83$). All these results together suggest that egg color was affected by the experimental manipulation of female body condition.

Egg Color and Parental Provisioning

Provisioning effort of spotless starling males in nests where eggs were not removed (mean feeding rate per hour \pm SE = 1.94 ± 0.24) did not differ significantly from that recorded in experimental nests (mean feeding rate per hour \pm SE = 1.57 ± 0.23 ; $F = 1.40$, $df = 1, 70.8$, $P = .24$) after taking into account the effect of nestling development stage ($F = 32.7$, $df = 2, 69$, $P < .0001$) and statistically controlling for number of nestlings ($F = 0.004$,

$df = 1, 69$, $P > .9$), hatching date ($F = 1.66$, $df = 1, 69$, $P = .2$), provisioning rate of females ($F = 0.46$, $df = 1, 69$, $P = .5$), and variation in nestling age within each nestling development stage ($F = 0.72$, $df = 1, 69$, $P = .40$). This conclusion did not vary after removing from the model all nonsignificant terms (effect of the experiment; $F = 0.14$, $df = 1, 50.5$, $P > .7$). Therefore, provisioning rates detected in experimental nests (i.e., those that incubated artificial model eggs) are within the natural variation in provisioning effort of the population.

Blue-green egg chroma of natural eggs was not significantly related to female feeding effort (first nestling development stage: $r = 0.13$, $N = 44$, $P = .4$; second stage: $r = 0.08$, $N = 40$, $P = .6$; third stage: $r = -0.01$, $N = 34$, $P = .96$), clutch size ($r = -0.06$, $N = 44$, $P = .7$), or egg size ($r = -0.25$, $N = 42$, $P = .1$). However, males from nests with experimental dark eggs fed the nestlings more frequently than those from nests with experimental pale eggs (fig. 4; final model: $F = 7.75$, $df = 1, 44.4$, $P = .008$; full model: $F = 4.10$, $df = 1, 49.7$, $P = .048$). Number of nestlings in the nest (full model: $F = 0.02$, $df = 1, 30$, $P > .9$), variation in nestling age within each nestling development stage (full model: $F = 0.32$, $df = 1, 30$, $P = .58$), and female provisioning effort (full model: $F = 1.56$, $df = 1, 30$, $P = .22$) did not explain a significant proportion of the variance in male provisioning rate. Apart from experimental treatment (see above), only nestling development stage ($F = 7.83$, $df = 2, 35$, $P = .0015$), nest identity ($F = 2.67$, $df = 20, 35$, $P = .005$), and hatching date (final model: $F = 3.17$, $df = 1, 35$, $P = .08$) remained in the final model. Although females tended to feed their nestlings more frequently in nests with ex-

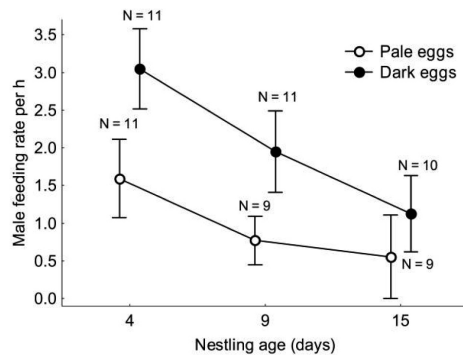


Figure 4: Mean number (\pm SE) of provisioning visits per hour performed by males in experimental nests with pale or dark blue-greenish eggs at three different stages of nestling development.

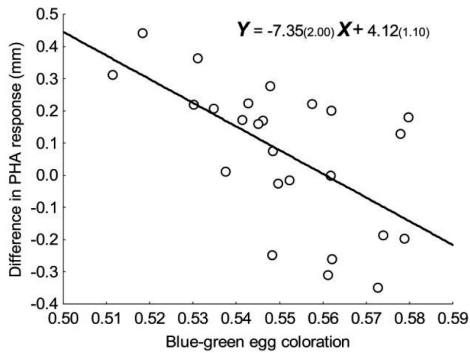


Figure 5: Relationship between blue-green coloration (R[400–575 nm]/R[300–700 nm]) of eggs and difference in PHA response of food-supplemented and control nestlings of the same nest. Regression equation (SE) is also shown.

perimental dark eggs (mean feeding rate per hour \pm SE = 5.35 ± 0.32 vs. 4.12 ± 0.47), differences did not reach statistical significance ($F = 3.62$, $df = 1, 45.8$, $P = .06$) after controlling for the effect of male feeding effort ($F = 0.47$, $df = 1, 36$, $P = .50$), laying date ($F = 2.93$, $df = 1, 36$, $P = .096$), variation in nestling age within each nestling development stage ($F = 3.01$, $df = 1, 36$, $P = .091$), observation time ($F = 0.94$, $df = 1, 36$, $P = .40$), and nest identity ($F = 3.08$, $df = 20, 36$, $P = .002$). As a consequence, total number of feeding bouts was larger in nests with dark eggs (mean feeding rate per hour \pm SE = 5.05 ± 0.53) than in nests with pale eggs (mean feeding rate per hour \pm SE = 7.36 ± 0.51 ; full model, treatment effect: $F = 10.10$, $df = 1, 53$, $P = .002$).

Egg Color and Nutritional Conditioned Traits of Nestlings

As predicted, the effect size of our food supply experiment on PHA response of nestlings was larger in nests with eggs reflecting less at the blue-green wavelength (R[400–575]/R[300–700]: $r = -0.61$, $N = 25$, $P = .001$; fig. 5). The statistical significance of this relationship did not depend on the negative effect of the food supply experiment on PHA response detected in some nests (i.e., PHA response of control nestlings resulting larger than that of experimental nestlings) because when only using nests with positive effects, the relationship is still negative and significant ($r = -0.53$, $N = 17$, $P = .029$). Moreover, laying date (partial $\beta \pm$ SE = 0.358 ± 0.151 , $t = 2.37$, $df = 22$, $P = .027$), but not clutch size ($P = .8$) or number of nestlings ($P = .8$), explained a significant portion of the

variance in difference of PHA response when added to the model, in addition to the variance explained by the intensity of blue-green egg color (partial $\beta \pm$ SE = -0.610 ± 0.151 , $t = 4.04$, $df = 22$, $P = .0006$). Therefore, the effect of the experimental food supply varied depending on blue-green color intensity of the eggs. Finally, we also detected that the relationship between PHA response and egg coloration differed between experimental and control nestlings (repeated-measured ANCOVA, PHA response as dependent variable; experimental treatment as a within factor: $F = 13.9$, $df = 1, 23$, $P = .0011$; interaction between intensity of blue-green color and experimental treatment: $F = 13.5$, $df = 1, 23$, $P = .0013$). While PHA response in nests with low-colored eggs tended to be lower for control nestlings than for experimental ones, the opposite occurred in nests with eggs reflecting more at the blue-green wavelength (fig. 6).

Discussion

In this study, we have found several lines of evidence supporting the hypothesis that blue-green color intensity of spotless starling eggs is a sexually selected trait of females that affects paternal feeding effort (SSH). We discuss the experimental methodologies used, the results in the context of the SSH, and also other alternative hypotheses explaining our results.

The experiment of wing feather clipping, which invariably provokes high energy expenditure associated with flying activities (Møller et al. 1995), resulted in a larger rate of body mass loss of experimental in comparison with control spotless starling females (see “Results”). This ex-

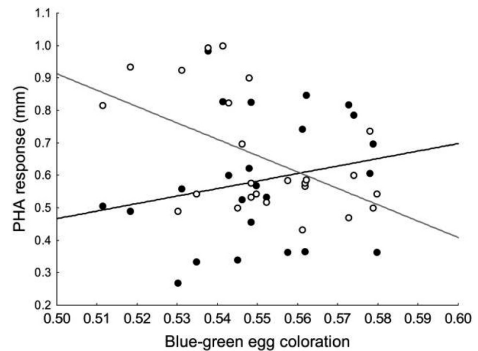


Figure 6: Relationship between blue-green coloration (R[400–575 nm]/R[300–700 nm]) of eggs and PHA response of food-supplemented (open circles, gray line) and control (filled circles, black line) nestlings.

perimental effect was detected before egg laying, and thus experimental females were in poorer condition than control females when producing the eggshell. Moreno and Osorno (2003) predicted a relationship between female condition and intensity of blue-green egg coloration because it should reflect levels of oxidative stress in laying females. The use of biliverdin in the eggshell (i.e., blue-green color) would reflect the oxidative condition of females because this pigment is a potent antioxidant. In accordance with the prediction, a positive relationship between body condition of females and intensity of blue-green color of their eggs has been empirically shown in different species (see the first section of this article). Furthermore, Moreno et al. (2006a) showed in a food supplementation experiment that pied flycatcher females provided with supplementary food before and during laying laid more intensely colored blue-green eggs than did control females. In this study, we did not manipulate body condition of females by food supplementation but by removal of wing feathers, which provoked an extra effort in flying activities. The effect of this experiment on the intensity of eggshell coloration was predicted solely by the SSH because of its effect on female oxidative condition. Because we did not manipulate female nutritional condition directly, differences in egg coloration between experimental and control females cannot be explained by a direct effect of pigments in the diet. Consequently, the effect of wing feather removal on egg color intensity is consistent with the hypothesis that egg color intensity signals phenotypic condition in spotless starling females.

Our second experiment investigated the effect of egg color per se on paternal feeding effort. As predicted by other postmating sexually selected characters (Burley 1988; Sheldon 2000), because intense blue-green eggs in the spotless starling indicate females in good body condition, males paired with such females should invest differentially in reproduction (Moreno and Osorno 2003). However, to know whether egg color is directly affecting male provisioning effort, the association between egg color and female condition needs to be broken, because males might be using other clues instead of egg color to assess female condition. We managed to do this by using experimental model eggs. These artificial eggs do not reflect at the UV wavelengths, but their blue-green chroma was within the limits of blue-green coloration in natural eggs. Differences between experimental and natural eggs in UV chroma did not result in different feeding rates of males attending nests with natural and experimental eggs (see "Results"). Moreover, at the visual part of the spectrum (400–700 nm), reflectance curves of both dark and pale experimental model eggs showed a shape similar to the curve estimated for natural eggs (fig. 1), and chroma of experimental model eggs was within the natural egg variation (fig. 2). Thus,

since pale and dark experimental model eggs greatly differed in their blue-green chroma, our experimental approach was appropriate to test the effect of egg coloration on male feeding effort.

After controlling for some potential confounding variables, including female provisioning rate, we found that males with intense blue-green artificial eggs in their nests fed the nestlings more frequently than did those males with pale artificial eggs (fig. 4). An association between natural egg color and male provisioning effort cannot explain this result because experimental treatments were randomly assigned and natural eggs were removed from the nests soon after laying (within a few hours). Moreover, nestlings raised in experimental nests were not related to adults feeding them, and thus the possible relationship between natural egg coloration and nestling phenotypic quality (e.g., immunocompetence; see above) was broken with our experimental design. We are not aware of any hypothesis that could explain the effect of the experiment with model eggs on paternal feeding effort apart from the SSH. Therefore, experimental evidence supporting the predicted relationships between egg coloration and paternal feeding effort and between female condition and egg coloration strongly suggests that blue-green intensity of eggs is a sexually selected signal in spotless starling females that affects parental effort of their mates (Moreno and Osorno 2003).

Experimental support for the predicted relationship between egg color and paternal feeding effort was recently found in pied flycatchers but not in collared flycatchers. Moreno et al. (2006b) detected that egg coloration of cross-fostered eggs predicted relative male contribution to nestling provisioning in pied flycatchers. However, Krist and Grim (2007) did not find such a relationship when studying collared flycatcher nests with cross-fostered eggs. In these two experiments, however, males fed nestlings that hatched from the same eggs that males had seen in their nests. There is evidence of a relationship between egg color and differential maternal investment in eggs (e.g., antibodies; Morales et al. 2006), and this maternal investment could affect the phenotypic quality of nestlings (e.g., immunocompetence). Therefore, the results found in pied flycatchers might be also explained as a consequence of males adjusting their provisioning effort to offspring phenotypic quality rather than to egg color.

The hypothesis of egg coloration being a postmating sexually selected signal in females also predicts better environmental conditions for nestling growth in nests with intense blue-green eggs. In our experiment with model eggs, we detected an effect of egg coloration on paternal feeding effort. Moreover, females also tended to feed their nestlings more frequently in nests with artificial dark eggs. The effect of the experiment on female feeding effort, al-

though not statistically significant, may suggest that females used the feeding effort of their mates to adjust their own feeding effort. In accordance with this possibility, we found that female and male feeding effort were significantly related ($r = 0.52$, $N = 20$, $P = .019$) but only for the first nestling development stage. In any case, although our results suggest a better nutritional environment for nestlings reared in nests where artificial dark eggs had been incubated, we did not find any significant effect of the experiment on nestling phenotypic quality measured at the end of the nesting period (i.e., PHA response, body mass, and body condition; comparisons between nestlings reared in nests with experimental pale and dark eggs: $t \leq 1.08$, $df = 16$, $P \geq .29$). However, sample sizes were quite small (see fig. 3), and thus Type II error (the risk of not rejecting the null hypothesis when it is false) was quite large. In addition, we reduced brood size of all experimental nests to two or three nestlings, partly to obtain nests with similar brood size and partly also to reduce nestling mortality due to brood reduction. The low level of sibling competition in experimentally reduced broods would make it difficult to find significant differences in nestling phenotypic condition between nests with pale and dark eggs. Given all these potential problems, to test the prediction that blue-green egg color intensity in the spotless starling predicts environmental (i.e., nutritional) conditions that nestlings experience during development, we performed a food supply experiment in a subsample of nests. In agreement with previous food supply experiments performed in other passerines (e.g., magpies: De Neve et al. 2004b, 2004c; barn swallows: Saino et al. 1997), we found that PHA response (but not body size or condition) of nestlings was affected by the experiment. Since we manipulated nutritional conditions of some nestlings in the nest, between-nest variation in the effect size of our experiment (i.e., difference in PHA response between experimental and control nestlings) should reflect between-nest variation in nutritional environments that nestlings (both experimental and control ones) experienced during growth. Therefore, we used the difference in levels of immune response between experimental and control nestlings in the same nest as an index of nutritional conditions experienced by nestlings. In accordance with this assumption, we found that laying date was positively related to the difference in PHA response between experimental and control siblings (see "Results"). Laying date is a life-history variable generally negatively related to other variables reflecting nestling phenotypic quality. This relationship is usually explained as the result of a decrease in resource availability as the season progresses (timing hypothesis) and also the result of genetic and/or phenotypic quality of breeders (i.e., parental quality) may decrease with time (quality hypothesis; e.g., Verhulst et al. 1995; Verboven

and Verhulst 1996; Verboven and Visser 1998; De Neve et al. 2004a). Both hypotheses suggest that the relationship between laying date and nestling phenotypic quality is mediated by nutritional conditions that nestlings experience during development. Therefore, the fact that the effect of our experimental food supply increased as the season progressed supports our assumption that differences in PHA response can be interpreted as indicators of nestling nutritional conditions.

As predicted by the SSH, our experiment of food supplementation provoked stronger positive effects in nests where eggs reflected less at the blue-green wavelengths (400–575 nm; fig. 5). Furthermore, the statistical significance of such a relationship did not depend on the influence of some nests where the immune response was lower in food-supplemented nestlings than in control ones (see "Results"). Since we did not record parental feeding behavior in these experimental nests, we cannot establish a direct link between our results and paternal feeding effort. An alternative explanation would be that egg coloration and offspring quality (i.e., immunocompetence) were positively related through maternal effects or genetic traits of females that correlate with egg coloration (Morales et al. 2006). However, even if that was the case, a differential investment of males in highly colored clutches would have a selective advantage (see Sheldon 2000). Results from our egg color experiment showed a differential reproductive effort of males that encountered experimental dark eggs; therefore, the finding that blue-green color intensity predicted the effect of experimental food supply on PHA response of nestlings can be interpreted as being consistent with the hypothesis that egg coloration is a sexually selected signal in females.

For nests with very blue-green eggs, our food supplementation experiment tended to have negative effects, with experimental nestlings showing lower immune response than their control siblings (see fig. 5). This result was mainly due to the negative relationship between PHA response and blue-green coloration detected for experimental but not for control nestlings (fig. 6) and may be conciliated with the hypothesis of blue-green coloration predicting nutritional conditions experienced by nestlings during development. For instance, it is likely that our food supplementation affected nestling begging behavior by decreasing nestling solicitation. Consequently, experimental nestlings would have been fed by parents at a lower frequency than expected in the absence of experimental feeding. Moreover, if experimental nestlings demanded less food, the parents might have allocated more food to the rest of the brood. Thus, our experiment may have affected the nutritional condition of both experimental and control nestlings. Interestingly, the SSH also predicts that parents should provide not only a larger quantity but also a higher

quality of food for their offspring in nests with more blue-green eggs than in nests with paler eggs (see Moreno and Osorno 2003). Therefore, on the one hand, it is possible that our experimental food supplementation provoked satiation in experimental nestlings, and control nestlings received a larger proportion of the food carried to the nest by parents. On the other hand, it is also possible that parents in nests with more colored eggs provided food of higher quality for their nestlings, contributing to a larger improvement of the food received by control nestlings in this kind of nest. If these assumptions are met, a negative effect of our food supplementation on nutritional conditioned traits (e.g., PHA response) in nests with very blue-green eggs would be plausible. However, we have no data on begging behavior of experimental and control nestlings or on quality of the food provided by adults, and hence this scenario is merely speculative.

Female sexual ornaments have been traditionally neglected in the study of sexual selection (Amundsen 2000). Most female ornaments have been studied in relation to mating investment (Amundsen and Forsgren 2001), but they are almost unexplored in a postmating sexual selection context (but see Pilastro et al. 2003). The hypothesis of egg coloration being a postmating sexually selected trait offers the possibility of studying processes of sexual selection in females. Until now, research efforts have been concentrated on studying predictions of the hypothesis and finding empirical, comparative, and experimental support (see the first section of this article). In this study, we found experimental support for the main predictions of the hypothesis in spotless starlings, and it constitutes one of the few experimental evidences of differential allocation in male parental investment in relation to a female character. Although more experiments to validate the hypothesis in other species are necessary, we think it is time to further explore quality signaling in females, assuming that the blue-green color of the eggs in many species is, at least in part, the result of postmating sexual selection.

Acknowledgments

This research was funded by the Spanish Ministry of Education and Science and the Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER; CGL2004-01777/BOS). The authorization for carrying out the experiments was granted by Dirección General de Gestión del Medio Natural, Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía. We thank C. Zamora and three anonymous reviewers for their comments and suggestions on a previous version of the manuscript.

Literature Cited

- Alonso-Alvarez, C., and J. L. Tella. 2001. Effects of experimental food restriction and body-mass changes on the avian T-cell-mediated immune response. *Canadian Journal of Zoology* 79:101–105.
- Alonso-Alvarez, C., S. Bertrand, G. Devevey, J. Prost, B. Faivre, and G. Sorci. 2004. Increased susceptibility to oxidative stress as a proximate cost of reproduction. *Ecology Letters* 7:363–368.
- Amundsen, T. 2000. Why are female birds ornamented? *Trends in Ecology & Evolution* 15:149–155.
- Amundsen, T., and E. Forsgren. 2001. Male mate choice selects for female coloration in a fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 98:13155–13160.
- Aviles, J. M., J. J. Soler, and T. Perez-Contreras. 2006a. Dark nests and egg colour in birds: a possible functional role of ultraviolet reflectance in egg detectability. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 273:2821–2829.
- Aviles, J. M., J. J. Soler, T. Perez-Contreras, M. Soler, and A. P. Møller. 2006b. Ultraviolet reflectance of great spotted cuckoo eggs and egg discrimination by magpies. *Behavioral Ecology* 17:310–314.
- Burley, N. 1986. Sexual selection for aesthetic traits in species with biparental care. *American Naturalist* 127:415–445.
- . 1988. The differential-allocation hypothesis: an experimental test. *American Naturalist* 132:611–628.
- Cramp, S. 1998. *Cramp's the complete birds of the Western Palearctic*. Optimedia, Oxford University Press, Oxford.
- Davies, N. B. 2000. *Cuckoos, cowbirds, and others cheats*. Poyser, London.
- Davies, N. B., and M. de L. Brooke. 1988. Cuckoos versus reed warblers: adaptations and counteradaptations. *Animal Behaviour* 36:262–284.
- De Neve, L., J. J. Soler, M. Soler, and T. Perez-Contreras. 2004a. Differential maternal investment counteracts for late breeding in magpies *Pica pica*: an experimental study. *Journal of Avian Biology* 35:237–245.
- De Neve, L., J. J. Soler, M. Soler, T. Perez-Contreras, M. Martin-Vivaldi, and J. G. Martinez. 2004b. Effects of a food supplementation experiment on reproductive investment and a post-mating sexually selected trait in magpies *Pica pica*. *Journal of Avian Biology* 35:246–251.
- De Neve, L., J. J. Soler, M. Soler, and T. Perez-Contreras. 2004c. Nest size predicts the effect of food supplementation to magpie nestlings on their immunocompetence: an experimental test of nest size indicating parental ability. *Behavioral Ecology* 15:1031–1036.
- Falchuk, K. H., J. M. Contin, T. S. Dziedzic, Z. Feng, T. C. French, G. J. Heffron, and M. Montorzi. 2002. A role for biliverdin IX α in dorsal axis development of *Xenopus laevis* embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 99:251–256.
- Gosler, A. G., J. P. Higham, and S. J. Reynolds. 2005. Why are birds' eggs speckled? *Ecology Letters* 8:1105–1113.
- Goto, N., H. Kodama, K. Okada, and Y. Fujimoto. 1978. Suppression of phytohemagglutinin skin response in thymectomized chickens. *Poultry Science* 57:246–250.
- Kennedy, G. Y., and H. G. Vevers. 1976. A survey of avian eggshell pigments. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 55:117–123.
- Kennedy, M. W., and R. G. Nager. 2006. The perils and prospects of using phytohaemagglutinin in evolutionary ecology. *Trends in Ecology & Evolution* 21:653–655.

- Kilner, R. M. 2006. The evolution of egg colour and patterning in birds. *Biological Reviews* 81:383–406.
- Krist, M., and T. Grim. 2007. Are blue eggs a sexually selected signal of female collared flycatchers? a cross-fostering experiment. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 61:863–876.
- Martin, L. B., P. Han, J. Lewittes, J. R. Kuhlman, K. C. Klasing, and M. Wikelski. 2006. Phytohemagglutinin-induced skin swelling in birds: histological support for a classic immunoeological technique. *Functional Ecology* 20:290–299.
- Møller, A. P., M. Lindén, J. J. Soler, M. Soler, and J. Moreno. 1995. Morphological adaptations to an extreme sexual display, stone-carrying in the black wheatear, *Oenanthe leucura*. *Behavioral Ecology* 6:368–375.
- Morales, J., J. J. Sanz, and J. Moreno. 2006. Egg colour reflects the amount of yolk maternal antibodies and fledging success in a songbird. *Biology Letters* 2:334–336.
- Moreno, J., and J. L. Osorno. 2003. Avian egg colour and sexual selection: does eggshell pigmentation reflect female condition and genetic quality? *Ecology Letters* 6:803–806.
- Moreno, J., J. L. Osorno, J. Morales, S. Merino, and G. Tomas. 2004. Egg colouration and male parental effort in the pied flycatcher *Ficedula hypoleuca*. *Journal of Avian Biology* 35:300–304.
- Moreno, J., J. Morales, E. Lobato, S. Merino, G. Tomas, and J. Martínez-de la Puente. 2005. Evidence for the signaling function of egg color in the pied flycatcher *Ficedula hypoleuca*. *Behavioral Ecology* 16:931–937.
- Moreno, J., E. Lobato, J. Morales, S. Merino, G. Tomas, J. Martínez-de la Puente, J. J. Sanz, R. Mateo, and J. J. Soler. 2006a. Experimental evidence that egg color indicates female condition at laying in a songbird. *Behavioral Ecology* 17:651–655.
- Moreno, J., J. Morales, E. Lobato, S. Merino, G. Tomas, and J. Martínez-de la Puente. 2006b. More colourful eggs induce a higher relative paternal investment in the pied flycatcher *Ficedula hypoleuca*: a cross-fostering experiment. *Journal of Avian Biology* 37: 555–560.
- Motis, A., J. Estrada, and D. Oro. 1997. Nestling diet of the spotless starling *Sturnus unicolor* and the European starling *Sturnus vulgaris* in a sympatric breeding area. *Ornis Fennica* 74:179–185.
- Petrie, M., and A. P. Møller. 1991. Laying eggs in others' nests: intraspecific brood parasitism in birds. *Trends in Ecology & Evolution* 6:315–320.
- Pilastro, A., M. Griggio, and G. Matessi. 2003. Male rock sparrows adjust their breeding strategy according to female ornamentation: parental or mating investment? *Animal Behaviour* 66:265–271.
- Saino, N., S. Calza, and A. P. Møller. 1997. Immunocompetence of nestling barn swallows in relation to brood size and parental effort. *Journal of Animal Ecology* 66:827–836.
- Schulte-Hostedde, A. I., B. Zinner, J. S. Millar, and G. J. Hickling. 2005. Restitution of mass-size residuals: validating body condition indices. *Ecology* 86:155–163.
- Sheldon, B. C. 2000. Differential allocation: tests, mechanisms and implications. *Trends in Ecology & Evolution* 15:397–402.
- Siefferman, L., K. Navara, and G. Hill. 2006. Egg coloration is correlated with female condition in eastern bluebirds (*Sialia sialis*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 59:651–656.
- Soler, J. J., and A. P. Møller. 1996. A comparative analysis of the evolution of variation in appearance of eggs of European passerines in relation to brood parasitism. *Behavioral Ecology* 7:89–94.
- Soler, J. J., and M. Soler. 2000. Brood-parasite interactions between great spotted cuckoos and magpies: a model system for studying coevolutionary relationships. *Oecologia* (Berlin) 125:309–320.
- Soler, J. J., J. Moreno, J. M. Avilés, and A. P. Møller. 2005. Blue and green egg-color intensity is associated with parental effort and mating system in passerines: support for the sexual selection hypothesis. *Evolution* 59:636–644.
- Solis, J. C., and F. de Lope. 1995. Nest and egg crypsis in the ground-nesting stone curlew *Burhinus oedipnemus*. *Journal of Avian Biology* 26:135–138.
- StatSoft. 2001. STATISTICA for Windows (computer program manual). Version 6.0. StatSoft, Tulsa, OK.
- Stocker, R., Y. Yamamoto, A. F. McDonagh, A. N. Glazer, and B. N. Ames. 1987. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 235:1043–1046.
- Stokke, B. G., A. Moksnes, and E. Roskaft. 2002. Obligate brood parasites as selective agents for evolution of egg appearance in passerine birds. *Evolution* 56:199–205.
- Underwood, T. J., and S. G. Sealy. 2002. Adaptive significance of egg coloration. Pages 280–289 in D. C. Deeming, ed. *Avian incubation, behaviour, environment and evolution*. Oxford University Press, Oxford.
- Veiga, J. P., J. Moreno, P. J. Cordero, and E. Mínguez. 2001. Territory size and polygyny in the spotless starling: resource-holding potential or social inertia? *Canadian Journal of Zoology* 79:1951–1956.
- Veiga, J. P., J. Moreno, M. Arenas, and S. Sanchez. 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.
- Verboven, N., and S. Verhulst. 1996. Seasonal variation in the incidence of double broods: the date hypothesis fits better than the quality hypothesis. *Journal of Animal Ecology* 65:264–273.
- Verboven, N., and M. E. Visser. 1998. Seasonal variation in local recruitment of great tits: the importance of being early. *Oikos* 81: 511–524.
- Verhulst, S., J. H. Vanbalen, and J. M. Tinbergen. 1995. Seasonal decline in reproductive success of the great tit: variation in time or quality? *Ecology* 76:2392–2403.
- Von Schantz, T., S. Bensch, M. Grahn, D. Hasselquist, and H. Wittzell. 1999. Good genes, oxidative stress and condition-dependent sexual signals. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 266:1–12.

Associate Editor: Ben C. Sheldon
 Editor: Michael C. Whitlock

Beak colour reflects circulating carotenoid and vitamin A levels in spotless starlings (*Sturnus unicolor*)

Carlos Navarro · Tomás Pérez-Contreras ·
Jesús M. Avilés · Kevin J. McGraw · Juan J. Soler

Received: 16 April 2009 / Revised: 1 February 2010 / Accepted: 2 February 2010 / Published online: 2 March 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract Many colourful sexually selected signals in animals are carotenoid-dependent and, because carotenoids function as antioxidants and immunostimulating molecules, carotenoid-dependent signals may honestly reflect the health state of individuals. Some other nutrients like vitamin A may also enhance health and colouration, but these have rarely been tested alongside carotenoids in colourful birds. Here, we examined whether beak colour of the spotless starling (*Sturnus unicolor*) reflected circulating levels of carotenoids and/or vitamin A (retinol). Spotless starlings are polygynous, sexually dimorphic birds (i.e. length of chest feathers). The tip of the beaks of male and female spotless starlings is more intensely coloured at the beginning of the breeding season and becomes dull after mating, which may suggest a sexual function. We found that females have a more intensely coloured beak and higher plasma carotenoid concentration than males during mating, and, despite the finding that carotenoid and vitamin A levels were not significantly related; colour intensity was positively correlated with plasma concentration of carote-

noids and vitamin A in both sexes. However, adult beak coloration was not associated with carotenoid and vitamin A concentrations after nestlings were hatched. Therefore, beak colouration of spotless starlings provides information about circulating levels of carotenoids and vitamins during the mating season and may potentially function as a reliable signal of physiological status in the context of sexual selection.

Keywords Antioxidant · Beak colouration · Plasma carotenoids · Retinol · Sex differences · Plastic signals · Vitamin A

Introduction

Signals are any acts or structures that alter the behaviour of other organisms and often benefit both communicating parties (Ender 2000; Maynard Smith and Harper 2003). Zahavi (1975) proposed that signals should reliably indicate phenotypic quality of individuals by means of differential costs associated with signal production or maintenance. Only high-quality individuals could afford such costs, which therefore assure the honesty of the signal. Honest signals may act in many different contexts, such as social status signalling (e.g. Møller 1987; McGraw and Hill 2000) or sexual selection (e.g. Møller 1988; Petrie 1994).

Carotenoids are one of the most important pigments responsible for colouration in birds (e.g. skin, feathers), and in the last few decades carotenoids have attracted the attention of many behavioural ecologists as potential honest signals of individual quality (Olson and Owens 1998; McGraw 2006). Much of the interest in carotenoids centers on the fact that they cannot be synthesised *de novo* by

Communicated by M. Hauber

C. Navarro (✉) · T. Pérez-Contreras · J. M. Avilés · J. J. Soler
Departamento de Ecología Funcional y Evolutiva,
Estación Experimental de Zonas Áridas (CSIC),
E-04120 Almería, Spain
e-mail: cnavarro@eeza.csic.es

J. M. Avilés
Departamento de Biología Animal y Ecología,
Universidad de Granada,
E-18071 Granada, Spain

K. J. McGraw
School of Life Sciences, Arizona State University,
Tempe, AZ 85287-4501, USA

animals; rather, they must be acquired from plants and herbivores in the diet (Kodric-Brown 1989; Hill 1991; Olson and Owens 1998). Consequently, carotenoid-based colouration should be linked to an individual's capacity to acquire food rich in carotenoids and to assimilate and process those nutrients (Endler 1980; Hill 1999).

Carotenoids may also improve individual health through their free-radical-scavenging actions (Burton and Ingold 1984; Møller et al. 2000; Chew and Park 2004; Martínez et al. 2008). However, Costantini and Møller (2008) recently showed in a meta-analysis of all available studies that there was no evidence that carotenoids are important antioxidants in birds. Carotenoids have also been touted as valuable immunostimulants, perhaps via gene-regulatory or cell-communication mechanisms (Møller et al. 2000), further promoting their honesty in colour signalling. Experimental studies manipulating dietary carotenoid levels (Blount et al. 2003; McGraw and Ardia 2003) and immunocompetence (Favre et al. 2003; Alonso-Alvarez et al. 2004) have produced results consistent with this view.

In addition to the focus on health actions of carotenoids, Hartley and Kennedy (2004) recently proposed that some vitamins (e.g. C, E, A) and enzymes with better antioxidant power than carotenoids would ultimately protect carotenoids from oxidation, permitting their use as honest colour signals. Several experimental studies have shown a positive relationship between non-pigmentary antioxidants (e.g. melatonin, vitamin E) and colouration in birds and fishes (e.g. Bertrand et al. 2006; Pérez et al. 2007; but see Karu et al. 2008), but no work to date has examined natural covariation among such non-pigmentary antioxidants, circulating carotenoids and colouration in free-living animals.

Here, we focused on vitamin A, which is a fat-soluble vitamin that plays key roles in vision, reproduction, growth and development and can be ingested directly from animal tissue or formed from carotenoid (e.g. β -carotene) precursors. Absorption efficiency of vitamin A depends on fat content of the diet (see review in Debier and Larondelle 2005), and its antioxidant and immune-boosting properties are also well recognised (Friedman and Sklan 1997). Aside from applied research in domestic poultry (e.g. Kuenzel et al. 2006) and some work on the retinol composition of tissues in free-living seabirds (Wallace et al. 1996; Surai et al. 2000), very little is known about the antioxidant and morphological effects of this vitamin in wild birds.

Females may rely on carotenoid-based ornaments as direct indicators of male condition and male capacity to acquire nutrients (Andersson 1994; Hill 2002). Furthermore, females may also use carotenoid-dependent characters to signal their own condition, and, if both males and females use the same kind of signals, mutual mate preferences are expected in species with biparental care

(Burley 1986) such as the spotless starling (*Sturnus unicolor*; Soler et al. 2008).

The majority of historical work on carotenoid-based honest signals in birds has focused on plumage (Hill 2006); only in a few taxa have the carotenoid-based colourful bare parts in adult birds been closely examined (e.g. zebra finches, blackbird, partridge, grouse, boobies; Burley and Coopersmith 1987; Favre et al. 2003; Perez-Rodriguez and Viñuela 2008; Martínez-Padilla et al. 2007; Velando et al. 2006). The beak of birds can be pigmented by melanin (e.g. horn, black, grey) and carotenoid (e.g. red, orange, yellow) pigments. For instance, astaxanthin, α -doradoxanthin, adonirubin and canthaxanthin are characteristic pigments of red bird beaks, but are not present in the plasma of the birds and, consequently, are likely directly metabolised in the beak (see McGraw 2004). Unlike some carotenoid-dependent feather ornaments, which are dead tissues, those that are present in bare-part structures like skin or beak must be mobilised continuously (Lozano 1994). Therefore, carotenoid-based signals in bare parts can better indicate real-time physiological status, body condition and resource availability, and consequently such signals may be used by individuals of both sexes to assess the current breeding state of a mate (e.g. Morales et al. 2009; Velando et al. 2006). This scenario predicts that within-individual variation in physiological status (i.e. carotenoid/antioxidant accumulation internally) is associated with intra-individual variation in carotenoid-based colouration across the breeding season.

Here, we examine relationships between carotenoid-dependent beak colour and circulating carotenoid and vitamin A levels across a breeding season in an avian species with biparental care—the spotless starling. The spotless starling is a polygynous species (Veiga et al. 2001) that in our population typically lays clutches of four to five eggs that, with a few exceptions, are incubated by females (Soler et al. 2008). Male throat-feather length is positively correlated with mating success in this species, suggesting a sexually selected role (Aparicio et al. 2001). Additionally, the end of the beak in males is yellow, turning grey with a tone of blue–green at the base. The end of the beak in the female is yellow, but pink at the base (Fig. 1). After breeding, the beak loses brilliant colouration and becomes dusky or even black in winter (Cramp 1998), which may suggest a sexual role before the reproduction.

The aims of this study were to (1) test for sexual differences in yellow beak colouration of spotless starlings; (2) investigate the relationships between beak colouration and plasma carotenoid levels, plasma vitamin A levels and body condition of males and females and (3) examine changes in the association between beak colouration and plasma carotenoids, vitamin A concentrations, and body condition across the breeding season. Our initial predictions are that; (1) males and females should differ in beak

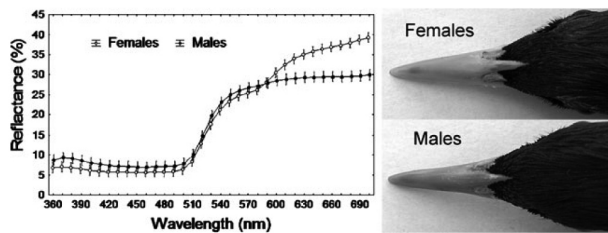


Fig. 1 Mean spectral reflectance of male (filled triangles) and female (empty triangles) spotless starling beaks. Vertical bars denote 95% confidence intervals. Photographs of the beak of male and female starlings are also shown

colouration intensity, (2) beak colouration is positively related with physiological condition in males and females and (3) because males and females are exposed to different physiological demands at different reproductive stages (e.g. nest defence, egg laying, incubation, nestling feeding), the predicted association between beak colouration and physiological status should differ for males and females.

Methods

Study area and capture of birds

This study was carried out in Guadix (southeastern Spain—37°18'N, 3° 11'W) in March–June 2007. We captured and ringed 64 spotless starlings (30 males and 34 females) at daybreak (6:30–8:30 a.m.) inside nest boxes (23×23×35 cm) installed close to or within colonies already established in old buildings in the area.

Bird were capture at the beginning of the breeding season (20 March–14 April 2007), when starlings are pairing and building nests. At the beginning of the nestling stage (2–3 days post-hatch), we captured 41 reproductive females and 20 reproductive males. Also, 13 males and nine females were captured at the beginning of the breeding season and after hatching of their eggs. We determined body mass (pesola, accuracy of 0.5 g) and tarsus length (digital calliper, accuracy of 0.01 cm) for all birds. Body condition was calculated as residuals from the mass-tarsus regression. Finally, by puncturing the brachial vein, we collected 50 µl of blood in heparinized tubes within the first two minutes after capture, thereby reducing the effect of stress on plasma antioxidants (Romero and Reed 2005; Chastel et al. 2005). Blood samples were placed on ice (4–5°C) until centrifugation and plasma was frozen immediately afterwards (at –20°C).

Vitamin A and carotenoid analyses

We analysed retinol (vitamin A; absorbance maximum = 325 nm) and carotenoid levels following the protocol

described in McGraw et al. (2008). Briefly, we thawed and added 15 µl of plasma to a microcentrifuge tube that together with 100 µl of ethanol was vortexed for 5 s. Afterward, we added 100 µl of MTBE and vortexed again for 5 s. We then centrifuged tubes for 3 min at 12,000 rpm. We transferred the supernatant to a fresh screw cap Eppendorf tube and evaporated to dryness with a nitrogen evaporator in a hood. Next, we resuspended the supernatant in 200 µl mobile phase, vortexed for 5 s, and injected 50 µl into a high-performance liquid chromatograph (HPLC; Waters Alliance® Instrument, Waters Corporation, Milford, MA). We used a 5 µm Waters Carotenoid C-30 column (4.6×250 mm ID) to determine types and amounts of carotenoids present. Pigment concentrations were calculated based on external curves constructed from known amounts of purified reference carotenoids. All measurements were made by CN, which reduced variance due to inter-observer variability, and after obtaining repeatable measurements in preliminary tests. Analyses were performed blind with respect to sex and beak. Based on comparison to reference carotenoids, we identified and estimated concentrations of cis-lutein, trans-lutein, zeaxanthin, β-carotene and esterified carotenoids (Table 1). We summed all concentrations to determine total carotenoid levels in plasma.

Beak colour measurements

Though avian visual perception can be now modelled in complex ways, incorporating retinal sensitivities and ambient wavelengths (Endler et al. 2005; Avilés et al. 2008), here we relied on colour variables extracted from spectrophotometric data that have proved to successfully reveal individual quality in previous work (see review in Hill and McGraw 2006). Beak colour was measured three times (except one bird that was measured only twice) on the distal yellow part (see Fig. 1). Reflectance spectra were obtained from 360–700 nm for all birds just after blood sampling using a spectrophotometer (Konica Minolta Sensing [Seoul, South Korea], CM-2600d) that estimates values at 10-nm intervals. Beaks were illuminated at 90° to the measuring

Table 1 Means and standard deviation for plasma concentrations of vitamin A and carotenoids (cis-lutein, trans-lutein, zeaxanthin, β -carotene and esterified carotenoids) in wild male and female spotless starlings

Antioxidant	Male=30 Mean (SD)	Female=34 Mean (SD)	$F_{1,60}$	p
Cis-lutein	0.729 (0.099)	0.654 (0.051)	0.18	0.67
Trans-lutein	4.875 (0.478)	6.281 (0.412)	4.39	0.04
Zeaxanthin	0.684 (0.088)	0.728 (0.040)	0.05	0.82
β -carotene	0.032 (0.004)	0.041 (0.003)	1.89	0.17
Carotenoid esters	0.161 (0.017)	0.226 (0.015)	6.81	0.01
Vitamin A	0.920 (0.197)	0.903 (0.186)	0.15	0.69

Results of univariate comparisons (F_{df} and associated p values) between sexes for all carotenoids and vitamin A are also shown

surface by a xenon light source, and the reflected light captured at the same angle. The measurements were taken relative to standard white (CM-A145, Konica Minolta Sensing) and dark references (CM-A32, Konica Minolta Sensing), which we calibrated before measurement of each bird. From spectrophotometric data, we calculated brightness as mean reflectance at every 10 nm interval from 360–700 nm. The shape of the spectrum of the beak of females shows two peaks. The first one corresponds with part of the range of absorbance of carotenoids (i.e. 450–570 nm; Britton et al. 1995), whereas the second (570–700 nm) coincides with the typical gradual increasing spectral shape of phaeomelanins (Prota 1992; Riley 1997; Fig. 1). This second peak, however, does not appear in the spectrum of males (Fig. 1).

Because we aimed to study sexual differences in the carotenoid waveband, we estimated hue and chroma within the 450–570 nm waveband for males and females. Hue was calculated as the wavelength at the inflection point of the spectra within the different wavelength ranks (Keyser and Hill 1999). Hue is a good indicator of the carotenoid pigment concentration of the integument in some species (Saks et al. 2003). Carotenoid chroma was defined as the proportion of reflectance within the carotenoids waveband (450–570 nm; Peters et al. 2004) in relation to total reflectance (360–700 nm). Birds that had high chroma values for the 450–570 nm interval had low chroma values for the 570–700 nm interval (see Fig. 1), so chroma estimates for low wavelength (450–570) were not used in our analyses.

Multiple measures of coloration in each sampled bird (see above) were repeatable both in females (brightness: $r=0.75$, $F_{82,165}=7.03$, $p<0.0001$; hue (450–570nm): $r=0.63$, $F_{82,165}=4.45$, $p<0.0001$; chroma (450,570nm): $r=0.94$, $F_{82,165}=35.77$, $p<0.0001$) and males (brightness: $r=0.70$, $F_{58,118}=5.85$, $p<0.0001$; hue (450–570nm): $r=0.47$, $F_{58,=$

2.77, $p<0.0001$; chroma (450–570nm): $r=0.94$, $F_{58,118}=29.56$, $p<0.0001$) Therefore, we used average values per individual for statistical analyses (Sokal and Rohlf 1981; Zar 1984).

All data, except hue values, approximately followed a normal distribution (Kolmogorov–Smirnov test for continuous variables, $p>0.2$). One outlier colour value for a female (Brightness=469.82; >2 standard deviation [mean=670.02; SD=95.78]) was eliminated from our data set. We examined intersexual differences in beak colour measures, body condition and plasma levels of retinol and carotenoids using measures obtained at the first capture (30 males and 33 females). We used capture date and the squared capture date as covariates in statistical analyses since plasma levels of vitamin A and carotenoids changed during the season following a quadratic function (multivariate analyses of variance (MANOVA), Date $F_{2,95}=3.32$, $p=0.04$; Date², $F_{2,95}=4.96$, $p=0.008$) (see Ninni et al. 2004).

MANOVA tests were used to assess relationships between beak colouration (dependent variables) and variables related to plasma antioxidants (total plasma carotenoid level (TPCL) and vitamin A level) and body condition as continuous independent variables. Sex was included as a fixed independent factor in the analysis. After estimation of statistical parameters associated with the above factors, we included in the model the interaction terms between sex and the continuous independent variables to explore sexual differences in the relationships between beak colour and plasma level of carotenoids and vitamin A (see Quinn and Keough 2002). The association between colour variables for the beak and plasma antioxidants and body condition was also explored for birds captured 2–3 days after hatching. In this analysis, hatching date was included as an additional covariate to correct for possible seasonal effects. Finally, for individuals captured twice (i.e. during mating and subsequently after hatching), we analysed within-season differences in the association between beak colouration and plasma antioxidants. In this analysis, we subtracted the average hatching date in our population from the capture date that was entered in the model to correct for possible seasonal trends. Two tailed p values and alpha level of 0.05 were used for statistical inference.

Results

Sexual differences

We found sex differences in beak-tip reflectance within the carotenoid waveband (i.e. 450–570 nm; MANOVA: $F_{3,57}=48.14$ $p<0.0001$), after controlling for the effect of date (MANOVA: $F_{3,57}=11.69$ $p<0.0001$) and squared date

(MANOVA: $F_{3,53}=12.05$ $p<0.0001$). Female beaks were more saturated ($F_{1,59}=67.57$, $p<0.0001$) and showed a non-significant trend to be brighter ($F_{1,59}=3.32$, $p=0.051$) than those of males in the carotenoid waveband (i.e. 450–570 nm; Fig. 2). The hue within the carotenoid waveband did not vary with sex ($F_{1,59}=0.26$, $p=0.61$). Moreover, males had lower circulating carotenoids in plasma than females (MANOVA test for differences in total carotenoid concentration between males and females, including capture date and capture date squared as covariates; Sex effect: $F_{3,56}=2.58$, $p=0.036$, see univariate test results in Table 1). Finally, we did not detect a sex difference in plasma vitamin A concentration ($F_{1,60}=0.15$, $p=0.69$).

Correlations among body condition, circulating antioxidants and beak colour during the mating period

During the mating season, we found a significant positive relationship between carotenoid hue of the beak tip and TPCL in both sexes (Table 3). We also detected negative associa-

tions between carotenoid chroma and brightness of the beaks and TPCL after controlling for the effect of sex and date, and date squared (MANOVA: $F_{3,53}=19.56$ $p<0.0001$, see univariate test result in Table 2, Fig. 3). Plasma level of vitamin A also explained additional variation in beak colour (i.e. chroma; MANOVA: $F_{3,53}=2.90$, $p=0.04$; see results of univariate tests in Table 2, Fig. 3). Furthermore, the relationships between beak colour and TPCL, but not those between beak colour and body condition and vitamin A, differed for males and females during the mating season (MANOVA: Sex \times TPCL: $F_{3,52}=3.71$, $p<0.017$; Sex \times vitamin A: $F_{3,52}=0.92$, $p<0.43$; Sex \times body condition: $F_{3,52}=2.23$, $p<0.09$, see results of univariate tests in Table 2). The relationship between beak brightness and TPCL was positive in females, but negative in males (Table 3). We also found that the slope of the relationship between hue and TPCL was steeper in males than in females (Fig. 3b; see statistics associated to the interaction term in Table 3). Both males and females show a negative relation between TPCL and carotenoid chroma estimated for low wavelengths. Plasma levels of vitamin A were not related to TPCL ($F_{1,61}=2.00$, $p=0.16$). In addition, there was no significant relationship between body condition and TPCL ($F_{1,59}=0.38$, $p=0.13$) or vitamin A ($F_{1,59}=0.40$, $p=0.52$) after controlling for sex, capture date and squared capture date square.

Correlations among body condition, circulating antioxidants and beak colour after hatching

Neither body condition, TPCL, nor vitamin A explained colour variables of the beak tip when we analysed these relationships with individuals caught a few days after hatching (i.e. chroma (450–570), hue (450–570) and brightness; MANOVA: Body condition $F_{3,46}=0.35$, $p=0.79$; TPCL $F_{3,46}=0.25$, $p=0.86$; Vitamin A $F_{3,46}=0.71$, $p=0.55$), after controlling for the effect of sex (MANOVA: $F_{3,46}=8.88$, $p<0.001$), hatching date (MANOVA: $F_{3,46}=0.67$, $p=0.57$) and squared hatching date (MANOVA: $F_{3,46}=0.90$, $p=0.45$). The interaction terms between sex and TPCL (MANOVA: $F_{3,45}=2.05$, $p=0.12$), sex and vitamin A (MANOVA: $F_{3,45}=1.25$, $p=0.30$) and sex and body condition (MANOVA: $F_{3,45}=0.45$, $p=0.71$) did not explain a significant proportion of variance in beak colouration 2–3 days after hatching. Only the interaction between sex and squared date was significant (MANOVA: $F_{3,45}=2.72$, $p=0.05$). Univariate tests showed that the relationship between hatching date and chroma (450–570) ($F_{1,47}=8.05$, $p=0.007$), but not for hue (450–570; $F_{1,47}=3.33$, $p=0.07$) or brightness ($F_{1,47}=0.06$, $p=0.80$), varied with sex. Chroma (450–570) increased as the season progressed in females ($F_{1,35}=35.61$, $p<0.0001$, $r=0.71$) but not in males ($F_{1,16}=0.09$, $p=0.76$, $r=-0.08$).

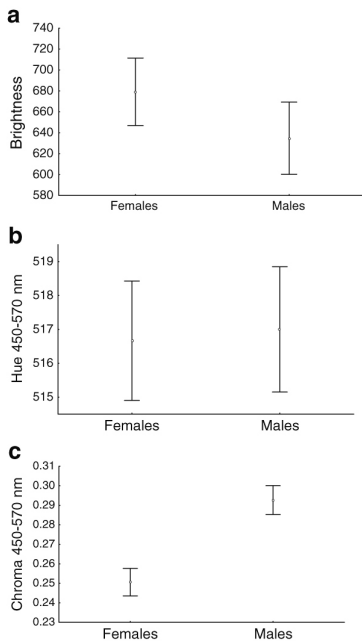


Fig. 2 Means \pm SE values of the tip of beak brightness (a), hue (450–570 nm) (b) and chroma (450–570 nm) (c) for male ($n=30$) and female ($n=33$) spotless starlings

Table 2 MANOVA test with bill brightness, hue (450–570 nm) and chroma (450–570 nm) as dependent variables. Sex was used as a fixed factor and capture date, capture date squared (date^2), body condition, vitamin A and total carotenoid plasma level (TPCL) as continuous variables

Variables	Wilks's values	$F_{3,53}$		Chroma (450–570nm)		Hue (450–570nm)		Brightness	
		$F_{3,52}^*$	p	Beta (SE)	p	Beta (SE)	p	Beta (SE)	p
Sex	0.32	37.21	<0.001	-0.56 (0.07)	<0.001	-0.22 (0.13)	<0.093	0.41 (0.14)	0.005
Date	0.74	6.06	0.001	-1.07 (0.46)	0.025	1.60 (0.84)	0.063	2.55 (0.93)	0.008
Date ²	0.72	6.78	<0.001	1.05 (0.45)	0.024	-1.57 (0.82)	0.060	-2.75 (0.90)	0.003
Body condition	0.96	0.63	0.596	0.03 (0.07)	0.669	-0.07 (0.13)	0.545	0.19 (0.14)	0.183
Vitamin A	0.85	2.90	0.043	0.16 (0.06)	0.010	-0.03 (0.11)	0.777	0.20 (0.12)	0.108
TPCL	0.47	19.56	<0.001	-0.49 (0.06)	<0.001	0.556 (0.12)	<0.001	-0.36 (0.13)	0.008
Sex × body condition	0.89	2.23	0.095	0.09 (0.10)	0.379	0.58 (0.12)	0.176	0.45 (0.19)	0.020
Sex * Vitamin A	0.95	0.93	0.435	-0.17 (0.30)	0.561	0.36 (0.54)	0.504	-0.96 (0.58)	0.106
Sex * TPCL	0.82	3.72	0.017	0.54 (0.17)	0.003	-0.56 (0.33)	0.09	0.64 (0.36)	0.082

The effects of interaction terms between sex and continuous variables were subsequently estimated in separated models that also included the independent variables and therefore degrees of freedoms associated to F values change ($F_{3,53}$ for estimates of independent variable effects and $F_{3,52}^*$ for estimates of the effects of the interaction terms). Univariate results (Beta (standard error) and associated p values) for brightness, hue (450–570 nm) and chroma (450–570 nm) are also shown. All results are consistent and retain significance after removing non-significant interactions from the initial model

Temporal changes in beak colour, body condition and antioxidant levels

The analysis of beak colouration on recaptured birds revealed that beak colouration was plastic in both male (MANOVA $F_{4,45}=8.9$, $p=0.00002$) and female (MANOVA $F_{4,69}=8.7$, $p=0.00001$) spotless starlings. Beaks of females at the hatching period were less bright, had lower hues and were more saturated at the carotenoid waveband beaks compared to those in the mating period. Beaks of males captured two days after hatching had lower brightness and chroma (450–570 nm) but higher green–yellow hue (450–570) than those during the mating period (see Table 4).

Furthermore, for males, TPCL ($F_{1,48}=8.74$, $p=0.005$) and vitamin A ($F_{1,48}=7.36$, $p=0.009$) were higher during the nestling (TPCL, Mean (SE)=9.20 (0.64)); Vitamin A: Mean (SE) = 1.09 (0.05) than during the mating stage (TPCL, Mean (SE) = 6.43 (0.58); Vitamin A: Mean (SE) = 0.93 (0.04)). Similarly, females showed an increase in vitamin A concentration ($F_{1,68}=6.99$, $p=0.01$; mating stage: Mean (SE) = 0.90 (0.03), post-hatching stage: Mean (SE) = 1.03 (0.04)), but a reduction of plasma carotenoid level ($F_{1,68}=11.96$, $p=0.0009$; mating stage: Mean (SE) = 7.83 (0.48), nestling stage: Mean (SE)=5.22 (0.47)) from mating to hatching.

Discussion

The main findings of this study were that (1) female spotless starlings had more colourful beaks and higher

plasma concentration of carotenoids than males, but not a higher concentration of vitamin A; (2) beak colouration was associated with total plasma carotenoid and plasma vitamin A levels at the onset of mating, but not during the nestling phase, both in males and females; (3) beak colouration was a plastic trait that changed differently in males and females across the different reproductive stages (i.e. from mating to post-hatching) and (4) from mating to post-hatching stages, plasma concentration of vitamin A increased in both sexes, but carotenoids increased in males and decreased in females. Below, we discuss these results that are consistent with the hypothesis that beak colouration is a dynamic signal that reflects changing physiological status (Safran et al. 2008; Rubenstein and Hauber 2008).

Male birds typically have more colourful carotenoid-dependent characters than females (Price and Burley 1993; McGraw et al 2003; Faivre et al. 2003; McGraw and Ardia 2005). However, we found that female starlings had higher levels of circulating carotenoids than males. This sex difference cannot be attributed to blood plasma-serum ratio since males and females did not differ in hematocrit estimations (unpublished data of the same starling population from 2005 [male ($n=61$), mean=52.9%, SD=3.2; female ($n=41$), mean=52.2%, SD=2.7] and 2006 [male ($n=35$), mean=52.4%, SD=3.1; female ($n=48$), mean=52.1%, SD=2.8], $F_{1,183}=1.77$, $p=0.18$), even after controlling for date ($F_{1,182}=0.017$, $p=0.90$) and date square ($F_{1,81}=0.074$, $p=0.79$). Beak tips of male and female spotless starlings did not differ in hue estimates for carotenoid wavelengths. However beak tips of females show an additional crest at longer wavelengths (570–

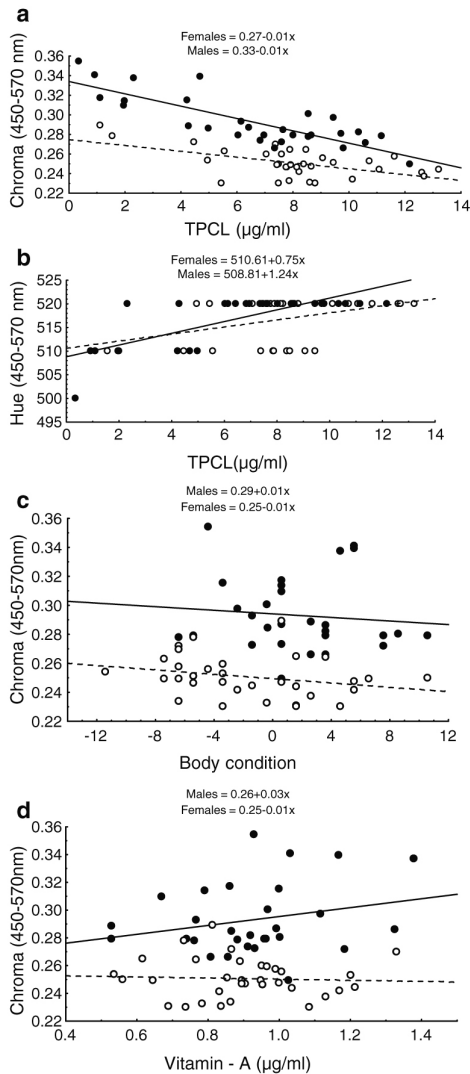


Fig. 3 Relationships between plasma carotenoid concentration and beak chroma and **b** hue; **c** between body condition and beak chroma; and **d** between plasma vitamin A concentration and beak chroma. Data points for males (filled symbols) and females (open symbols) and regression lines are shown

700 nm) (Fig. 1) and, thus, the beak tips of females are more colourful than those of males (Fig. 1). These detected sexual differences may suggest that this character is subject to more intense selection in females than in males. The spotless starling, however, is a polygynous species and, although social polyandry has been detected in our population (Navarro et al., unpublished data), higher intensity of sexual selection in females is an unlikely explanation for the detected sexual dimorphism in beak colouration. Female acquisition and maintenance of breeding sites is closely related to their breeding success, and because steroid-hormone implants affect these abilities (Veiga and Polo 2008) it is likely that other traits showing phenotypic quality also covaried with the ability of females to acquire and maintain breeding sites. Beak colour intensity would thus be a good candidate for signalling in a female-female competition context.

Independent of whether sexual selection is stronger for beak coloration in males or females, males selecting females with colourful beaks are the most likely cause of the evolution of exaggerated carotenoid-based colouration of female beaks (Amundsen and Pärn 2006, but see Rubenstein and Lovette 2009 for cooperative breeding bird species). It is known that females transfer essential micro-nutrients, including carotenoids, vitamin A and immune factors, to the offspring and that the amount of such substances should be related to females' phenotype and physiological abilities (i.e. availability in the female body; e.g. Morales et al. 2006; Biard et al. 2007). If that was the case, spotless starling males may select females with more colourful beaks because they have higher plasma concentration levels of carotenoids and vitamin A, and it is expected that those females transfer to the eggs larger amount of those substances than others. Reciprocally, by evaluating beak colour intensity of males, females may also estimate male health and condition, since the relationship between colouration and plasma concentrations of carotenoids and vitamin A exist in both sexes.

A relationship between beak colour measures and total plasma carotenoid concentration during the mating season has been detected in other avian species (e.g. Faivre et al. 2003; McGraw et al. 2003). Mechanistically, this relationship could be explained by concentration-dependent uptake of carotenoids from blood circulation by rhamphothelial keratinocytes, (Lucas and Stettenheim 1972). Furthermore, because the possible influence of sex steroid hormones on carotenoids and colouration (Alonso-Alvarez et al. 2004), such a relationship may differ for males and females; accordingly, we found that the relationship between beak colour and plasma carotenoid concentration differed significantly between males and females, with a tighter relationship for males (Table 3). In addition to the fact that physiological state influences sexual signal expression, we

Table 3 Slopes and associated *p* values of regression analyses between beak colour variables (chroma, hue and brightness) and date, date square, body condition, vitamin A plasma level and TPCL for males and females

	Tip chroma (450–570nm)			Tip Hue (450–570nm)			Tip brightness					
	Male (<i>n</i> =30)			Female (<i>n</i> =33)			Male (<i>n</i> =30)			Female (<i>n</i> =33)		
	Slope (SE)	<i>p</i>	Slope (SE)	Slope (SE)	<i>p</i>	Slope (SE)	Slope (SE)	<i>p</i>	Slope (SE)	Slope (SE)	<i>p</i>	
Date	0.0004 (5.97)	0.38	-0.002 (3.74)	0.03	-0.11 (5.98)	0.42	0.38 (3.90)	0.13	-4.06 (5.81)	0.12	-0.04 (4.08)	0.12
Date ²	0.91×10^{-5} (366.44)	0.18	-4.58×10^{-5} (196.90)	0.04	-0.003 (369.72)	0.27	0.01 (204.98)	0.15	-0.08 (354.29)	0.05	0.01 (213.63)	0.93
Body condition	-0.0008 (4.91)	0.14	-0.0006 (4.22)	0.60	0.02 (5.08)	0.90	0.24 (4.17)	0.34	5.20 (4.85)	0.09	-1.75 (4.23)	0.71
Vitamin A	-0.004 (0.19)	0.77	0.03 (0.19)	0.17	5.99 (0.19)	0.18	-3.78 (0.20)	0.46	-11.09 (0.19)	0.89	172.63 (0.19)	0.06
TPCL	-0.003 (2.28)	<0.001	-0.006 (1.95)	<0.001	0.75 (2.49)	0.01	1.23 (2.20)	>0.001	7.69 (2.67)	0.18	-14.05 (2.98)	0.01

Table 4 Means and standard deviation for beak colouration (chroma, hue and brightness) in male (MANOVA, $F_{4,45}=8.9$, $p=0.00002$) and female (MANOVA, $F_{4,69}=8.7$, $p=0.00001$) spottless starlings

Sex	Colour variable	Mating Mean		<i>n</i> =33 <i>n</i> *=30 SD		<i>n</i> =41 <i>n</i> *=20 SD		$F_{1,72}$ $F^*_{1,48}$		<i>p</i>
		Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	
Females	Brightness	680.01	89.52	601.97	140.26	7.70	0.007			
	Chroma 450–570 nm	0.25	0.02	0.27	0.02	9.54	0.002			
	Hue 450–570 nm	516.67	4.78	512.68	5.49	10.8	0.001			
Males	Brightness	640.01	99.10	520.65	122.39	17.45	<0.001			
	Chroma 450–570 nm	0.29	0.02	0.27	0.01	14.51	<0.001			
	Hue 450–570 nm	517.00	5.35	520.50	2.23	7.6	0.008			

Results of univariate comparisons ($F_{1,72}$ for females and $F^*_{1,48}$ for males and associated *p* values) for beak colour variables estimated at different reproductive stages (i.e. mating and nestling) are also shown

cannot rule out the possibility in our correlational study that signal expression itself (and behavioural responses by signal receivers) feeds back to affect physiological parameters (Safran et al. 2008).

We found for the first time a statistical link between retinol and integumentary colouration. Research effort to date has focused on associations between vitamins E and C and secondary sexual traits. However, vitamin A is metabolically linked to carotenoids (Debiec and Larondelle 2005) and can affect sexual activity (Gaál and Csaba 1998) as well as integument development (see review in Debiec and Larondelle 2005). Therefore, vitamin A might be involved in the expression of secondary sexual characters. An experimental study is now needed to understand whether or not vitamin A causally impacts carotenoid-based beak colouration in birds.

Concentrations of plasma vitamin A and carotenoids were not inter-correlated, which suggests different nutritional or metabolic mechanisms underlying the accumulation of the two biochemicals. Plasma carotenoid concentration is mainly related to the amount of carotenoids consumed in the diet, and changes in dietary intake can very quickly result in changes in plasma carotenoids (review in Thurnham and Northrop-Clewes 1999, but see Hórak et al. 2004). Consuming a rich carotenoid diet may result in an increase in plasma retinol, since approximately 10% of consumed carotenoids are in fact pro-vitamin A (i.e. β -carotene) that is transformed to retinol in the intestinal mucosa (Ganguly et al. 1953; Surai 2002). Plasma concentrations of retinol, however, are homeostatically regulated and should remain relatively constant. High or low plasma levels of vitamin A might have serious negative effects, but excess of vitamin A is stored in the liver and released directly to the blood when plasma concentration of vitamin A decreases (Thurnham and Northrop-Clewes 1999; Debiec and Larondelle 2005). Consequently, variation in plasma levels of carotenoids and vitamin A could be related to different physiological activities and therefore reveal different aspects of physiological condition of individuals. Independent of the proximate (i.e. physiological) mechanisms explaining the associations between plasma antioxidants and beak colour in spotless starlings, our results suggest that beak colour of both males and females may be used by conspecifics as a signal of physiological status.

Beak colour of male and female spotless starlings changed during the breeding season, suggesting that males or females could mutually and continuously evaluate current mate quality (see Velando et al. 2006). Unlike some carotenoid-dependent ornaments with no physiological activity like feathers (McGraw 2006), carotenoids that are present in beak or other fleshy (i.e. physiological active) integuments can be remobilized continuously and may

better indicate ongoing physiological activities. Beak colour changes were different in males and females, and this may reflect sexual differences in hormonal activity (Burley et al. 1992; Negro et al. 1998), costs of reproduction (egg laying, incubation, feeding effort, etc.) across the season and/or ectoparasitism (Ewen et al. 2009). In any case, the expected decrease in carotenoids concentration only occurred in females, while vitamin A increased from mating to hatching in the two sexes. So, sexual mismatches between changes in beak colour and carotenoid levels may suggest that maintenance of such physiologically important chemicals in the integument (i.e. beak) after pairing is no longer adaptive for feeding males, but for females trying to affect feeding effort of their mates (i.e. beak colour as a postmating sexually selected signals that affect investment in reproduction of her male). This possibility awaits further experimental testing.

Acknowledgments We thank A.P. Møller and two anonymous referees for their comments on the manuscript. This research was funded by the Spanish Ministry of Education and Science and European funds (FEDER) (CGL2004-01777/BOS, CGL2007-61251). CN was supported by a predoctoral grant from the Spain's Ministry of Science and Technology (BES-2005-8619). The authorization for carrying out the experimental work on animals in the field was granted by the Dirección General de Gestión del Medio Natural of the Consejería de Medio Ambiente of Junta de Andalucía.

References

- Alonso-Alvarez C, Bertrand S, Devevey G, Gaillard M, Prost J, Faivre B, Sorci G (2004) An experimental test of dose-dependent effect of carotenoids and immune activation on sexual signals and antioxidant activity. *Am Nat* 164:651–659
- Andersson M (1994) Sexual selection. Princeton University Press, Princeton
- Amundsen T, Pärn H (2006) Female colouration: review of functional and non-functional hypotheses. In: Hill GE, McGraw KJ (eds) Bird coloration. Vol. 2, Function and evolution. Harvard University Press, Cambridge
- Aparicio JM, Cordero PJ, Veiga JP (2001) A test of the hypothesis of mate choice based on heterozygosity in the spotless starling. *Anim Behav* 61:1001–1006
- Avilés JM, Soler JJ, Navarro C, Pérez-Contreras T (2008) Dark nests and nestling conspicuousness in color patterns of altricial birds. *Am Nat* 171:327–338
- Bertrand S, Faivre B, Sorci G (2006) Do carotenoid-based sexual traits signal the availability of non-pigmentary antioxidants? *J Exp Biol* 209:4414–4419
- Biard C, Surai PF, Møller AP (2007) An analysis of pre- and post-hatching maternal effects mediated by carotenoids in the blue tit. *J Evol Biol* 20:326–339
- Blount JD, Metcalfe NB, Birkhead TR, Surai PF (2003) Carotenoid modulation of immune function and sexual attractiveness in zebra finches. *Science* 300:125–127
- Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H (1995) Carotenoids. Volume IA: isolation and analysis. Birkhäuser, Basel
- Burley N (1986) Sexual selection for aesthetic traits in species with biparental care. *Am Nat* 127:415–445

- Burley N, Coopersmith CB (1987) Bill color preferences of zebra finches. *Ethology* 76:133–151
- Burley NT, Price DK, Zann RA (1992) Bill color, reproduction and condition effects in wild and domesticated zebra finches. *Auk* 109:13–23
- Burton GW, Ingold KU (1984) β -carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science* 224:569–573
- Chastel O, Lacroix A, Weimerskirch H, Gabrielsen GW (2005) Modulation of prolactin but not corticosterone responses to stress in relation to parental effort in a long-lived bird. *Horm Behav* 47:459–466
- Chew BP, Park JS (2004) Carotenoid action on the immune response. *J Nutr* 134:257S–261S
- Costantini D, Møller AP (2008) Carotenoids are minor antioxidants for birds. *Funct Ecol* 22:367–370
- Cramp S (1998) Cramp's the complete birds of the Western Palearctic. Optimedia. Oxford University Press, Oxford
- Debiec C, Larondelle Y (2005) Vitamins A and E: metabolism, role and transfer to offspring. *Br J Nutr* 93:153–174
- Endler JA (1980) Natural selection on color patterns in *Poecilia reticulata*. *Evolution* 34:76–91
- Endler JA (2000) Evolutionary implications of the interaction between animal signals and the environmental. In: Espmark Y, Amundsen T, Rosenqvist G (eds) Animal signals: signalling and design in animal communication. Tapir Academic Press, Trondheim, Norway, pp 11–46
- Endler JA, Westcott DA, Madden JR, Robson T (2005) Animal visual systems and the evolution of color patterns; sensory processing illuminates signal evolution. *Evolution* 50:1795–1818
- Ewen JG, Thorogood R, Brekke P, Cassey P, Karadas F, Armstrong DP (2009) Maternally invested carotenoids compensate costly ectoparasitism in the hibi. *PNAS* 106:12798–12802
- Faivre B, Grégoire A, Prémault M, Cézilly F, Sorci G (2003) Immune activation rapidly mirrored in a carotenoid-based secondary sexual trait. *Science* 300:103
- Friedman A, Sklan D (1997) Effect of dietary fatty acids on humoral immune response of turkeys. *Br Poult Sci* 38:186–195
- Gaál A, Csaba G (1998) Testosterone and progesterone level alterations in the adult rat after retinoid (retinol or retinoic acid) treatment (imprinting) in neonatal or adolescent age. *Horm Metab Res* 30:487–489
- Ganguly J, Mehl JW, Deuel HJ Jr (1953) Studies on carotenoid metabolism. XIII. The carotenoid composition of the blood, liver and ovaries of the rat, ewe, cow, and frog. *J Nutr* 50:73–83
- Hartley RC, Kennedy MW (2004) Are carotenoids a red herring in sexual display? *Trends Ecol Evol* 19:353–354
- Hill GE (1991) Plumage coloration is a sexually selected indicator of male quality. *Nature* 350:337–339
- Hill GE (1999) Is there an immunological cost to carotenoid-based ornamental colouration? *Am Nat* 154:589–595
- Hill GE (2002) A red bird in a brown bag: the function and evolution of colorful plumage in the house finch. Oxford University Press, Oxford
- Hill GE (2006) Female mate choice for ornamental coloration. In: Hill GE, McGraw KJ (eds) Bird coloration, volume 2. Function and evolution. Harvard University Press, Cambridge
- Hill GE, McGraw KJ (2006) Bird coloration. volume 1. Mechanisms and measurements. Harvard University Press, Cambridge
- Hörak P, Surai PF, Ots I, Møller AP (2004) Fat soluble antioxidants in brood-rearing great tits: relations to health and appearance. *J Avian Biol* 35:63–70
- Karu U, Saks L, Horak P (2008) Carotenoid-based plumage coloration is not affected by vitamin E supplementation in male greenfinches. *Ecol Res* 23:931–935
- Kodric-Brown A (1989) Dietary carotenoids and male mating success in the guppy: an environmental component to female choice. *Am Nat* 124:309–323
- Kuenzel WJ, Rowland AM, Pillai PB, O'Connor-Dennie TI, Emmert JL, Wideman RF (2006) The use of vitamin A-deficient diets and jugular vein ligation to increase intracranial pressure in chickens (*Gallus gallus*). *Poultry Sci* 85:537–545
- Lozano GA (1994) Carotenoids, parasites and sexual selection. *Oikos* 70:309–311
- Lucas AM, Stettenheim PR (1972) Avian anatomy. Integument. Agriculture Handbook 362. U.S. Dept. Agric, Washington
- Martinez A, Rodriguez-Girones MA, Barbosa CM (2008) Donator acceptor map for carotenoids, melatonin and vitamins. *J Physic Chem A* 112:9037–9042
- Martinez-Padilla J, Mougeot F, Perez-Rodriguez L, Bortolotti GR (2007) Nematode parasites reduce carotenoid-based signalling in male red grouse. *Biol Letters* 3:161–164
- Maynard Smith J, Harper D (2003) Animal signals. Oxford University Press, Oxford
- McGraw KJ (2004) Colorful songbirds metabolize carotenoid at the integument. *J Avian Biol* 35:471–476
- McGraw KJ (2006) Mechanics of carotenoid-based coloration. In: Hill GE, McGraw KJ (eds) Bird coloration. Vol. 1, Function and evolution. Harvard University Press, Cambridge
- McGraw KJ, Hill GE (2000) Carotenoid based ornamentation and status signalling in house finch. *Behav Ecol* 11:520–527
- McGraw KJ, Ardia DR (2003) Carotenoids, immunocompetence, and the information content of sexual colors: an experimental test. *Am Nat* 162:704–712
- McGraw KJ, Ardia DR (2005) Sex differences in carotenoid status and immune performance in zebra finches. *Evol Ecol Res* 7:251–262
- McGraw KJ, Gregory AJ, Parker RS, Adkins-Regan E (2003) Diet, plasma carotenoids and sexual coloration in the zebra finch (*Taeniopygia guttata*). *Auk* 120:400–410
- McGraw KJ, Tourville EA, Butler MW (2008) A quantitative comparison of the commonly used methods for extracting carotenoids from avian plasma. *Behav Ecol Sociobiol* 62:1991–2002
- Møller AP (1987) Variation in badge size in male House Sparrows (*Passer domesticus*): evidence for status signalling. *Anim Behav* 35:1637–1644
- Møller AP (1988) Female choice selects for male sexual tail ornaments in the monogamous swallow. *Nature* 322:996–1005
- Møller AP, Biard C, Blount JD, Houston DC, Ninni P, Saino N, Surai PF (2000) Carotenoid-dependent signals: indicators of foraging efficiency, immunocompetence and detoxification ability. *Avian Poultry Biol Rev* 11:137–159
- Morales J, Sanz JJ, Moreno J (2006) Egg colour reflects the amount of yolk maternal antibodies and fledging success in a songbird. *Biol Letters* 2:334–336
- Morales J, Velando A, Torres R (2009) Fecundity compromises attractiveness when pigments are scarce. *Behav Ecol* 20:117–123
- Negro JJ, Bortolotti GR, Tella JL, Fernie KJ, Bird DM (1998) Regulation of integumentary colour and plasma carotenoids in American Kestrels consistent with sexual selection theory. *Funct Ecol* 12:307–312
- Ninni P, de Lope F, Saino N, Haussy C, Møller AP (2004) Antioxidants and condition-dependence of arrival date in a migratory passerine. *Oikos* 105:55–64
- Olson VA, Owens IPF (1998) Costly sexual signals: are carotenoids rare, risky or required? *Trends Ecol Evol* 13:510–514
- Pérez MB, Galderón NL, Croci CA (2007) Radiation-induced enhancement of antioxidant activity in extracts of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Food Chem* 104:585–592

- Perez-Rodriguez L, Viñuela J (2008) Carotenoid-based bill and eye ring coloration as honest signals of condition: an experimental test in the red-legged partridge (*Alectoris rufa*). *Naturwissenschaften* 95:821–830
- Peters A, Denk AG, Dehley K, Kempenaers B (2004) Carotenoid-based bill colour as an indicator of immunocompetence and sperm performance in male mallards. *J Evol Biol* 17:1111–1120
- Petrie M (1994) Improved growth and survival of offspring of peacocks with more elaborate traits. *Nature* 371:598–599
- Price DK, Burley NT (1993) Constraints on the evolution of attractive traits: genetic (co)variation of zebra finch bill color. *Hereditas* 71:405–412
- Prota G (1992) *Melanins and melanogenesis*. Academic Press, San Diego
- Quinn GP, Keough MJ (2002) *Experimental design and data analysis for biologists*. Cambridge University Press, Cambridge
- Romero LM, Reed JM (2005) Collecting baseline corticosterone samples in the field: is under 3 min good enough? *Comp Biochem Physiol* 140A:73–79
- Rubenstein DR, Hauber ME (2008) Dynamic feedback between phenotype and physiology in sexually selected traits. *Trends Ecol Evol* 23:655–658
- Rubenstein DR, Lovette IJ (2009) Reproductive skew selection on female ornamentation in social species. *Nature* 462:786–789
- Riley PA (1997) Melanin. *Int J Biochem Cell Biol* 29:1235–1239
- Safran RJ, Adelman J, McGraw KJ, Hau M (2008) Sexual signal elaboration affects physiological state in a social vertebrate. *Curr Biol* 18:461–462
- Saks L, McGraw K, Horak P (2003) How feather colour reflect its carotenoid content. *Ecology* 17:555–561
- Sokal RR, Rohlf FJ (1981) *Biometry*. W.H.Freeman, New York
- Soler JJ, Navarro C, Pérez-Contreras T, Avilés JM, Cuervo JJ (2008) Sexually selected egg coloration in spotless starlings. *Am Nat* 171:183–194
- Surai PE (2002) *Natural antioxidants in avian nutrition and reproduction*. Nottingham University Press, Nottingham
- Surai PE, Kuklenko TV, Ionov IA, Noble RC, Sparks NHC (2000) Effect of Vitamin A on the antioxidant system of the chick during early postnatal development. *Brit Poultry Sci* 41:454–458
- Thumham DI, Northrop-Clewes CA (1999) Optimal nutrition: vitamin A and the carotenoids. *Proc Nutr Soc* 58:449–457
- Veiga JP, Polo V (2008) Fitness consequences of increased testosterone levels in female Spotless Starlings. *Am Nat* 172:42–53
- Veiga JP, Moreno J, Cordero PJ, Minguéz E (2001) Territory size and polygyny in the spotless starling: resource-holding potential or social inertia? *Can J Zool* 79:1951–1956
- Velando A, Beamonte-Barrientos R, Torres R (2006) Pigment-based skin colour in the blue-footed booby: an honest signal of current condition used by females to adjust reproductive investment. *Oecologia* 149:535–542
- Wallace RS, Teare JA, Diebold E, Michaels M, Willis M (1996) Plasma tocopherol, retinol, and carotenoid concentrations in free-ranging Humboldt penguins in Chile. *Zoo Biol* 15:127–134
- Zahavi A (1975) Mate selection—a selection for a handicap. *J Theor Biol* 53:205–214
- Zar JH (1984) *Biostatistical analysis*. Prentice Hall, Englewood Cliffs

Journal of Avian Biology 2011 (en imprenta)

**Blue-green eggshell coloration reflects yolk antioxidant
content in spotless starlings (*Sturnus unicolor*)**

CARLOS NAVARRO¹*, TOMÁS PÉREZ-CONTRERAS¹, JESÚS M. AVILÉS¹,
KEVIN J. McGRAW² and JUAN J. SOLER¹

¹Departamento de Ecología Funcional y Evolutiva, Estación Experimental
de Zonas Áridas (CSIC), E-04120 Almería, Spain

²School of Life Sciences, Arizona State University, Tempe, AZ 85287-4501, USA

Word count: 4951

Correspondence to CN:

Tel.: (+34) 950 281045

Fax : (+34) 950 277100

*E-mail: cnavarro@eeza.csic.es

Running headline: C. Navarro et al. Blue eggs and yolk antioxidant content

Summary:

The hypothesis that eggshell colouration is a sexually selected trait of female birds is based on the fact that biliverdin, the pigment responsible for blue-green colours of the eggshell, is a potent antioxidant and that only females with high antioxidant capacity can deposit higher concentrations of biliverdin as eggshell pigment. Antioxidants (e.g. carotenoids, vitamins) are also abundant in the egg yolk, which serve as nutrient reserves for the developing embryo, and eggshell colour intensity may reflect maternal investment in yolk antioxidants. Here, we test the relationship between blue-green eggshell colour intensity and concentration and amount of carotenoids, vitamin A, and vitamin E in the egg yolk of spotless starling (*Sturnus unicolor*), a species for which we have previously shown good evidence of sexual selection driving egg coloration. As could be extrapolated from the hypothesis of sexual selection driving the evolution of blue-green eggshells, we found that eggshell colour intensity was positively related to the concentration and amount of carotenoids and vitamin E in the yolk. Thus, mothers may use egg colour intensity to signal to fathers the antioxidant status of their offspring. Moreover, we provide evidence suggesting that maternal yolk investment in more coloured eggs can also explain the detected association between feeding decision of males and egg colour intensity that we have found previously in this species.

Key words: egg colouration, carotenoids, vitamin A, vitamin E, sexual selection.

INTRODUCTION

The hypothesis that eggshell colouration is a sexually selected trait of females (EC hypothesis) in species with biparental care suggests that colour intensity of the eggshells of birds reveals the condition of females at the time of laying and is used by males as a cue to determine their parental effort (Moreno and Osorno 2003; Soler et al. 2008). This hypothesis is based on the antioxidant capacity of eggshell pigments, such as biliverdin (Kennedy and Vevers 1976, Stocker et al. 1987). Because females are thought to be under high levels of oxidative stress during breeding (e.g. Von Schantz et al. 1999, Alonso-Alvarez et al. 2004), only those with a high antioxidant capacity would be able to deposit higher concentrations of biliverdin in eggshells (Moreno and Osorno 2003).

Three main predictions emerge from the EC hypothesis. First, the intensity of blue-green coloration should reflect female condition at the time of laying. This prediction has received empirical and experimental support (Moreno et al. 2005, Siefferman et al. 2006, Krist and Grim 2007, Hanley et al. 2008,). Second, the hypothesis posits that males should adjust paternal behaviour as a function of blue-green eggshell colour intensity. Some findings support that idea that males provision young more when they hatched from more colourful eggs (Moreno et al. 2004, Hanley et al. 2008, Soler et al. 2008, Morales et al. 2010), but this is not always the case (Krist and Grim 2007, Hanley and Doucet 2009, Reynolds et al. 2009). In spotless starlings (*Sturnus unicolor*), Soler et al. (2008) showed that the intensity of egg coloration significantly influenced male effort. Third, the hypothesis predicts that shifts in paternal effort as a result of egg coloration should translate to higher offspring fitness, but this prediction has received indirect support only (Soler et al. 2008).

Egg colouration may also signal egg quality (Morales et al. 2006, Hargitai et al. 2010). Birds provision their egg yolks with nutrients, hormones, antibodies, as well as antioxidants (e.g. vitamin A, vitamin E, and carotenoids) that can aid in development, growth, and health of offspring (Surai et al. 2001a, b, Saino et al. 2003). Studies have shown that blue-green colour intensity of the eggshell can reflect yolk immunoglobulin concentration in pied flycatchers (*Ficedula hypoleuca*; Morales et al. 2006), yolk testosterone titer in spotless starlings (Lopez-Rull et al. 2008), and yolk carotenoid concentration in European cuckoos (*Cuculus canorus*) and great reed warblers (*Acrocephalus arundinaceus*) (Hargitai et al. 2010). However, Cassey et al. (2008) failed to show such relationships in two thrush (*Turdus* sp.) species.

Carotenoids are important for offspring fitness and for regulation of embryonic development, gene expression, and the activity of growth factors and hormones (Hofmann and Eichele 1994). Carotenoids in eggs also affect the development and the expression of some components of the immune system related to probability of offspring survival (Saino et al. 2003, Blount et al. 2003, McGraw and Ardia 2003), and provide the embryo with defences against oxidative stress in tissues (Surai and Speake 1998). Others compounds present in the egg yolk, such as vitamins A and E, also contribute to antioxidant defences and therefore to offspring development (Surai et al. 2001b). The integrated antioxidant system of developing animals is quite complex (Surai 2002), as different carotenoids can occur (e.g. carotenes, hydroxycarotenoids, ketocarotenoids) with different antioxidant activity and with different interactions with vitamins and other antioxidant components (e.g. enzymes) (Catoni et al. 2008). There are also important ecological and genetic factors underlying interspecific variability in antioxidant composition (Tella et al. 2004, Cohen et al. 2009), and it is likely that different kinds of antioxidants affect embryonic development in different ways.

Here, we investigate the hypothesis that the intensity of blue egg colouration signals maternal investment in yolk carotenoids and vitamins in a species, the spotless starling, for which support for the three main predictions of the EC hypothesis has been previously found (see above).

MATERIAL AND METHODS

Spotless starlings are sexually dimorphic and typically socially monogamous (Navarro et al., unpublished data). Eggs are blue-green in colour, with a small peak in the ultraviolet (300-400 nm) range (Soler et al. 2008). Females lay one egg daily (Cramp 1998), and start incubation before clutch completion, which determines asynchronous hatching (Cramp 1998). In our population, clutch size is 4 or 5 eggs (Soler et al. 2008) and females typically incubate eggs.

The study was carried out in Guadix (37°18'N 3°11'W), south-eastern Spain, during the breeding season of 2008, on colonies of spotless starlings that breed in nest-boxes. We visited each nest-box every 3-4 days during the laying season. Once we detected egg(s) in the nest, we started to visit the nest every day to determine the end of laying. Intra specific nest parasitism has been demonstrated in spotless starling (Calvo et al. 2000), but our daily visits allowed us to eliminate eggs laid by

other females. Although we have not accounted for paternal identity in statistical analyses, each nest was attended by a single male. Because starlings lay one egg per day, we could then calculate the date on which females started to lay (hereafter, laying date). Two days after the end of laying, we randomly collected 38 eggs, two eggs from 16 nests and one single egg from 6 additional nests. Nests from which we collected one or two eggs did not differ in clutch size ($t = -0.67$, $df = 20$, $p = 0.51$), egg colour ($t = 0.44$, $df = 20$, $p = 0.66$) or antioxidant content (PC1 $t = 1.46$, $df = 20$, $p = 0.16$; PC2 $t = 2.03$, $df = 20$, $p = 0.06$; PC3 $t = 1.01$, $df = 20$, $p = 0.32$). To reduce the possible influence of laying date in our analyses, we limited our sample to nests that were initiated over a 6-day period ($n = 22$, $SD = 1.59$ days) at the peak of reproduction. After collecting eggs, we immediately transported them to the lab in a portable cooler, and measured eggshell colour in a dark room. Thereafter, following previous work (e.g. Borttoloti et al. 2003), we stored eggs in a -20°C freezer.

Egg measurements

All eggs were weighed with a digital balance (accuracy = 0.001 g) and measured with digital callipers (length and width to the nearest 0.01 mm) before frozen. Egg yolks were weighed from frozen eggs. Egg volume was calculated using Hoyt (1979). Variation in egg mass, egg volume and yolk mass were significantly higher among than within nests (volume of eggs: $R = 0.65$, $F_{15,16} = 4.71$, $p = 0.001$; egg mass: $R = 0.51$, $F_{15,16} = 3.08$, $p = 0.01$; weight of yolk: $R = 0.46$, $F_{15,16} = 2.70$, $p = 0.02$), so we used mean values per nest in statistical analyses.

We measured egg colour on five randomly selected areas of the surface of the egg along the long axis (Aviles et al. 2006). Reflectance spectra (300-700 nm) were recorded by using an Ocean Optics S2000 spectrometer connected to a deuterium-halogen light (D2-W, mini) by a coaxial reflectance probe (QR-400-7-UV-vis) and the OOIBase32™ operating software (Ocean Optics, Inc., Dunedin, FL, USA). Reflectance was measured with the probe placed at a constant distance (2 mm) and at an angle of 45° . Measurements were taken relative to complete darkness and a standard white reference (WS-2).

Though avian visual perception can be partially modelled in complex ways, by incorporating retinal sensitivities and ambient wavelengths (Endler et al. 2005; Aviles et al. 2008), here we relied on colour variables extracted from spectrophotometric data that have proved

successful in revealing individual quality in previous work (Siefferman et al. 2006). So, as a variable indicating intensity of blue-green coloration, we used the proportion of total reflectance within the blue-green region (R400–575/R300–700) of the spectrum (Siefferman et al. 2006, Soler et al. 2008). Biliverdin shows the lowest absorbance (Falchuk et al. 2002) within the blue-green region (400–574 nm), where reflectance of starling eggs reaches its maximum (see Fig. 1 in Soler et al. 2008). Furthermore, we know that total reflectance in this region is related to biliverdin concentration in the eggshell of spotless starlings (López Rull et al. 2008). Colour estimates for the same eggs showed high repeatability ($R = 0.93$; $F_{476,1901} = 31.14$; $p < 10^{-7}$), whereas mean values per egg showed moderate intra-nest repeatability (R400–575/R300–700; $R = 0.62$; $F_{15,16} = 4.22$; $p = 0.003$) (Harper, 1994). Thus, we used mean values for each nest in subsequent analyses.

After measuring eggshell coloration, eggs were frozen (-20°C) in individualized hermetic plastic bags and protected in a dark cardboard box. On the following day, yolk and albumen were separated from frozen eggs using a scalpel and blotting paper for later antioxidant analyses. Yolk samples were again frozen (-20°C) in cryotubes and stored in dark cardboard boxes for 165 days, at which point the samples were stored in a -80°C freezer until antioxidant analyses were performed 109 days later.

Antioxidant analyses

Lipid-soluble carotenoids and vitamins were extracted from yolks following McGraw et al. (2005). Based on comparison with standards, we detected retinol (vitamin A), tocopherol (vitamin E), cis-lutein, trans-lutein, zeaxanthin, two unidentified ketocarotenoids ($\lambda\text{-max} = 473$ and 474 nm), and β -carotene (Table 1). Concentrations of vitamins A and E and of the different carotenoids were calculated based on external curves constructed from known amounts of each purified reference compound. Total amounts of compounds were calculated by multiplying compound concentration \times total yolk mass. All measurements were made by KJM, which reduced variance due to inter-observer variability, and after obtaining repeatable measurements in preliminary tests. Analyses were performed blind with respect to egg colour values. We found moderate within-nest repeatability for concentrations of most of these compounds (vitamin E: $R = 0.76$; $F_{15,16} = 7.23$; $p = 0.0001$; trans-lutein: $R = 0.68$; $F_{15,16} = 5.30$; $p = 0.0009$; cis-lutein: $R = 0.62$; $F_{15,16} = 4.27$; $p = 0.0032$; zeaxanthin: $R = 0.70$; $F_{15,16} = 5.56$; $p = 0.0007$; ketocarotenoids: $R = 0.86$; $F_{15,16} = 13.30$; $p < 0.00001$; and β -carotene: $R = 0.66$; $F_{15,16} = 4.84$; $p = 0.0016$) with the exception of vitamin A

($R = 0.03$; $F_{15,16} = 1.07$; $p = 0.44$). Thus, we used the mean value per nest for the repeatable variables, while for vitamin A we used the value from a randomly selected egg.

N=22	Mean (SD)	PC 1	PC 2	PC 3
Vitamin A concentration	9.52 (2.18)	0.13	-0.86	-0.31
Vitamin A total	11.88 (3.13)	0.16	-0.81	-0.33
Vitamin E concentration	199.39 (84.94)	0.88	-0.27	-0.08
Vitamin E total	246.76 (106.35)	0.90	-0.25	-0.12
Cis-lutein concentration	26.28 (10.61)	0.97	-0.08	0.04
Cis-lutein total	32.65 (13.22)	0.98	-0.05	0.00
Trans-lutein concentration	135.50 (51.72)	0.98	-0.10	-0.06
Trans-lutein total	168.83 (66.35)	0.96	-0.06	-0.10
Zeaxanthin concentration	23.92 (9.68)	0.96	0.17	-0.03
Zeaxanthin total	29.78 (12.51)	0.95	0.19	-0.06
Ketocarotenoids concentration	10.60 (5.14)	0.21	-0.41	0.88
Ketocarotenoids total	13.09 (6.05)	0.21	-0.41	0.88
β -carotene concentration	0.89 (0.56)	0.52	0.75	0.11
β -carotene total	1.10 (0.70)	0.56	0.74	0.09
Factor loading		0.57	0.22	0.13

Table 1. Means (SD) for concentration and total yolk vitamin A, vitamin E and carotenoid (cis-lutein, trans-lutein, zeaxanthin, unidentified ketocarotenoids and β -carotene) levels ($\mu\text{g/g}$). Factor loadings for the principal components as well as the relationships with different antioxidants are also shown.

Statistical analyses

All variables approximately fitted a normal distribution (Kolmogorov-Smirnov test for continuous variables, $p > 0.2$). To reduce the number of independent variables and problems of collinearity, we performed a Principal Components Analysis (PCA). Amounts and concentrations of total yolk carotenoids and vitamins were highly positively correlated (one-way ANOVAs, $F_{1,36} = 526.95$, $p < 0.00001$, $R > 0.96$) and, thus,

we used PCAs on amounts and concentration values for the different carotenoids and vitamins analysed. PCA summarized the fourteen variables into three orthogonal principal component axes. The first principal component (PC1) explained 57% of the variation and described variation in concentration and amount of yolk vitamin E, cis-lutein, trans-lutein and zeaxanthin. The second principal component (PC2) explained 22% of the variation and was related to concentration and amount of vitamin A (negatively) and β -carotene (positively) concentration. The third principal component (PC3) explained 13% of the variance and was positively associated with concentration and amount of yolk ketocarotenoid (Table 1).

Blue-green colour intensity was used as the dependent variable and concentrations and amount of vitamins and carotenoids (PC1, PC2 and PC3) as independent variables in General Regression Models (GRM). All analyses were performed with Statistica 6 software (Statsoft 2001).

RESULTS

The carotenoids and vitamins in the yolk of spotless starling eggs were similar to those found for other species (Cassey et al. 2005). On a $\mu\text{g/g}$ basis, vitamins A and E represented 2% and 49% respectively of the total chemicals studied in the egg-yolks of spotless starlings. Carotenoids comprised the remaining 49% of total antioxidants analysed in egg-yolks, with the common xanthophyll lutein being the dominant form (Table 1).

We found a significant positive relationship between the intensity of blue-green coloration of eggshells of starlings and concentration and amount of some (PC1: $F_{1,18} = 8.10$, $p = 0.011$, $\text{Beta(SE)} = 0.55(0.19)$), but not other yolk antioxidants (PC2: $F_{1,18} = 0.35$, $p = 0.56$, $\text{Beta(SE)} = 0.12(0.19)$; PC3: $F_{1,18} = 0.02$, $p = 0.89$, $\text{Beta(SE)} = 0.03(0.19)$) (Figure 1). The full model explained 21% of variance in egg colour intensity ($R^2 = 0.21$, $F_{3,18} = 2.82$, $p = 0.068$). Results did not change when we used one randomly selected egg per nest or included the non-significant effect of laying date in the model (result not shown). The inclusion of the non-significant effect of egg volume ($F_{1,17} = 4.38$, $p = 0.052$, $\text{Beta(SE)} = 0.40(0.18)$) in the model did not affect the significance of the relationship (PC1: $F_{1,17} = 6.76$, $p = 0.019$, $\text{Beta(SE)} = 0.47(0.18)$). Thus egg colour intensity of spotless starling eggs was positively associated with the most abundant antioxidants in the egg yolk (lutein, zeaxanthin, and vitamin E).

DISCUSSION

We found that blue–green colour intensity of eggshells of spotless starlings was positively related to the concentration and amount of vitamin E, and two common hydroxycarotenoids, lutein and zeaxanthin, in egg yolk. Carotenoids and fat-soluble vitamins are valuable micronutrients for developing embryos that can affect hatching success (Surai et al. 2001a, Møller et al. 2008), nestling immunocompetence (Saino et al. 2003), and survival of birds (McGraw et al. 2005). We have previously shown that paternal effort of starlings increased for bluer clutches of eggs (Soler et al. 2008), which was interpreted as the adjustment of males to female condition (i.e. antioxidant, immunological, hormonal status) (Moreno and Osorno 2003). Our results here suggest that this adjustment may also be related to maternal investment in egg yolk and embryos (Morales et al. 2006).

Biliverdin, the pigment responsible for the blue-green colour of the eggshell, is a potent antioxidant synthesized by egg-laying females that may combat oxidative stress (Stocker et al. 1987). Other antioxidants like carotenoids and some vitamins (i.e., A, E) cannot be synthesized *de novo* by vertebrates, and are obtained in food. Carotenoids are therefore limited resources for females to include in eggs (Blount et al. 2004). Carotenoids, however, may not always exhibit direct antioxidant activity *in vitro* (Costantini and Møller 2008), but may work in concert with other non-pigmented antioxidants, such as some enzymes and vitamins, to boost health (Hartley and Kennedy 2004). This is why some authors have suggested that carotenoids can function as signals revealing the availability of non-pigmented antioxidants in the body (or eggs) (Bertrand et al. 2006, Pike et al. 2007, Perez et al. 2008). Thus, it appears that only females in optimal oxidative balance will be able to lay highly pigmented blue-green eggs that have elevated yolk concentrations of carotenoids and vitamins.

Associations between pigmented and non-pigmented antioxidants, such as vitamin E, are not always detected. In a study of blood plasma antioxidants from 99 bird species, Cohen and McGraw (2009) did not find associations between levels of vitamin E and carotenoids in plasma. Here, we found that blue-green colour intensity was associated with both vitamin E and carotenoid concentrations and, although we did not measure directly the biliverdin content in eggshell, previous work has shown such an association (López Rull et al. 2008). Moreover, it is known that pigment allocation to eggs decreases plasma antioxidants in collared flycatcher females (Morales et al. 2008). Thus, the relationship between

eggshell colour intensity and yolk vitamin E levels could be an example of the use of pigmented antioxidants in the eggshells for signalling both non-pigmented and pigmented antioxidant molecules.

We failed to find a relationship between egg pigmentation and concentration of vitamin A in the egg yolk. Yet we have previously found that vitamin A concentrations in plasma are linked to plasma carotenoid concentrations of adult starlings, and that both plasma vitamin A and carotenoid concentrations covaried with beak colouration of males and females (Navarro et al. 2010). Vitamin A plays an important role in vision, health, and other life history traits of birds (i.e. Cohen et al. 2009). However, its role in embryonic development is not so clear, and apparently carotenoids and vitamin E were more important than vitamin A for avian embryos (Blount et al. 2000) (i.e. low levels of antioxidants, such as vitamin E, are associated with a decrease hatching success and slow embryonic development in birds (Wilson 1997)). In sum, the results of our two studies of spotless starlings suggest that females advertise to males their physiological characteristics, including vitamin A status, through the colour of their bills, while signalling maternal investment in a different vitamin (E) through the colour of their eggs.

As far as we know, only Cassey et al. (2009) and Hargitai et al. (2010) have previously tested the relationship between egg-yolk antioxidants and eggshell colouration. The former studied eggs of two species of thrushes, and failed to detect a relationship, while the later found a relationship with blue-green chroma of eggshells of the European cuckoo and of the great reed warbler and antioxidants. Here, we also found that the strength of the relationships between carotenoids and egg colouration differed for different types of carotenoids. Intensity of blue-green eggshell colouration was positively correlated with yolk concentration and amount of vitamin E, trans-lutein, cis-lutein and zeaxanthin (PC1), but not with other carotenoids. A possible reason for this association between vitamin E, trans-lutein, cis-lutein and zeaxanthin (PC1) could be that zeaxanthin is a stereoisomer of lutein and both accumulate at similar levels in tissues. Also, it has been suggested that these two carotenoids may play analogous functions to vitamin E (α -tocopherol) in the liver of embryos. Later in development, zeaxanthin and lutein are gradually replaced in this function by vitamin E (see review in Surai et al 2001c).

In conclusion, our results support the hypothesis that blue-green eggshell colour intensity is associated with carotenoid and vitamin content of egg yolk in a species, the spotless starling, where crucial predictions of

the hypothesis that egg coloration is a sexually selected trait of females has been previously tested experimentally (Soler et al. 2008). Eggs of exaggerated blue-green colouration would be of higher reproductive value for spotless starling males not only because it reflects phenotypic quality of females, but also maternal investment in egg yolk antioxidants.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Juan Manuel Peralta Sanchez for help with field work and Joe Williams and three anonymous referees for helpful comments on the manuscript. This research was funded by the Spanish Ministry of Education and Science (CGL2004-01777/BOS, CGL2007-61251), Junta de Andalucía (RNM 345) and European funds (FEDER). CN was supported by a predoctoral grant from the Spain's Ministry of Science and Technology (BES-2005-8619). The authorization for carrying out the experimental work on animals in the field was granted by the Dirección General de Gestión del Medio Natural of the Consejería de Medio Ambiente of Junta de Andalucía

REFERENCES

- Alonso-Alvarez, C., Bertrand, S., Devevey, G., Prost, J., Faivre, B. and Sorci, G. 2004. Increased susceptibility to oxidative stress as a proximate cost of reproduction. - *Ecol. Letters* 7: 363-368.
- Aviles, J. M., Soler, J. J., Navarro, C. and Perez-Contreras, T. 2008. Dark nests and nestling conspicuousness in color patterns of altricial birds. - *Am. Nat.* 171: 327-338.
- Aviles, J. M., Soler, J. J. and Perez-Contreras, T. 2006. Dark nests and egg colour in birds: a possible functional role of ultraviolet reflectance in egg detectability. - *Proc. R. Soc. B* 273: 2821-2829.
- Bertrand, S., Faivre, B. and Sorci, G. 2006. Do carotenoid-based sexual traits signal the availability of non-pigmentary antioxidants? - *J. Exp. Biol.* 209: 4414-4419.
- Blount, J. D., Houston, D. C., Surai, P. F. and Møller, A. P. 2004. Egg-laying capacity is limited by carotenoid pigment availability in wild gulls *Larus fuscus*. - *Proc. R. Soc. Lond. B* **271**: 79-81.
- Blount, J. D., Houston, D. C. and Møller, A. P. 2000. Why egg yolk is yellow. - *Trends Ecol. Evol.* 15:47-49.

- Blount, J. D., Metcalfe, N. B., Birkhead, T. R. and Surai, P. F. 2003. Carotenoid modulation of immune function and sexual attractiveness in zebra finches. - *Science* 300: 125-127.
- Borttoloti, G. R., Negro, J. J., Surai, P. F. and Prieto, P. 2003. Carotenoids in eggs and plasma of Red-Legged partridges: Effects of diet and reproductive output. - *Physiol. Biochem. Zool.* 76: 367-374.
- Calvo, J. M., Pascual, J. A., Deceunick, B. and Peris, S. J. 2000. Intraspecific nest parasitism in the Spotless starling (*Sturnus unicolor*). - *Bird Study* 47: 285-294.
- Cassey, P., Ewen J. G., Blackburn, T. M., Hauber, M. E., Vorobyev, M. and Marshall, N.J. 2008. Eggshell colour does not predict measures of maternal investment in eggs of *Turdus thrushes*. - *Naturwissenschaften* 95: 713-721.
- Cassey, P., Ewen, J. G., Boulton, R. L., Blackburn, T. M., Moller, A. P., Biard, C., Olson, V. A. and Karban, R. 2005. Egg carotenoids in passerine birds introduced to New Zealand: relations to ecological factors, integument coloration and phylogeny. - *Funct. Ecol.* 19: 719-726.
- Cassey, P., Ewen, J. G., Marshall, N. J., Vorobyev, M., Blackburn, T. M., and Hauber, M. E. 2009. Are avian eggshell colours effective intraspecific communication signals in the Muscicapoidea? A perceptual modelling approach. - *Ibis* 151: 689-698.
- Catoni, C., Peters, A. and Schaefer, H. M. 2008. Life-history trade-offs are influenced by the diversity, availability and interactions among dietary antioxidants. - *Anim. Behav.* 76: 1107-1119.
- Cohen, A. A. and McGraw, K. J. 2009. No simple measures for antioxidant status in birds: complexity in inter- and intraspecific correlations among circulating antioxidant types. - *Funct. Ecol.* 23: 310-320.
- Cohen, A. A., McGraw, K. J. and Robinson, W. D. 2009. Serum antioxidant levels in wild birds vary in relation to diet, season, life history strategy, and species. - *Oecologia* 161: 673-683.
- Costantini, D. and Møller, A. P. 2008. Carotenoids are minor antioxidants for birds. - *Funct. Ecol.* 22: 367-370.
- Cramp, S. 1998. *Cramp's the complete birds of the Western Palearctic*. - Optimedia, Oxford University Press.

- Endler, J. A., Westcott, D. D., Madden, J. R. and Robson, T. 2005. Animal visual systems and the evolution of color patterns; sensory processing illuminates signal evolution. - *Evolution* 50: 1795-1818.
- Falchuk, K. H., Contin, J. M., Dziejczak, T. S., Feng, Z., French, T. C., Heffron, G.J. and Montorzi, M. 2002. A role for biliverdin IX α in dorsal axis development of *Xenopus laevis* embryos. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 251-256.
- Hanley, D. and Doucet, S. M. 2009. Egg coloration in ring-billed gulls (*Larus delawarensis*): a test of the sexual signaling hypothesis. - *Behav. Ecol. Sociobiol.* 63: 719-729.
- Hanley, D., Heiber, G. and Dearborn, D. C. 2008. Testing an assumption of the sexual signaling hypothesis: does blue-green egg color reflect maternal antioxidant capacity? - *Condor* 110: 767-771.
- Harper, D. G. C. 1994. Some comments on the repeatability of measurements.- *Ringing & Migration* 15: 84-90.
- Hargitai, R., Moskát, C., Bán, M., Gil, D., López-Rull, I., Solymos, E. 2010. Eggshell characteristics and yolk composition in the common cuckoo *Cuculus canorus*: are they adapted to brood parasitism? - *J. Avian Biol.* 41:177-185.
- Hartley, R. C. and Kennedy, M. W. 2004. Are carotenoids a red herring in sexual display? - *Trends Ecol. Evol.* 19, 353-354.
- Hofmann, C. and Eichele, G. 1994. Retinoids in development. - In: Sporn, M. B., Roberts, A. B. and Goodman, D. S. (eds.), *The Retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine*. Raven Press, pp. 387-441.
- Hoyt, D. F. 1979. Practical methods of estimating volume and fresh weight of bird eggs. - *Auk* 96: 73-77.
- Kennedy, G. Y. and Vevers, H. G. 1976. A survey of avian eggshell pigments. - *Comp. Biochem. Physiol. B* 55: 117-123.
- Krist, M. and Grim, T. 2007. Are blue eggs a sexually selected signal of female collared flycatchers? A cross-fostering experiment. - *Behav. Ecol. Sociobiol.* 61: 863-876.
- Lopez-Rull, I., Miksik, I. and Gil, D. 2008. Egg pigmentation reflects female and egg quality in the Spotless Starling *Sturnus unicolor*. - *Behav. Ecol. Sociobiol.* 62: 1877-1884.

- McGraw, K. J., Adkin-Regan, E. and Parker, R. S. 2005. Maternally derived carotenoid pigments affect offspring survival, sex ratio, and sexual attractiveness in a colourful songbird. - *Naturwissenschaften* 92: 375-380.
- McGraw, K. J. and Ardia, D. R. 2003. Carotenoids, immunocompetence, and the information content of sexual colors: an experimental study. - *Am. Nat.* 162: 704-712.
- Møller, A. P., Karadas, R. and Mousseau, T. 2008. Antioxidant in egg of great tits *Parus major* from Chernobyl and hatching success. - *J. Comp. Psychol.* 178: 735-743.
- Morales, J., Sanz, J. J. and Moreno, J. 2006. Egg colour reflects the amount of yolk maternal antibodies and fledging success in a songbird. - *Biol. Letters* 2: 334-336.
- Morales, J., Torres, R., and Velando, A. 2010. Parental conflict and blue egg coloration in a seabird. - *Naturwissenschaften* 97: 173-180.
- Morales, J., Velando, A., and Moreno, J. 2008. Pigment allocation to eggs decreases plasma antioxidants in a songbird. - *Behav. Ecol. Sociobiol.* 63: 227-233.
- Moreno, J., Morales, J., Lobato, E., Merino, S., Tomas, G. and Martinez-De la Puente, J. 2005. Evidence for the signaling function of egg color in the pied flycatcher *Ficedula hypoleuca*. - *Behav. Ecol.* 16: 931-937.
- Moreno, J. and Osorno, J. L. 2003. Avian egg colour and sexual selection: does eggshell pigmentation reflect female condition and genetic quality? - *Ecol. Letters* 6: 803-806.
- Moreno, J., Osorno, J. L., Morales, J., Merino, S. and Tomas, G. 2004. Egg colouration and male parental effort in the pied flycatcher *Ficedula hypoleuca*. - *J. Avian Biol.* 35: 300-304.
- Navarro, C., Pérez-Contreras, T., Avilés J. M., McGraw, K. J. and Soler, J. J. 2010. Beak colour reflects circulating carotenoid and vitamin A levels in spotless starlings (*Sturnus unicolor*). - *Behav. Ecol. Sociobiol.* 64: 1057-1067.
- Perez, C., Lores, M. and Velando, A. 2008. Availability of nonpigmentary antioxidant affects red coloration in gulls. - *Behav. Ecol.* 19: 967-973.

- Pike, T. W., Blount, J. D., Lindstrom, J. and Metcalfe, N. B. 2007. Availability of non-carotenoid antioxidants affects the expression of a carotenoid-based sexual ornament. - *Biol. Lett.* 3: 353-356.
- Reynolds, S. J., Martin, G. R. and Cassey, P. 2009. Is sexual selection blurring the functional significance of eggshell coloration hypotheses? - *Anim. Behav.* 78: 209-215.
- Saino, N., Ferrari, R. P., Romano, M., Martinelli, R. and Møller, A. P. 2003. Experimental manipulation of egg carotenoids affects immunity of barn swallow nestlings. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 270: 2485-2489.
- Siefferman, L., Navara, K. and Hill, G. 2006. Egg coloration is correlated with female condition in eastern bluebirds (*Sialia sialis*). - *Behav. Ecol. Sociobiol.* 59: 651-656.
- Soler, J. J., Navarro, C., Perez-Contreras, T., Aviles, J. M. and Cuervo, J. J. 2008. Sexually selected egg coloration in spotless starlings. - *Am. Nat.* 171: 183-194.
- Statsoft, I. 2001. STATISTICA for Windows [Computer program manual] 6.0. - Statsoft, Inc.
- Stocker, R., Yamamoto, Y., McDonagh, A. F., Glazer, A. N. and Ames, B. N. 1987. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. - *Science* 235: 1043-1046.
- Surai, P.F. 2002. Natural antioxidants in avian nutrition and reproduction. - Nottingham University Press, Nottingham, UK.
- Surai, P. F. and Speake, B. K. 1998. Distribution of carotenoids from the yolk to the tissues of the chick embryo. - *J. Nutr. Biochem.* 9: 645-651.
- Surai, P., Speake, B. K. and Sparks, N. H. C. 2001a. Carotenoids in avian nutrition and embryonic development. 1. Absorption, availability and levels in plasma and egg yolk. - *J. Poult. Sci.* 38: 1-27.
- Surai, P., Speake, B. K. and Sparks, N. H. C. 2001b. Carotenoids in avian nutrition and embryonic development. 2. Antioxidant properties and discrimination in embryonic tissues. - *J. Poult. Sci.* 38: 117-145.
- Surai, P. F., Speake, B. K., Wood, N. A. R., Blount, J. D., Bortolotti, G. R. and Sparks, N. H. C. 2001c. Carotenoid discrimination by the avian embryo: a lesson from wild birds.- *Comp. Biochem. Physiol.* B128:743-750.

- Tella, J. L., Figuerola, J., Negro, J. J., Blanco, G., Rodriguez-Estrella, R., Forero, M. G., Blazquez, M. C., Green, A. J. and Hiraldo, F. 2004. Ecological, morphological and phylogenetic correlates of interspecific variation in plasma carotenoid concentration in birds. - *J. Evol. Biol.* 17: 156-164.
- Von Schantz, T., Bensch, S., Grahn, M., Hasselquist, D. and Wittzell, H. 1999. Good genes, oxidative stress and condition-dependent sexual signals. - *Proc. R. Soc. Lond. B* 266: 1-12.
- Wilson, H. R. 1997. Effects of maternal nutrition on hatchability. - *Poult. Sci.* 76, 134-143.

AGRADECIMIENTOS

*Somos como enanos a los hombros
de gigantes. Podemos ver más, y más
lejos que ellos, no por alguna distinción
física nuestra, sino porque somos
levantados por su gran altura*

Bernardo de Chartres
(Bernardus Carnotensis)

Son muchos los gigantes que me han aupado hasta aquí, en lo personal y en lo científico, y no siempre es fácil reconocer su valía. Otras veces, en cambio, es tan fácil como echar un vistazo al corazón, entonces la dificultad estriba solamente en poder expresar todo lo que uno ve allí. ¿Cómo hacerles saber por ejemplo a mi esposa Raquel todo el amor que siento por ella, lo mucho que representa para mí vida y agradecerle todo lo que ha hecho durante estos duros años de tesis? ¿Y a nuestro hijo Carlos? Que nació poco antes de empezar este proyecto, y al que hemos visto crecer a medida que avanzaba mi tesis, con el que me he emocionado, reído y sorprendido, y del que me siento orgulloso. Necesitaría un libro entero solo para expresar mis sentimientos y mi gratitud por estar siempre ahí (a pesar de las pulgas, las malas mías y las de las ovejas), por vuestro sacrificio, vuestra ayuda, paciencia y, sobre todo, por vuestro cariño. Y gracias, a mi madre, que siempre ha creído en mí, me ha ayudado y empujado a perseguir mis sueños. A mi padre, seguramente la persona más buena, sabia e inteligente que jamás conoceré iqué gran hombre se

pierde el mundo y qué gran padre he disfrutado yo! A mis hermanos, José María, Carmen, Alberto, Marta, Gonzalo, que siempre han estado dispuestos a ayudarme y a los que quiero, admiro y de los que me siento orgulloso. A mis cuñados y cuñadas, Virginia, Bass, María, Alexis, Iván y Alexis ¡qué grandes descubrimientos! A mis suegros, Paco y Paqui, que siempre están ahí cuando se les necesita y a los que siempre estaré agradecido. A mis sobrinos, Pablo, Gonzalo, Laura, Alberto, Virginia, Guillermo y María, esos locos pequeños que tanto me hacen disfrutar. A mis padrinos Purita y Manolo, siempre curiosos y sorprendentes con su inteligencia. A mi tío Francisco Javier, del que descubrí que no es tan raro esto de que te gusten los "bichos" y con el que tanto he disfrutado y aprendido. Y al resto de mis tíos y primos (por razones obvias no puedo poner la lista completa) con los que tantas cosas buenas he vivido. Y cómo no a mis abuelos que con tanto cariño recuerdo, especialmente a mi abuelo Carlos, seguramente la persona que más me ha marcado en mi vida, cuyo recuerdo siempre me empuja a seguir adelante y a ser mejor persona, y cuya presencia me acompaña siempre que tengo un problema o, como con esta tesis, culmino algo bueno, hoy seguro que estaría orgulloso.

Esta tesis no hubiera sido posible sin el apoyo y el esfuerzo de Juan José Soler, mi director, sin cuya gran profesionalidad y enorme paciencia jamás habría salido adelante, y del que tanto he aprendido y siempre lamentaré no haber aprendido aún más. Como no hubiera sido posible tampoco sin el apoyo de mis compañeros de la EEZA: Jesús Avilés, Deseada Parejo y J. Javier Cuervo, que siempre dejaron la puerta abierta para que pudiera entrar con mis preguntas, y que tan sabia y pacientemente contestaron; Magdalena y Lupe, mis compañeras de despacho, que pacientemente ha aguantado "mis cosas"; Juanma, amigo, hermanastro de tesis y macho alfa de la cueva, siempre dispuesto a aconsejarme y a ayudarme haciéndome mil y un favores; Tomás, que me ayudo en la toma de datos. A Lali, Jordi, Andrés, David, Sebas y demás personal y compañeros precarios ¡gracias! Tampoco puedo olvidarme de mis compañeros de la Universidad de Granada y demás cavernícolas, que en esas maratónicas jornadas me han ayudado a sobrellevar mejor el trabajo de campo: Paco, Lietsbe, Juan (Gavilán), Elena (Críalo), María (Corneja), Manuel Soler, Manolo Martín Vivaldi y Juanga, que además me dio "cuartelillo" en su casa cada vez que me hizo falta, y tantos otros que pasaron por la cueva.

También quiero agradecer su apoyo y enseñanzas a Santiago Merino, Anders Møller y a Kevin J. McGraw que me aceptaron en sus laboratorios del MNCN de la Universidad Pierre et Marie Curie y de la ASU respectivamente durante mi tesis, y a toda la buena gente que allí encontré: Josué, Judith, Lisa, Melissa, Matthew, Mike y, cómo no, a Victor, Adeli, Frank, Sarai, Andrea y Samuel, que en Arizona nos ayudaron tanto, que nos hicieron sentirnos como en casa y a los que siempre recordaré con cariño

y agradecimiento. Y a los amigos del Colegio de España de París: Nacho, Mario, Juan... y a mí prima Natalia, que nos ayudo a que pasásemos dos maravillosos meses viviendo bajo las campanas de Notre Dame.

Tampoco puedo olvidarme de los ya viejos y grandes amigos, los Sun Rockets y familia, que me dieron fuerzas para pasar los malos tragos durante mi solitario último año en Almería, y que seguramente sean el mejor descubrimiento que he hecho en esa hermosa tierra que tan bien nos ha acogido a mí y a mi familia, y a la que siempre llevare conmigo. Y, cómo no, a los amigos de Sevilla, que han hecho que este último año sea mejor, los nuevos y los de toda la vida, que como buenos camaradas siempre están allí donde se les necesita, Pablo, Yiyo, Alberto, Santi, Nacho, Antonio, a las niñas y a la gran familia que todos hacemos juntos, y a la peña de Rockin´ Swarm isi no fuera por esos ratillos...!

Por último, y no menos importante, tengo que acordarme de mis raíces científicas, de los que de alguna u otra forma me empujaron a seguir este camino, de aquellos que me guiaron en mis primeros pasos, Willy, que me abrió las puertas, Tinín, amigo y maestro, al que siempre estaré agradecido, que me acogió, me guió y que tanto me ha enseñado de este mundo de la ciencia y de las personas. De Anders, al que tanto debo y que siempre ha estado dispuesto a escucharme, enseñarme y deslumbrarme con sus conocimientos e inteligencia. Tampoco puedo olvidarme de mis otros compañeros y amigos de la Universidad de Extremadura que, como Carlos de la Cruz, tanto me enseñaron de la ciencia y de los pájaros. Y cómo no, de mis amigos, compañeros de piso, mi familia durante ocho apasionantes años, los grandes cazadores de "ranas de patas largas" y como yó, aun mejores, jugadores de mus: Paco, Mario y Miguel.

Se que probablemente soy injusto y me olvido de mucha gente que me ha aupado y guiado hasta aquí; seguramente son muchos más de los que actualmente soy capaz de vislumbrar, pero tened en cuenta que muchas veces, como dije al principio, es difícil reconocerlos, les pido perdón. Estoy seguro que el tiempo me hará redescubrirlos y poner a cada uno en su sitio con justicia. A esos gigantes, hoy irreconocibles por mí, les doy también las gracias y les pido disculpa por mi ceguera presente.

