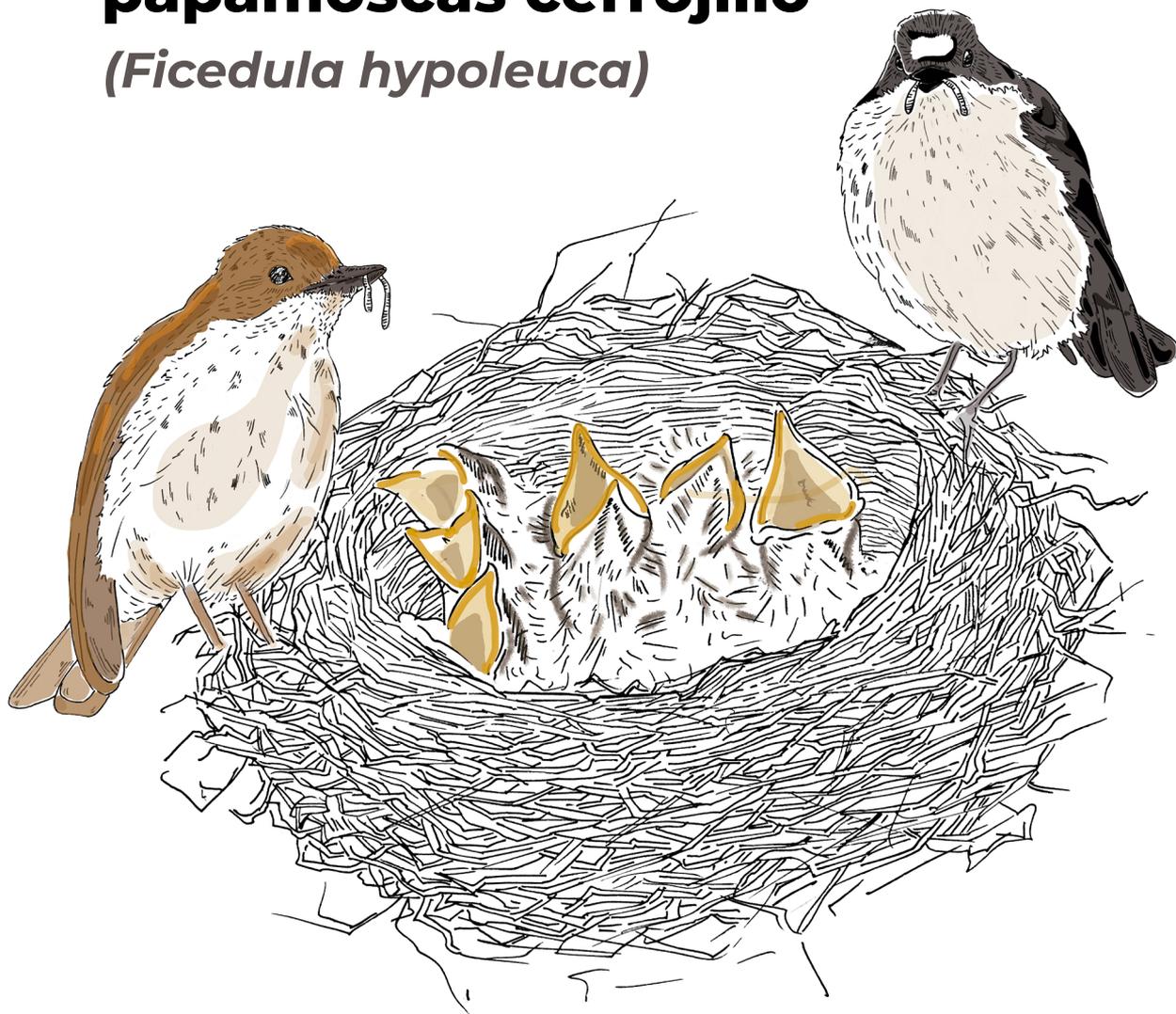


Programa de Doctorado: Biología Fundamental y de Sistemas

Estudio de los costes y la evolución del comportamiento de petición de los pollos de papamoscas cerrojillo

(Ficedula hypoleuca)



UNIVERSIDAD
DE GRANADA

TESIS DOCTORAL
David Ochoa Castañón
Departamento de Zoología

CITACIÓN RECOMENDADA: Ochoa, D. 2021. Estudio de los costes y la evolución del comportamiento de petición de los pollos de papamoscas cerrojillo (*Ficedula hypoleuca*). Tesis Doctoral. Universidad de Granada.

DISEÑO DE PORTADA: Virginia Gutiérrez Río

DISEÑO DE CONTRAPORTADA: David Ochoa Castañón

FOTOGRAFÍAS: Las fotografías incluidas en esta Tesis Doctoral han sido tomadas por el autor de la misma, con la posible excepción de las correspondientes a las manchas frontales en machos y hembras que fueron tomadas de forma colaborativa por el grupo de trabajo sin poder especificar el autor.

*“Fui a los bosques porque quería vivir deliberadamente;
Enfrentar sólo los hechos esenciales de la vida
y ver si podía aprender lo que ella tenía que enseñar.
Quise vivir profundamente y desechar todo aquello que no fuera vida...
para no darme cuenta, en el momento de morir, que no había vivido”*
Walden. (Henry David Thoreau)

Estudio de los costes y la evolución del comportamiento de petición de los pollos de papamoscas cerrojillo (*Ficedula hypoleuca*)



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**

David Ochoa Castañón

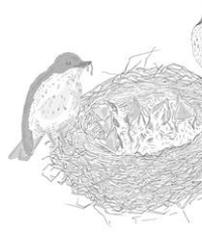
Tesis Doctoral

Universidad de Granada 2021

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: David Ochoa Castañón
ISBN: 978-84-1117-153-3
URI: <http://hdl.handle.net/10481/71766>

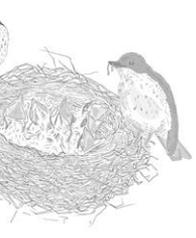


Los trabajos, tanto de campo como posteriores, que han permitido la realización de esta tesis fueron financiados por los proyectos CGL2011-29694, CGL2014-55969-P y CGL2017-84938-P subvencionados por MINECO.

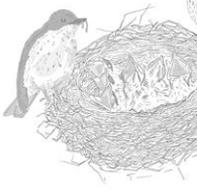


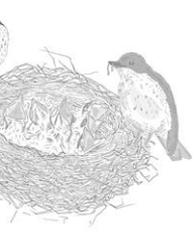
ÍNDICE

RESUMEN	19
ABSTRACT	21
INTRODUCCIÓN GENERAL	24
Señales y Comportamiento de petición	25
Conflicto Paterno-Filial	26
Modelos teóricos de la evolución del comportamiento y las señales de petición	28
Costes asociados al comportamiento de petición	31
Posibles efectos del parasitismo sobre el comportamiento de petición	35
OBJETIVOS	38
ESPECIE DE ESTUDIO	42
ÁREA DE ESTUDIO	52
METODOLOGÍA	58
Metodología general	59
Metodología específica en la determinación de los costes asociados a las señales en términos de crecimiento e inmunocompetencia	60
Metodología específica en la determinación del efecto de la carga parasitaria sobre el comportamiento de petición	65
Metodología específica en la simulación de una variante fenotípica que presente una petición exagerada y la cuantificación de los costes y beneficios relativos a los fenotipos salvajes	67



Análisis de datos _____	71
RESULTADOS _____	76
Resultados de la determinación de los costes asociados a las señales en términos de crecimiento e inmunocompetencia _____	77
Resultados de la determinación del efecto de la carga parasitaria sobre el comportamiento de petición _____	84
Resultados de la simulación de una variante fenotípica que presente una petición exagerada y la cuantificación de los costes y beneficios relativos a los fenotipos salvajes _____	91
DISCUSIÓN _____	110
Determinación de los costes asociados a las señales en términos de crecimiento e inmunocompetencia _____	111
Determinación del efecto de la carga parasitaria sobre el comportamiento de petición _____	119
Simulación de una variante fenotípica que presente una petición exagerada y la cuantificación de los costes y beneficios relativos a los fenotipos salvajes _____	122
CONCLUSIONES _____	130
REFERENCIAS _____	134
AGRADECIMIENTOS _____	162
ANEXOS _____	168
Anexo I: Publicaciones derivadas de la Tesis Doctoral como Indicador de Calidad _____	169

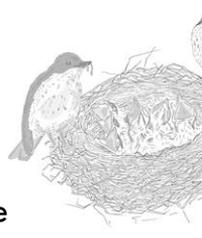




RESUMEN

Las crías de un gran número de especies animales, incluyendo los humanos, necesitan de los cuidados de sus padres para su correcto desarrollo y supervivencia. Para obtener estos cuidados recurren a un elaborado conjunto de señales, tanto auditivas como visuales, como llamadas, movimientos o patrones de coloración bucal, que transmiten a sus padres sus necesidades. En el caso de los pollos de aves altriciales, con estas señales de petición, tratan de influir en la cantidad de alimento aportado al nido y a su reparto que, debido a su rápido desarrollo, es un factor condicionante de su fitness. La enorme complejidad de estas señales ha sido entendida como la expresión fenotípica de un subyacente conflicto de intereses entre pollos y padres en cuanto a ese aporte y reparto de alimento, denominándose conflicto paterno-filial. Se han planteado un gran número de modelos que analizan cómo se resolvería este conflicto dando lugar a una estabilidad evolutiva de este sistema de comunicación y, en general, coinciden en que, de acuerdo a la teoría del Hándicap, es necesario la presencia de un coste asociado y proporcional a la intensidad de dichas señales para garantizar la honestidad de las mismas. Estos costes asociados podrían ser indirectos, afectando a su eficacia biológica inclusiva, o directos, afectando a su propio fitness. Algunos de estos costes serían, por ejemplo, costes de depredación, energético-metabólicos, de crecimiento o a nivel inmunológico. El parasitismo, debido a sus efectos negativos sobre los pollos, podría tener un impacto sobre este comportamiento, considerándolo como un factor importante tanto a nivel ecológico como evolutivo.

El objetivo de esta tesis es estudiar la posible presencia de los costes a nivel de crecimiento e inmunológico, asociados al comportamiento de petición en pollos de papamoscas cerrojillo (*Ficedula hypoleuca*), así como la posible influencia del estado parasitario en este comportamiento. Esto fue posible mediante el estudio de los tiempos, intensidades y latencias de petición de los pollos a diferentes niveles de privación del alimento en condiciones de laboratorio, mediante el uso de la



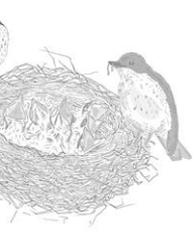
Ciproheptadina, fármaco estimulante del apetito, tanto en condiciones de laboratorio como en condiciones naturales, y con la cuantificación del estado parasitario de los nidos.

Los resultados de los experimentos realizados nos mostraron que, en condiciones de laboratorio, los pollos de papamoscas cerrojillo no mostraron evidencias de un coste a nivel de crecimiento asociado al esfuerzo de petición. Sin embargo, sí se encontraron evidencias de un coste a nivel inmunológico asociado a dicho esfuerzo, mostrando aquellos pollos que realizaron un mayor esfuerzo una capacidad de montar una respuesta inmune reducida.

En condiciones naturales los resultados de nuevo no mostraron evidencias de un efecto sobre la condición física, la longitud del tarso ni el peso en los pollos al finalizar su periodo de desarrollo y, por tanto, al igual que en condiciones de laboratorio, no se encontró un coste a nivel de crecimiento. De nuevo, al igual que en el laboratorio, sí se encontraron evidencias de un coste a nivel inmunológico, presentando también los pollos que realizaban un mayor esfuerzo de petición una capacidad inmune reducida.

También en condiciones naturales se encontró un efecto negativo del esfuerzo de petición sobre dos variables hematológicas, el ratio Heterófilo/Linfocito y el número de Heterófilos por cada 10.000 Eritrocitos, ambas relacionadas con la probabilidad de supervivencia y reclutamiento.

Por último, los resultados nos mostraron que la parasitación tiene un efecto limitante y negativo sobre el esfuerzo de petición, mostrando los pollos que sufrían parasitación, a igual condiciones nutricionales, un esfuerzo de petición menor.



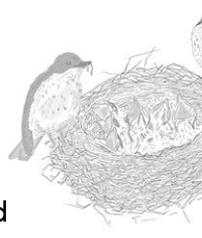
ABSTRACT

A great amount of animal species' offspring, including human beings, need parental care to survive and to achieve an accurate development. To secure this care, offspring appeal to an intricate set of signals, including visual and hearing ones as calling signals, movements or coloring mouth patterns to inform their parents about their needs.

Referring to altricial nestlings, with these begging, they try to influence in the amount of food parents provided and its distribution, that due to its quick development, it is a decisive factor of their fitness.

The exceptional complexity of these signals has been understood as a phenotype expression of an intricated conflict of interest amidst nestlings and their parents as regards food supply and distribution, this is called parent-offspring conflict. A large number of models have tried to analyze how this conflict could be solved giving rise to an evolutive stability of this complex communication system and, overall, taking into consideration the Handicap theory, all these models agree on the necessity of an associated and proportional costs to the intensity of signals to guarantee its integrity. These associated costs would be indirect, affecting biological inclusive fitness or direct costs, affecting nestling fitness. Some of these costs would be, for instance, predation cost, metabolic-energetic, growth or immune ones. The parasitism, due to negative effects on nestling, could have an impact on this behavior, considering this as an essential factor both at the ecological and evolutionary level.

The objective of this PhD project is to study the possible presence of the costs to a growth and immunological level associates to begging in pied flycatcher nestlings (*Ficedula hypoleuca*), as well as the feasible influence in their parasitism status in this behavior. This has been possible by means of studying time, intensity and latency of the begging behavior at different levels of food privation in laboratory, by the use of

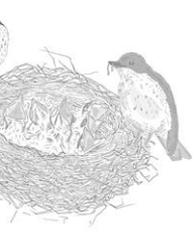


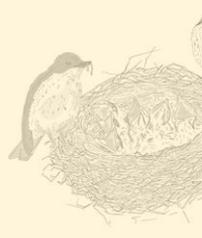
Cyproheptadine, a medicine appetite stimulating, both in laboratory and natural conditions, measuring the parasitism status of nests.

The results of the experiments carry out have shown that, both laboratory and natural conditions, pied flycatcher nestlings did not show evidences of a growth cost associated to begging effort. However, evidences were found in an immune level cost associated to begging effort. Nestlings that shown higher effort suffered a lower ability to produce an immune respond.

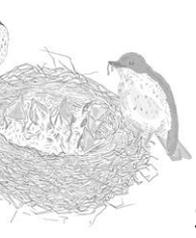
Also, in natural conditions the results have shown a negative effect of begging effort over two hematological variables, Heterophil to lymphocyte ratio and Heterophil number for each 10.000 Erythrocytes, both associated to the probability of survival and recruitment.

Lastly, the results have shown that parasitism has a limited and negative effect on begging effort, showing that parasitized nestlings, in same nutritional conditions, shown lower begging effort.





INTRODUCCIÓN GENERAL

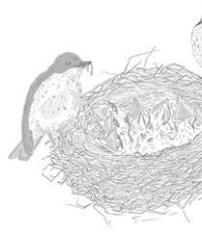


Señales y comportamiento de petición

En un gran número de las especies animales las crías dependen durante su desarrollo de los cuidados parentales de sus padres (Clutton-Brock, 1991), los cuales les aportan protección, ayuda en el mantenimiento de la temperatura corporal y otros cuidados, entre los que destaca el aporte de alimento. Las crías demandan estos cuidados y aporte de recursos a sus padres mediante un complejo y elaborado conjunto de señales de petición, tanto auditivas como visuales. Estas señales incluyen posturas, patrones de coloración bucal, sonidos y movimientos llamativos con los que transmitir a sus padres sus necesidades (Budden & Wright, 2001; Kilner, 2002; Kilner, 2006), influyendo en la cantidad de alimento aportado y en su reparto por parte de los mismos (Budden & Wright, 2001; Kilner & Johnstone, 1997; Kilner, 2002)

Estas señales y comportamientos tienen especial importancia cuando nos centramos en las especies de aves altriciales, cuyos pollos presentan un desarrollo temprano muy rápido (Erickson et al., 2001), el cuál debe ser sustentado por un aporte de recursos muy elevado por parte de los padres para cubrir dichas necesidades (Starck et al., 1998). Esta especial importancia es debida a que un aporte insuficiente de alimento por parte de los padres durante el desarrollo de los pollos provocaría en los mismos un desarrollo y crecimiento por debajo del óptimo, lo cual podría conllevar consecuencias a largo plazo y de forma duradera, no sólo en la supervivencia temprana del individuo, sino a lo largo de toda su vida y por ello en su fitness (Lindström, 1999; Metcalfe & Monaghan, 2001).

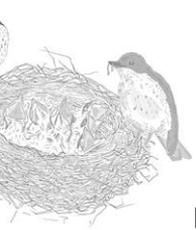
Sin embargo, y a pesar de su importancia, el conjunto de señales que conforman el comportamiento de petición de alimento, al igual que otras señales comunicativas como pueden ser los comportamientos de cortejo (Andersson, 1994), parecen presentar una excesiva complejidad. Estas señales incurren en gastos energéticos o de recursos elevados o aumentan la atracción de posibles depredadores. Esta complejidad y gasto es elevado, especialmente si su única finalidad es la de garantizar una correcta transmisión de recursos.



Conflicto paterno-filial

La razón de esta exagerada complejidad en el conjunto de las señales de petición, en especies iteróparas que presentan reproducción sexual y cuidado parental, ha sido explicada como la manifestación visible de un conflicto genético entre los padres y los hijos en cuanto a la cantidad de alimento a aportar al nido y a su reparto, denominado conflicto paterno-filial (Trivers, 1974).

Partiendo del hecho de que los padres y los pollos dentro de una nidada están emparentados genéticamente, cabría esperar entre ellos una colaboración, de forma que todos ellos maximizaran los beneficios obtenidos en forma de eficacia biológica (Platt & Bever, 2009; Wilson & Clark, 2002). Sin embargo, se debe tener en cuenta que la relación genética y de parentesco tanto entre padres e hijos como entre hermanos es de 0.5 (Hamilton, 1964), lo que implica, al no compartir un 100% de sus alelos, intereses individuales que pueden desembocar en una competencia entre individuos emparentados (West et al., 2002). Dado que, como hemos mencionado, la relación de parentesco es de 0.5 entre los individuos de una nidada, ello conlleva que los costes (C) y los beneficios (B) en un determinado nivel de cuidado parental difieran en función del punto de vista de cada individuo. Para los padres, el aporte de alimento y el esfuerzo de cuidado parental invertido sólo redundarían en un beneficio del 0.5, siguiendo la relación de parentesco mencionada, mientras que para los pollos sería de 1, beneficiándose de toda la inversión parental. Sin embargo, los costes (C) que implica el esfuerzo parental, entendidos como la posible reducción del número de futuros hijos para los padres y por tanto de futuros hermanos para los pollos, sería la misma ya que a ambos los uniría una relación de 0.5 con esos futuros pollos (Figura 1). Estas diferencias entre los beneficios (B) obtenidos por padres y pollos para un mismo coste (C) en un determinado nivel de inversión de cuidado parental conllevan, por lo tanto, a que el nivel óptimo de recursos a aportar y de esfuerzo parental a invertir en la nidada difiera en función del punto de vista de los pollos y los



padres dando lugar al mencionado conflicto paterno-filial (Clutton-Brock, 1991; Mock & Parker, 1997; Kilner & Hinde, 2008).

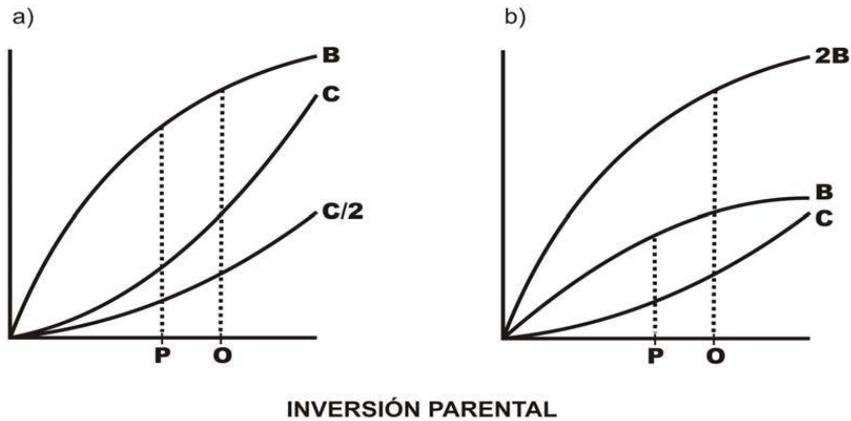
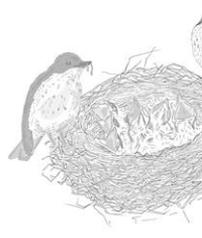


Figura 1: (a) Trivers (1974) y (b) Lazarus & Inglis (1986). Beneficios (B) y costes (C) de la inversión parental según el nivel de inversión, para padres e hijos. P: nivel de inversión óptimo para los padres; O: inversión óptima para los hijos. La diferencia O-P se conoce como *Conflicto Paterno-Filial*.

Teniendo en cuenta todo esto, y si además recordamos la importancia de la suficiente aportación de recursos, en especial en aves altriciales con un rápido desarrollo, cabría pensar que existiera una presión evolutiva en los pollos que les llevase a tratar de maximizar sus beneficios, intentando recibir la mayor cantidad posible de alimento, cuya disponibilidad además nunca es segura (Leech & Leonard, 1996), aunque ello conlleve a un efecto negativo sobre el fitness tanto de sus padres como de sus hermanos (Hoover & Reetz, 2006; Royle et al., 2002b).

Sin embargo, y a pesar de todo lo descrito anteriormente, se ha observado que los padres se basan en la información de las señales fiándose y respondiendo acorde a ellas en cuanto a la cantidad de recursos que aportar al nido y a su distribución (Budden & Wright, 2001; Searcy & Nowicki, 2005). Además, estas señales no sólo parecen fiables, sino que también su intensidad covaría de forma proporcional con el nivel

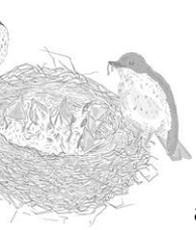


de hambre de los pollos (Kilner & Johnstone, 1997; Searcy & Nowicki, 2005) y que los niveles de petición suelen estar por debajo de los niveles máximos que los pollos podrían alcanzar (Rodríguez-Gironés, 2002).

Todas estas consideraciones indican que la evolución de las señales, y por tanto del comportamiento de petición, se ha desarrollado dentro de un marco dirigido por esta situación de conflicto de intereses entre los padres y los pollos (Kilner & Hinde, 2008; Trivers, 1974) llegando a una resolución del conflicto que lleva a un punto de estabilidad evolutiva.

Modelos teóricos de la evolución del comportamiento y las señales de petición

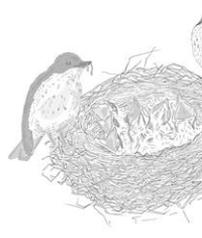
Previamente al planteamiento de este conflicto se consideraba que los adultos, de forma independiente, determinaban el esfuerzo parental a realizar, así como la cantidad y el reparto del alimento (Alexander, 1974; Kilner & Hinde, 2008). Sin embargo, como hemos mencionado antes, los pollos influyen en los padres mediante el comportamiento de petición y las señales emitidas (Budden & Wright, 2001; Kilner & Johnstone, 1997; Kilner, 2002) de forma que no es fácil deducir cómo y en qué punto se resolverá el conflicto. Para determinar cómo se ha llegado a la resolución de este conflicto se han desarrollado multitud de modelos matemáticos teóricos que han tratado de resolver dicha incógnita (Bergstrom & Lachmann, 1997, 1998; Eshel & Feldman, 1991; Godfray, 1991, 1995; Harper, 1986; Johnstone, 1999, 1996, 1998; Lachmann et al., 2001; Lachmann & Bergstrom, 1998; Macnair & Parker, 1979; Nöldeke & Samuelson, 1999; Parker & Macnair, 1979; Parker et al., 2002; Payne & Rodríguez-Gironés, 1998; Price et al., 2002; Redondo et al., 1992; Reeve, 1997; Rodríguez-Gironés et al., 1996; Rodríguez-Gironés et al., 2001; Stamps et al., 1978; Zahavi & Zahavi, 1999; ver revisiones en: Mock & Parker, 1997; Godfray & Johnstone, 2000; Godfray, 1995a; Johnstone & Godfray, 2002; Kilner & Johnstone, 1997; Kilner & Hinde, 2008; Parker et



al., 2002a; Royle et al., 2002, 2004; Searcy & Nowicki, 2005; Maynard Smith & Harper, 2003; Wells, 2003).

Aunque existen diferencias considerables entre estos modelos, se han podido agrupar en función de su planteamiento en dos grandes grupos, que proponen diferentes rutas evolutivas por las que se ha podido llegar a la resolución del conflicto:

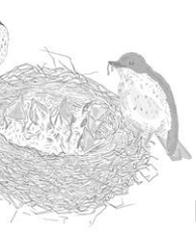
1. Modelos de competición (Parker & Macnair, 1979; Parker et al., 2002b; revisión en: Mock & Parker, 1997; Royle et al., 2002a): este grupo de modelos está basado en que los pollos compiten entre ellos para obtener los recursos que los padres traen al nido, utilizando para ello las señales de petición. Esto implicaría que las señales no obligatoriamente tendrían que ser informativas sobre las necesidades del pollo, aunque sí es cierto que el esfuerzo que podrían invertir en dicha competición vendría limitado por la condición física del pollo (Parker et al., 2002b). En estos modelos los pollos irían elevando su nivel de petición para competir con sus hermanos, obteniendo con ello un mayor beneficio (B) (en forma de alimento cuyo aporte dependería de los padres). Sin embargo, no se debe olvidar que la emisión de las señales tiene un coste (C) asociado que varía con el esfuerzo invertido en la señalización, por lo que se establecería un nivel que denominaremos óptimo donde la relación entre los beneficios obtenidos y los costes (B/C) será máxima, fuera del cual o bien los beneficios serían menores o los costes mayores (Fig. 2a). En conclusión, mediante la propuesta de estos modelos el conflicto se resolvería en un punto intermedio entre los niveles óptimos desde el punto de vista de los hijos y los padres (Parker & Macnair, 1979).
2. Modelos de señalización (Godfray, 1991, 1995b; revisados en Godfray & Johnstone, 2000; Johnstone & Godfray, 2002; Kilner & Johnstone, 1997): estos modelos nos dicen que los pollos emiten señales fiables que informan de su necesidad de alimento y que tienen un coste asociado (C) que sería proporcional a dicha necesidad y a ese esfuerzo de petición, por lo que los padres



podrían fiarse de la honestidad de dichas señales y responder acorde a ellas en cuanto al alimento a aportar y a su distribución (Godfray, 1991). Este punto de estabilidad se logra alcanzar ya que, aunque los pollos, por la presión evolutiva de competencia, incrementasen cada vez más sus niveles de petición, los padres evolucionarían respondiendo menos a estas señales, ya que serían menos fiables e informativas. De nuevo se alcanzaría un punto en el cual la relación B/C sería máxima (Fig. 2a), fuera del cual se reduciría la eficacia biológica. En estos modelos el conflicto se resolvería favoreciendo a los padres, con los hijos realizando una señalización honesta y fiable de sus necesidades y ellos respondiendo a las mismas, aunque los padres podrían incrementar su esfuerzo en el cuidado parental ligeramente para favorecer a sus hijos sin que por ello conlleve alejarse mucho de su óptimo (Johnstone, 1996).

Ambos tipos de modelos propuestos podrían llevar a una resolución del conflicto paterno-filial alcanzando con ello un punto de estabilidad evolutiva en donde los pollos emitirían señales honestas, aportando información fiable acerca de sus necesidades, y los padres se beneficiarían de ello respondiendo acorde a dicha información. Sin embargo, para que se llegue a este punto de estabilidad, la mayoría de los modelos desarrollados coinciden en que las señales deben llevar un coste asociado y proporcional a la intensidad de las mismas que afecte al fitness de los pollos (Parker et al., 2002; Royle et al., 2002b) tomando para ello como base la Teoría del Hándicap (Zahavi, 1975). Por lo tanto, estos costes dependerán directamente del nivel y esfuerzo de petición y los beneficios asociados a la obtención del alimento dependerán a su vez de los diferentes estados de necesidad nutricional, por lo que para cada nivel podrían establecerse diferentes puntos de equilibrio en donde se maximizaría la relación B/C.

De forma paralela a estos modelos, que asumen la necesaria presencia de un coste determinante que permita llegar al equilibrio, se han desarrollado otras hipótesis en las que dicho coste sería muy bajo o incluso inexistente (Bergstrom & Lachmann, 1997, 1998; Maynard Smith, 1994;



Lachmann et al., 2001). Estos modelos teóricos se desarrollarían dentro de un marco en el cual se alcanzaría un punto óptimo de petición con un coste bajo, pero que para los demás niveles fuese tan alto que no sería viable (Fig. 2b) y que además implicaría que las señales fuesen de bajo nivel informativo y se encontrasen en un punto no estable a nivel evolutivo (Brilot & Johnstone, 2002, 2003).

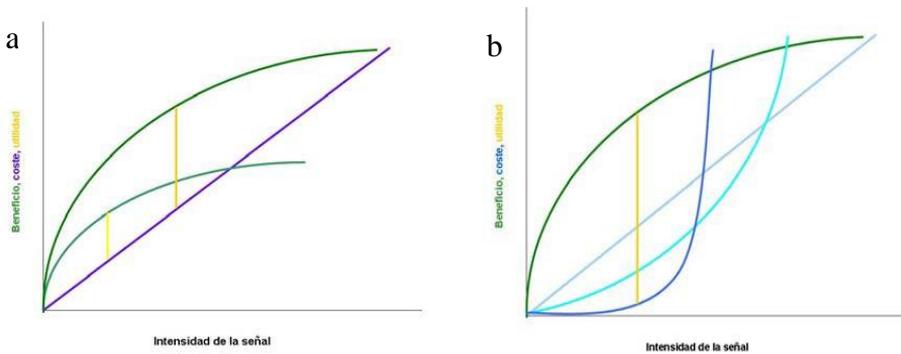
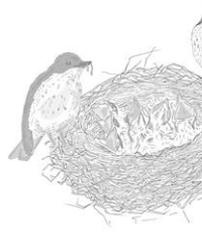


Figura 2: Relación entre los beneficios (B) y los costes (C) de la petición de alimento para los hijos, según (a) los modelos de petición costosa, y (b) los modelos de petición "barata".

Costes asociados al comportamiento de petición

Como hemos destacado en el apartado anterior, los costes y los beneficios asociados al comportamiento de petición son determinantes para entender la evolución de estas señales comunicativas y explicar cómo se puede llegar a un punto de resolución en el conflicto paterno-filial. Tanto costes como beneficios se pueden dividir en dos grupos, directos e indirectos. Los directos son aquellos costes y beneficios que tienen un efecto directo sobre la eficacia biológica del individuo emisor. Por otro lado, los indirectos involucran a sus



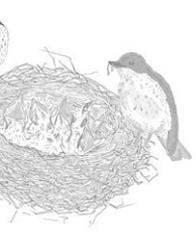
hermanos y padres afectando de esta forma a su eficacia biológica inclusiva.

Los costes indirectos, a pesar de su posible importancia a la hora de determinar la evolución de las señales de petición (Briskie et al., 1994; McCarty, 1997; Moreno-Rueda, 2007; Kilner, 1999), no han sido testados ni probados de forma extensa. En los escasos estudios donde se ha tratado de entender y demostrar su importancia, se encontró que una mayor fiabilidad en la relación de parentesco dentro de una nidada (menor probabilidad de pollos medio hermanos debido a cópulas extrapareja) solía estar asociada a un nivel de petición más bajo, reduciendo con ello los efectos negativos sobre los hermanos y por lo tanto sobre su propia eficacia biológica inclusiva (Briskie et al., 1994).

Por otro lado, los costes directos sí han sido extensamente estudiados, aunque los resultados obtenidos fueron variados e incluso contradictorios.

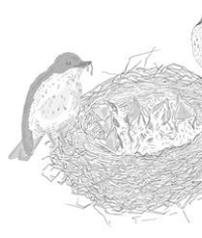
Los principales tipos de costes directos descritos son los siguientes:

1. Coste de depredación: como hemos explicado, dentro del conjunto de señales que conforman el comportamiento de petición se encuentran las sonoras. Estas llamadas, que pueden llegar a ser muy audibles e incluso ruidosas, podrían causar un incremento en la detectabilidad del nido por parte de posibles depredadores (Haff & Magrath, 2011; McDonald et al., 2009). Una evidencia de ello se ha encontrado en los estudios comparativos realizados (Briskie et al., 1999; Haskell, 1999; Redondo & Arias de Reyna, 1988) que nos muestran que en las especies donde el riesgo de depredación en el nido es mayor las señales sonoras de petición suelen ser menos intensas. Sin embargo, no se trataría de un coste individual ya que, por lo general, cuando se produce un episodio de depredación suele involucrar a toda la nidada. Este tipo de coste se ha encontrado en varios estudios realizados en diferentes especies (Dearborn, 1999; Haskell, 1994, 1999; Ibáñez-Álamo et al.,



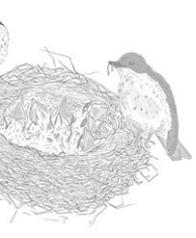
2010; Leech & Leonard, 1997; McDonald et al., 2009; revisión en Haskell, 2002; Moreno-Rueda, 2007), aunque no ha aparecido en otras (Dearborn, 1999) o sólo se ha encontrado en función del tipo de nidificación (Haskell, 1999), por lo que no podríamos hablar de un coste generalizado y no está claro de si por sí solos podrían asegurar la fiabilidad y honestidad de las señales (Godfray, 1995; Parker et al., 2002).

2. Coste energético y metabólico: a pesar de haberse realizado un gran número de estudios que analizaban dicho coste, de nuevo los resultados fueron poco concluyentes para saber si este tipo de coste sería suficiente para determinar la evolución de las señales y dar estabilidad evolutiva al sistema comunicativo (Abraham & Evans, 1999; Bachman & Chappell, 1998; Chappell & Bachman, 1998; Leech & Leonard, 1996; Mccarty, 1996; Soler et al., 1999). Aunque varios estudios mostraban que la tasa metabólica de los pollos, medida como el oxígeno consumido, aumentaba un 27% en comparación con el consumo en estado de reposo aunque esto tan solo suponía menos de 0.25% del presupuesto energético diario lo cual podría compensarse con un poco de alimento extra (Chappell & Bachman, 2002; Mccarty, 1996). No obstante, dado el rápido desarrollo temprano esto podría tener consecuencias que influyesen negativamente en su crecimiento (Verhulst & Wiersma, 1997).
3. Coste de crecimiento: otro de los posibles costes sería el que afectase al crecimiento de los pollos. Este coste tendría una gran importancia ya que la tasa de crecimiento durante el desarrollo tiene una marcada relación con la supervivencia de los pollos (Schwagmeyer & Mock, 2008). De nuevo los resultados obtenidos en los estudios que se han realizado con diferentes especies son diversos y no concluyentes, pudiendo probarse la presencia de dicho coste en algunos (Kilner, 2001; Moreno-Rueda & Redondo, 2011; Rodríguez-Gironés et al., 2001) mientras que en otros dicho coste no aparecía (Kedar et al., 2000; Leonard et al., 2003; Leonard & Horn, 2008; Moreno-Rueda, 2010; Rodríguez-Gironés



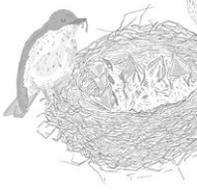
et al., 2001) llegando incluso a resultados opuestos en diferentes estudios con la misma especie (Kedar et al., 2000; Moreno-Rueda, 2010; Moreno-Rueda & Redondo, 2011, 2012; Soler et al., 2014). Esta variedad en los resultados obtenidos ha tratado de ser explicada al considerar una serie de factores. Habría que destacar que las diferentes especies con las que se ha realizado los estudios pueden presentar diferencias en las tasas de crecimiento y desarrollo, en la demanda energética máxima (Leonard et al., 2003; Rodríguez-Gironés et al., 2001), el esfuerzo empleado en la petición (Kilner, 2001) o el desarrollo de otras formas de competencia entre hermanos como rivalizar por la posición en el nido (Chappell & Bachman, 2002; Moreno-Rueda, 2007). Incluso en algunas especies se han podido ver indicios de la aparición de mecanismos compensatorios que permitirían a los pollos eliminar el efecto de dicho coste cuando los tratamientos se mantienen a largo plazo, de modo que, aunque se presenten los efectos en una primera etapa del desarrollo, se vean compensados más adelante (Moreno-Rueda et al., en preparación).

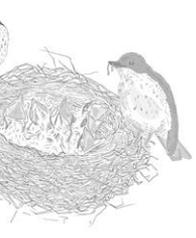
4. Coste inmunológico: el desarrollo de una respuesta inmunológica por parte del individuo implicaría la inversión de una gran cantidad de recursos que también estarían involucrados en otros procesos como por ejemplo el control del estrés oxidativo. Por ello se han realizado varios estudios que han tratado de ver cómo este coste podría influir en el comportamiento de petición. En todos los casos estudiados se ha podido comprobar de forma concluyente que un alto esfuerzo en el comportamiento de petición mediante una intensa señalización conlleva un efecto negativo sobre el individuo a modo de reducción en su capacidad de montar una respuesta inmunitaria (Buchanan et al., 2007; Moreno-Rueda, 2010; Moreno-Rueda & Redondo, 2011, 2012; Soler et al., 2014).

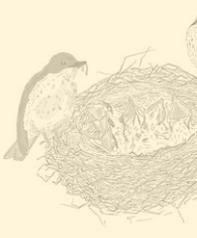


Posibles efectos del parasitismo sobre el comportamiento de petición

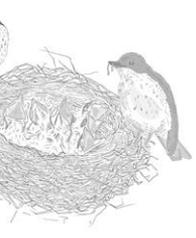
Un parásito es un organismo que vive sobre o en otro organismo de diferente especie obteniendo recursos y beneficiándose de dicha relación, causando efectos negativos sobre el individuo hospedador. Siguiendo esta definición, y dado que se apropian de recursos de los hospedadores causándoles con ello un efecto negativo sobre su fitness, los parásitos deben ser considerados como un factor importante tanto ecológica como evolutivamente (Schmid-Hempel, 2011). Frecuentemente los vertebrados se ven parasitados por varios tipos de artrópodos de forma externa y que se alimentan mayoritariamente de su sangre, sufriendo por tanto de un ectoparasitismo hematófago. En el caso de las aves, con mucha frecuencia esta parasitación ocurre en los nidos donde los ectoparásitos se nutren de la sangre de los pollos, los cuales sufren por ello un daño en su estado físico (Møller et al., 2009). Dado que si los pollos aumentasen su esfuerzo de petición recibirían más recursos por parte de sus padres (Kilner & Johnstone, 1997), tal vez podrían así compensar, al menos de forma parcial, este efecto negativo. De hecho, tanto en carbonero común (*Parus major*) como en papamoscas cerrojillo (*Ficedula hypoleuca*) se ha observado que existe un incremento en el esfuerzo de petición por parte de los pollos en las nidadas parasitadas (Cantarero et al., 2013; Christie et al., 1996). No obstante, en estos estudios no se tuvo en cuenta el estado nutricional de los pollos. Sin embargo, se debe tener en cuenta que el parasitismo en el nido afecta negativamente a los pollos en otros aspectos fisiológicos además de su estado nutricional, como disminuyendo su capacidad termorreguladora (Simon et al., 2004), su capacidad antioxidante (López-Arrabé et al., 2015), su hematocrito (Potti et al., 1999) o incrementando su respuesta al estrés (Lobato et al., 2008). Por todo ello, y recordando que las señales de petición tienen un coste asociado a su producción, éste pueda ser excesivo de asumir a partir de cierto nivel de esfuerzo por unos pollos, ya de por sí en un estado deteriorado debido a los efectos del parasitismo.







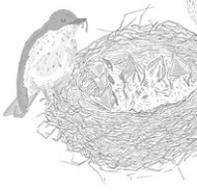
OBJETIVOS

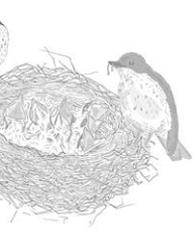


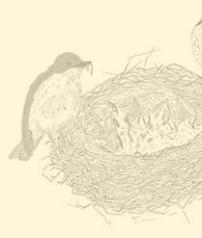
El objetivo principal de esta tesis es estudiar y testar la presencia de diferentes tipos de costes asociados al comportamiento de petición y a la emisión de las señales de sollicitación en pollos de papamoscas cerrojillo (*Ficedula hypoleuca*), así como el efecto de la parasitación sobre las mismas, para así obtener información que nos permita poder comprender su importancia en el proceso evolutivo de este tipo de señales comunicativas.

Para lograr dicho objetivo principal hemos planteado los siguientes objetivos concretos:

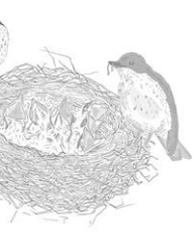
1. Medir los costes asociados a las señales en términos de crecimiento.
2. Medir los costes asociados a las señales en términos de inmunocompetencia.
3. Medir el efecto de la carga parasitaria en los pollos sobre el comportamiento de petición de los pollos.
4. Simular experimentalmente la aparición de una nueva variante fenotípica que presente señales de petición exageradas para así poder cuantificar los costes y beneficios relativos en comparación a los fenotipos salvajes.







ESPECIE DE ESTUDIO



El papamoscas cerrojillo (*Ficedula hypoleuca*) es un pequeño passeriforme, insectívoro y migratorio. Reside durante el periodo invernal en el oeste del África, pero durante el periodo reproductor se localiza en diferentes poblaciones de boscosas a lo largo de Europa (Lundberg & Alatalo, 1992; Ouweland et al., 2016).

Se trata, como hemos mencionado, de un ave de pequeño tamaño (11-13 g de peso, con una envergadura alar de 21,5-24 cm y una longitud de 12-13 cm) con un cuerpo compacto, una cabeza ancha de cráneo grácil y un pico largo y fino (Figura 3). Durante el otoño e invierno ambos sexos presentan un aspecto similar, con la zona ventral blanquecina y la dorsal de color marrón grisáceo (Cramp et al., 1993). En cambio, durante la época reproductora existe un marcado dimorfismo sexual (Figura 3). Las hembras permanecen con la coloración descrita (aunque el tono pardusco se va oscureciendo con la edad, Potti et al., 2014). Mientras, los machos, tras la muda durante el invierno, adquieren un llamativo plumaje nupcial caracterizado por un fuerte contraste de negro y blanco, siendo el área dorsal y la cola negros y las zonas ventrales blancas, aunque dicha coloración, en especial los negros, presentan una gran variabilidad en cuanto a intensidad (Lehtonen et al., 2009; Lundberg & Alatalo, 1992). Ambos sexos presentan una franja alar blanca (Figura 4), siendo de mayor tamaño en los machos (Curio, 1960). Los machos, y algunas hembras (Morales et al., 2007a; Potti, 1993a; Potti et al., 2013), presentan una mancha blanca en la frente, siendo un carácter con gran variabilidad intrapoblacional (Figura 5). Diversos estudios han comprobado que un mayor tamaño de este ornamento está relacionado con una mayor rapidez y probabilidad de encontrar pareja (Potti & Montalvo, 1991b), una mayor paternidad extrapareja (Canal et al., 2011), una mejor capacidad antioxidante (Moreno et al., 2011b) y niveles de estrés fisiológico más bajos (Lobato et al., 2010; Moreno et al., 2011b).

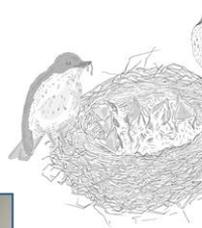


Figura 3: Hembra (izq) y macho (dcha) de papamoscas cerrojillo durante el periodo reproductor.



Figura 4: Presencia de mancha alar en macho (izq) y hembra (dcha) de papamoscas cerrojillo.

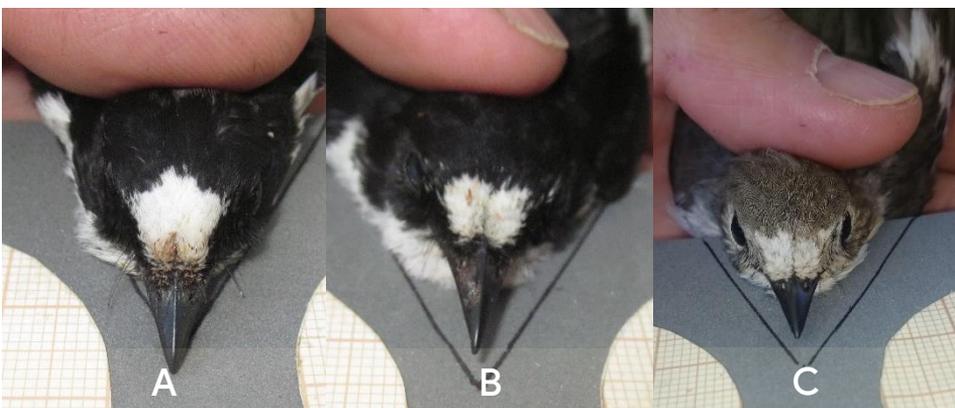
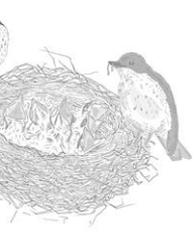


Figura 5: Variabilidad de la mancha frontal en machos (a y b) y hembras (c) de papamoscas cerrojillo.



El papamoscas cerrojillo es una especie migratoria transahariana (Bernis, 1962), que durante el periodo reproductivo se extiende en diferentes poblaciones a lo largo de Europa (Figura 6). En el caso de España presenta una distribución fragmentada al establecerse en áreas montañosas (Merino Rodríguez y Potti Sánchez, 1997), con un rango altitudinal de entre 1000-1500 m (De Juana, 1980; Jubete, 1997; Román et al., 1996). Estas poblaciones se establecen en hábitats boscosos con una elevada densidad, especialmente robledales maduros y zonas de pinar (Lundberg & Alatalo, 1992; Mäntylä et al., 2015), aunque también se ha encontrado criando en zonas de encinares (López-Huertas, 2003). Además de la elección de este tipo de hábitats, el papamoscas cerrojillo es una especie altamente filopátrica (Potti & Montalvo, 1991c; Sanz & Moreno, 2000; Sanz, 2001), no sólo por la población en la que nació sino incluso por un mismo territorio (Montalvo & Potti, 1992). De forma natural el papamoscas cerrojillo cría en agujeros en los árboles, aunque muestra una gran adaptabilidad e incluso preferencia por el uso de las cajas nido (Lundberg & Alatalo, 1992), lo que permite que su seguimiento y monitorización sea más sencilla, razón por la que ha sido seleccionada con frecuencia como modelo de estudio en biología evolutiva y ecología (Alatalo & Lundberg, 1986; Both & Visser, 2001; Harvey et al., 1984; Lehtonen et al., 2009; Potti & Canal, 2011).

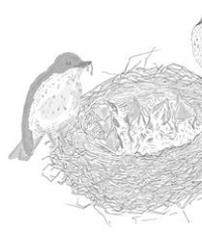
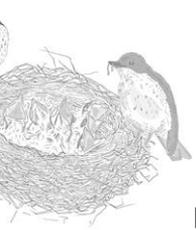


Figura 6: *Mapa de la distribución del papamoscas cerrojillo en época reproductora (adaptado de Camacho et al, 2018). El punto indica la zona de estudio de la presente tesis doctoral.*

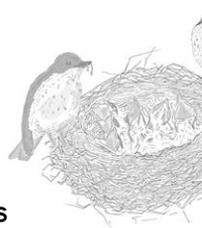
Se trata de una especie insectívora (Sanz, 1998), siendo sus principales presas pequeños invertebrados como orugas (especialmente en época reproductora, Moreno et al., 1995; Sanz, 1998), moscas, arañas, polillas, avispas y escarabajos.

Normalmente los papamoscas cerrojillos suelen comenzar su reproducción en el segundo año de vida (Montalvo & Potti, 1992; Potti & Montalvo, 1991a). Los machos llegan a las zonas de cría entre finales de abril y principios de mayo, siendo el momento exacto relativamente flexible y dependiente de las condiciones ambientales durante la migración (Both et al., 2006). Una vez llegado al territorio de cría localizan un agujero natural en un árbol o una caja nido donde nidificar y defienden este territorio a la vez que comienzan a cantar para atraer a las hembras (Lundberg & Alatalo, 1992; Potti, 1998). Estas suelen llegar una semana más tarde y seleccionan pareja en función de las características del macho y del territorio que ocupa (Canal et al., 2011; Sirkiä & Laaksonen, 2009). Por lo general, los machos de más edad suelen ser los primeros en llegar, habiéndose observado que



presentan un mayor éxito reproductor (Potti, 1998a; Potti & Montalvo, 1991b). Además, tienen una probabilidad más alta de intervenir en cópulas con hembras emparejadas con otros machos, aumentando su paternidad extrapareja y también de emparejarse con una segunda hembra (Canal et al., 2012a). El papamoscas cerrojillo es una especie mayormente monógama que presenta un grado de poligamia moderado, un 4,4% (Canal et al., 2011, 2012b; Lundberg & Alatalo, 1992; Potti & Montalvo, 1993a), presentando las hembras también un porcentaje (alrededor de un 27%) de cópulas extrapareja (Canal et al., 2012b).

Una vez emparejados, construyen un nido con material vegetal (Figura 7a), como cortezas de jara, pino, hojas o hierba, variando éste en función de la disponibilidad y hábitat (Cantarero et al., 2013; Moreno et al., 2009). Aunque la hembra se encarga mayoritariamente de la construcción del nido, estudios recientes han observado que un 25% de los machos contribuyen aportando material, estando este hecho relacionado con un mayor tamaño en los huevos de dicha puesta (Martínez-de la Puente et al., 2009a). El tamaño de puesta es de entre 4 y 6 huevos, ajustando las hembras este número en función de la disponibilidad de alimento al inicio de la reproducción (Sanz & Moreno, 1995a). La puesta se realiza a primera hora de la mañana y es de un huevo al día, comenzando la incubación con la puesta del penúltimo huevo (Potti, 1998b). Los huevos son elípticos y de una tonalidad azulada (Figura 7b) (Lundberg & Alatalo, 1992), con un peso medio de 1,6 gramos, estando su tamaño y coloración condicionado por la edad y la condición física de la hembra (Moreno et al., 2006a; Potti, 1993b). Además, su tamaño parece estar relacionado con el desarrollo de los pollos, encontrándose que los pollos provenientes de huevos de mayor tamaño desarrollaban tarsos más largos (Potti & Merino, 1994a). Se ha propuesto que la coloración de los huevos podría actuar como señal de calidad de la hembra fomentando el cuidado parental por parte del macho (Moreno et al., 2004, 2005b, 2006b; Moreno & Osorno, 2003; Osorno & Moreno, 2005). De hecho, se ha encontrado que una coloración más intensa de los huevos está relacionada con una mejor condición nutricional (Moreno et al., 2006a) y capacidad inmunitaria (Moreno et al., 2005b) de las hembras, además de una mayor cantidad de anticuerpos maternos en el huevo (Morales et al., 2006b). Por su parte, los machos parecen responder a esta

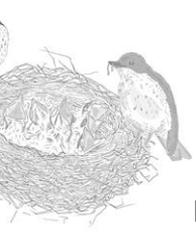


señal con un mayor esfuerzo parental en modo de cebas a las nidadas provenientes de puestas con huevos con una coloración más intensa (Moreno et al., 2004, 2006b, 2008c). La incubación es llevada a cabo exclusivamente por la hembra (Figura 7c) y dura 12-13 días (Lundberg & Alatalo, 1992), durante los cuales una parte de su alimentación es aportada por el macho, que ajusta esta tasa de ceba a las necesidades nutricionales de la hembra (Cantarero et al., 2014; Moreno et al., 2011a).



Figura 7: Nido una vez finalizada su construcción (a), finalizada la puesta (b) e incubación de la hembra (c) de papamoscas cerrojillo.

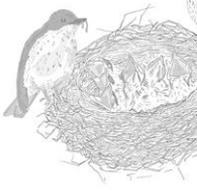
Una vez eclosionados los huevos los pollos permanecerán en el nido durante los siguientes 15-19 días (Figura 8) seguido de un periodo de varios días más en los que permanecerán en las proximidades del nido. Durante este periodo ambos padres participan activamente en la cría y ceba de los pollos, aunque la inversión en esfuerzo parental por parte de los machos es más variable (Moreno et al., 1995, 1999b), soliendo ser en nidadas secundarias muy escasa o incluso nula, al menos hasta que haya finalizado la cría de su nidada primaria (Dale et al., 1996; Potti, 2003). La inversión en cuidado parental, a modo de tasa de ceba, en esta especie se ve determinada por la intensidad de petición por parte de los pollos (Gottlander, 1987) y dicho esfuerzo repercute negativamente en el fitness y supervivencia de los adultos (Ottosson et al., 1997). Se ha observado que determinados factores de los pollos en los momentos próximos a abandonar el nido están fuertemente relacionados con su probabilidad de supervivencia y reclutamiento. En el caso de esta especie se ha encontrado que la condición corporal, las respuesta inmune celular y los niveles de

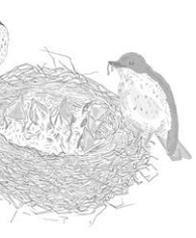


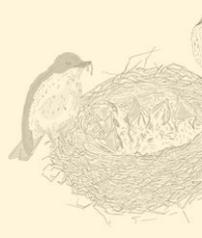
heterófilos y linfocitos están estrechamente relacionados con su probabilidad de supervivencia (Lobato et al., 2005; Moreno et al., 2005a; Potti et al., 2002). Una vez finalizado su periodo reproductivo, durante finales de verano y principios de otoño, tanto adultos como pollos migran de nuevo hacia sus áreas de invernada en el oeste de África (Lundberg & Alatalo, 1992).



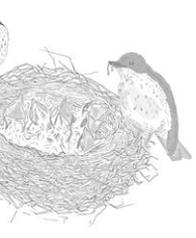
Figura 8: Pollos de papamoscas cerrojillo con 1 día de edad (izq), 8 días (centro) y 13 días (dcha).







ÁREA DE ESTUDIO



Nuestro sistema de estudio está localizado en España, situado en el Sistema Central (Figura 6) y está compuesto por dos áreas separadas por 1 km entre sus extremos (Camacho et al., 2015; véase Figura 10). La primera de estas áreas está localizada en el municipio de La Hiruela (Madrid, 41°04'N 3°27'W), a una altitud de 1250 m.s.n.m. y tiene una extensión de 9,3 ha. Este hábitat está formado principalmente por un bosque maduro de roble melojo (*Quercus pyrenaica*), con una densidad media de 460 árboles por hectárea, cubierto además por un desarrollado sotobosque de plantones de roble melojo, brezo blanco (*Erica arborea*), jara (*Cistus laurifolius*) y majuelos (*Crataegus monogyna*), que representan una cobertura media del 80% (Figura 9a). El segunda área, pese a estar a tan sólo 1 km, es totalmente diferente en cuando a composición vegetal. Se encuentra ubicada en el municipio del Cardoso de la Sierra (Castilla La Mancha, 40°40'N 4°8'W), a una altitud de 1300 m.s.n.m. y con una extensión de 4,8 ha. En este caso el hábitat está conformado en su mayoría por una plantación forestal de pino silvestre (*Pinus sylvestris*), con una densidad media de 200 árboles por hectárea, con la presencia dispersa de algunos individuos de roble melojo, pino resinero (*Pinus pinaster*) y ciprés de Arizona (*Cupressus arizonica*). En esta área la cobertura de sotobosque es mucho menor, estando limitada a zonas abiertas, y conformado por jaras y majuelos, representado una cobertura media del 5% (Figura 9b).

El alimento potencial, tanto de adultos como para las cebas de los pollos, también difiere entre ambos hábitats, siendo en el caso del robledal principalmente orugas mientras que en el pinar su proporción es menor y aumenta la de arañas, larvas de coleópteros y saltamontes.

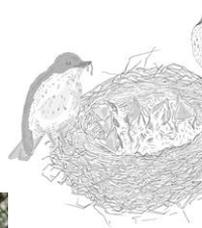


Figura 9: Imágenes del bosque maduro de roble melojo (a) y de la plantación de pino silvestre (b) donde se desarrolla el estudio.

A lo largo de ambas áreas hay distribuidas cajas nido (158 en el robledal y 86 en el pinar), instaladas a una altura de entre 2,5 y 4 metros colgando de las ramas de los árboles y con una separación media de 20 metros, manteniéndose entre años la localización de las mismas (Figura 10).

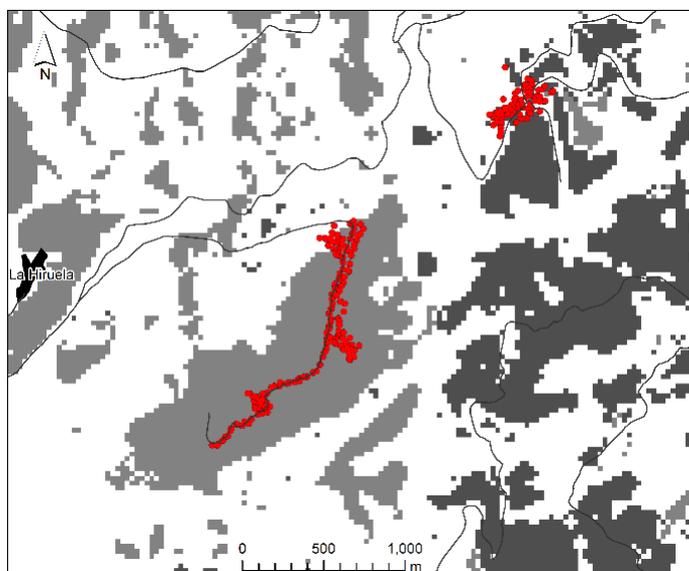
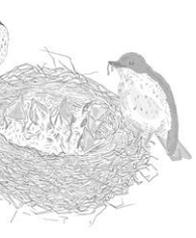


Figura 10: Mapa de la distribución espacial de las cajas nido (puntos rojos) a lo largo del área de robledal (gris claro) y de el pinar (gris oscuro) (adaptado de Camacho, 2018).



La colocación de las cajas y el seguimiento de las poblaciones comenzó en 1984 en el robledal, habiendo ya presencia de algunas parejas reproductoras, y en el pinar en 1988 donde no había presencia debido a la falta de agujeros naturales donde nidificar. A lo largo de estos más de 30 años la población en ambas áreas ha ido aumentando (Camacho et al., 2019) hasta alcanzar en 2020 un total de 172 parejas reproductoras (117 en el robledal y 62 en el pinar; Figura 11). Este estudio y seguimiento exhaustivo a largo plazo ha permitido el desarrollo de muchas investigaciones sobre la ecología y la biología evolutiva de los papamoscas cerrojillos (p.e. Camacho et al., 2013, 2015, 2016; Merino et al., 1996; Merino & Potti, 1995; Montalvo & Potti, 1992; Potti, 2008; Potti & Canal, 2011; Potti & Montalvo, 1990, 1991; para más información sobre diferencias ecológicas y evolutivas entre áreas véase Camacho, 2018).

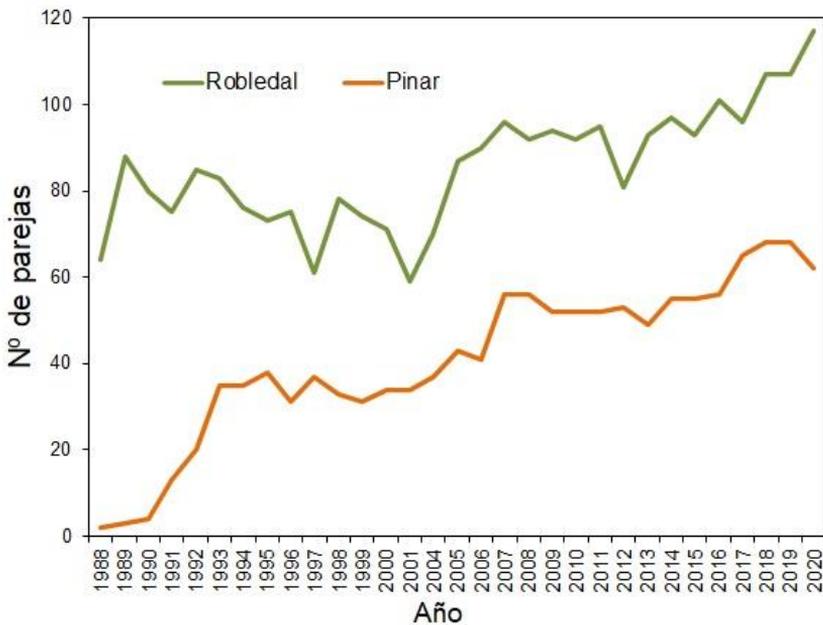
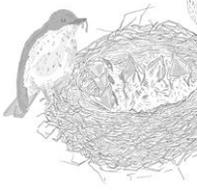
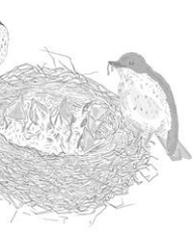
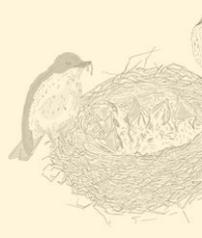


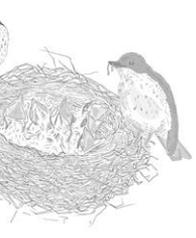
Figura 11: Evolución del tamaño poblacional de papamoscas cerrojillo en ambas áreas de estudio medido como el número de parejas reproductoras entre los años 1988 y 2020.







METODOLOGÍA

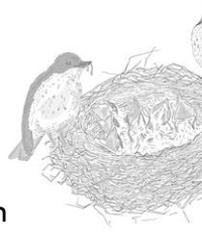


Metodología general

El estudio experimental y la toma de datos para el desarrollo de esta tesis fue llevado a cabo durante las primaveras de los años 2011, 2012 y 2013, durante el periodo reproductivo, en la población de papamoscas cerrojillo (*Ficedula hypoleuca*) descrita anteriormente (véase apartado *Área de estudio*).

Nuestros diseños experimentales fueron englobados dentro del seguimiento poblacional y del estudio a largo plazo llevado a cabo en la población durante más de 30 años. Durante el periodo reproductivo, fundamentalmente los meses de mayo y junio, se lleva a cabo un control exhaustivo de las cajas nido distribuidas a lo largo de ambas áreas, revisándolas cada 1-3 días. Esto nos permite conocer y establecer información básica de la reproducción de los individuos como la fecha de puesta (entendida como la fecha en que la hembra pone el primer huevo de la nidada), el tamaño de puesta o pronosticar la fecha de eclosión de los huevos. Una vez comienza la incubación por parte de la hembra dicho nido no será revisado hasta el momento previsto para la eclosión para evitar molestar de forma innecesaria a la hembra y tratando así de evitar posibles abandonos. La fecha de eclosión será el día en que eclosiona el primer huevo, considerándose dicha fecha como día 1 de vida de los pollos. De ser necesario, el nido se revisaría en días posteriores a la eclosión hasta poder establecer el número de huevos eclosionados, dado que puede existir cierta asincronía en el momento de eclosión (Potti, 1998).

Cuando los pollos alcanzan los 8 días de edad se captura a ambos padres, mediante trampeo en la caja nido, tomándoles una amplia serie de medidas biométricas, anillándolos en caso de no estarlo y extrayéndoles una muestra de sangre tras lo que son liberados. En el día 13 de vida de los pollos, momento en el que su crecimiento ha finalizado, éstos son anillados, pesados, se mide su tarso y se les toma una muestra de sangre para realizar posteriores análisis hematológicos y sexado molecular. Además, durante este proceso se estima la carga parasitaria de ácaros en el nido (véase más adelante). Tras esto no se visitará de nuevo el nido para evitar abandonos del nido prematuros hasta que, a partir del día 18 tras el nacimiento de los

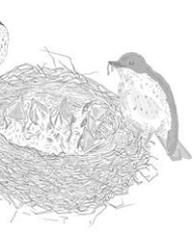


pollos, se visite de nuevo para comprobar si todos los pollos han abandonado el nido. Una vez terminado todo proceso la caja nido es vaciada y limpiada, examinando al retirarlo el material de nido para obtener otra medida de carga parasitaria, en este caso por parte de larvas de *Protocalliphora azurea* (véase más adelante).

Metodología específica en la determinación de los costes asociados a las señales en términos de crecimiento e inmunocompetencia

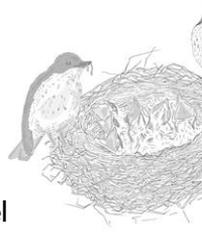
Los pollos, en condiciones naturales, determinan libremente su nivel de petición tratando de optimizar la relación entre los beneficios obtenidos con el alimento en función de su necesidad y el coste dependiente del esfuerzo de petición (Godfray, 1991; Johnstone, 1997). En este diseño experimental manipulamos el esfuerzo de petición manteniendo una necesidad nutricional constante e igual para todos los pollos para así poder medir variaciones en el coste de la petición.

El año previo a la realización del estudio se colocaron en 11 cajas nido con nidadas de 5-6 pollos de 7 días de edad cámaras (Sony Go-Pro) camufladas, habiendo colocado un día antes una cámara señuelo para permitir a los individuos habituarse a las mismas, evitando así comportamientos anómalos ocasionados por la presencia de un nuevo elemento en el nido. Las cámaras filmaron el comportamiento de los pollos y sus padres en el nido durante 2 horas. Del análisis de las grabaciones de estos nidos mediante el programa JWatcher 1.0 (Blumstein & Daniel, 2007) se obtuvo información sobre la tasa de ceba por parte de los padres y del comportamiento de petición de los pollos. Esto nos permitió elaborar un estudio experimental en el que se determinaba un esfuerzo de petición mayor (Kedar et al., 2000; Kilner, 2001; Leonard et al., 2003; Moreno-Rueda, 2010; Moreno-Rueda & Redondo, 2011, 2012; Soler et al., 2014) pero que se encontrase en los rangos presentes en la condiciones naturales.



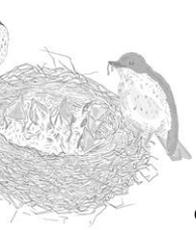
El experimento fue llevado a cabo durante la primavera de 2013 y se realizó con 40 pollos de 20 nidos diferentes cuando éstos tenían 6 días de vida. Durante la tarde del día previo al experimento se cogían de los nidos 2 pollos, de una masa corporal similar e intermedia dentro de la nidada, asegurándonos de que, al menos, quedasen 3 pollos en el nido para evitar la deserción parental. Los pollos se transportaban en un recipiente con calor para evitar el descenso de su temperatura corporal hasta el laboratorio, durando este proceso aproximadamente 20 minutos. Una vez en el laboratorio, los pollos se colocaban de forma individual en nidos artificiales forrados con telas de algodón. Durante todo el proceso en el que los pollos permanecieron en el laboratorio se monitorizó la temperatura en los nidos artificiales mediante un termómetro digital, manteniéndola a 36°C utilizando como fuente de calor lámparas. Durante esta primera tarde los pollos fueron condicionados a un estímulo de petición, que consistía en reproducir una llamada de ceba parental grabada en la misma población, cebándoles *ad libitum*. Durante las dos noches que los pollos pasaban en el laboratorio los nidos artificiales eran cubiertos con un material opaco para atenuar la luz. Cada pareja de pollos hermanos era dividida, asignando aleatoriamente a cada pollo a uno de los dos tratamientos, petición baja (PB) o petición alta (PA). Los pollos se agrupaban por tratamientos en los extremos opuestos del laboratorio minimizando así la interferencia entre ambos grupos por episodios de petición espontánea. Ambas zonas fueron elegidas aleatoriamente, pero manteniendo siempre la asignada a cada tratamiento, estando bajo las mismas condiciones de iluminación, temperatura y humedad así como de potenciales ruidos ambientales. Esto nos permitió asegurar que ambos grupos se encontraban igualmente expuestos a factores ambientales que pudieran influir en la respuesta inmunitaria (Romero, 2004).

El experimento era llevado a cabo al día siguiente, el día 7 de vida de los pollos, iniciándose a las 8:00 y finalizando a las 20:45. Para la ceba de los pollos se calculó una estimación de la cantidad de alimento que debían recibir a lo largo del día en función de su masa mediante la relación alométrica $Alimento\ diario = 0.98 \times M^{0.814}$, donde M es el peso corporal expresado en gramos (Weathers, 1996). Esta cantidad total fue dividida en 18 cebas iguales, asociadas a sus correspondientes episodios de petición,



que se realizaban cada 45 min, haciendo una duración total del experimento de 12 horas y 45 minutos. En caso de producirse alguna desviación de la ingesta durante una de las cebas era compensada durante las cebas posteriores. Como alimento para las cebas se utilizó, de forma alterna, larvas de dípteros y pequeños trozos de tortilla que eran pesados individualmente. Para cada pollo se recogieron los excrementos en recipientes cerrados y que se mantenían refrigerados tomando dos medidas de la masa defecada acumulada, una a las 13:00, a mitad del experimento, y otra al final del mismo a las 21:00. Durante el periodo de descanso entre cebas se simulaba la cobertura materna cubriendo los nidos con un paño para evitar episodios de petición entre las cebas establecidas.

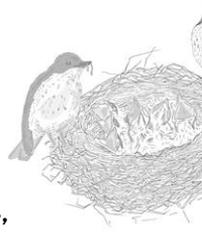
Los episodios de ceba eran llevados a cabo en una habitación contigua, a donde se llevaba a los pollos de forma individual para evitar la estimulación del resto de los pollos. Allí se les cebaba motivando la petición con el estímulo antes descrito con el que se les condicionó. La diferencia entre tratamientos consistió en que, mientras que a los pollos PB se les cebaba inmediatamente al inicio de la petición, a sus hermanos asignados al tratamiento PA se les hacía pedir durante 1 minuto antes de ser alimentados. Cada pollo fue grabado en 5 de estos episodios de petición a partir de las 9:30 de la mañana, repartidos a lo largo del día cada 135 min, mediante una cámara de video digital Handycam HDR-XR155E (Sony®). Estos videos fueron posteriormente analizados mediante el programa JWatcher 1.0 (Blumstein & Daniel, 2007) para obtener los tiempos e intensidades de petición en cada episodio de ceba. Para calcular la intensidad de petición se establecieron rangos de intensidad postural crecientes en cuanto a vigor y actividad muscular siendo 1 (abre la boca, tarsos flexionados), 2 (abre la boca, cuello estirado, tarsos flexionados), 3 (abre boca, cuello extendido, cuerpo erguido), y 4 (cuello completamente estirado, tarsos extendidos, a veces incluyendo aleteo) (modificado de Redondo & Castro, 1992). Estas categorías representan un gradiente de inversión energética en la petición y están correlacionadas con los niveles de necesidad nutricional y la probabilidad de ser alimentados (Gottlander, 1987). Con estos datos se calculó el tiempo promedio y la intensidad media de petición para cada pollo en cada episodio como medidas individuales de



esfuerzo de petición. Algunos pollos no realizaron petición durante algún episodio (especialmente durante las horas centrales del día, en las que en condiciones naturales la tasa de cebsa disminuye también en gran medida), asignándole a la ausencia de petición un valor 0 tanto para tiempo como intensidad de petición. Se midió también, calculando para ello los coeficientes de correlación intraclassa (ICC), la repetibilidad individual de la petición de los pollos entre los diferentes episodios grabados, utilizando para ello 4 de los 5 episodios grabados, omitiendo el de las horas centrales por la razón antes mencionada, en los que todos los pollos respondían al estímulo con la excepción de 3 pollos del tratamiento PB en 3 cebas diferentes. Para esta medición de repetibilidad se omitieron los episodios en los que hubo ausencia de petición (valor 0).

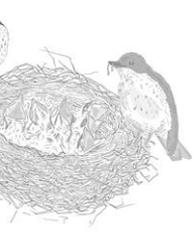
El peso de los pollos fue medido en 3 ocasiones mediante una báscula digital de precisión (Sartorius®; precisión 0,01 g). Los pesos se midieron a las 8:00, al iniciar del experimento (M_1), a las 21:00, al finalizar (M_2) y a las 8:00 del día siguiente, 24 horas tras el inicio del experimento (M_3), siempre tras haber defecado. En el caso de no defecar en ese momento pero sí en los 15 minutos siguientes al pesado, el peso de las heces era descontado del peso medido. La variación de la masa diurna (V_{MD}), la ocurrida durante el experimento, se estimó como $V_{MD} = M_2 - M_1$. La variación de masa nocturna (V_{MN}), durante la noche, se estimó como $V_{MN} = M_3 - M_2$. La variación de la masa diaria total (V_{MT}) se calculó como $V_{MT} = M_3 - M_1$. También se calculó la masa perdida atribuible al gasto metabólico (M_{GM}) como $M_{GM} = M_I - V_{MT} - M_H$, donde M_I es la masa ingerida en forma de alimento y M_H es la masa de heces defecada. Una vez obtenidos estos datos, se calculó la diferencia de esta medida entre cada pareja de pollos hermanos asignados a cada tratamiento, siendo medida como $DM_{GM} = M_{GM}(PA) - M_{GM}(PB)$ como estimación del coste metabólico asociado a la petición (Kilner 2001). Dos pollos, uno de cada tratamiento, vomitaron entre dos cebas consecutivas por lo que se les excluyó en los análisis de M_{GM} .

Durante el desarrollo del experimento también se midió cómo la respuesta inmune celular era afectada en función de los tratamientos. Para ello, antes del inicio del experimento, a las 7:30, se inyectaba en el patagio



izquierdo de cada pollo 0,2 mg de fitohemaglutinina (PHA-P, L-8754, Sigma-Aldrich) diluida en 0,04 ml de tampón isotónico fosfato (siguiendo Moreno et al., 2005). La PHA-P es un mitógeno inocuo que induce una respuesta inmune en aves, causando una hinchazón de la piel del patagio, que está positivamente correlacionada con la fuerza de la respuesta inmune celular mediada por células T (Kennedy & Nager, 2006), aunque otros componentes del sistema inmunológico también participan (Martin et al., 2006). Se tomaron 3 medidas del grosor del patagio con un micrómetro sensible a la presión (Mitutoyo®; precisión: 0,01 mm) y de forma ciega respecto al tratamiento de cada pollo. La medición se realizaba por triplicado utilizando como valor final, para cada momento de medición, la media de las 3 medidas realizadas. Las medidas se tomaron antes de la inyección (P_1), a las 21:00, al final del experimento (P_2), y de nuevo a la mañana siguiente (P_3), a las 24 horas tras la inyección. De forma similar a lo anterior se calcularon las variaciones en el grosor del patagio como estima de la intensidad de la respuesta inmune celular. La variación de grosor durante el día (P_{VD}), correspondiéndose con la realización del experimento, se estimó como $P_{VD} = P_2 - P_1$. La variación de grosor durante la noche (P_{VN}) se estimó como $P_{VN} = P_3 - P_2$. La variación de grosor total (P_{VT}) se estimó como $P_{VT} = P_3 - P_1$. Con estos datos se calculó la diferencia entre cada pareja de pollos hermanos, asignados a los diferentes tratamientos, como $DP_{VT} = P_{VT}(PA) - P_{VT}(PB)$ como estimación del coste inmunológico asociado a la petición.

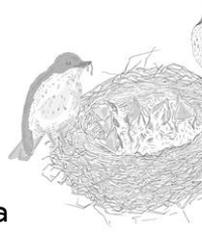
Tras finalizar todo el proceso los pollos fueron cebados *ad libitum*, se les marcaba con rotuladores no tóxicos y eran devueltos durante esa mañana a sus nidos de origen. Durante los siguientes días los nidos fueron revisados regularmente para comprobar el estado de los pollos que habían participado en el experimento. Todos los pollos que participaron en el experimento se encontraban en buen estado en su día 13 de vida y abandonaron el nido con normalidad a excepción de un pollo, que murió unos días después del experimento, junto con dos de sus hermanos que no habían participado en el experimento, sin causas atribuibles al mismo y obedeciendo a la tasa normal de mortalidad de los pollos.



Metodología específica en la determinación del efecto de la carga parasitaria sobre el comportamiento de petición

El experimento fue llevado a cabo durante las primaveras de los años 2011 y 2013 y se realizó con 36 pollos de 18 nidos diferentes (3 no infectados, 5 infectados por larvas de *Protocalliphora azurea*, 4 infectados por los ácaros hematófagos *Dermanyssus gallinoide* y *Dermanyssus gallinae* y 6 infectados por ambos tipos de parásitos). Se usaron pollos de 9 días de edad, seleccionándolos con peso similar y en el rango intermedio dentro de la nidada. La recogida de los pollos, su transporte al laboratorio, las condiciones en el mismo y el proceso de condicionamiento a un estímulo sonoro son los mismos que los descritos en el apartado anterior, con la salvedad de que cada pareja de pollos hermanos permanecían juntos en un mismo nido artificial. Dado que los parásitos considerados en este estudio son ectoparásitos y que están presentes en el nido, ningún pollo de los participantes en este experimento tenía presencia parasitaria en el laboratorio.

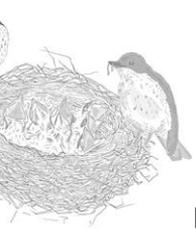
El día del experimento, pero antes de su inicio, los pollos fueron estimulados para pedir y se les cebó *ad libitum* a las 7:30, 8:00 y 8:30 para eliminar posibles diferencias iniciales en las necesidades nutricionales. Esto reviste gran importancia ya que, para poder medir de forma correcta el comportamiento de petición de los pollos y asegurar que las posibles diferencias que se encontrasen no fuesen debidas a diferencias iniciales en la necesidad nutricional, los pollos deben estar saciados al inicio del experimento. Para poder cuantificar el comportamiento de petición se realizaron a los pollos 4 test de petición, a los 15, 30, 60 y 90 minutos tras haber recibido la última ceba. Para la realización de los test los pollos eran llevados a una habitación adyacente de forma individual en donde mediante la reproducción de la llamada de ceba parental se estimulaba la petición de alimento. Dado que en ocasiones los pollos podían estar dormidos, y pudiera no producirse respuesta debido a esto, en cada test se reproducía 3 veces el mencionado estímulo, esperando entre cada reproducción a que el pollo dejase de pedir de forma voluntaria. Estos test



que reflejan el comportamiento de petición fueron grabados mediante una cámara de video digital Handycam HDR-XR155E (Sony®) y posteriormente analizados mediante el programa JWatcher 1.0 (Blumstein & Daniel, 2007) de forma ciega respecto al estado parasitario del nido de origen. Los datos obtenidos del análisis de los videos nos permitió determinar el tiempo e intensidad de petición (según lo descrito en el apartado anterior), así como también la latencia de petición, entendida como el tiempo transcurrido desde el inicio de la reproducción del estímulo hasta el inicio de la petición por parte del pollo.

Una vez finalizado el experimento los pollos fueron alimentados *ad libitum*, marcados con rotuladores no tóxicos y devueltos a sus nidos, al igual que en el apartado anterior. En total los pollos que participaron en este experimento permanecieron menos de 24 horas fuera de sus nidos de origen. De nuevo, durante los días posteriores, se visitó de forma regular los nidos para comprobar el estado de los pollos. De los 36 pollos que participaron en el experimento 33 abandonaron el nido con éxito y 3 murieron de causas naturales no relacionadas con el diseño experimental.

A la vez que los protocolos descritos, y llevados a cabo durante el día 13 de vida de los pollos, también se determina el estado parasitario, en cuanto a ácaros *Dermanyssus gallinoide* y *Dermanyssus gallinae* se refiere, de los nidos. Para ello los pollos se colocan dentro de una bolsa de algodón durante 5 minutos, comprobando una vez devueltos al nido la presencia o no de ácaros adheridos a la tela. Se ha comprobado que esta estimación está fuertemente correlacionada con el número de ácaros en el nido tras el análisis del material de nido mediante el uso de embudos de Berlese (Merino & Potti, 1995). La no presencia de ácaros en la bolsa implicaría la ausencia de parásitos o al menos una carga parasitaria lo suficientemente baja como para no causar efectos negativos sobre la condición física de los pollos. Para determinar el parasitismo por parte de larvas de la mosca *Protocalliphora azurea*, una vez que los pollos abandonan el nido, el material del mismo es examinado para contabilizar la presencia de larvas y pupas de dicha especie. Aunque nuestra estimación de la carga parasitaria se realiza después de haber realizado el experimento, podemos asegurar que reflejan la carga parasitaria en el momento de ser llevados al laboratorio ya que los

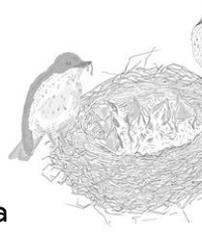


parásitos precisan de 10-36 días para completar sus ciclos vitales (Bruneau et al., 2001; Gold et al., 1989) y porque ambos tipos de parásitos suelen ser detectados previamente y con un nivel de parasitismo similar al encontrado al realizar la estima (C. Camacho, D. Canal & J. Potti, datos no publicados). Además, esto nos ha permitido la realización del experimento de forma ciega respecto a la carga parasitaria de los nidos.

Metodología específica en la simulación de una variante fenotípica que presente una petición exagerada y la cuantificación de los costes y beneficios relativos a los fenotipos salvajes

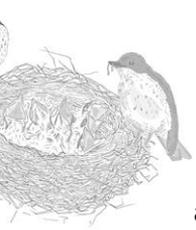
La mayoría de los modelos teóricos desarrollados nos indican que el comportamiento de petición se encuentra en un equilibrio evolutivo en el cual los pollos seleccionan libremente el esfuerzo invertido en la señalización alcanzando un nivel óptimo en la relación B/C que maximiza su eficacia biológica y en el que la señalización sería honesta. Dada esta asunción, si los pollos variaran su comportamiento de petición, saliendo de este punto óptimo, deberían sufrir un efecto negativo en su eficacia biológica.

Para testar dicha hipótesis se desarrolló un experimento durante la época reproductora en los años 2011, 2012 y 2013, en el que participaron 863 pollos de 173 nidos diferentes. Este diseño experimental simula la aparición de una nueva variante fenotípica que presenta un comportamiento de petición exagerado en comparación con el mostrado por los pollos del fenotipo salvaje dentro de la misma población. Para simular este fenotipo con petición exagerada se utilizó ciproheptadina (CPH), un fármaco inhibidor de la serotonina que actúa a nivel hipotalámico estimulando el apetito sin causar efectos nocivos en el individuo (Martín-Gálvez et al., 2011). Se crearon tres tipos de nidada: experimental (NE), en la que a todos los pollos se les suministraba CPH (pollos CC), control (NC) en la que a todos los pollos de la nidada se les suministraba agua (pollos AA)



y mixta (NM), en la que la mitad de los pollos recibían CPH (pollos MC) y la otra mitad agua (pollos MA). En las nidadas NM los pollos se clasificaban en función de su masa asignando alternativamente los tratamientos y alternando el orden entre nidos. La asignación de los nidos a los 3 tipos diferentes de nidada se realizó de forma balanceada en función de la fecha de eclosión y del tamaño de la nidada en el día 3 de vida de los pollos, minimizando así un posible sesgo en el muestreo. La CPH tiene una vida media en el organismo de 12 horas tras su administración (Norris et al., 1998), por lo que se suministraba diariamente a primera hora de la mañana para asegurar que durante el día, momento en que se produce la ceba activa por parte de los padres, los niveles plasmáticos de la CPH fueran efectivos. Las dosis de CPH eran suministradas por vía oral, mediante una jeringuilla de 0,5 ml, utilizando una solución acuosa de CPH (SIGMA 279072) a una concentración de 90 mg/L, desde los 3 a los 11 días de edad de los pollos. Las dosis eran diariamente ajustadas en función del peso de cada pollo según la fórmula $Dosis\ CPH\ (ml / g) = 0,02\ ml \times masa\ del\ pollo\ (g)$. Para ello los pollos eran pesados diariamente con una balanza electrónica de precisión (0,01 g) y marcados individualmente con rotuladores no tóxicos para su identificación individual. Los pollos a los que en lugar de la CPH se les suministraba agua fueron tratados de la misma forma descrita para evitar cualquier tipo de diferencias que pudiera ocasionar esta manipulación.

Para examinar el coste de crecimiento se utilizaron los pesos obtenidos de la medición diaria entre los 3 y los 11 días de vida de los pollos junto con el peso en su día 13 tomado durante el anillado de los mismos. Esto nos permitió elaborar curvas de crecimiento individuales para comparar las posibles diferencias en la variación de peso y crecimiento de los pollos durante su desarrollo en función de su tratamiento y su tipo de nidada de origen. También se analizó las posibles diferencias en su respuesta inmune celular utilizando el protocolo antes descrito para la inyección de PHA. En este caso se tomaron dos medidas del grosor del patagio, una antes de la inyección durante la mañana del día 12 de vida de los pollos y otra 24 horas después durante el procesado de los pollos en su día 13. De nuevo las diferencias fueron estimadas como las diferencias entre los grosores de ambas mediciones. También, en su día 13 de vida y



aprovechando la extracción de sangre realizada para posteriores análisis hematológicos y sexado molecular, se realizaron frotis sanguíneos (utilizando tinción May Grunwald Giemsa) para un posterior análisis y conteo de tipos de celulares.

Los diferentes tipos de leucocitos circulan mediante el torrente sanguíneo para alcanzar los tejidos y así poder desarrollar el sistema inmune correctamente sus funciones. Por esto, tanto el número como las proporciones de los diferentes tipos de leucocitos presentes en la sangre es representativo del estado del sistema inmune del individuo (Dhabhar et al., 1995). En las aves, los tipos de leucocitos más abundantes en la sangre son los heterófilos y los linfocitos (Campbell, 1995) y la proporción entre ambos tipos, el H/L ratio (Davison et al., 1983; Gross & Siegel, 1983), se ha comprobado como un indicador fiable y preciso del estrés (Maxwell & Robertson, 1998), por ejemplo mostrando una fuerte asociación entre el estrés y el rango de tamaño dentro de la nidada en pollos de cernícalo vulgar (*Falco tinnunculus*) (Martínez-Padilla et al., 2004). Además, se ha demostrado que, dentro de los diferentes parámetros hematológicos, el conteo de heterófilos por 10.000 eritrocitos es la variable que mejor predice la probabilidad de reclutamiento en el papamoscas cerrojillo (Lobato et al., 2005). Basándonos en todo ello, los frotis realizados con la sangre extraída a 238 pollos fueron examinados a una ampliación de 400x con un microscopio (Zeiss Axio Imager A1) con una cámara acoplada (Zeiss AxioCam ERc5s) que posibilitaba tomar fotografías de los campos examinados. En este análisis se contabilizó e identificó 100 leucocitos por frotis, lo que nos permite conocer la fórmula leucocitaria del individuo y con ello la proporción de los diferentes tipos leucocitarios presentes en sangre. Además, para un total de 129 individuos, se contabilizó el número de heterófilos por 10.000 eritrocitos. Para realizar el conteo de eritrocitos se desarrolló el programa Mizutama que, partiendo de las imágenes tomadas de los campos observados, realiza un conteo automatizado de los eritrocitos con un error medio del 1,4 % (Ochoa et al., 2019) (Figura 12).

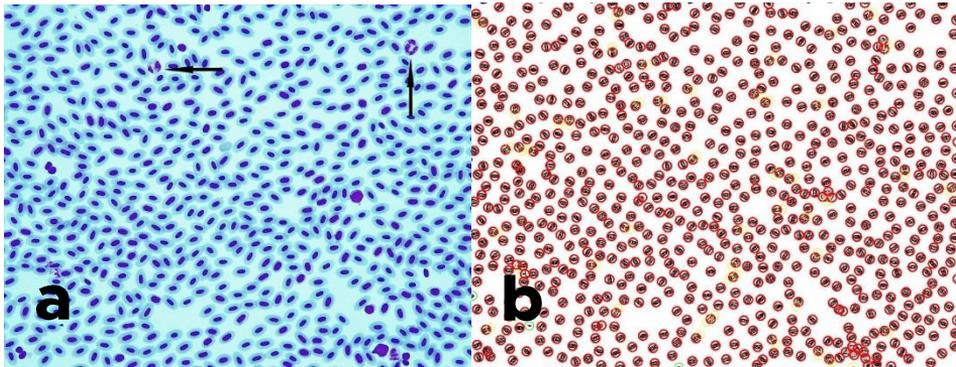
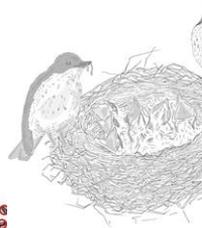
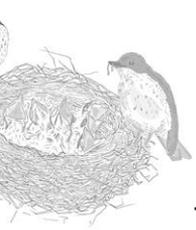


Figura 12: (a) *Imagen de frotis sanguíneo (tinción May Grunwald Giemsa) donde se pueden observar los eritrocitos y los heterófilos (señalados con flechas negras); (b) Imagen de salida del programa Mizutama tras realizar el conteo en la misma imagen (los círculos rojos indican los elementos contabilizados).*

De forma complementaria, durante los años 2011 y 2013, se realizó un experimento en laboratorio con 130 pollos de 65 nidos (12 NE, 21 NC y 32 NM) cuando los pollos tenían 9 días de edad. Para la realización de dicho experimento, en el que se medía el comportamiento de petición, se siguió el protocolo descrito en el apartado anterior tanto para la realización del mismo como para las condiciones, recogida y devolución de los pollos a sus nidos de origen.

Durante el año 2012 se realizaron grabaciones en 56 nidos para obtener información sobre el comportamiento de petición así como de las tasas de ceba de los padres en condiciones naturales. Estas grabaciones se realizaron cuando los pollos tenían 7 días de vida mediante la colocación de cámaras (Sony Go-Pro) durante primera hora de la tarde. Para evitar la aparición de comportamientos anómalos debido a la introducción de un elemento extraño en el nido, el día previo se colocó una cámara señuelo de idéntica apariencia externa para la habituación de los padres. Esto, junto con estudios que demuestran que esta especie tolera la instalación de cámaras sin variar su comportamiento (Martínez de la Puente et al., 2009), nos permite asegurar la naturalidad de los comportamientos registrados. Tras la colocación de la cámara los adultos reanudaron en poco tiempo su comportamiento normal de entrada al nido y de ceba (media de 10,1 min \pm 1,49 SE, N = 39). Fue necesario descartar las grabaciones de 12 nidos por

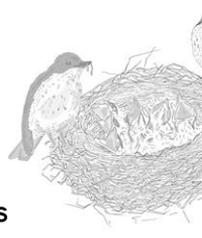


fallos en la iluminación, que imposibilitaron el posterior análisis, y de 5 nidos debido a un comportamiento anómalo de los adultos (latencias en entrar al nido superiores a 40 minutos). Estos videos fueron posteriormente analizados mediante el programa JWatcher 1.0 (Blumstein & Daniel, 2007). Se estableció el comienzo del análisis en el inicio del minuto anterior a la primera aparición de uno de los adultos y se excluyó del tiempo total analizado los periodos en que no todos los pollos eran visibles, dando lugar a un tiempo medio de análisis por nido de 86,02 min ($\pm 5,4$ SE, N = 39). Los análisis fueron realizados de forma ciega respecto al tipo de nidada y al tratamiento de los pollos. En el análisis de los videos se registraron las tasas de cebs por parte de ambos adultos y el esfuerzo de petición de los pollos entendido como tiempo de petición. Para ello en cada instante del análisis se registró el número de pollos que realizaban la petición, a partir de lo cual se pudo calcular el tiempo medio de petición de los pollos así como la tasa global de petición en el nido.

Análisis de datos

Análisis estadísticos para la determinación de los costes asociados a las señales en términos de crecimiento e inmunocompetencia

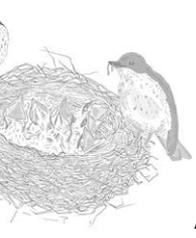
En el análisis estadístico de estos datos se utilizaron modelos lineales mixtos ajustados por la estimación de máxima verosimilitud restringida (en adelante REML-LMM; Zuur et al., 2009), mediante el paquete “nlme” (Pinheiro et al., 2012) en R (R Development Core Team 2012). En cada modelo, “Nido de origen” fue introducido como factor aleatorio para controlar la varianza entre nidos y permitiéndonos prever con ello problemas de independencia estadística (Hurlbert, 1984). En algunos modelos, “Masa inicial” y “Alimento consumido” fueron introducidos como predictores para examinar los posibles efectos sobre las variables dependientes. En todos los modelos se comprobó la homocedasticidad (residuos vs valores ajustados). La variable



“Tiempo de petición” se transformó por el logaritmo para cumplir los requerimientos necesarios de homocedasticidad. También se comprobó de forma visual la normalidad de los residuos, mediante gráficos Q-Q, que en ningún caso se desviaron de una distribución normal de acuerdo a los test Kolmogorow-Smirnov (Queen et al., 2002). Las medias se dan con el error estándar (SE).

Análisis estadísticos para la determinación del efecto de la carga parasitaria sobre el comportamiento de petición

De nuevo, para el análisis estadístico de los datos se utilizaron modelos lineales mixtos ajustados por la estimación de máxima verosimilitud restringida (en adelante REML-LMM; Zuur et al., 2009), mediante el paquete “nlme” (Pinheiro et al., 2012) en R (R Development Core Team 2012). En cada modelo “Identidad del pollo” dentro de “Nido de origen” a su vez dentro de “Año” fue introducido como factor aleatorio para controlar por la varianza entre años, nidos y medidas repetidas de pollos (Gelman & Hill, 2006). Como predictores fijos se usó “Privación” (con 4 niveles: 15, 30, 60 y 90 min desde la última ceba), “Estado parasitario” (con 4 niveles: no infectado, infectado sólo por ácaros, infectado sólo por *Protocalliphora* e infectado por ambos), y sus interacciones. Sin embargo, dado que no hubo diferencias en las variables dependientes entre los nidos parasitados por ácaros, por *Protocalliphora* o ambos (*ANOVA*, $F_{2,27} < 1.40$, $P > 0.25$ para todas las variables de petición y todos los niveles de privación de alimento; Información suplementaria en Tabla 4 y Figura 17), se repitieron los análisis con dos niveles para “Estado parasitario”: infectado y no infectado. Se introdujeron como variables dependientes “Latencia”, “Intensidad” y “Tiempo de petición”. Para cada modelo se comprobó la homocedasticidad y la normalidad de los residuos. Las medias se dan con un error estándar (SE). Los efectos principales fueron analizados mediante un modelo tipo III, que es lo recomendado para diseños no equilibrados (Queen et al., 2002).

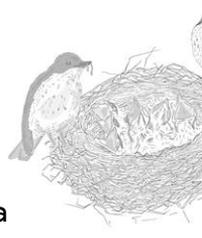


Análisis estadísticos para la simulación de una variante fenotípica que presente una petición exagerada y la cuantificación de los costes y beneficios relativos a los fenotipos salvajes

Para el análisis estadístico de los datos se utilizaron modelos lineales mixtos ajustados por la estimación de máxima verosimilitud restringida (en adelante REML-LMM; Zuur et al., 2009), mediante el paquete “nlme” (Pinheiro et al., 2012) en R (R Development Core Team 2012). En cada modelo “Identidad del pollo” dentro de “Nido de origen” fue introducido como factor aleatorio para controlar la varianza entre nidos (Gelman & Hill, 2006). Para los análisis de los datos correspondientes al comportamiento de petición con las variables dependientes “Latencia”, “Intensidad” y “Tiempo de petición” se utilizaron como factores fijos “Privación” (con 4 niveles: 15, 30, 60 y 90 min desde la última ceiba) y “Tratamiento del pollo” (con 4 niveles: CC, MC, MA y AA, correspondientes a los 4 tratamientos) y sus interacciones. En los análisis de las variables dependientes “Crecimiento”, “Condición física”, “Peso 13d”, “Tarso 13d”, “H/L ratio” y “Respuesta inmune” se utilizó como factor fijo “Tratamiento del pollo” (con 4 niveles: CC, MC, MA y AA).

En los análisis relativos a los datos del conteo del número de heterófilos por cada 10.000 eritrocitos se realizó un modelo lineal generalizado mixto (GLMM) con “Tratamiento del pollo” (con 4 niveles: CC, MC, MA y AA, correspondientes a los 4 tratamientos) como factor fijo y “Nido” como factor random y una distribución de Poisson para distribución de errores y la presencia de ceros en los datos (Martin et al., 2005; Zuur et al., 2009) mediante el paquete “glmmTMB” (Brooks et al., 2017). Para realizar la comparativa entre los diferentes tratamientos se realizó un test de Tukey Post-hoc utilizando la función “glht” del paquete “multcomp” (Bretz et al., 2016) con “Nido” como factor random.

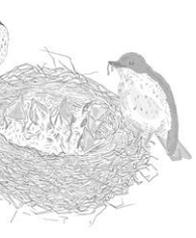
Para el análisis de los datos correspondientes a la prevalencia y abundancia de ácaros y protocaliforas, así como para la tasa de mortalidad, se utilizaron modelos lineales generales (GLM) asociados a una función

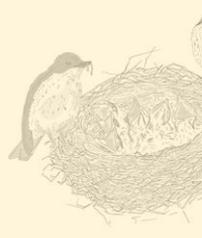


logit con una distribución binomial, para prevalencias y mortalidad, y una distribución binomial negativa para las abundancias. “Tratamiento del nido” (3 niveles: NE, NM y NC) fue utilizado como factor fijo.

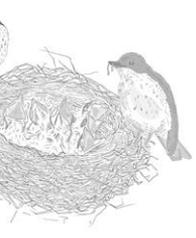
En los análisis estadísticos de los datos correspondientes a las grabaciones realizadas en las cajas nido en condiciones naturales durante el año 2012 se utilizaron modelos lineales introduciendo como factor fijo “Tratamiento del nido” (3 niveles: NE, NM y NC). “Fecha” fue añadido a los modelos como variable independiente al encontrar una fuerte correlación significativa con los tiempos de petición en el nido (ver apartado correspondiente en Resultados).

Para cada modelo se comprobó la homocedasticidad y la normalidad de los residuos y las medias se dieron con un error estándar (SE).





RESULTADOS

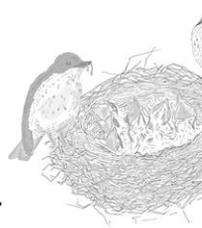


Resultados de la determinación de los costes asociados a las señales en términos de crecimiento e inmunocompetencia

Efecto del tratamiento en el tiempo e intensidad de petición

Los tratamientos mostraron diferencias significativas, tanto en el tiempo como en la intensidad de petición. Los pollos PA pidieron durante una media de 51.18s (\pm 2.57 SE) y con una intensidad media de 2.14 (\pm 0.04, SE), frente a sus hermanos PB que pidieron de media 3.43 (\pm 0.32 SE) y con una intensidad media de 1.78 (\pm 0.07 SE) (Tabla 1). La variación tanto en tiempo como en la intensidad de petición fue explicada de forma mayoritaria por el tratamiento (Tabla 2). La repetibilidad individual de la petición de los pollos entre 4 de los diferentes episodios grabados fue baja (Tabla 2).

Con el análisis de las grabaciones en los nidos el año previo a la realización del experimento se comprobó que los pollos en condiciones naturales pedían alimento en cortos episodios de petición (4.8s \pm 1.23 SE, rango total 0.1-21.5s, rango medio por pollo 3.1-8.5s). Por lo tanto, el esfuerzo de petición realizado por los pollos PA en cada episodio de ceba rebasó notablemente el rango natural que presenta esta especie (Figura 13). Sin embargo, dado que los episodios de ceba se producían cada 45 min, la tasa de petición por hora de los pollos PA (68.24 s/h \pm 3.42 SE) estuvo dentro del rango presente en los nidos (135 s/h \pm 29.4 SE, rango 21-344 s/h).



	PB (n = 20)	PA (n = 20)	gl	Tratamiento, F'
Masa corporal inicial (M1) (g)	7.79 ± 0.21	7.76 ± 0.22	1, 19	0.05ns
Alimento consumido (MI) (g)	3.93 ± 0.08	3.96 ± 0.07	1, 19	0.60ns
Masa fecal total (MH) (g)	1.25 ± 0.08	1.32 ± 0.10	1, 19	0.32ns
Masa fecal a las 13:00h (%)	24.1 ± 2.85	30.6 ± 1.91	1, 19	3.96ns
Tiempo de petición (s/ceba)	3.43 ± 0.32	51.18 ± 2.57	1, 19	662.7***
Intensidad de petición	1.78 ± 0.07	2.14 ± 0.04	1, 19	21.70***
Variación masa diurna (VMD) (g)	2.02 ± 0.06	1.85 ± 0.06	1, 19	7.46**
Variación masa nocturna (VMN) (g)	-1.16 ± 0.05	-1.00 ± 0.04	1, 19	5.21*
Variación masa total (VMT) (g)	0.87 ± 0.09	0.85 ± 0.07	1, 19	0.02ns
Gasto metabólico (MGM) (g)	1.78 ± 0.11	1.73 ± 0.08	1, 17	0.24ns
Respuesta inmune diurna (PVD) (mm)	4.21 ± 0.19	3.41 ± 0.19	1, 19	28.30***
Respuesta inmune nocturna (PVN) (mm)	-0.43 ± 0.21	-0.15 ± 0.12	1, 19	1.90ns
Respuesta inmune nocturna (PVT) (mm)	3.78 ± 0.22	3.25 ± 0.14	1, 19	11.31**

Tabla 1: Media \pm SE para cada variable medida en el estudio y el efecto del tratamiento (como factor fijo), controlando por nido (factor aleatorio). Los valores de F se obtuvieron con un modelo REML-LMM. El tiempo de petición se transformó con una función logarítmica antes de los análisis. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ns como no significativo.

	gl	Tiempo de petición		Intensidad de petición	
		MS	F'	MS	F'
Efecto					
Tratamiento	2	6989.65	7642.64***	315.28	1223.29***
Pollo (tratamiento)	38	0.92	3.64***	0.26	2.54***
Error	117	0.25			
Repetibilidad (coeficiente de correlación intraclase)					
PA		0.45***		0.52***	
PB		0.22*		0.33***	

Tabla 2: Análisis de la estimación de la varianza de los componentes de la varianza debido al tratamiento (factor fijo) y pollo (factor aleatorio) en el tiempo y la intensidad de petición. La repetibilidad de las variables del comportamiento de petición en los 4 episodios de petición analizados para cada tratamiento (PA y PB) indican la fracción total de varianza explicada por "Nido" como factor aleatorio. El tiempo de petición se transformó con una función logarítmica antes de los análisis. *P < 0.05, ***P < 0.001.

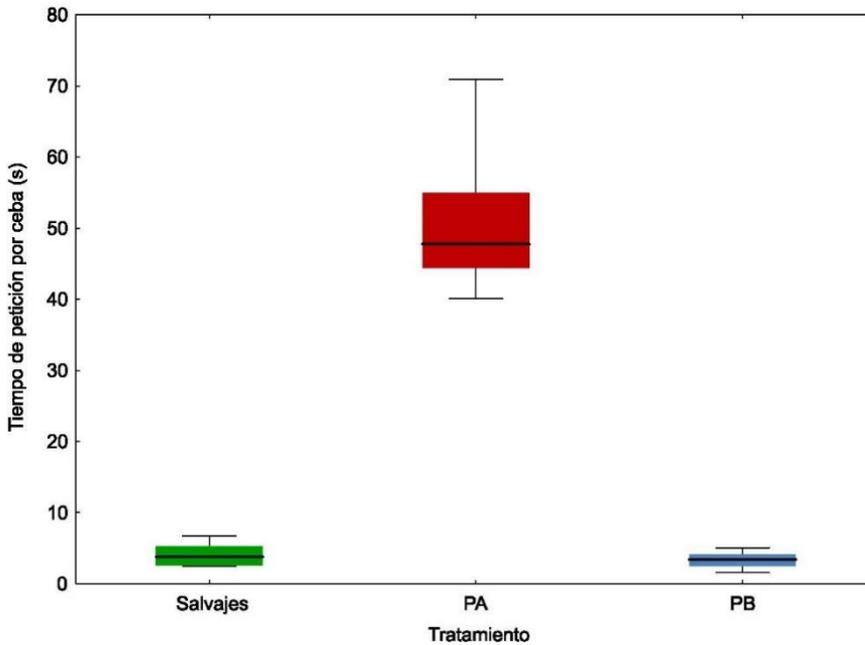
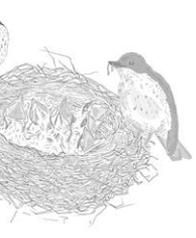
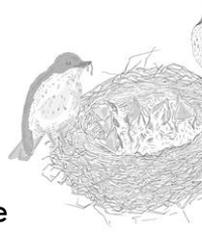


Figura 13: Tiempo de petición en cada uno de los 4 episodios de petición analizados por individuos para los pollos PA, PB y para los pollos en condiciones naturales. Se muestra las medianas (línea negra), el rango intercuartil (cajas) y el rango percentil 10-90 (barras de error).

Efecto del tratamiento sobre el incremento de peso y el gasto metabólico

No hubo diferencias significativas en la masa inicial ni en la cantidad de alimento consumido durante el experimento entre los pollos de los diferentes tratamientos (PA y PB) (Tabla 1). Sí hubo diferencias en la variación de la masa diurna (V_{MD}), periodo durante el cual se realizaron los episodios de ceba y petición, mostrando los pollos PA un incremento significativamente menor que los pollos PB (Tabla 1). Además, la variación de la masa durante el periodo diurno no se vio significativamente afectada ni por la masa inicial ($F_{1, 19} = 0.24, P = 0.63$), ni por la cantidad de alimento consumido ($F_{1, 19} = 0.46, P = 0.51$). Por lo tanto, el efecto del tratamiento en la variación de la masa durante el día siguió



siendo significativo al incluir en los modelos la masa inicial y la cantidad de alimento consumido ($\chi^2 = 7.82, P = 0.005$). Sin embargo, al analizar la variación de la masa diaria total (V_{MT}), la correspondiente a 24 horas, no se encontraron diferencias significativas entre ambos tratamientos (Tabla 1). Al igual que ocurrió en el análisis anterior, la variación de la masa total (V_{MT}) no se vio afectada significativamente ni por la masa inicial ($F_{1, 19} = 1.06, P = 0.32$), ni por la cantidad de alimento consumido ($F_{1, 19} = 0.02, P = 0.89$). Al incluir estas dos variables en los modelos no hubo diferencias en los resultados ($\chi^2 = 0.20, P = 0.65$). La discrepancia entre la variación de masa diurna (V_{MD}) y la variación de la masa total (V_{MT}) fue explicada porque los pollos PA sufrieron una pérdida de masa nocturna, durante el periodo de descanso, significativamente menor que los pollos PB (Tabla 1). En este caso, la masa inicial influyó negativamente en la pérdida de masa durante la noche ($\beta = -0.39, F_{1, 19} = 6.82, P = 0.017$), mientras que la cantidad de alimento consumido no tuvo efecto sobre los resultados ($F_{1, 19} = 2.19, P = 0.15$). A pesar de esto, el efecto del tratamiento sobre la variación de las masas durante la noche siguió siendo significativo al controlar por la masa inicial y por la cantidad de alimento consumido ($\chi^2 = 4.84, P = 0.028$). Por lo tanto, estos resultados muestran que los pollos PA crecieron menos durante el día, periodo en el que se realizaron los episodios de ceba y petición, que los pollos PB, pero perdieron menos masa durante el periodo de descanso nocturno, conllevando por ello unas tasas de crecimiento similares entre los tratamientos en el periodo total de 24 horas (Figura 14).

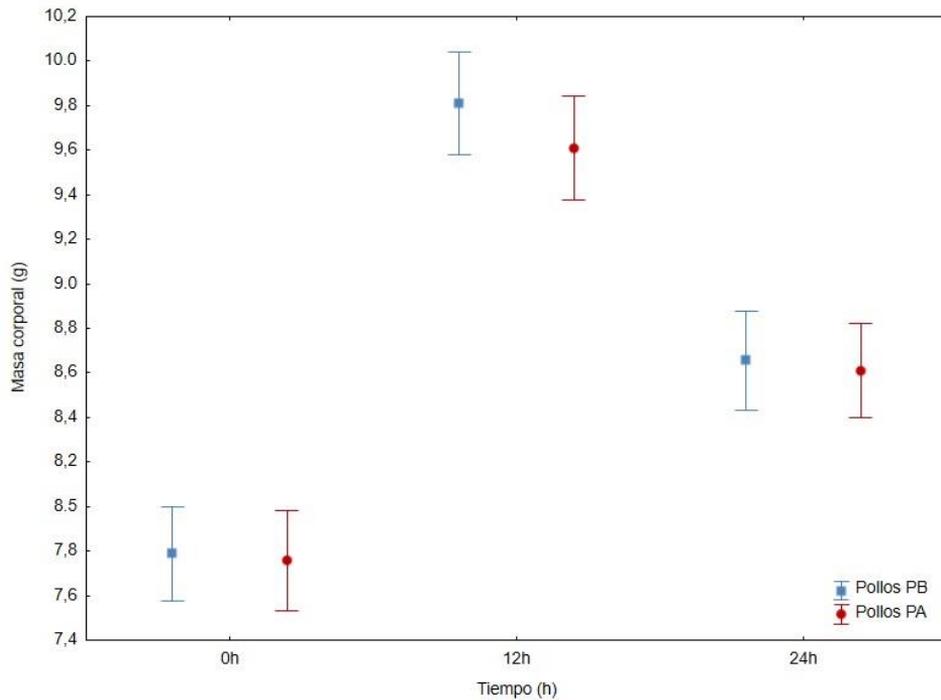
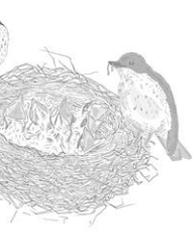
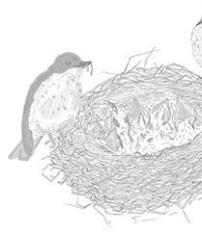


Figura 14: Variación de la masa de los pollos PA (puntos rojos) y PB (puntos azules) al inicio del experimento (0h), al final de la fase diurna (12h) y a las 24h. Las barras de error indican el SE respecto a la media.

Respecto a la masa perdida atribuible al gasto metabólico (M_{GM}), no hubo diferencias significativas entre tratamientos (Tabla 1), aunque sí representa una fracción mayor de la ganancia de masa diurna en los pollos PA ($40.0\% \pm 4.04$) que en los pollos PB ($32.5\% \pm 5.08$), pero sin que esta diferencia sea significativa ($F_{1, 17} = 1.16$, $P = 0.29$). La diferencia en pérdida de masa atribuible al gasto metabólico asociado a la petición (DM_{GM}) fue de $0.09\text{g} (\pm 0.087, N = 18)$, no estando correlacionada con las diferencias entre cada pareja de pollos hermanos (PA y PB) en cuanto a tiempo de petición ($r = -0.10$, no significativo), ni a intensidad de petición ($r = 0.05$, no significativo).

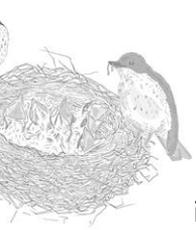


Efecto del tratamiento sobre la producción de masa fecal

La producción de masa fecal total no mostró diferencias significativas en función de los tratamientos considerando la masa fecal excretada durante todo el periodo diurno en el que se desarrollaron los episodios (Tabla 1). Sin embargo, los pollos PA sí excretaron una fracción marginalmente mayor ($P = 0.061$) de masa fecal durante la primera mitad del día que los pollos PB (Tabla 1). En los pollos PA, el tiempo de petición tuvo un efecto marginalmente positivo en la cantidad de heces excretadas durante la primera mitad del periodo diurno de actividad controlando por la cantidad de alimento consumida ($\beta = 0.39$, $F_{1, 19} = 3.98$, $P = 0.062$) pero esta tendencia no se observó en los pollos PB ($\beta = -0.04$, $F_{1, 19} = 0.02$, $P = 0.88$). Estos datos sugieren que la petición de alimento tiene un efecto leve y a corto plazo sobre la dinámica digestiva de los pollos.

Efecto del tratamiento sobre la respuesta inmune celular

Los pollos PA, que pidieron durante más tiempo y a una mayor intensidad, presentaron una respuesta inmune celular significativamente menor a las 12 horas que los pollos PB (Tabla 1; Figura 15). La respuesta inmune celular a las 12 horas no se vio afectada ni por la masa inicial ($F_{1, 19} = 2.85$, $P = 0.11$), ni por la cantidad de alimento consumido ($F_{1, 19} = 2.48$, $P = 0.13$). Una vez incluidas en el modelo, los resultados no variaron, permaneciendo un efecto significativo del tratamiento ($\chi^2 = 27.80$, $P < 0.001$). Al analizar los datos tomados a las 24 horas, los pollos PA siguieron mostrando una respuesta inmune celular significativamente menor que los pollos PB (Tabla 1; Figura 15). De nuevo, ni la masa inicial ($F_{1, 19} = 0.26$, $P = 0.62$), ni la cantidad de alimento consumido ($F_{1, 19} = 2.51$, $P = 0.13$) tuvieron efecto y al incluirlos en el modelo los resultados no se vieron afectados cualitativamente, permaneciendo significativos ($\chi^2 = 10.05$, $P = 0.0015$). Independientemente del tratamiento, la respuesta inmune celular disminuyó durante la noche (Prueba T para muestras pareadas, $t = -2.36$, $P = 0.023$; Tabla 1). Una vez más, ni la masa



inicial ($F_{1, 19} = 0.85, P = 0.37$), ni la cantidad de alimento consumido ($F_{1, 19} < 0.01, P = 0.95$) afectaron a la respuesta inmune celular durante la noche pero su inclusión en el modelo, aunque no alteró cualitativamente los resultados, sí los hizo marginalmente no significativos ($\chi^2 = 2.97, P = 0.08$).

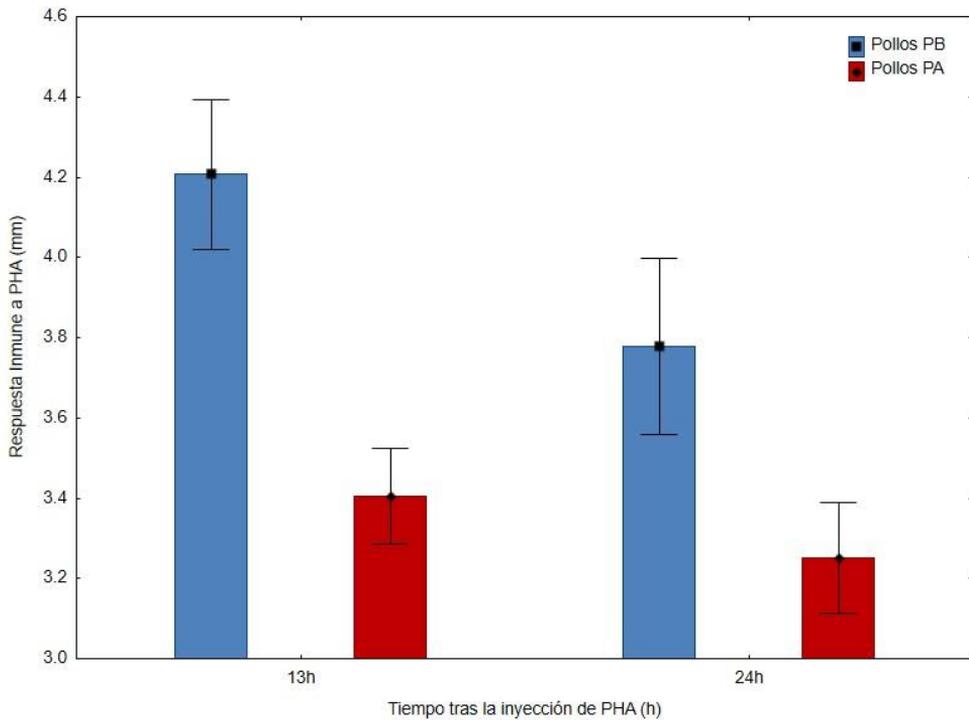
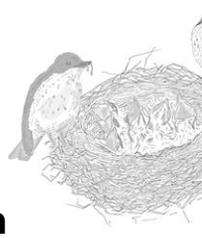


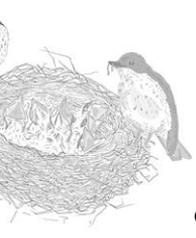
Figura 15: Variación en la respuesta inmune mediada por células T a la PHA en los pollos PA y PB tras 13h y 24h tras la inoculación. Las barras de error indican el SE respecto a la media.



Resultados de la determinación del efecto de la carga parasitaria sobre el comportamiento de petición

Efecto del estado parasitario sobre el comportamiento de petición

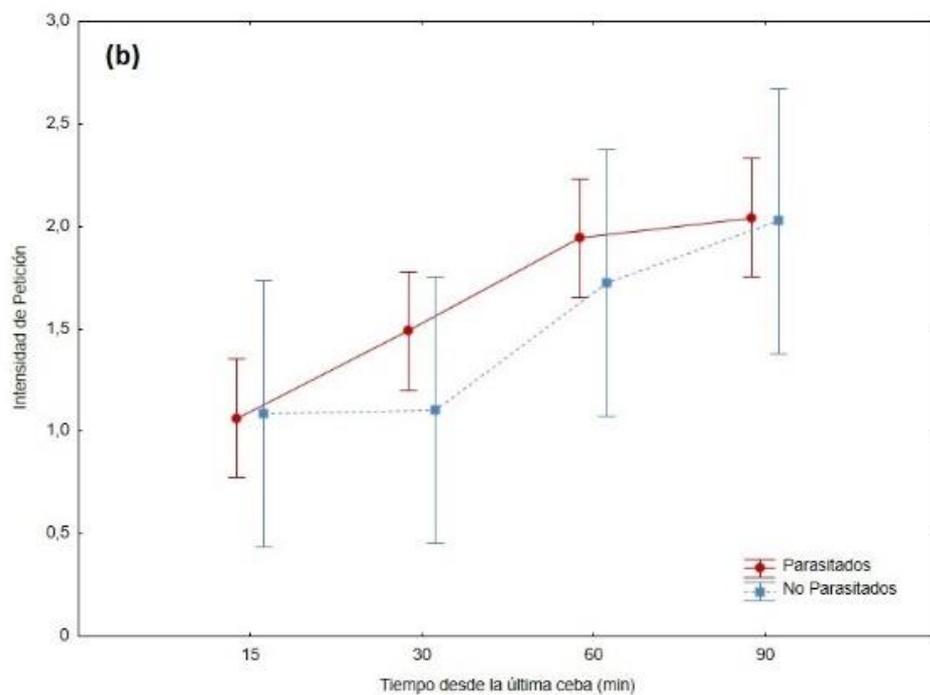
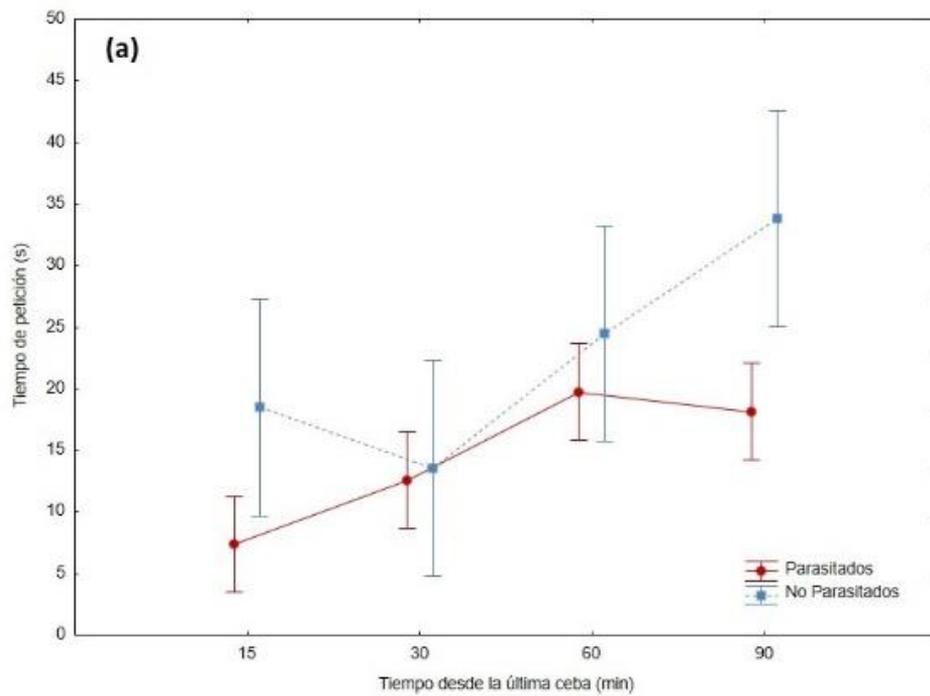
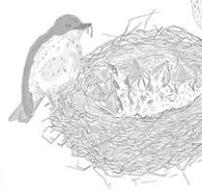
Para los análisis realizados en este apartado se utilizaron un total de 18 nidos (3 no infectados, 5 infectados por larvas de *Protocalliphora azurea*, 4 infectados por los ácaros hematófagos *Dermanyssus gallinoide* y *Dermanyssus gallinae* y 6 infectados por ambos tipos de parásitos) tomando de cada uno una pareja de pollos hermanos. Los nidos presentaron una media de 9.18 ± 6.26 ácaros (rango: 0-71) y 5.45 ± 2.57 protocalliforas (rango: 0-29). No se encontraron diferencias respecto al estado parasitario en función de la fecha de eclosión ($F_{3,14} = 0.49$, $P = 0.70$), tamaño de la nidada ($F_{3,14} = 0.70$, $P = 0.57$), ni con el peso de los pollos en su día 8 de vida ($F_{3,14} = 0.64$, $P = 0.60$). En los pollos que sobrevivieron hasta abandonar el nido (33 de los 36), no se encontraron diferencias en la longitud del tarso en su día 13 de vida ($F_{3,29} = 1.24$, $P = 0.31$). Sin embargo, sí se encontró evidencia, aunque débil, de que los pollos provenientes de los nidos no parasitados pesaban más en su día 13 de vida ($F_{3,29} = 2.89$, $P = 0.052$), lo que sugiere que la infección por ectoparásitos debe tener un efecto negativo en el crecimiento de los pollos. Al examinar dos de las medidas del comportamiento de petición, la latencia y la intensidad con la que los pollos pedían, se encontró que ambas medidas aumentaban en función del nivel de hambre independientemente del estado parasitario (Tabla 3; Figura 16). Por el contrario, al analizar el tiempo de petición sí se encontraron diferencias significativas, siendo menor el tiempo empleado pidiendo en los pollos que provenían de nidos parasitados (Tabla 3; Figura 16a). Las diferencias encontradas fueron mayores en el nivel más alto de privación de alimento, reflejándose en la interacción significativa entre nivel de hambre y estado parasitario (Tabla 3; Figura 16a). A los 90 minutos de haber recibido la última ceiba, las diferencias en el tiempo de petición entre pollos variaron en función de su



estado parasitario de forma altamente significativa ($\chi^2 = 10.85, P < 0.001$). Sin embargo, no lo fueron en los test realizados a los 30 y 60 minutos tras la última cebsa ($P > 0.65$), ni en el realizado a los 15 minutos, aunque los resultados estuvieron próximos a ser significativos ($\chi^2 = 3.42, P = 0.064$). Los modelos estadísticos se repitieron considerando 4 niveles de estado parasitario (no infectado, infectado sólo por ácaros, infectado sólo por *Protocalliphora* e infectado por ambos) siendo los resultados cualitativamente similares (Tabla 4; Figura 17).

	χ^2	gl	P
Tiempo de petición			
Nivel de hambre	35.82	3	< 0.001
Estado parasitario	3.91	1	0.048
Nivel de hambre*Estado parasitario	16.83	3	< 0.001
Intensidad de petición			
Nivel de hambre	9.67	3	0.022
Estado parasitario	0.02	1	0.88
Nivel de hambre*Estado parasitario	1.34	3	0.72
Latencia de petición			
Nivel de hambre	5.59	3	0.13
Estado parasitario	0.5	1	0.48
Nivel de hambre*Estado parasitario	2.8	3	0.42

Tabla 3: Resultados del modelo REML-LMM para analizar el efecto del nivel de hambre (4 niveles: 15, 30, 60 y 90 minutos desde la última cebsa), del estado parasitario (2 niveles: parasitado y no parasitado) y su interacción, para las variables tiempo, intensidad y latencia de petición. Para cada modelo identidad del pollo ($n = 36$), dentro de nido de origen ($n = 18$), a su vez dentro de año fueron introducidos como factores aleatorios para controlar las varianza entre años, nidos y medidas repetidas de los pollos.



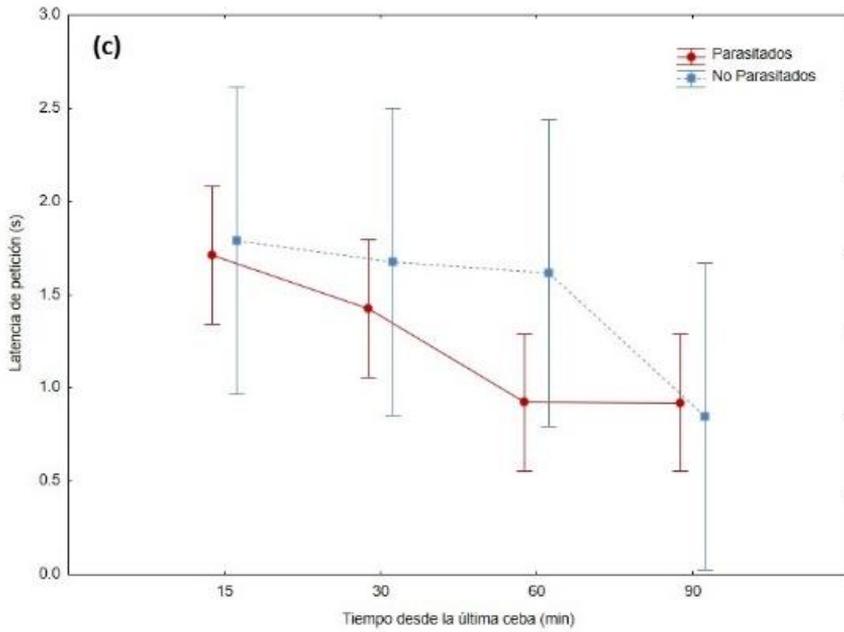
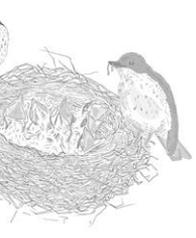
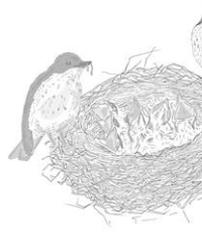
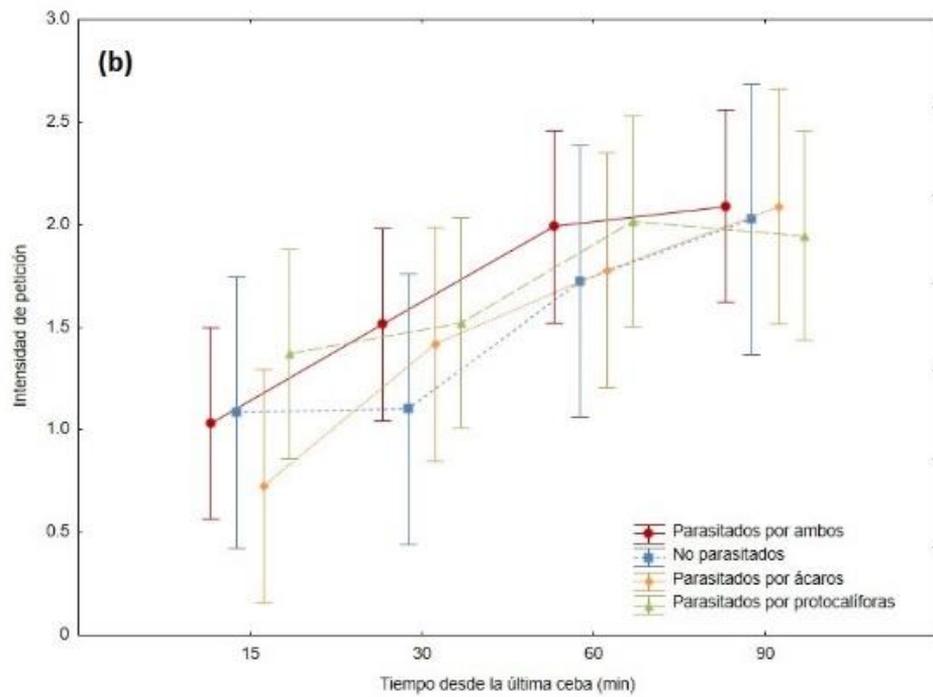
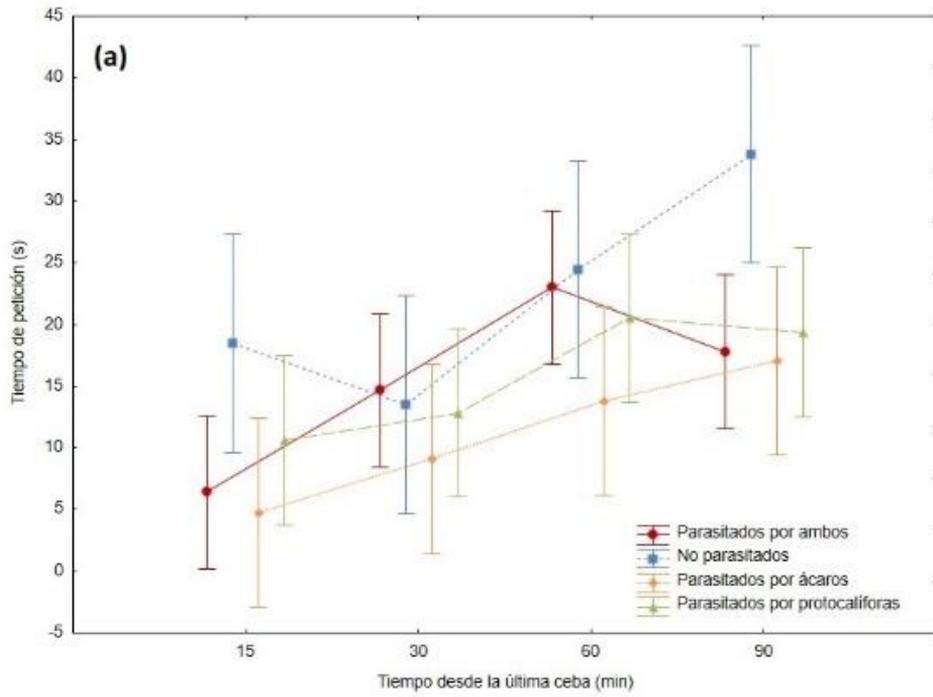
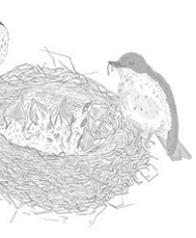


Figura 16: Valores medios, con intervalos de confianza del 95%, del Tiempo de petición (a), Intensidad de petición (b) y Latencia de petición (c) para cada nivel de hambre (tiempo transcurrido tras la última ceiba) y el estado parasitario del nido (no infectados, $n = 6$: cuadros azules; infectados, $n = 30$: puntos rojos).



	χ^2	gl	P
Tiempo de petición			
Nivel de hambre	46.15	3	< 0.001
Estado parasitario	6.9	3	0.075
Nivel de hambre*Estado parasitario	24.85	9	0.003
Intensidad de petición			
Nivel de hambre	20.44	3	< 0.001
Estado parasitario	2.56	3	0.46
Nivel de hambre*Estado parasitario	4.98	9	0.84
Latencia de petición			
Nivel de hambre	7.61	3	0.055
Estado parasitario	1.67	3	0.64
Nivel de hambre*Estado parasitario	8.89	9	0.45

Tabla 4: Resultados del modelo REML-LMM para analizar el efecto del nivel de hambre (4 niveles: 15, 30, 60 y 90 minutos desde la última cebs), del estado parasitario (4 niveles: no parasitado, parasitado por ácaros, parasitado por protocalíforas y parasitado por ambos) y su interacción, para las variables tiempo, intensidad y latencia de petición. Para cada modelo identidad del pollo ($n = 36$), dentro de nido de origen ($n = 18$), a su vez dentro de año fueron introducidos como factores aleatorios para controlar las varianza entre años, nidos y medidas repetidas de los pollos.



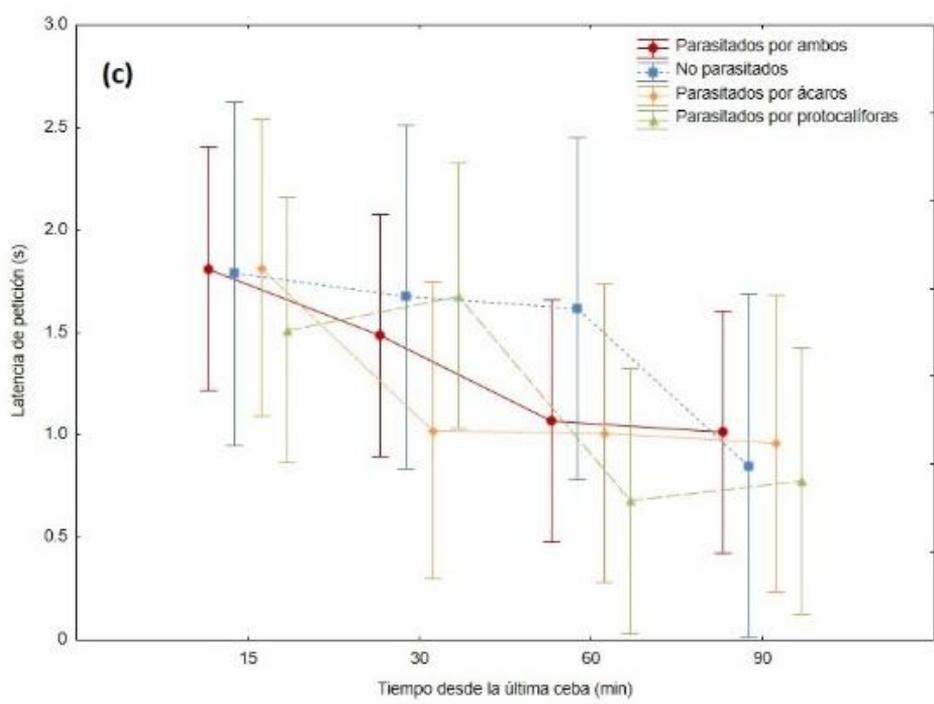
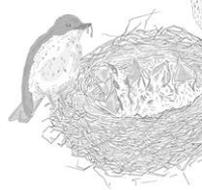
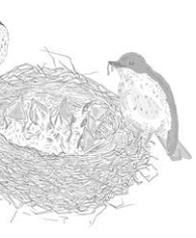


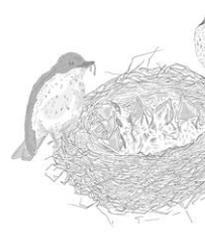
Figura 17: Valores medios, con intervalos de confianza del 95%, del Tiempo de petición (a), Intensidad de petición (b) y Latencia de petición (c) para cada nivel de hambre (tiempo transcurrido tras la última cebs) y el estado parasitario del nido (no infectados, $n = 6$: cuadrados azules; infectados por ácaros, $n = 8$: rombos naranjas; infectados por protocaliforas, $n = 10$: triángulos verdes; infectados por ambos, $n = 12$: puntos rojos).



Resultados de la simulación de una variante fenotípica que presente una petición exagerada y la cuantificación de los costes y beneficios relativos a los fenotipos salvajes

Efecto del tratamiento sobre el comportamiento de petición en laboratorio

La intensidad de petición aumentó de forma significativa en función del nivel de hambre (tiempo transcurrido desde la última ceba), encontrándose también diferencias significativas en función del tratamiento (Tabla 5; Figura 18). Sin embargo, el efecto del tratamiento sobre la intensidad de petición sólo fue significativa a los 15 minutos tras haber recibido la última ceba ($F_{3,126} = 4.17$, $P = 0.0075$), estableciéndose el gradiente $CC > MC > MA > AA$ de intensidad de petición (Figura 18). Para el resto de los niveles de privación de alimento el efecto del tratamiento no fue significativo, aunque se observó una tendencia en la que los pollos CC y MC, aquellos a los que se les suministró CPH, mostraron una mayor intensidad de petición que los pollos MA y AA. Esta tendencia fue más marcada en los niveles más bajos de hambre y fue disminuyendo en los niveles más altos en los que los resultados fueron más homogéneos.



	χ^2	gl	P
Tiempo de petición			
Nivel de hambre	82.68	3	< 0.001
Tratamiento pollo	15.95	3	0.001
Nivel de hambre*Tratamiento pollo	22.66	9	0.007
Intensidad de petición			
Nivel de hambre	64.48	3	< 0.001
Tratamiento pollo	8.16	3	0.04
Nivel de hambre*Tratamiento pollo	12.39	9	0.19
Latencia de petición			
Nivel de hambre	9.19	3	0.027
Tratamiento pollo	1.78	3	0.62
Nivel de hambre*Tratamiento pollo	11.99	9	0.21

Tabla 5: Resultados del modelo REML-LMM para analizar el efecto del nivel de hambre (4 niveles: 15, 30, 60 y 90 minutos desde la última cebs), del tratamiento del pollo (4 niveles: CC, MC, MA y AA) y su interacción, para las variables tiempo, intensidad y latencia de petición. Para cada modelo la identidad del pollo anidada dentro del nido de origen fue introducido como factor aleatorio para controlar la varianza entre nidos.

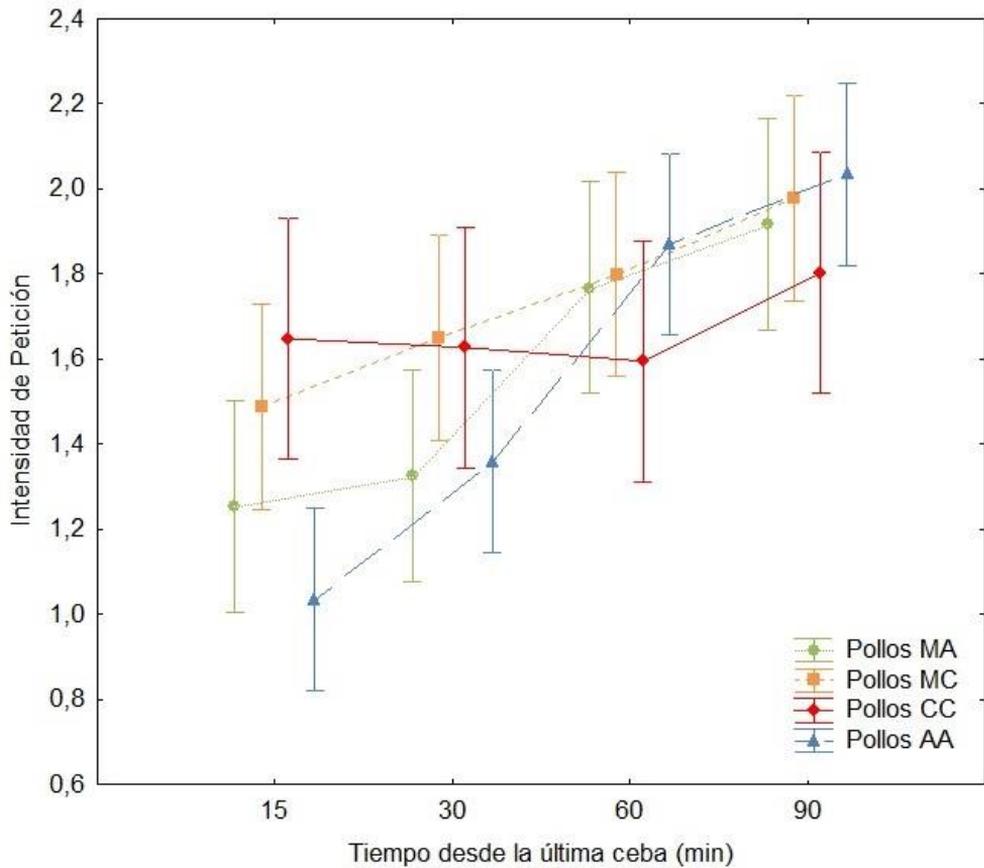
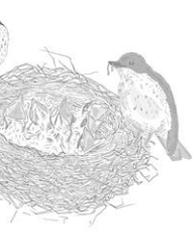


Figura 18: Valores medios, con intervalos de confianza del 95%, de la Intensidad de petición para cada nivel de hambre (tiempo transcurrido tras la última ceba) y tratamiento de los pollos.

La latencia de petición se vio afectada significativamente por el nivel de hambre (Tabla 5, Figura 19), disminuyendo el tiempo transcurrido entre el estímulo y el inicio de la petición a medida que el nivel de hambre aumentaba. No se encontraron diferencias significativas en el tiempo de latencia en función del tratamiento ni de la interacción tratamiento y nivel de hambre, aunque sí hubo una tendencia a los 15 minutos tras la última ceba en la que los pollos CC mostraron una latencia más baja, desapareciendo de nuevo esta tendencia al aumentar el nivel de hambre (Figura 19).

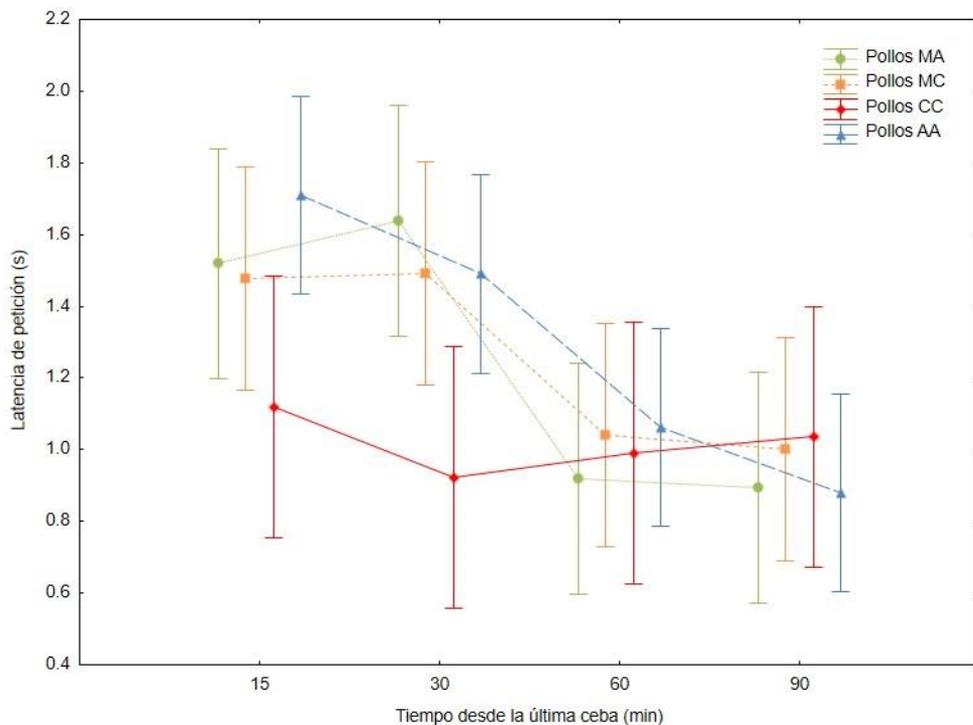
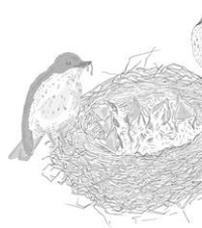
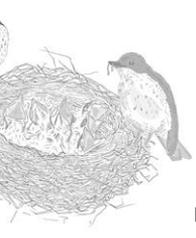


Figura 19: Valores medios, con intervalos de confianza del 95%, de la Latencia de petición para cada nivel de hambre (tiempo transcurrido tras la última cebsa) y tratamiento de los pollos.

El tiempo de petición de los pollos aumentó significativamente al aumentar el nivel de hambre, llegando a un nivel asintótico a partir de los 60 minutos tras la última cebsa (Tabla 5; Figura 20). Esta asintota en el tiempo de petición fue mayor en los pollos CC y MC, que habían recibido CPH, que en los pollos MA y AA a los que se les suministró agua (Figura 20). El tiempo de petición también presentó diferencias significativas en función del tratamiento así como en la interacción de ambos factores (Tabla 5), aunque hubo una sutil convergencia a niveles altos de hambre. En los pollos experimentales, aquellos a los que se suministró CPH, los pollos CC tendieron a pedir durante más tiempo que los pollos MC ($F_{1, 37} = 3.75$, $P = 0.06$), siendo significativa la interacción con el nivel de hambre ($F_{3, 150} = 3.85$, $P = 0.01$; Figura 20). Respecto a los pollos control, aquellos que



recibieron agua, el tiempo de petición no mostró diferencias significativas entre los pollos MA y AA ($F_{1, 47} = 0.65, P = 0.43$), ni en la interacción con el nivel de hambre ($F_{3, 176} = 1.12, P = 0.34$; Figura 20). En los nidos mixtos los pollos MC pidieron significativamente durante más tiempo que los pollos MA ($F_{1, 34} = 10.69, P = 0.0025$; Figura 20), sin embargo, la interacción con el nivel de hambre no fue significativa ($F_{3, 159} = 0.36, P = 0.78$; Figura 20).

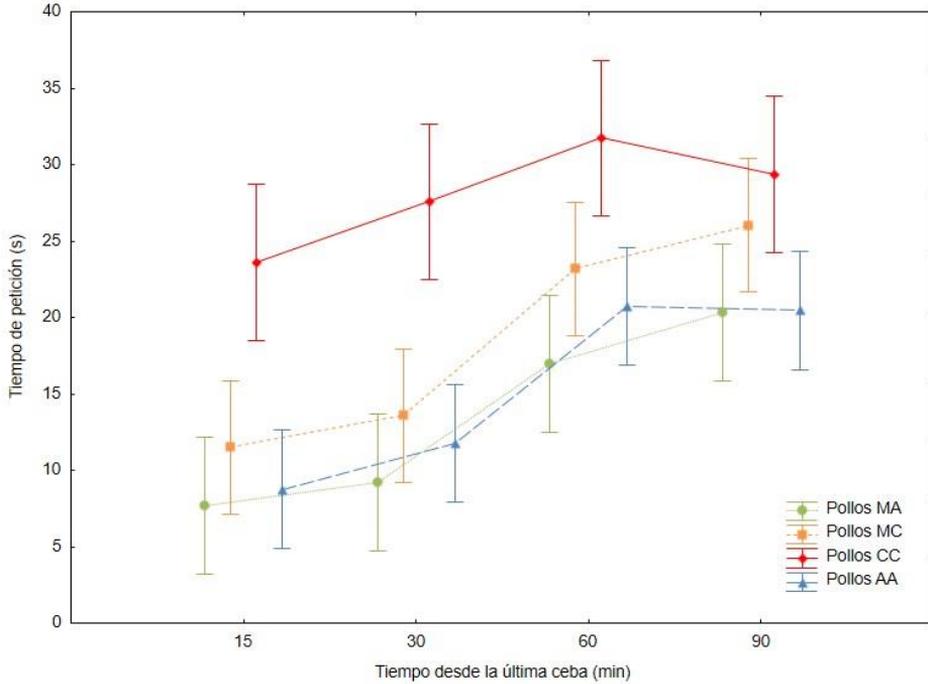
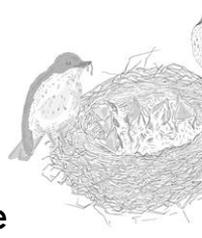


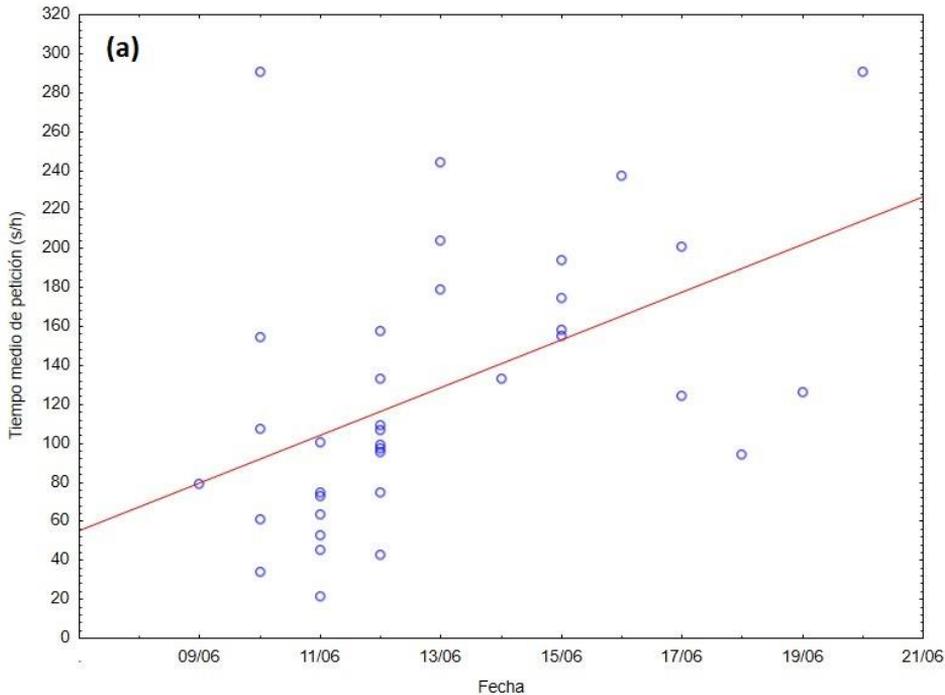
Figura 20: Valores medios, con intervalos de confianza del 95%, del Tiempo de petición para cada nivel de hambre (tiempo transcurrido tras la última cebsa) y tratamiento de los pollos.



Efecto del tratamiento sobre el comportamiento de petición en condiciones naturales

Para los análisis realizados en este apartado se utilizaron 36 nidos (14 NE, 11 NC y 11 NM). Se comprobó que no hubiese diferencias entre tratamientos respecto al número de pollos en el nido, el hábitat y las fechas y horas de las grabaciones, no encontrando diferencias en ninguno de ellos.

Se encontró que la fecha en la que se realizaron las grabaciones mostró una correlación positiva altamente significativa tanto con el tiempo medio de petición (entendido como tiempo medio que cada pollo del nido estuvo pidiendo expresado en segundos/hora) ($r = 0.56$, $P < 0.001$; Figura 21a), como con el tiempo de petición total del nido (entendido como la suma de los tiempos de petición de los pollos expresado en segundos/hora) ($r = 0.47$, $P = 0.004$; Figura 21b), por lo que la fecha fue incluida en los modelos.



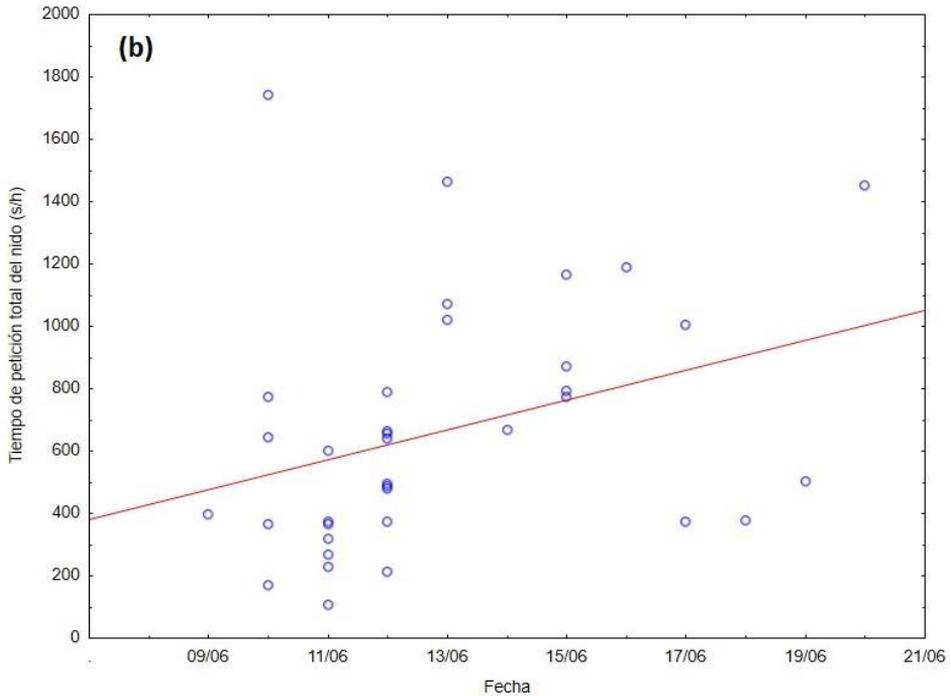
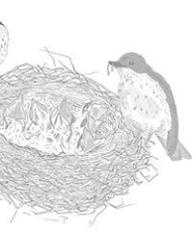
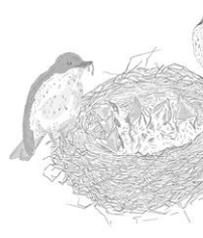


Figura 21: Correlaciones entre los valores del tiempo medio de petición por pollo (a) y el tiempo de petición total del nido (b) con la fecha.

Al analizar la correlación de la fecha con el tiempo medio de petición y con el tiempo de petición total del nido de forma individual para cada tratamiento se encontró que dicha correlación sólo fue significativa en el caso de los nidos control (NC) y mucho más fuerte ($r = 0.8$, $P = 0.003$). En los nidos NM estuvo muy próxima a la significación ($r = 0.59$, $P = 0.057$), mientras que para los nidos NE fue baja y no significativa (tiempo medio de petición: $r = 0.23$, $P = 0.43$; tiempo de petición total: $r = 0.07$, $P = 0.8$).

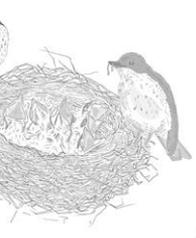
Tras analizar los datos con los modelos anteriormente descritos, se encontró que, tanto el tiempo medio de petición como el tiempo de petición total del nido se vieron afectados significativamente tanto por el tratamiento, como por la fecha y la interacción de ambos factores (Tabla 6).



	gl	F	P	
Tiempo medio de petición				
Tratamiento	2	4.07	0.027	*
Fecha	1	15.89	<0.001	***
Tratamiento*Fecha	2	3.83	0.03	*
Petición nido				
Tratamiento	2	3.68	0.037	*
Fecha	1	9.82	0.004	**
Tratamiento*Fecha	2	3.46	0.04	*

Tabla 6: Resultados del modelo lineal para analizar el efecto del tratamiento (3 niveles: NE, NM y NC) y de la fecha sobre el tiempo medio de petición y sobre la petición total del nido.

Posteriormente repetimos dichos análisis comparando 2 a 2 los tres tipos de nidadas (Tablas 7 y 8). Se encontró que el efecto del tratamiento sobre ambos tiempos de petición sólo fue significativo al comparar los nidos NE, en los que todos los pollos recibieron el tratamiento con CPH, y los nidos NC, en los que a todos los pollos se les suministró agua (Tablas 7 y 8), mostrando unos mayores tiempos de petición los nidos NE (Figura 21). No se encontró un efecto significativo al comparar los NE con los NM, en los que a la mitad de los pollos se les suministraba CPH y a la otra mitad agua (Tablas 7 y 8), ni en la comparativa entre los nidos NM y NC, aunque en este caso cerca de la significación (Tablas 7 y 8). Es decir, al controlar por el efecto de la fecha se encontró que tanto para el tiempo medio de petición, como para el tiempo de petición total del nido se estableció un gradiente en el que los nidos NE, donde todos los pollos recibieron CPH mostraron unos mayores tiempos de petición que los nidos mixtos (NM), a su vez mayores que los nidos en los que sólo se suministró agua (NC) aunque las diferencias sólo fueron significativas al comparar los nidos NE y NC.



TIEMPO MEDIO DE PETICION	gl	F	P
Cipro vs Agua			
Tratamiento	1	8.09	0.01 *
Fecha	1	15.84	<0.001 ***
Tratamiento*Fecha	1	7.6	0.01 *
Cipro vs Mixto			
Tratamiento	1	0.82	0.38
Fecha	1	0.1	0.75
Tratamiento*Fecha	1	0.62	0.44
Agua vs Mixto			
Tratamiento	1	3.3	0.085
Fecha	1	23.67	0.0001 ***
Tratamiento*Fecha	1	3.39	0.08

Tabla 7: Resultados del modelo lineal para analizar el efecto del tratamiento y de la fecha sobre el tiempo medio de petición comparando los tratamientos 2 a 2.

PETICION DEL NIDO	gl	F	P
Cipro vs Agua			
Tratamiento	1	7	0.015 *
Fecha	1	9.35	0.006 **
Tratamiento*Fecha	1	6.57	0.02 *
Cipro vs Mixto			
Tratamiento	1	0.75	0.4
Fecha	1	0.13	0.72
Tratamiento*Fecha	1	0.59	0.45
Agua vs Mixto			
Tratamiento	1	3.44	0.08
Fecha	1	17.25	<0.001 ***
Tratamiento*Fecha	1	3.48	0.08

Tabla 8: Resultados del modelo lineal para analizar el efecto del tratamiento y de la fecha sobre el tiempo de petición total del nido comparando los tratamientos 2 a 2.

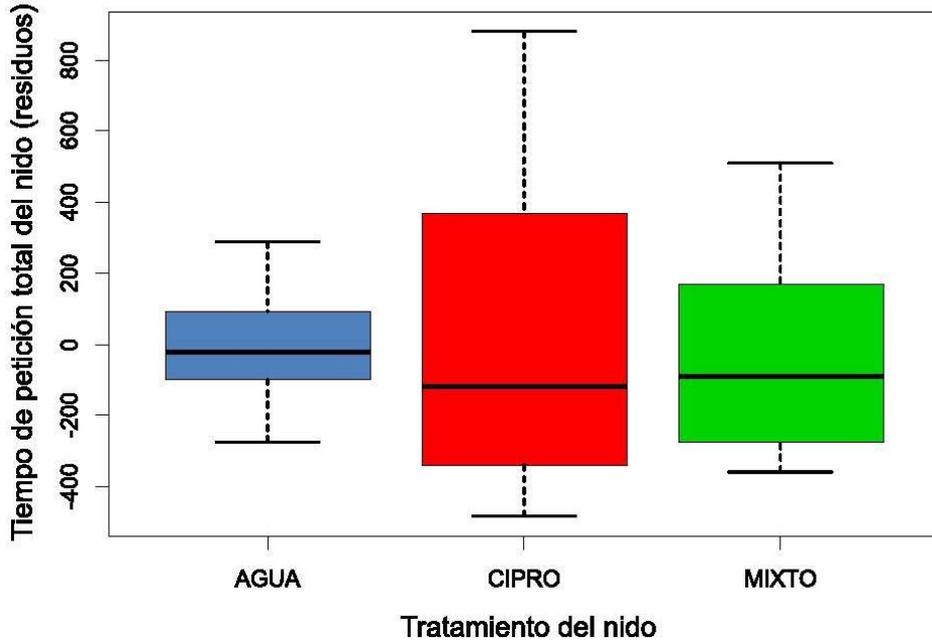
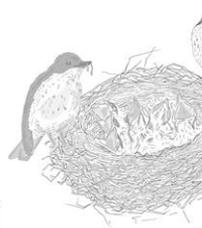


Figura 22: Residuos del Modelo Lineal para el Tiempo de Petición Total para cada Tratamiento y tipo de nidada. Se muestra las medianas (línea negra), el rango intercuartil (cajas) y el rango percentil 10-90 (barras discontinuas de error).

También se analizó si existía una correlación entre los tiempos de petición y las tasas de cebsa por parte de los adultos. Tras los análisis encontramos que la tasa de petición total del nido está correlacionada positiva y significativamente con la tasa de cebsa en los nidos ($r = 0.39$, $P = 0.02$) (Figura 23). Cuando buscamos la correlación entre el tiempo medio de petición por pollo y la tasa de cebsa media por pollo no encontramos una correlación significativa ($r = 0.26$, $P = 0.12$). Sin embargo, al descomponer las cebsas en función del sexo del adulto se encontró que la correlación con las cebsas por parte de las hembras sí era positiva y significativa ($r = 0.35$, $P = 0.035$) (Figura 24a), mientras que para los machos no se encontró significancia en la correlación e incluso esta fue negativa ($r = -0.13$, $P = 0.46$) (Figura 24b).

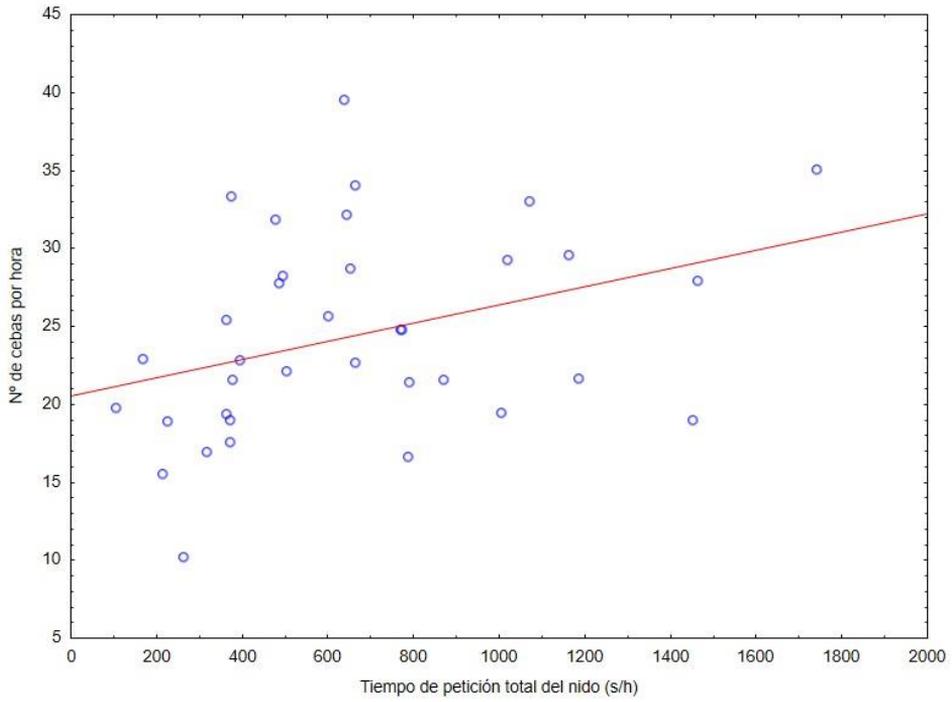
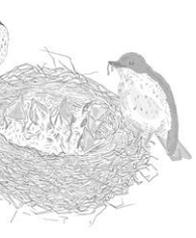


Figura 23: Correlación entre los valores del tiempo de petición total del nido por hora y la tasa de ceba de los adultos.

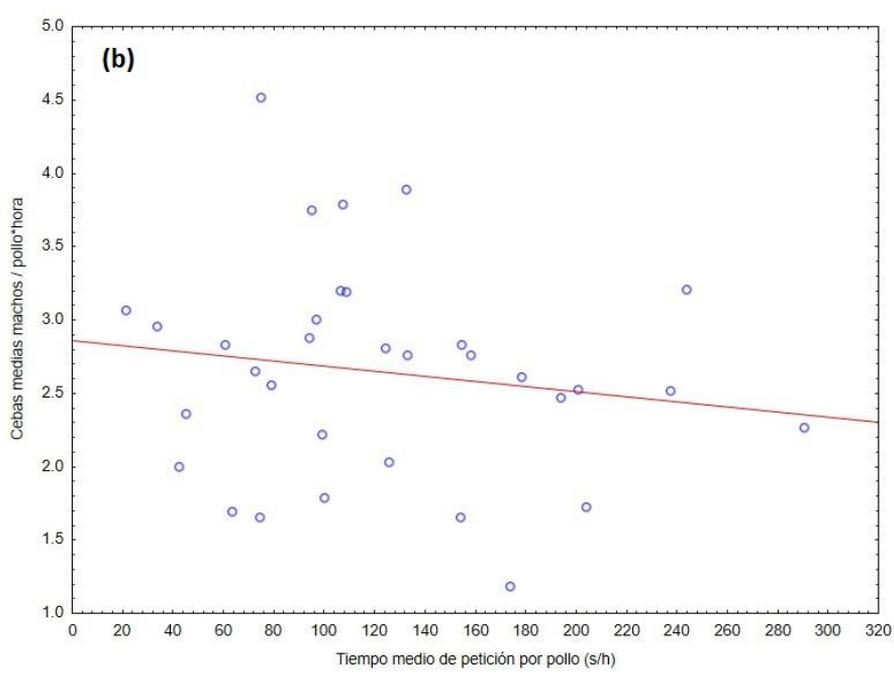
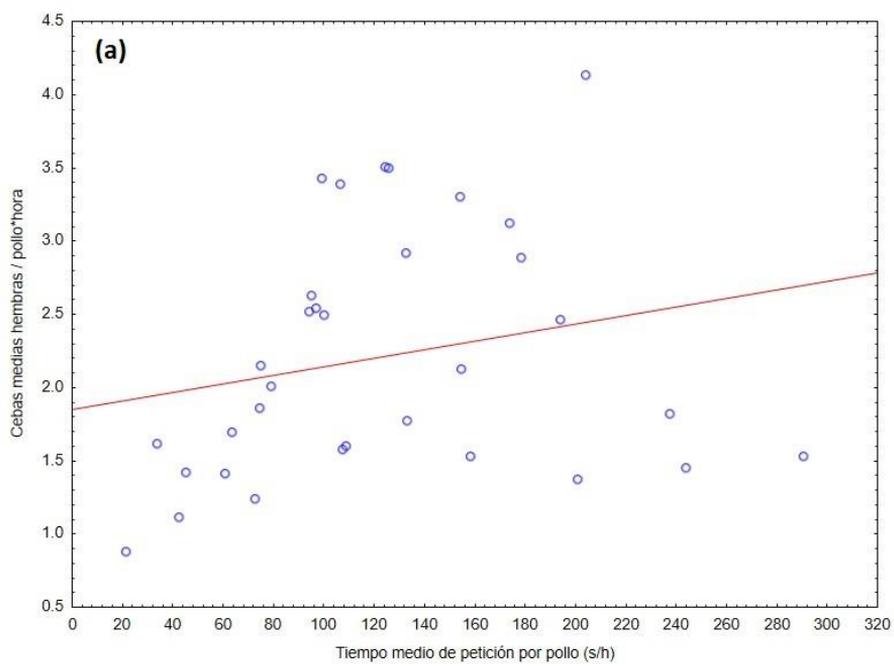
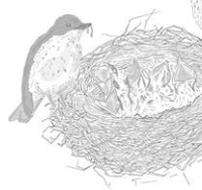
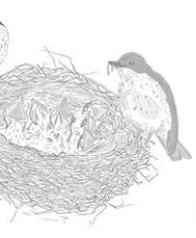


Figura 24: Correlación entre los valores del tiempo medio de petición por pollo y la tasa de ceba de las hembras (a) y los machos (b).



Efecto del tratamiento sobre variables biométricas, hematológicas e inmunológicas de los pollos

Tras los análisis realizados para las variables dependientes “Crecimiento”, “Condición física”, “Peso 13d” y “Tarso 13d” no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla 9; Figura 25). Sin embargo, sí se encontraron diferencias significativas en el H/L ratio (Tabla 9; Figura 26). Los pollos AA tuvieron un H/L ratio menor que los pollos a los que se les suministró CPH (pollos CC y MC) y que los pollos MA que recibieron agua pero que tuvieron que competir con los pollos MC dentro de los nidos mixtos. Respecto a la respuesta inmune celular a la PHA, hubo diferencias significativas en función del tratamiento (Tabla 9; Figura 27), mostrando los pollos AA, que recibieron agua, una mayor respuesta inmune que los pollos CC, a los que se les suministró CPH, y que los pollos de los nidos mixtos (independientemente de haberles suministrado CPH o agua, pollos MC y MA respectivamente).

	χ^2	gl	P
Crecimiento 3-13d	0.48	3	0.92
Peso 13d	1.08	3	0.78
Tarso 13d	1.03	3	0.79
Condición física 13d	2.26	3	0.52
H/L ratio	8.63	3	0.035
Respuesta Inmune a PHA	19.7	3	< 0.001

Tabla 9: Resultados del modelo REML-LMM para analizar el efecto del tratamiento del pollo (4 niveles: CC, MC, MA y AA) para las variables Crecimiento entre los 3-13d, Peso a los 13d, Tarso a los 13d, Condición física a los 13d, H/L ratio y Respuesta Inmune a PHA. Para cada modelo el nido de origen fue introducido como factor aleatorio para controlar la varianza entre nidos.

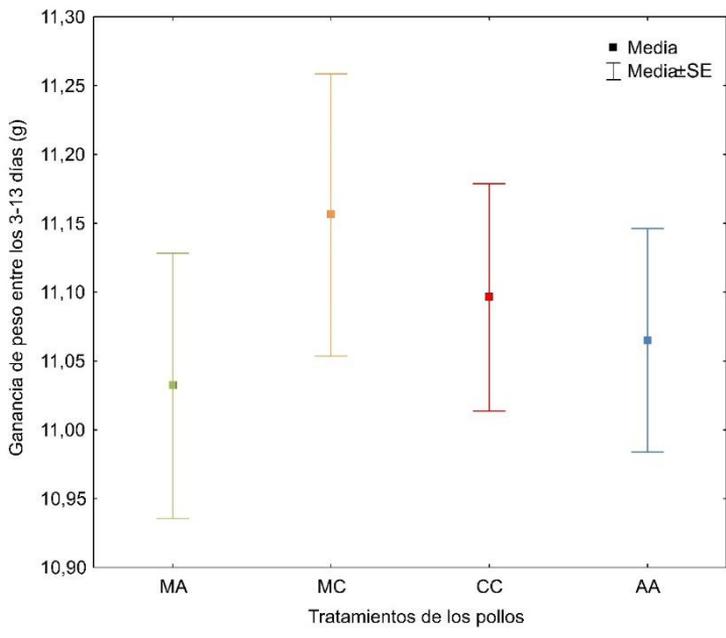
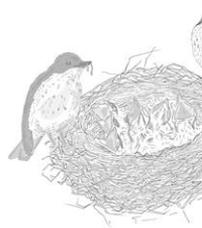


Figura 25: Valores medios, con intervalos de confianza del 95%, de la ganancia de peso entre los días 3 y 13 de vida para cada tratamiento de los pollos.

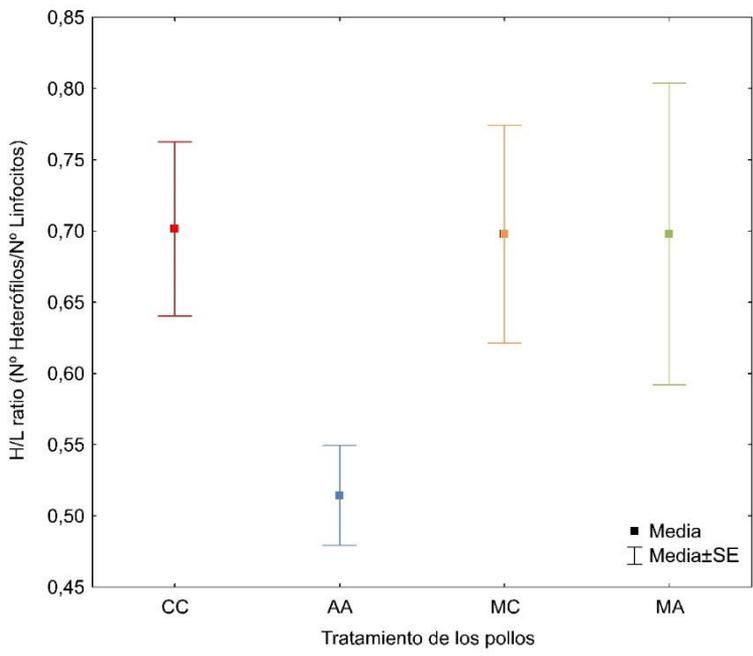


Figura 26: Valores medios, con intervalos de confianza del 95%, del H/L ratio para cada tratamiento de los pollos.

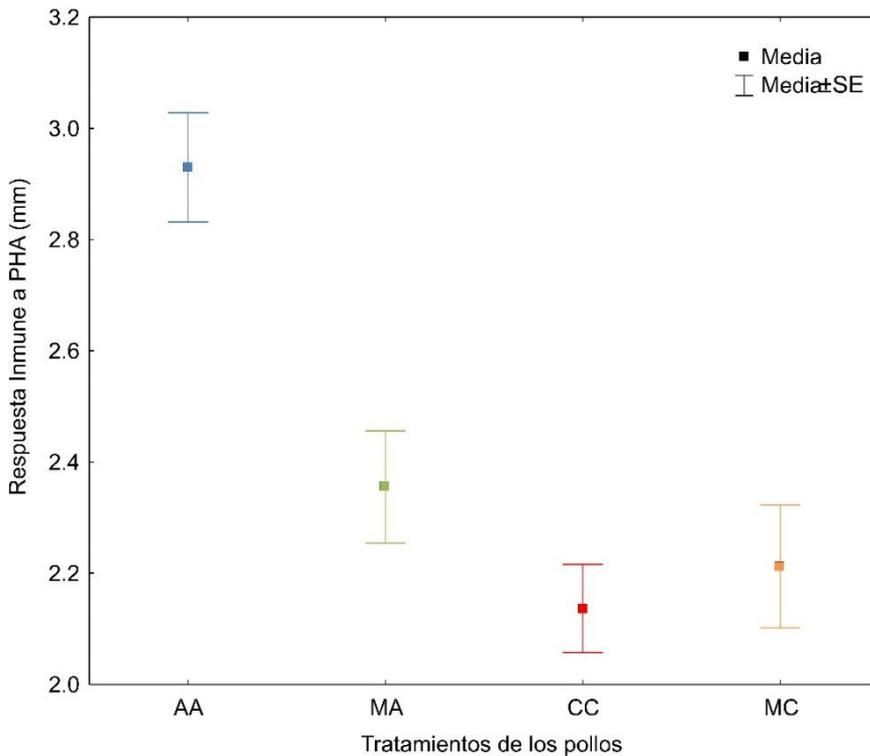
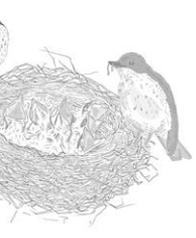


Figura 27: Valores medios, con intervalos de confianza del 95%, de la Respuesta Inmune a PHA para cada tratamiento de los pollos.

Por último, al analizar los datos correspondientes al número de heterófilos presentes por cada 10.000 eritrocitos entre los cuatro diferentes tratamientos, se encontró que se establecía un gradiente en el que los pollos CC (aquellos que provenían de NE, en los que a todos los pollos se les había suministrado CPH) eran los que mayor número de heterófilos presentaban, seguidos de los pollos MC y con valores más bajos y similares los pollos MA y AA (Figura 28), siendo las diferencias significativas sólo entre los pollos CC y a los que se suministró agua (MA y AA) ($z = -2.857$, $P = 0.02$; $z = 2.86$, $P = 0.02$; respectivamente), independientemente de su tipo de nidada de origen (Tabla 10).

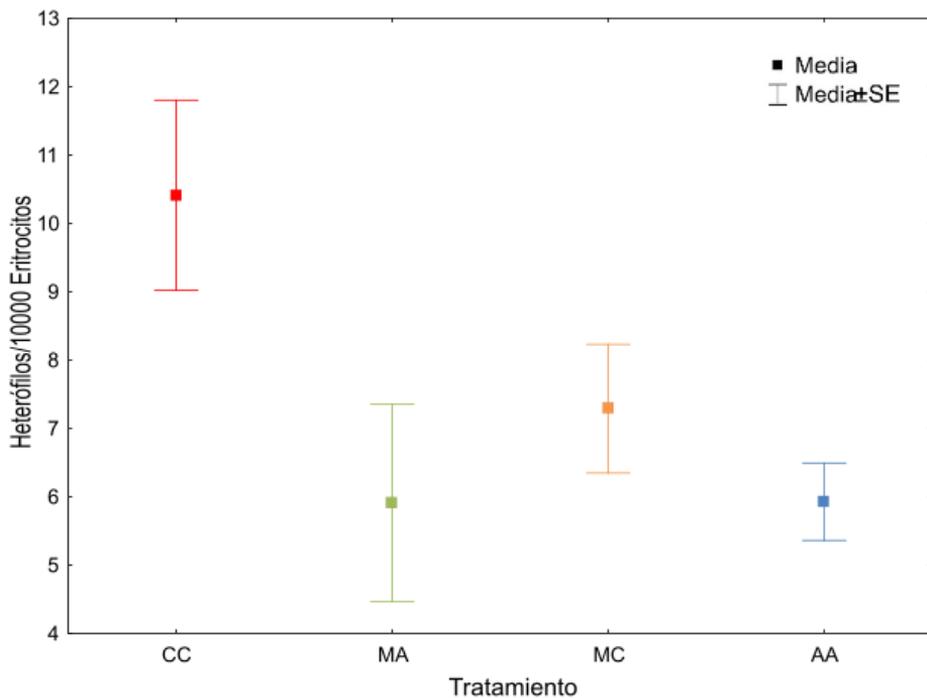
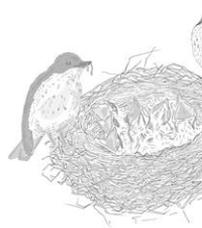
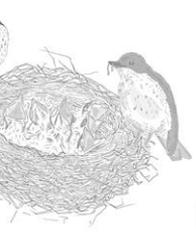


Figura 28: Valores medios, con intervalos de confianza del 95%, del N° Heterófilos/10.000 Eritrocitos para cada tratamiento de los pollos.

	Z	gl	P
CC-AA	2.86	3	0.02 *
MA-AA	-0.36	3	0.98
MC-AA	0.92	3	0.79
MA-CC	-2.86	3	0.02 *
MC-CC	-1.76	3	0.29
MC-MA	1.82	3	0.26

Tabla 10: Resultados del modelo GLMM y el Test de Tukey Post-hoc para analizar el efecto del tratamiento del pollo (4 niveles: CC, MC, MA y AA) para la variable N° Heterófilos/10.000 Eritrocitos. Para cada modelo el nido de origen fue introducido como factor aleatorio para controlar la varianza entre nidos.



Efecto del tratamiento sobre la prevalencia y abundancia de ácaros y protocalíforas y mortalidad

Al analizar la prevalencia de ácaros en función del tratamiento se observó que en el 24% de los nidos NE (n = 45) hubo presencia de ácaros frente al 15% de los nidos NM (n = 53) y el 12% de los nidos NC (n = 58), pero las diferencias no fueron significativas (Tabla 11). Si lo fueron en cambio al analizar la abundancia en función del tratamiento (Tabla 11), siendo mayor en los nidos NE, donde todos los pollos habían recibido CPH (Figura 29).

Respecto a las protocalíforas, se observó presencia de larvas o pupas en el 39% de los nidos NE (n = 49), 33% de los nidos NM (n = 54), y 47% de los nidos NC (n = 57), sin embargo las diferencias tanto en prevalencia como en abundancia no fueron significativas entre los tratamientos (Tabla 11).

Se examinó también la mortalidad en el nido en función de los tratamientos, encontrándose diferencias significativas (Tabla 11). Hubo mortalidad de al menos un pollo en el 19% de los nidos NE (n = 58), 39% de los nidos NM (n = 41) y 20% de los nidos NC (n = 71), es decir, los nidos NM sufrieron una mortalidad de casi el doble que los nidos NE y NC.

	χ^2	gl	P
Prevalencia Ácaros	2.82	2	0.24
Abundancia Ácaros	15.47	2	< 0.001
Prevalencia Protocalíforas	2.32	2	0.31
Abundancia Protocalíforas	1.92	2	0.38
Mortalidad	6.57	2	0.037

Tabla 11: Resultados del modelo GLM asociado a una función logit, con una distribución binomial para prevalencias y mortalidad y una distribución binomial negativa para las abundancias, para analizar el efecto de los tratamientos sobre las variables Prevalencia de ácaros, Abundancia de ácaros, Prevalencia de protocalíforas, Abundancia de protocalíforas y Mortalidad.

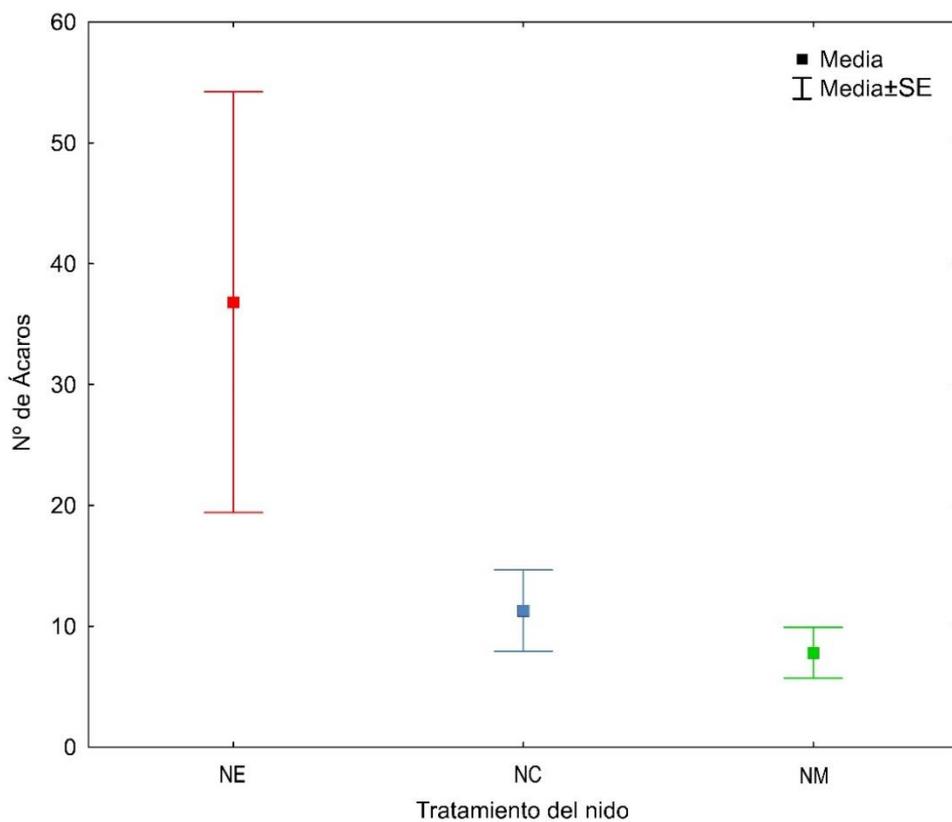
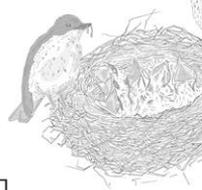
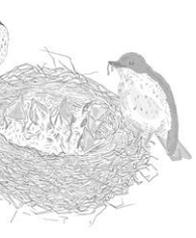
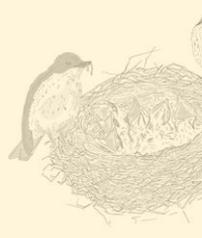
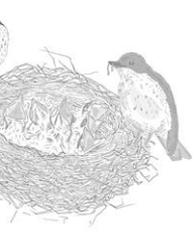


Figura 29: Valores medios, con intervalos de confianza del 95%, de la Abundancia de ácaros para cada tratamiento del nido.





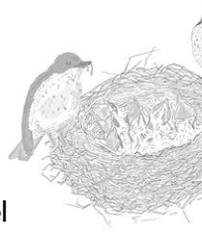
DISCUSIÓN



Determinación de los costes asociados a las señales en términos de crecimiento e inmunocompetencia

Comparando los esfuerzos de petición realizados por los pollos de los dos grupos del experimento, los pollos PA invirtieron y realizaron un esfuerzo mucho mayor que sus hermanos PB. Durante los episodios de ceba los pollos PB realizaron una petición media de 3.4 segundos, similar a los episodios de petición realizados en la naturaleza (5 segundos). Por el contrario, los pollos PA realizaron una petición durante el episodio de ceba 15 veces más larga (media de 51 segundos) y mucho más elevada que el máximo observado en los nidos naturales (21.5 segundos). La variación en los tiempos de petición observados en condiciones naturales durante los episodios de ceba sería explicada, al menos en parte, por la necesidad nutricional de los pollos en el nido, pidiendo durante más tiempo aquellos con mayor necesidad nutricional y con episodios más cortos aquellos mejor alimentados. La cantidad media de alimento que un pollo de 7 días recibe en condiciones naturales en su nido está estimada en 9 gramos (0.44 gramos por gramo de masa corporal) con una ingesta máxima de 0.67 g / g masa corporal, según se estableció en un estudio previo que probaba los efectos de la necesidad nutricional sobre el comportamiento de petición y la digestión (Wright et al., 2010). Durante el periodo de 24 horas en el que se desarrolló nuestro experimento, los pollos, independientemente de su tratamiento, recibieron aproximadamente 0.5 g de alimento por gramo de masa corporal, con lo que dicha tasa de ingesta se encuentra por encima de la media en condiciones naturales. Esto nos permite asumir que los pollos, durante el desarrollo del experimento y de los episodios de petición, se encontraban bien alimentados. Por lo tanto, los episodios de petición de los pollos PA, con un tiempo muy superior a los manifestados tanto por su hermanos PB como en condiciones naturales, se pueden considerar como señales fuera del equilibrio (Számadó, 2011).

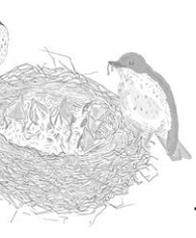
Durante el experimento, las tasas de petición por hora de los pollos PA (68 s/h) se encontraron dentro del rango observado en condiciones



naturales, al igual que en otros estudios previos sobre el efecto del comportamiento de petición sobre el crecimiento (Kilner, 2001; Leonard et al., 2003; Moreno-Rueda et al., 2012). En otros estudios las tasas de petición en condiciones naturales no estaban especificadas, pero se ajustó su escala para asimilarla a la tasa de ceba por parte de los adultos en la naturaleza (Kedar et al., 2000; Moreno-Rueda, 2010; Moreno-Rueda & Redondo, 2011, 2012).

Si comparamos los tiempos de petición de los pollos PA frente a los de los pollos PB, observamos que dicha relación (15 veces mayor el tiempo de petición en los pollos PA) es mucho más marcada que en la mayoría de los estudios previos anteriormente citados (Kilner, 2001 (6); Leonard et al., 2003 (6); Moreno-Rueda et al., 2012 (6.7); Rodríguez-Gironés et al., 2001 (3.5 y 5)), siendo similar a los de otros (Moreno-Rueda & Redondo, 2011 (16.7); Moreno-Rueda & Redondo, 2012 (14.1)) y sólo menor que en dos de ellos (Moreno-Rueda, 2010 (24); Soler et al., 2014 (36)). Es decir, en este experimento, los pollos PA tuvieron que realizar un esfuerzo de petición de al menos la misma magnitud que el presente en los estudios en los que se encontró un coste de crecimiento asociado a la petición de alimento (Kilner, 2001; Moreno-Rueda & Redondo, 2011; Moreno-Rueda et al., 2012; Rodríguez-Gironés et al., 2001). Cabe mencionar que la ganancia de masa corporal durante las 24 horas en las que se desarrolló el experimento (0.86 gramos) fue menos que la ganancia observada en el campo en condiciones naturales (1.36 gramos), siendo esto lo normal y esperable durante la cría no natural de aves silvestres, atribuible al estrés general de esta práctica (Flammer & Clubb, 1994), aún con dietas de alta calidad como la suministrada en este estudio.

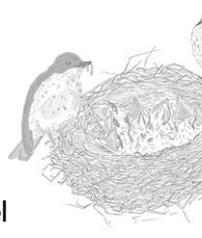
Este comportamiento de petición excesiva y fuera del equilibrio que forzamos a realizar a los pollos PA provocó un efecto negativo tanto en la ganancia de masa durante las horas diurnas, cuando los episodios de ceba y petición tenían lugar, como sobre la respuesta inmune. Estos efectos encontrados no podrían ser explicados en términos de gasto metabólico, medido como la masa perdida o invertida durante los episodios de petición, ya que el gasto metabólico fue similar entre los pollos de ambos tratamientos, PA y PB, ya fuese expresado en términos absolutos o como



fracción de ganancia de masa, y las diferencias entre tratamientos en el esfuerzo de petición no tuvieron efecto sobre la pérdida de masa atribuible al comportamiento de petición. Por lo tanto, el efecto de una petición excesiva y fuera del equilibrio sobre el gasto metabólico fue muy pequeño y no significativo, siendo estos resultados consistentes con estudios previos de respirometría (Chappell & Bachman, 2002).

Una alternativa al gasto energético sería la causada por el estrés oxidativo generado por el ejercicio físico intenso asociado a un esfuerzo de petición elevado (Boncoraglio et al., 2012; Costantini, 2014; Noguera et al., 2010). La función inmunitaria y el crecimiento durante su desarrollo producen radicales libres (Alonso-Alvarez et al., 2007; Costantini & Møller, 2009; Sorci & Faivre, 2009) por lo que los pollos PA, que fueron forzados a mantener un elevado esfuerzo de petición, puede que fuesen capaces de regularlo, disminuyendo temporalmente otros procesos que generasen radicales libres logrando mantener así el equilibrio oxidativo (Moreno-Rueda et al., 2012).

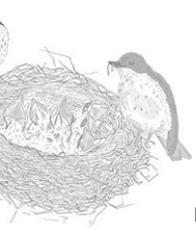
Por último, otra posibilidad sería que el esfuerzo físico asociado a la petición no sea por sí mismo lo que tenga un efecto negativo sobre la respuesta inmune sino los procesos fisiológicos implicados en que los pollos realicen un mayor esfuerzo de petición (Buchanan et al., 2007). En estudios previos se ha encontrado que los niveles endógenos de testosterona y glucocorticoides pueden tener el efecto de provocar simultáneamente un comportamiento de petición más intenso a la vez que reducir la respuesta inmune y el crecimiento, encontrándose dichas evidencias tanto en nuestra especie de estudio (Goodship & Buchanan, 2006, 2007), como en otras especies (Buchanan et al., 2007; Loiseau et al., 2008; Quillfeldt et al., 2006). Nuestros resultados serían consistentes con esta explicación ya que los pollos PA pidieron durante más tiempo y también con una mayor intensidad postural. Además se ha observado que los efectos asociados a los niveles de las hormonas endógenas sobre el comportamiento de petición, el crecimiento y la respuesta inmune pueden variar entre especies (Smiseth et al., 2011), lo que nos permitiría proporcionar una explicación a los diferentes resultados obtenidos en los



estudios previos sobre el efecto del comportamiento de petición sobre el crecimiento.

Nuestro diseño experimental mostró un efecto muy fuerte sobre la respuesta inmune celular a la PHA, especialmente a las 13 horas tras la inyección, cuando finalizó el periodo diurno en el que se desarrollaron los episodios de petición y ceba (“d” de Cohen = 1.15) y también, aunque más leve, al finalizar el experimento 24 horas después de la inoculación (“d” de Cohen = 0.64). Esta variación temporal es lo esperado en estos ensayos en los que se inyecta PHA (Navarro et al., 2003) ya que primero (en las primeras 3-12 horas) se produce una infiltración rápida de heterófilos y linfocitos, seguido posteriormente (a las 24 horas) de la infiltración de macrófagos, remitiendo la inflamación habitualmente tras 48 horas (Martin et al., 2006; Smits et al., 1999).

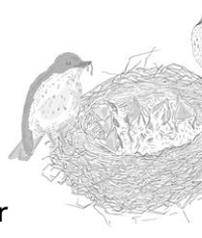
El coste a nivel de reducción de la respuesta inmune celular asociado al comportamiento de petición, demostrado mediante la inducción experimental de un esfuerzo de petición excesivo y fuera del equilibrio, ha sido el único que, hasta ahora, se ha encontrado en todos los trabajos llevados a cabo con diferentes especies. Dicho efecto se ha encontrado en gorrión común (*Passer domesticus*) (Moreno-Rueda, 2010; Soler et al., 2014), urraca (*Pica pica*) (Moreno-Rueda et al., 2012), alcaudón real (*Lanius meridionalis*) (Moreno-Rueda & Redondo, 2011, 2012) y en papamoscas cerrojillo (en este estudio; Redondo et al., 2016). Contrario a estos resultados, otro estudio llevado a cabo con pollos de golondrina común (*Hirundo rustica*) (Romano et al., 2011) encontró que a los pollos hembras a los que se les inyectó un antígeno (en este caso un lipopolisacárido bacteriano) aumentaron su intensidad de petición. Sin embargo, este estudio no fue diseñado específicamente para testar este coste y los pollos podían pedir libremente escogiendo el esfuerzo de petición invertido. Este hecho tiene una importancia crítica al considerar que para poder evaluar los costes asociados al comportamiento de petición predichos por los modelos matemáticos se debe manipular experimentalmente a los pollos para llevarlos a una situación en la que el esfuerzo implicado en el petición se encuentre por encima de sus niveles óptimos y fuera del equilibrio (Kilner, 2001; Számadó, 2011). Además, en el



mencionado estudio, el comportamiento de petición se estudió 2 días después de la inoculación del antígeno, momento en el que el estado nutricional y físico de los pollos, considerado como masa corporal, coloración bucal y estado del plumaje, había sufrido un deterioro consecuencia del desafío inmune causado por el antígeno bacteriano. Debido a esto, el comportamiento de petición pudo verse afectado tanto por los componentes inmunitarios como por la condición en la que se encontraban los pollos (Jacob et al., 2011).

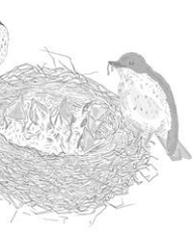
En los estudios mencionados, para lograr que uno de los tratamientos, en nuestro caso los pollos PA, inviertan un esfuerzo de petición excesivo y fuera del equilibrio, es necesario que sean estimulados más que sus hermanos de petición baja y dentro del equilibrio (en nuestro caso pollos PB) (Moreno-Rueda, 2010; Moreno-Rueda & Redondo, 2011, 2012; Moreno-Rueda et al., 2012; Soler et al., 2014). Esta estimulación extra podría suponer un inconveniente para este tipo de estudios, ya que podría causar estrés en los pollos, y esto podría causar un aumento en los niveles de glucocorticoides deprimiendo la respuesta inmune (Saino et al., 2003). El mismo problema se plantea en otros estudios centrados en estudiar los posibles costes a nivel del crecimiento (Kedar et al., 2000; Kilner, 2001) aunque no en otros (Leonard et al., 2003; Rodríguez-Gironés et al., 2001). Sin embargo, hay que destacar que no se encontró una evidencia directa en estos estudios entre la estimulación y sí se encontró un efecto significativo en términos de crecimiento (Kilner, 2001; Rodríguez-Gironés et al., 2001) o no se halló (Kedar et al., 2000; Leonard et al., 2003). Los glucocorticoides pueden afectar tanto a la respuesta inmune como al crecimiento de los pollos de forma simultánea (Saino et al., 2003), sugiriéndonos que una estimulación diferencial podría no ser la única causa que produjera una respuesta inmune menor en los pollos PA, que mantuvieron esfuerzos de petición mayores.

Para poder considerar la reducción en la respuesta inmune celular como un coste directo asociado al comportamiento de petición del tipo predicho por los modelos matemáticos se deben cumplir varios criterios. El coste debería afectar a la condición física de los pollos reduciendo su viabilidad (Számadó, 2011) y además dicho coste no debería poder ser



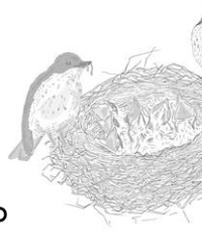
compensando mediante unos beneficios diferenciales, es decir, una mayor cantidad de alimento, manteniendo por tanto un efecto negativo sobre la condición física y con ello sobre la viabilidad (Számadó, 2011). Nuestros resultados, al igual que los de otros estudios previos, que muestran que una petición fuera del equilibrio tiene un efecto negativo sobre la respuesta inmune celular, cumplen dichos requisitos. En primer lugar, una reducción en la respuesta inmunitaria puede disminuir la probabilidad de supervivencia de los pollos ante una posible infección parasitaria. En las poblaciones ibéricas, como la nuestra, los pollos de papamoscas cerrojillo sufren, con una prevalencia superior al 20%, la parasitación por parte de hematozoos y ectoparásitos como ácaros y protocalíforas (Merino & Potti, 1995a, 1996). Se ha encontrado en varios estudios que los pollos con una respuesta inmune reducida afrontarían peor una posible infección parasitaria (Pitala et al., 2010; Tschirren et al., 2007), resultando su viabilidad reducida a largo plazo (Bowers et al., 2014; Cichoń & Dubiec, 2005).

En segundo lugar, se ha observado que la respuesta inmune celular en el momento en que los pollos de papamoscas cerrojillo han finalizado su desarrollo predice mejor la probabilidad de supervivencia que la masa corporal o la condición física en esa edad (Moreno et al., 2005). Este hecho implica que, si la capacidad de producir una respuesta inmune adecuada se encuentra disminuida, una ganancia de masa superior debido a un esfuerzo de petición mayor podría no tener una importancia decisiva en la probabilidad de supervivencia, no estando claro que la obtención de recursos adicionales pueda compensar una respuesta inmune deteriorada. De hecho, en un estudio en el que se controlaron tanto los costes a nivel de esfuerzo de petición como los beneficios en forma de alimento adicional en pollos de alcaudón real (*Lanius meridionalis*), se encontró que los pollos que mostrando un esfuerzo de petición fuera del equilibrio pero que recibieron un 30% más de alimento fueron capaces de compensar los costes asociados al crecimiento pero no los asociados a la respuesta inmune, que sufría un deterioro (Moreno-Rueda & Redondo, 2012). Esto nos permite afirmar que una petición excesiva, fuera del equilibrio tiene un coste a modo de efecto negativo sobre la respuesta inmune en pollos de papamoscas cerrojillo.



Cuando analizamos el efecto de los tratamientos sobre el crecimiento encontramos que, durante el periodo diurno, en el que se produjeron los episodios de ceba y petición, los pollos PA, a los que se forzó a realizar un esfuerzo de petición mucho mayor, ganaron menos masa que sus hermanos PB, lo que nos indica un fuerte efecto (“d” de Cohen = 0.65). Sin embargo, a la mañana siguiente este efecto había prácticamente desaparecido, ya que los pollos PA sufrieron una pérdida de masa durante el periodo de descanso menor que los pollos PB, sugiriendo el desarrollo de una regulación compensatoria durante esas horas. Dicho proceso de regulación compensatoria podría ser explicado por varios mecanismos que regulasen una menor pérdida de masa nocturna. Los pollos invierten una gran proporción de su presupuesto energético (alrededor de un 75%) en procesos disipativos como son la termorregulación y el mantenimiento (Verhulst & Wiersma, 1997). Debido a ello, uno de los posibles mecanismos que podrían estar implicados en la regulación compensatoria sería que, durante la noche, los pollos PA redujesen su metabolismo basal o la producción de calor a favor del crecimiento (Killpack & Karasov, 2012; Moe et al., 2004; Vézina et al., 2009).

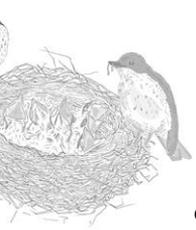
Otra posibilidad es que, en el caso de los pollos PA, realizar un esfuerzo de petición mucho mayor hubiese afectado a su mecánica digestiva haciendo que se retrasase la asimilación de los alimentos. Un mecanismo similar se puede encontrar en las palomas (*Columba livia*), que son capaces de retrasar la digestión en condiciones de bajas temperaturas para así beneficiarse del calor adicional producido durante la termogénesis asociada a la digestión (Laurila et al., 2003). Dado que no llevamos un registro continuo de la producción fecal durante el periodo diurno ni a la mañana que registrase posibles cambios, no hemos podido analizar detalladamente esta posibilidad. Sin embargo, sí se tomaron medidas acumuladas a la mitad y al final del periodo diurno, que nos mostraron una tendencia significativa, aunque sólo marginalmente, de que los pollos PA produjeron una masa fecal acumulada menor en la segunda mitad del periodo diurno. En un estudio realizado con canarios (*Serinus canaria*), en donde se forzó a realizar un esfuerzo de petición elevado, se observó que esta petición forzosa provocaba un aumento de producción de sacos fecales, aunque la masa fecal producida era menor (Kilner, 2001). Una



última posibilidad sería que la menor ganancia de masa durante el periodo de actividad por parte de los pollos PA fuese debido a una menor eficacia digestiva (Budden & Wright, 2008; Grodzinski et al., 2009; Kilner, 2001; Wright et al., 2010), que podría ser compensada durante la noche cuando no había actividad.

Por lo tanto, en los pollos de papamoscas cerrojillo, un comportamiento de petición, en este caso forzado, que implique una inversión a nivel de esfuerzo fuera del equilibrio tendría un efecto negativo sobre el crecimiento después de 13 horas, al finalizar el periodo de actividad, pero dicho efecto desaparecería si lo estudiamos a las 24 horas del inicio del experimento. Estos resultados, que varían en función de la escala de tiempo utilizada, coinciden con la mezcla de resultados obtenidos en otros estudios en lo que se encontró que el efecto varía en función tanto de la escala de tiempo como de la edad. Por ejemplo, en canarios se encontró un efecto sobre el gasto metabólico, pero sólo cuando los pollos tenían 8 días de edad y no cuando tenían 6 o 10 días, variando también las diferencias en crecimiento, entendido como ganancia de masa, en función de la edad (Kilner, 2001). En otro estudio, realizado con urracas, en el que se mantuvo los tratamientos durante un periodo de 3 días, se observó que había un efecto en la ganancia de masa a las 24 horas pero no se encontró a las 48 ni a las 72 horas (Moreno-Rueda et al., 2012). Además, en pollos de alcaudón, se encontraba un efecto a las 24 horas en función de la cantidad y la calidad del alimento suministrado (Moreno-Rueda & Redondo, 2011, 2012). Por último, en gorriones, un esfuerzo de petición elevado y sostenido sólo tuvo efecto a las 60 horas, pero no cuando se estudió a las 6, 12, 72, 84 y 108 horas (Kedar et al., 2000; Moreno-Rueda, 2010; Soler et al., 2014).

Todo lo anterior descrito nos sugiere que la mezcla de resultados obtenidos en los diferentes estudios sobre el efecto del comportamiento de petición sobre el crecimiento de los pollos pueden reflejar una diferente capacidad de los pollos, en función de su especie y del momento de desarrollo, para variar y compensar la ganancia de masa como respuesta a un esfuerzo de petición excesivo según las diferentes circunstancias. Esto nos lleva a plantear si, en el caso de que el efecto de una petición fuera del equilibrio pueda ser compensada, éste debería ser considerado como un

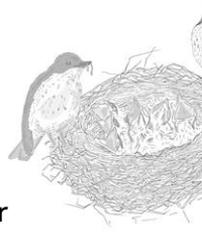


coste directo como los planteados por los modelos matemáticos (Számadó, 2011). Además, nos plantea el nuevo interrogante de porqué se producen estas variaciones en el efecto entre diversas especies y en diferentes momentos del desarrollo.

A modo de resumen, en pollos de papamoscas cerrojillo, no podríamos decir que existe un coste de crecimiento asociado al comportamiento de petición, pero sí un coste a nivel inmunológico.

Determinación del efecto de la carga parasitaria sobre el comportamiento de petición

Dado que la presencia de ectoparásitos hematófagos causaría un efecto negativo sobre el estado físico de los pollos (Møller et al., 2009), sería esperable que, para intentar compensar el daño causado por esta parasitación, los pollos aumentasen su esfuerzo de petición con el fin de recibir más alimento por parte de sus padres (Kilner & Johnstone, 1997). Los resultados obtenidos en nuestro estudio nos muestran que el estado parasitario no tuvo efectos perceptibles sobre la latencia de petición ni sobre la intensidad postural de los pollos. Esto nos sugiere que la parasitación parece no tener efecto sobre la capacidad muscular ni nerviosa. Sin embargo, sí se encontró un efecto claro sobre el tiempo de petición, los pollos provenientes de nidos parasitados pidieron durante significativamente menos tiempo que los pollos que provenían de nidos no parasitados en un estado nutricional similar, especialmente a niveles altos de privación de alimento (tras 90 minutos desde la última ceba). De hecho, estudios previos muestran que el tiempo de petición parece ser la variable en el comportamiento de petición más relacionada con el esfuerzo de petición y con los costes asociados al mismo (Moreno-Rueda & Redondo, 2011). A pesar de estos resultados, se debe tener en cuenta que nuestro estudio es correlativo y con un tamaño muestral limitado, por lo que no podemos descartar con seguridad la posibilidad de que exista algún factor desconocido, como podrían ser la calidad del área o el microclima, que pueda afectar de forma simultánea al

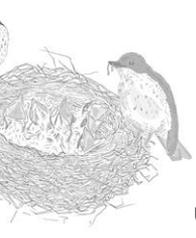


comportamiento de petición y a la prevalencia de parásitos y que dé lugar a la relación encontrada en nuestros resultados.

Los resultados encontrados en nuestro estudio parecen contrastar con otros estudios realizados. En una población cercana de papamoscas cerrojillo se encontró que los pollos de en nidos parasitados realizaban una intensidad postural de petición mayor que los pollos de nidos no parasitados (Cantarero et al., 2013), encontrándose en otro estudio realizado con carbonero común (*Parus major*) resultados similares (Christe et al., 1996). Sin embargo, en estos estudios el esfuerzo de petición realizado por los pollos no se controló por sus necesidades nutricionales a corto plazo, por lo que el incremento encontrado podría ser explicado por una mayor necesidad nutricional inicial. Nuestro diseño experimental, al cebar a los pollos hasta que estuvieran saciados antes del inicio del experimento, sí controló dichas posibles diferencias, encontrando que, para un mismo nivel de privación del alimento, los pollos de los nidos parasitados piden durante un menor tiempo que los pollos de nidos no parasitados. Coincidiendo con nuestros resultados, otro estudio anterior, realizado con pinzón de Darwin fuliginoso (*Geospiza fuliginosa*), observó que los pollos parasitados por larvas de la moscas *Philornis downsi* pedían durante menos tiempo que los pollos no parasitados.

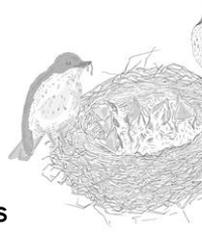
Todos estos resultados nos sugieren que, aunque los pollos parasitados puedan aumentar en cierta medida su esfuerzo de petición para tratar de compensar, al menos en parte, el efecto negativo causado por el parasitismo (Cantarero et al., 2013; Christe et al., 1996), esto probablemente no sea posible cuando su condición física se encuentre ya deteriorada (O'Connor et al., 2014). Acorde a esto, nuestros resultados muestran que las mayores diferencias en el tiempo de petición entre los pollos parasitados y no parasitados tienen lugar cuando las necesidades nutricionales de los pollos son mayores, a los 90 minutos tras haber recibido la última ceiba.

Los mecanismos por los que en los pollos que sufren parasitismo se produce una reducción en el esfuerzo de petición aún no están claros. Una causa energética (Moreno-Rueda & Redondo, 2011) sería consistente con



una mayor efecto del parasitismo a niveles altos de esfuerzo de petición pero, en nuestro experimento, los pollos no diferían en peso por lo que deberían disponer de similares reservas energéticas. Una segunda explicación podría ser que la reducción en el esfuerzo de petición observada estuviera mediada por hormonas ya que, por ejemplo, se ha observado que los niveles de corticosterona aumentan con la parasitación (Lobato et al., 2008). Sin embargo, esto contrastaría con nuestros resultados, ya que la corticosterona causa un incremento en el esfuerzo de petición según otro estudio (Loiseau et al., 2008). Una tercera posibilidad sería que la reducción en el esfuerzo de petición encontrada estuviera mediada por el estrés oxidativo. Una de las principales respuestas a los ectoparásitos es la inflamación, lo que lleva asociado la liberación de moléculas oxidantes como el óxido nítrico (NO) o el anión superóxido (O_2^-) (Sorci & Faivre, 2009). Además, en pollos de papamoscas cerrojillo, se ha observado que la parasitación reduce las reservas antioxidantes (López-Arrabé et al., 2015). También se debe tener en cuenta que el comportamiento de petición implica una considerable actividad muscular y nerviosa que también lleva asociada liberación de más moléculas oxidantes (Costantini, 2014), encontrándose en varios estudios evidencias de que el comportamiento de petición está asociado al estrés oxidativo (Moreno-Rueda et al., 2012; Noguera et al., 2010). Teniendo en cuenta todo esto, y que los pollos parasitados deben asumir el coste asociado al incremento de estrés oxidativo, se podrían ver beneficiados al reducir su esfuerzo de petición en pro de mantener el balance oxidativo dentro de un rango seguro.

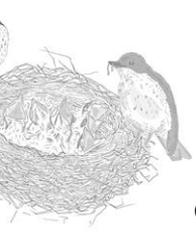
Una última posibilidad sería que la reducción en el esfuerzo de petición reflejase un tradeoff con la respuesta inmune. La parasitación por ectoparásitos en aves conlleva, por parte de las mismas, el desarrollo de una respuesta inmune (Owen et al., 2010), y como hemos encontrado en los anteriores resultados, en pollos de papamoscas cerrojillo, el esfuerzo de petición lleva asociado un coste a nivel de respuesta inmune (Redondo et al., 2016). Por lo tanto, es posible que los pollos parasitados reduzcan su esfuerzo de petición para prevenir las consecuencias negativas que causarían un deterioro en su respuesta inmunitaria.



Nuestros resultados implican que el tiempo de petición de los pollos podría no sólo indicar sus necesidades nutricionales sino también aportar información sobre el estado parasitario del nido. Dado que los pollos parasitados representan un menor valor reproductivo para sus padres (Forbes, 1993), éstos podrían obtener información de la calidad de los pollos a través de las señales de petición (Mock et al., 2011), respondiendo acorde a dicha información y alimentando preferentemente a los pollos menos parasitados (Saino et al., 2000). Principalmente se han considerado las señales relacionadas con la coloración bucal (por ejemplo Saino et al., 2003) como indicadores del estado de salud de los pollos, siendo de hecho un indicador del parasitismo por el ácaro hematófago *Pellonysus reedi* en gorrión común (*Passer domesticus*) (Dugas & Doumas, 2014). Por lo tanto, dado que nuestros resultados muestran que el tiempo de petición aporta información, además de sobre el estado nutricional, del estado parasitario, podría considerarse como un indicador de la calidad individual de los pollos (Mock et al., 2011).

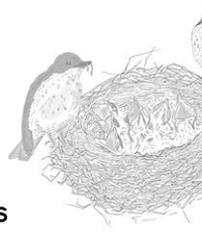
Simulación de una variante fenotípica que presente una petición exagerada y la cuantificación de los costes y beneficios relativos a los fenotipos salvajes

Los resultados obtenidos en nuestro experimento al analizar el comportamiento de petición en pollos de 9 días de vida en el laboratorio, bajo condiciones controladas tanto ambientales como de suministro de alimento, nos muestran que el hambre tuvo un fuerte efecto sobre las tres variables del comportamiento de petición analizadas. El efecto del tratamiento sólo fue significativo al analizar el tiempo de petición de los pollos. Debemos recordar que estudios previos nos indican que el tiempo de petición parece ser la variable más relacionada con el esfuerzo de petición (Moreno-Rueda & Redondo, 2011). Los pollos que recibieron CPH pidieron durante significativamente más tiempo que aquellos a los que se les suministró agua. Entre los pollos que recibieron



CPH, los CC tendieron a pedir más tiempo que los pollos MC que provenían de los nidos mixtos (NM). Los pollos que recibieron agua, independientemente del tipo de nidada al que pertenecieran, pidieron durante un tiempo significativamente menor, no encontrándose además diferencias entre ellos. En el caso de los nidos mixtos sí se observó esta diferencia, pidiendo significativamente más los pollos MC, que habían recibido CPH, aunque la interacción con el nivel de hambre no fue significativa, lo que parece indicar que los pollos MA, a pesar de no haber recibido el estimulante del apetito, tuvieron que elevar su esfuerzo de petición para competir con sus hermanos MC.

Las diferencias encontradas entre los pollos que habían recibido CPH pueden ser explicadas por una diferente competencia entre hermanos en los diferentes tipos de nidada, basándonos en los modelos propuestos que reflejarían una escalada en la inversión a modo de esfuerzo de petición de los pollos para competir con sus hermanos (Macnair & Parker, 1979). Los pollos CC provienen de nidos en los que todos los pollos recibieron CPH y mostraban una petición exagerada, por lo que sería necesario un mayor esfuerzo de petición para competir con sus hermanos. En el caso de los pollos MC, que provenían de los nidos NM, en los que la mitad de los pollos recibieron agua y la otra mitad CPH, la competencia sería menor ya que los pollos MA pedían menos tiempo, por lo que no sería necesaria una inversión tan elevada en esfuerzo de petición como la mostrada por los pollos CC. Un estudio previo similar, realizado con urracas (*Pica pica*), mostró que los pollos que recibían CPH no diferían de los controles respecto a la intensidad de petición, coincidiendo con nuestros resultados (Martín-Gálvez et al., 2011). Sin embargo, no encontraron un efecto sobre el tiempo de petición de los pollos. Esta diferencia con nuestros resultados, en los que sí se encontró este efecto, podría ser explicada por las dosis de CPH suministradas. En este estudio previo la CPH fue suministrada en días alternos; por el contrario, en nuestro diseño experimental fue suministrada diariamente debido a que, según lo encontrado en otro estudio, la CPH tiene una vida media en el organismo de 12 horas tras su administración (Norris et al., 1998). Además, en nuestro diseño experimental, la CPH fue suministrada a primera hora de la mañana para asegurar un efecto activo de la CPH durante las horas de actividad de los pollos. Por todo ello puede

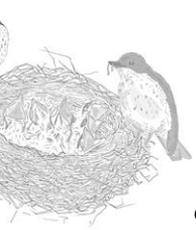


que las diferencias entre los resultados del tiempo de petición sean debidas a que, en el estudio previo, debido a la suministración más espaciada de las dosis, el efecto del tratamiento fuese insuficiente para mostrar diferencias en cuanto al tiempo de petición.

En condiciones naturales se observó que la fecha tenía un fuerte efecto sobre el tiempo medio de petición y la petición total del nido, aumentando los tiempos de petición con la fecha. Dicho efecto sería esperable ya que, a medida que la temporada reproductora avanza, las condiciones tanto ambientales como de disponibilidad tienden a empeorar en fases más tardías del periodo reproductor (Verhulst & Nilsson, 2008). Además, se observó que dicho efecto era mucho más acusado en los nidos NC, es decir, aquellos en los que a todos los pollos se les había suministrado agua (pollos AA). De nuevo esto sería lo esperable ya que, en los nidos NE donde a todos los pollos se les suministraba CPH y en los nidos NM donde la mitad recibía agua y la otra mitad CPH, los pollos manifestaban ya un comportamiento de petición exagerado como consecuencia del efecto del tratamiento y de la competencia entre hermanos, posiblemente no pudiendo aumentar aún más su esfuerzo de petición debido a la limitación impuesta por su condición física (Parker et al., 2002b).

Además de la fecha, se encontró que el tratamiento, así como la interacción de ambos factores, tuvo efecto sobre los tiempos de petición, estableciéndose un gradiente en que los nidos NE mostraron tiempos de petición más elevados que los NM y, a su vez, que los nidos NC. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el laboratorio y con lo anteriormente discutido.

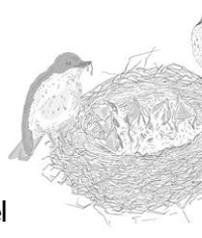
El tiempo de petición total del nido estuvo significativa y positivamente correlacionado con las tasas de ceba, de acorde a lo encontrado en otros estudios (Budden & Wright, 2001; Gottlander, 1987; Kilner & Johnstone, 1997; Kilner, 2002). Estos estudios muestran que, mediante el comportamiento de petición, los pollos influyen en la cantidad de alimento aportado al nido por los adultos y en su reparto. No hubo, en cambio, una correlación significativa cuando estudiamos la relación entre el tiempo medio de petición por pollo y el número de cebas recibidas. Sin



embargo, al descomponer la tasa de ceba en función del sexo del adulto sí encontramos que las hembras respondían positivamente aumentando la tasa de ceba ante un aumento en los tiempos de petición, mientras que no hubo tal correlación con los machos. Las hembras suelen realizar una inversión en el cuidado parental casi asintótica mientras que en los machos es mucho más variable (Moreno et al., 1995, 1999b). Este resultado observado en los machos contrasta con los obtenidos en otro estudio previo (Ottosson et al., 1997).

Nuestro estudio no encontró diferencias significativas entre tratamientos en varias medidas biométricas a los 13 días utilizadas como predictores de la probabilidad de supervivencia y reclutamiento, como son la condición física, el peso o la longitud del tarso (Moreno et al., 2005a; Potti et al., 2002). Tampoco se encontraron diferencias respecto a la ganancia de masa a lo largo del desarrollo, lo que sugiere que no hay un coste de crecimiento asociado a las diferentes inversiones en esfuerzo de petición originadas por el tratamiento. Estos resultado parecen contrastar con los encontrados en el estudio previo realizado con urracas (Martín-Gálvez et al., 2011), en donde los pollos que recibieron el tratamiento con CPH mostraron en momento próximos a abandonar el nido un mayor peso, una mayor longitud del tarso y una mejor condición física. De nuevo, como discutimos anteriormente, puede que las dosis, que se suministraban cada dos días, no fuesen capaces de lograr que se manifestase una petición exagerada y, además, dado que la vida media de la CPH es de 12 horas (Norris et al., 1998), puede que los pollos se beneficiaran de una cantidad de alimento extra sin para ello tener que incurrir en mantener un esfuerzo de petición elevado durante la mayoría del tiempo.

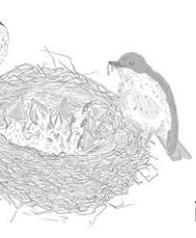
Respecto a las variables hematológicas analizadas, encontramos que los pollos AA, que provienen de nidos donde a todos los pollos se les suministró agua y manifestaron un menor esfuerzo de petición, tenían valores significativamente menores del H/L ratio que los pollos de los otros 3 tratamientos, independientemente de si habían recibido CPH o agua. Dado que el H/L ratio es utilizada como medida de estrés y está correlacionado con la probabilidad de supervivencia (Moreno et al., 2005; Lobato et al., 2005), nuestros resultado sugieren que aquellos pollos que



mostraron un mayor esfuerzo de petición, tanto por el efecto del tratamiento como por la competencia con sus hermanos, manifiestan una menor probabilidad de supervivencia.

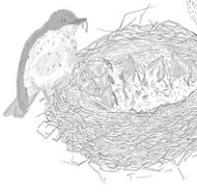
Al analizar el número de heterófilos por cada 10.000 eritrocitos encontramos que los pollos CC, aquellos que provenían de nidadas en las que todos los pollos habían recibido CPH (NE), fueron los que mayor número de heterófilos presentaban, siendo la diferencia significativa respecto a los pollos que habían recibido agua (MA y AA) independientemente de su tipo de nidada. Los pollos CC fueron aquellos que presentaron un esfuerzo de petición más elevado, tanto por el efecto de la CPH como por la competencia con sus propios hermanos que presentaban también este comportamiento de petición exagerado. Este resultado está acorde a los demás hallazgos encontrados, ya que un número más elevado de heterófilos por cada 10.000 eritrocitos está relacionado con una menor probabilidad de supervivencia según se ha descrito en esta misma especie (Lobato et al., 2005). Esto es concordante con el mayor esfuerzo de petición realizado, que acarrearía un mayor coste asociado, y con los demás resultados de las variables hematológicas.

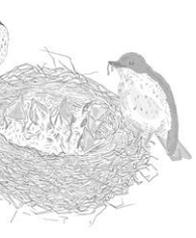
De forma similar encontramos que los pollos AA mostraron una respuesta inmune a la PHA significativamente más fuerte que los pollos de los otros 3 tratamientos, que realizaron esfuerzos de petición mayores. En esta especie se ha encontrado que la capacidad de montar una respuesta inmune celular está estrechamente relacionada con la probabilidad de supervivencia del individuo (Moreno et al., 2005), por lo que, de nuevo, encontramos que los pollos AA, que realizaron una inversión menor en esfuerzo de petición presentan mayores probabilidades de supervivencia. Al analizar la carga parasitaria no se encontraron diferencias en cuanto a prevalencia y abundancia de protozoos en función del tratamiento. Sin embargo, aunque no en prevalencia, sí se encontró una abundancia significativamente mayor de ácaros en los nidos NE, donde todos los pollos recibieron CPH. Esto puede ser explicado debido a que los pollos CC fueron los que realizaban un mayor esfuerzo de petición y, como hemos comentado, esto afectaba a su capacidad de montar una respuesta

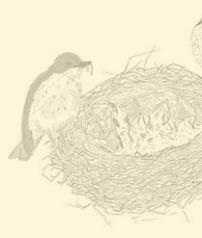


inmune, por lo que se encontrarían en una posición más vulnerable para frenar una posible infección.

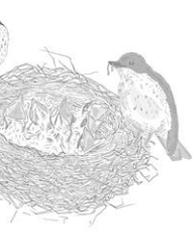
También encontramos diferencias en cuanto a la mortalidad en los nidos, aunque no en la dirección esperada, ya que los nidos mixtos (NM) mostraron una mortalidad de casi el doble que los otros dos tipos de nidada, tanto experimentales como control.



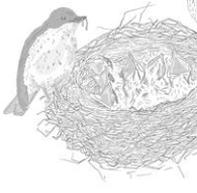


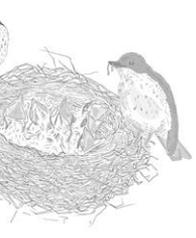


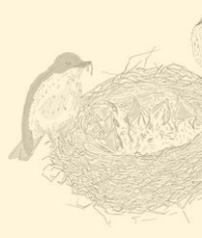
CONCLUSIONES



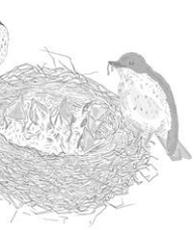
1. En el papamoscas cerrojillo no hay un coste a nivel de crecimiento asociado al esfuerzo de petición realizado por los pollos.
2. En el papamoscas cerrojillo tampoco hay efectos del esfuerzo de petición sobre el gasto metabólico.
3. En cambio, existe un coste a nivel inmunológico asociado al esfuerzo de petición. Los pollos que realizan un mayor esfuerzo de petición ven reducida su respuesta inmune.
4. En condiciones naturales, hay un efecto negativo del esfuerzo de petición sobre las variables hematológicas de H/L ratio y número de Heterófilos/10000 eritrocitos, ambas relacionadas con la probabilidad de supervivencia y reclutamiento. Este resultado sugiere la existencia de un coste de viabilidad asociado al esfuerzo de petición.
5. Por último, los pollos que sufren una mayor carga de ectoparásitos, a igualdad de necesidades nutricionales, muestran un menor esfuerzo de petición.







REFERENCIAS

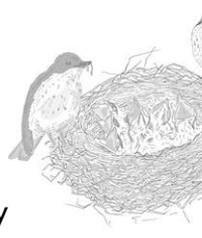


A

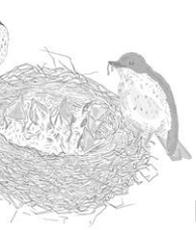
- Abraham, C. L., & Evans, R. M. (1999). Metabolic costs of heat solicitation calls in relation to thermal need in embryos of American white pelicans. *Animal Behaviour*, *57*(4), 967–975.
- Alatalo, R. V., & Lundberg, A. (1986). Heritability and selection on tarsus length in the pied flycatcher (*Ficedula hypoleuca*). *Evolution*, *40*(3), 574–583.
- Alexander, R. D. (1974). The evolution of social behavior. *Annual Review of Ecology and Systematics*, *5*(1), 325–383.
- Alonso-Alvarez, C., Bertrand, S., Faivre, B., & Sorci, G. (2007). Increased susceptibility to oxidative damage as a cost of accelerated somatic growth in zebra finches. *Functional Ecology*, *21*(5), 873–879. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2007.01300.x>
- Andersson, M. (1994). *Sexual selection* (Vol. 72). Princeton University Press.

B

- Bachman, G. C., & Chappell, M. A. (1998). The energetic cost of begging behaviour in nestling house wrens. *Animal Behaviour*, *55*(6), 1607–1618.
- Bergstrom, C. T., & Lachmann, M. (1997). Signalling among relatives. I. Is costly signalling too costly? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, *352*(1353), 609–617.
- Bergstrom, C. T., & Lachmann, M. (1998). Signaling among relatives. III. Talk is cheap. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(9), 5100–5105. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.9.5100>
- Bernis, F. (1962). Sobre migración de nuestros passeriformes transaharianos. *Ardeola*, *8*, 41–119.
- Blumstein, D. T., & Daniel, J. C. (2007). *Quantifying behavior the JWatcher way*. Sinauer Associates Incorporated.



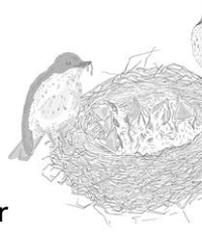
- Boncoraglio, G., Caprioli, M., & Saino, N. (2012). Solicitation displays reliably reflect oxidative damage in barn swallow nestlings. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *66*(4), 539–546. <https://doi.org/10.1007/s00265-011-1302-3>
- Both, C., Bouwhuis, S., Lessells, C. M., & Visser, M. E. (2006). Climate change and population declines in a long-distance migratory bird. *Nature*, *441*(7089), 81–83.
- Both, C., & Visser, M. E. (2001). Adjustment to climate change is constrained by arrival date in a long-distance migrant bird. *Nature*, *411*(6835), 296–298.
- Bowers, E. K., Hodges, C. J., Forsman, A. M., Vogel, L. A., Masters, B. S., Johnson, B. G. P., Johnson, L. S., Thompson, C. F., & Sakaluk, S. K. (2014). Neonatal body condition, immune responsiveness, and hematocrit predict longevity in a wild bird population. *Ecology*, *95*(11), 3027–3034. <https://doi.org/10.1890/14-0418.1>
- Bretz, F., Hothorn, T., & Westfall, P. (2016). *Multiple comparisons using R*. Chapman and Hall/CRC.
- Brilot, B. O., & Johnstone, R. A. (2002). Cost, competition and information in communication between relatives. *Journal of Theoretical Biology*, *217*(3), 331–340.
- Brilot, B. O., & Johnstone, R. A. (2003). The limits to cost-free signalling of need between relatives. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *270*(1519), 1055–1060. <https://doi.org/10.1098/rspb.2003.2329>
- Briskie, J. V., Martin, P. R., & Martin, T. E. (1999). Nest predation and the evolution of nestling begging calls. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *266*(1434), 2153–2159. <https://doi.org/10.1098/rspb.1999.0902>
- Briskie, J. V., Naugler, C. T., & Leech, S. M. (1994). Begging intensity of nestling birds varies with sibling relatedness. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, *258*(1351), 73–78.
- Brooks, M. E., Kristensen, K., Van Benthem, K. J., Magnusson, A., Berg, C. W., Nielsen, A., Skaug, H. J., Machler, M., & Bolker, B. M. (2017). glmmTMB balances speed and flexibility among packages for zero-inflated generalized linear mixed modeling. *The R Journal*, *9*(2), 378–400.



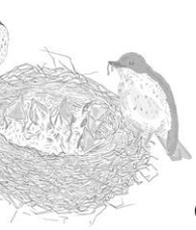
- Bruneau, A., Dernburg, A., Chauve, C., & Zenner, L. (2001). First in vitro cycle of the chicken mite, *Dermanyssus gallinae* (DeGeer 1778), utilizing an artificial feeding device. *Parasitology*, *123*(6), 583–589. <https://doi.org/10.1017/S0031182001008836>
- Buchanan, K. L., Goldsmith, A. R., Hinde, C. A., Griffith, S. C., & Kilner, R. M. (2007). Does testosterone mediate the trade-off between nestling begging and growth in the canary (*Serinus canaria*)? *Hormones and Behavior*, *52*(5), 664–671. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2007.08.009>
- Budden, A. E., & Wright, J. (2001). Begging in nestling birds. In *Current ornithology* (pp. 83–118). Springer.
- Budden, A. E., & Wright, J. (2008). Effects of feeding frequency on nestling begging and digestion. *Ibis*, *150*(2), 234–241. <https://doi.org/10.1111/j.1474-919X.2007.00769.x>

C

- Camacho, C., Canal, D., & Potti, J. (2013). Nonrandom dispersal drives phenotypic divergence within a bird population. *Ecology and Evolution*, *3*(14), 4841–4848.
- Camacho, C., Canal, D., & Potti, J. (2015). Testing the matching habitat choice hypothesis in nature: phenotype–environment correlation and fitness in a songbird population. *Evolutionary Ecology*, *29*(6), 873–886. <https://doi.org/10.1007/s10682-015-9793-4>
- Camacho, C., Canal, D., & Potti, J. (2016). Natal habitat imprinting counteracts the diversifying effects of phenotype-dependent dispersal in a spatially structured population. *BMC Evolutionary Biology*, *16*(1), 1–9.
- Camacho, C., Martínez-Padilla, J., Canal, D., & Potti, J. (2019). Long-term dynamics of phenotype-dependent dispersal within a wild bird population. *Behavioral Ecology*, *30*(2), 548–556.
- Campbell, T. W., & others. (1995). *Avian hematology and cytology*. (Issue Ed. 2). Iowa State University Press.



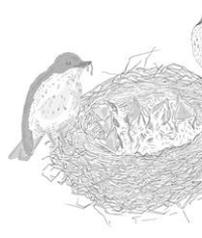
- Canal, D., Dávila, J., & Potti, J. (2011). Male phenotype predicts extra-pair paternity in pied flycatchers. *Behaviour*, *148*(5–6), 691–712.
- Canal, D., Jovani, R., & Potti, J. (2012a). Male decisions or female accessibility? Spatiotemporal patterns of extra pair paternity in a songbird. *Behavioral Ecology*, *23*(5), 1146–1153.
- Canal, D., Jovani, R., & Potti, J. (2012b). Multiple mating opportunities boost protandry in a pied flycatcher population. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *66*(1), 67–76.
- Cantarero, A., López-Arrabé, J., Palma, A., Redondo, A. J., & Moreno, J. (2014). Males respond to female begging signals of need: a handicapping experiment in the pied flycatcher, *Ficedula hypoleuca*. *Animal Behaviour*, *94*, 167–173.
- Cantarero, A., López-Arrabé, J., Redondo, A. J., & Moreno, J. (2013). Behavioural responses to ectoparasites in pied flycatchers *Ficedula hypoleuca*: An experimental study. *Journal of Avian Biology*, *44*(6), 591–599. <https://doi.org/10.1111/j.1600-048X.2013.00134.x>
- Chappell, M. A., & Bachman, G. C. (1998). Exercise capacity of House Wren nestlings: Begging chicks are not working as hard as they can. *The Auk*, *115*(4), 863–870.
- Chappell, M. A., & Bachman, G. C. (2002). Energetic costs of begging behaviour. In *The evolution of begging* (pp. 143–162). Springer.
- Christe, P., Richner, H., & Oppliger, A. (1996). Begging, food provisioning, and nestling competition in great tit broods infested with ectoparasites. *Behavioral Ecology*, *7*(2), 127–131. <https://doi.org/10.1093/beheco/7.2.127>
- Cichoń, M., & Dubiec, A. (2005). Cell-mediated immunity predicts the probability of local recruitment in nestling blue tits. *Journal of Evolutionary Biology*, *18*(4), 962–966. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2005.00910.x>
- Clutton-Brock, T. H. (1991). *The evolution of parental care* (Vol. 64). Princeton University Press.
- Costantini, D. (2014). Oxidative stress and hormesis in evolutionary ecology and physiology. *A Marriage between Mechanistic and Evolutionary Approaches*, 362.



- Costantini, D., & Møller, A. P. (2009). Does immune response cause oxidative stress in birds? A meta-analysis. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, *153*(3), 339–344. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.03.010>
- Cramp, S., Perrins, C. M., & Brooks, D. J. (1993). *Vol. VII: Flycatchers to shrikes*. Oxford [etc.]: Oxford University Press.
- Curio, E. (1960). Die systematische Stellung des spanischen Trauerschnäppers. *Vogelwelt*, *81*, 113–121.

D

- Dale, S., Gustavsen, R., & Slagsvold, T. (1996). Risk taking during parental care: a test of three hypotheses applied to the pied flycatcher. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *39*(1), 31–42.
- Davison, T. F., Rowell, J. G., & Rea, J. (1983). Effects of dietary corticosterone on peripheral blood lymphocyte and granulocyte populations in immature domestic fowl. *Research in Veterinary Science*, *34*(2), 236–239.
- de Juana Aranzana, E. (1980). *Atlas ornitológico de la Rioja* (Vol. 34). Servicio de Cultura de la Excma. Diputación Provincial.
- Dearborn, D. C. (1999). Brown-headed cowbird nestling vocalizations and risk of nest predation. *The Auk*, *116*(2), 448–457.
- Dhabhar, F. S., Miller, A. H., McEwen, B. S., & Spencer, R. L. (1995). Effects of stress on immune cell distribution. Dynamics and hormonal mechanisms. *The Journal of Immunology*, *154*(10), 5511–5527.
- Dugas, M. B., & Doumas, L. T. (2014). Ectoparasite density is associated with mouth colour and size in nestling House Sparrows *Passer domesticus*. *Ibis*, *156*(3), 682–686. <https://doi.org/10.1111/ibi.12154>
- DW, M., & Parker, G. A. (1997). *The evolution of sibling rivalry*. Oxford University Press, Oxford.



E

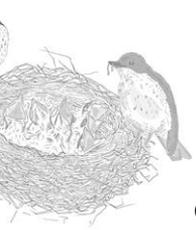
- Erickson, G. M., Rogers, K. C., & Yerby, S. A. (2001). Dinosaurian growth patterns and rapid avian growth rates. *Nature*, *412*(6845), 429–433. <https://doi.org/10.1038/35086558>
- Eshel, I., & Feldman, M. W. (1991). The handicap principle in parent-offspring conflict: comparison of optimality and population-genetic analyses. *The American Naturalist*, *137*(2), 167–185.

F

- Flammer, K., & Clubb, S. L. (1994). Neonatology. *Avian Medicine: Principles and Application*. Wingers Publishing Inc., Lake Worth, Florida, 805–841.
- Forbes, M. R. L. (1993). Parasitism and Host Reproductive Effort. *Oikos*, *67*(3), 444. <https://doi.org/10.2307/3545356>

G

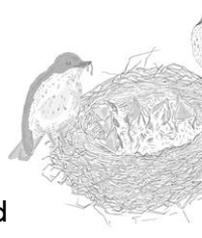
- Gelman, A., & Hill, J. (2006). *Data analysis using regression and multilevel/hierarchical models*. Cambridge university press.
- Godfray, H. C.J. (1991). Signalling of need by offspring to their parents. *Nature*, *352*(6333), 328–330. <https://doi.org/10.1038/352328a0>
- Godfray, H C J. (1995). Signaling of need between parents and young: parent-offspring conflict and sibling rivalry. *The American Naturalist*, *146*(1), 1–24.
- Godfray, H C J, & Johnstone, R. A. (2000). Begging and bleating: the evolution of parent--offspring signalling. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, *355*(1403), 1581–1591.



- Godfray, H Charles J. (1991). Signalling of need by offspring to their parents. *Nature*, 352(6333), 328–330.
- Godfray, H Charles J. (1995). Evolutionary theory of parent--offspring conflict. *Nature*, 376(6536), 133–138.
- Gold, C., Dahlsten, D., & others. (1989). Prevalence, habitat selection, and biology of *Protocalliphora* (Diptera: Calliphoridae) found in nests of mountain and chestnut-backed chickadees in California. *Hilgardia*, 57(2), 1–19.
- Goodship, N. M., & Buchanan, K. L. (2007). Nestling testosterone controls begging behaviour in the pied flycatcher, *Ficedula hypoleuca*. *Hormones and Behavior*, 52(4), 454–460. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2007.06.008>
- Goodship, Nicola M., & Buchanan, K. L. (2006). Nestling testosterone is associated with begging behaviour and fledging success in the pied flycatcher, *Ficedula hypoleuca*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273(1582), 71–76. <https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3289>
- Gottlander, K. (1987). Parental feeding behaviour and sibling competition in the pied flycatcher *Ficedula hypoleuca*. *Ornis Scandinavica*, 269–276.
- Grodzinski, U., Hauber, M. E., & Lotem, A. (2009). The role of feeding regularity and nestling digestive efficiency in parent-offspring communication: An experimental test. *Functional Ecology*, 23(3), 569–577. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2008.01536.x>
- Gross, W. B., & Siegel, H. S. (1983). Evaluation of the heterophil/lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens. *Avian Diseases*, 972–979.

H

- Haff, T. M., & Magrath, R. D. (2011). Calling at a cost: Elevated nestling calling attracts predators to active nests. *Biology Letters*, 7(4), 493–495. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2010.1125>
- Hamilton, W. D. (1964). The genetical evolution of social behaviour. II. *Journal of Theoretical Biology*, 7(1), 17–52.



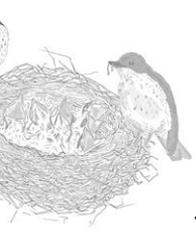
- Harper, A. B. (1986). The evolution of begging: sibling competition and parent-offspring conflict. *The American Naturalist*, 128(1), 99–114.
- Harvey, P. H., Greenwood, P. J., Campbell, B., & Stenning, M. J. (1984). Breeding dispersal of the Pied Flycatcher (*Ficedula hypoleuca*). *The Journal of Animal Ecology*, 727–736.
- Haskell, D. (1994). Experimental evidence that nestling begging behaviour incurs a cost due to nest predation. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 257(1349), 161–164.
- Haskell, D. G. (1999). The effect of predation on begging-call evolution in nestling wood warblers. *Animal Behaviour*, 57(4), 893–901.
- Haskell, D. G. (2002). Begging behaviour and nest predation. In *The evolution of begging* (pp. 163–172). Springer.
- Hoover, J. P., & Reetz, M. J. (2006). Brood parasitism increases provisioning rate, and reduces offspring recruitment and adult return rates, in a cowbird host. *Oecologia*, 149(1), 165–173. <https://doi.org/10.1007/s00442-006-0424-1>
- Hurlbert, S. H. (1984). Pseudoreplication and the design of ecological field experiments. *Ecological Monographs*, 54(2), 187–211.

I

- Ibáñez-Álamo, J. D., & others. (2010). *Estrategias antidepredatorias de adultos y pollos en el mirlo común: Implicaciones evolutivas y ecológicas*.

J

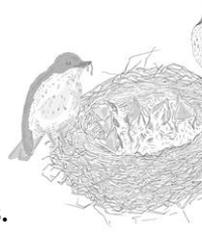
- Jacob, S., Rieucou, G., & Heeb, P. (2011). Multimodal begging signals reflect independent indices of nestling condition in European starlings. *Behavioral Ecology*, 22(6), 1249–1255. <https://doi.org/10.1093/beheco/arr121>



- Johnstone, R. A. (1996). Begging signals and parent--offspring conflict: do parents always win? *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 263(1377), 1677–1681.
- Johnstone, R. A. (1997). The evolution of animal signals. *Behavioural Ecology: An Evolutionary Approach*, 155178.
- Johnstone, R. A. (1998). Efficacy and honesty in communication between relatives. *The American Naturalist*, 152(1), 45–58.
- Johnstone, R. A. (1999). Signaling of need, sibling competition, and the cost of honesty. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(22), 12644–12649.
- Johnstone, R. A., & Godfray, H. C. J. (2002). Models of begging as a signal of need. In *The Evolution of Begging* (pp. 1–20). Springer.
- Jubete Tazo, F. (1997). *Atlas de las aves nidificantes de la provincia de Palencia (1987–1995)*. Asociación de Naturalistas Palentinos.

K

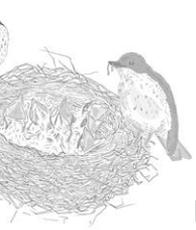
- Kedar, H., Rodriguez-Girones, M. A., Yedvab, S., Winkler, D. W., & Lotem, A. (2000). Experimental evidence for offspring learning in parent-offspring communication. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 267(1454), 1723–1727. <https://doi.org/10.1098/rspb.2000.1201>
- Kennedy, M. W., & Nager, R. G. (2006). The perils and prospects of using phytohaemagglutinin in evolutionary ecology. *Trends in Ecology & Evolution*, 21(12), 653–655.
- Killpack, T. L., & Karasov, W. H. (2012). Growth and development of house sparrows (*Passer domesticus*) in response to chronic food restriction throughout the nestling period. *Journal of Experimental Biology*, 215(11), 1806–1815. <https://doi.org/10.1242/jeb.066316>
- Kilner, R., & Johnstone, R. A. (1997). Begging the question: are offspring solicitation behaviours signals of need? *Trends in Ecology & Evolution*, 12(1), 11–15.



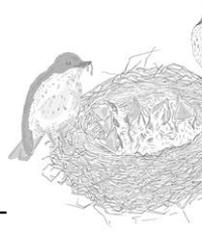
- Kilner, R. M. (2001). A growth cost of begging in captive canary chicks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(20), 11394–11398. <https://doi.org/10.1073/pnas.191221798>
- Kilner, R. M. (1999). Family conflicts and the evolution of nestling mouth colour. *Behaviour*, *136*(6), 779–804.
- Kilner, R. M. (2006). *Function and evolution of colour in young birds*. In: Hill, G.E. and McGraw, K.J. (eds). *Bird coloration, vol. II: Function and evolution*. Harvard Univ. Press, Cambridge, pp. 201–232.
- Kilner, R. M. (2002). The evolution of complex begging displays. In *The evolution of begging* (pp. 87–106). Springer.
- Kilner, R. M., & Hinde, C. A. (2008). Information warfare and parent-offspring conflict. *Advances in the Study of Behavior*, *38*, 283–336.

L

- Lachmann, M., & Bergstrom, C. T. (1998). Signalling among relatives: II. Beyond the tower of babel. *Theoretical Population Biology*, *54*(2), 146–160.
- Lachmann, M., Számadó, S., & Bergstrom, C. T. (2001). Cost and conflict in animal signals and human language. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(23), 13189–13194. <https://doi.org/10.1073/pnas.231216498>
- Laurila, M., Hohtola, E., Saarela, S., & Røshotte, M. E. (2003). Adaptive timing of digestion and digestion-related thermogenesis in the pigeon. *Physiology and Behavior*, *78*(3), 441–448. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(03\)00031-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(03)00031-3)
- Leech, S. M., & Leonard, M. L. (1996). Is there an energetic cost to begging in nestling tree swallows (*Tachycineta bicolor*)? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *263*(1373), 983–987. <https://doi.org/10.1098/rspb.1996.0145>
- Leech, Susan M., & Leonard, M. L. (1997). Begging and the risk of predation in nestling birds. *Behavioral Ecology*, *8*(6), 644–646.



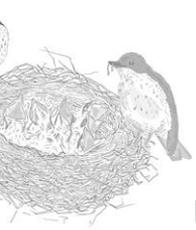
- Lehtonen, P. K., Laaksonen, T., Artemyev, A. V., Belskii, E., Both, C., Bureš, S., Bushuev, A. V., Krams, I., Moreno, J., Mägi, M., & others. (2009). Geographic patterns of genetic differentiation and plumage colour variation are different in the pied flycatcher (*Ficedula hypoleuca*). *Molecular Ecology*, *18*(21), 4463–4476.
- Leonard, M. L., & Horn, A. G. (2008). Does ambient noise affect growth and begging call structure in nestling birds? *Behavioral Ecology*, *19*(3), 502–507.
- Leonard, M. L., Horn, A. G., & Porter, J. (2003). Does begging affect growth in nestling tree swallows, *Tachycineta bicolor*? *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *54*(6), 573–577. <https://doi.org/10.1007/s00265-003-0668-2>
- Lindström, J. (1999). Early development and fitness in birds and mammals. *Trends in Ecology and Evolution*, *14*(9), 343–348. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(99\)01639-0](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(99)01639-0)
- Lobato, E., Merino, S., Moreno, J., Morales, J., Tomás, G., Martínez- de la Puente, J., Osorno, J. L., Kuchar, A., & Möstl, E. (2008). Corticosterone metabolites in blue tit and pied flycatcher droppings: Effects of brood size, ectoparasites and temperature. *Hormones and Behavior*, *53*(1), 295–305. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2007.10.010>
- Lobato, E., Moreno, J., Merino, S., Morales, J., Tomás, G., Martínez- de la Puente, J., Vázquez, R. A., Kuchar, A., Möstl, E., & Osorno, J. L. (2010). Arrival date and territorial behavior are associated with corticosterone metabolite levels in a migratory bird. *Journal of Ornithology*, *151*(3), 587–597.
- Lobato, E., Moreno, J., Merino, S., Sanz, J. J., & Arriero, E. (2005). Haematological variables are good predictors of recruitment in nestling pied flycatchers (*Ficedula hypoleuca*). *Ecoscience*, *12*(1), 27–34.
- Loiseau, C., Sorci, G., Dano, S., & Chastel, O. (2008). Effects of experimental increase of corticosterone levels on begging behavior, immunity and parental provisioning rate in house sparrows. *General and Comparative Endocrinology*, *155*(1), 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2007.03.004>



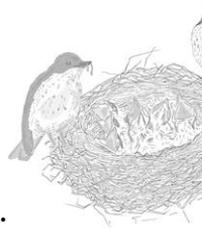
- López-Arrabé, J., Cantarero, A., Pérez-Rodríguez, L., Palma, A., Alonso-Alvarez, C., González-Braojos, S., & Moreno, J. (2015). Nest-dwelling ectoparasites reduce antioxidant defences in females and nestlings of a passerine: a field experiment. *Oecologia*, *179*(1), 29–41. <https://doi.org/10.1007/s00442-015-3321-7>
- Lundberg, A., & Alatalo, R. V. (1992). *The Pied Flycatcher*. London: T. & AD Poyser Ltd. 267 p.

M

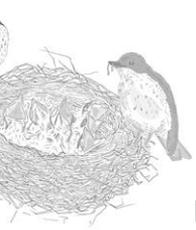
- Macnair, M. R., & Parker, G. A. (1979). Models of parent-offspring conflict. III. Intra-brood conflict. *Animal Behaviour*, *27*, 1202–1209.
- Mäntylä, E., sirkiä, P. M., Klemola, T., & Laaksonen, T. (2015). An experimental test of whether pied flycatchers choose the best territory for rearing the young. *Current Zoology*, *61*(4), 604–613.
- Martín-Gálvez, D., Pérez-Contreras, T., Soler, M., & Soler, J. J. (2011). Benefits associated with escalated begging behaviour of black-billed magpie nestlings overcompensate the associated energetic costs. *Journal of Experimental Biology*, *214*(9), 1463–1472.
- Martin, L. B., Han, P., Lewittes, J., Kuhlman, J. R., Klasing, K. C., & Wikelski, M. (2006). Phytohemagglutinin-induced skin swelling in birds: Histological support for a classic immunoeological technique. *Functional Ecology*, *20*(2), 290–299. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2006.01094.x>
- Martin, T. G., Wintle, B. A., Rhodes, J. R., Kuhnert, P. M., Field, S. A., Low-Choy, S. J., Tyre, A. J., & Possingham, H. P. (2005). Zero tolerance ecology: improving ecological inference by modelling the source of zero observations. *Ecology Letters*, *8*(11), 1235–1246.
- Martínez-de la Puente, J., Merino, S., Lobato, E., Moreno, J., Tomás, G., & Morales, J. (2009). Male nest-building activity influences clutch mass in Pied Flycatchers *Ficedula hypoleuca*. *Bird Study*, *56*(2), 264–267.



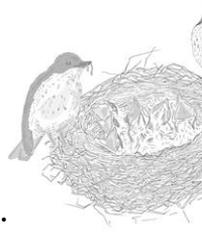
- Martínez-Padilla, J., Dávila, J. A., Merino, S., Moreno, J., & Millán, J. (2004). Within-brood size differences, sex and parasites determine blood stress protein levels in Eurasian Kestrel nestlings. *Functional Ecology*, *18*(3), 426–434.
- Maxwell, M. H., & Robertson, G. W. (1998). The avian heterophil leucocyte: a review. *World's Poultry Science Journal*, *54*(2), 155–178.
- Maynard Smith, J. (1994). Must reliable signals always be costly? *Animal Behaviour*, *47*(5), 1115–1120.
- Maynard Smith, J. & Harper, D. (2003). *Animal signals*. Oxford University Press.
- Mccarty, J. P. (1996). Nestling Cost of Begging in part of the biology of nestling birds, especially ditures or increased. *Trials*, *113*(1), 178–188.
- McCarty, J. P. (1997). The role of energetic costs in the evolution of begging behavior of nestling passerines. *The Auk*, *114*(1), 135–137.
- McDonald, P. G., Wilson, D. R., & Evans, C. S. (2009). Nestling begging increases predation risk, regardless of spectral characteristics or avian mobbing. *Behavioral Ecology*, *20*(4), 821–829. <https://doi.org/10.1093/beheco/arp066>
- Merino, S., & Potti, J. (1995a). Mites and blowflies decrease growth and survival in nestling pied flycatchers. *Oikos*, 95–103.
- Merino, S., & Potti, J. (1995b). Mites and Blowflies Decrease Growth and Survival in Nestling Pied Flycatchers. *Oikos*, *73*(1), 95. <https://doi.org/10.2307/3545730>
- Merino, S., & Potti, J. (1996). Weather dependent effects of nest ectoparasites on their bird hosts. *Ecography*, *19*(2), 107–113. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0587.1996.tb00161.x>
- Merino, S., Potti, J., & Moreno, J. (1996). Maternal effort mediates the prevalence of trypanosomes in the offspring of a passerine bird. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *93*(12), 5726–5730.
- Metcalfe, N. B., & Monaghan, P. (2001). Compensation for a bad start: Grow now, pay later? *Trends in Ecology and Evolution*, *16*(5), 254–260. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(01\)02124-3](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(01)02124-3)
- Mock, D. W., Dugas, M. B., & Strickler, S. A. (2011). Honest begging: Expanding from Signal of Need. *Behavioral Ecology*, *22*(5), 909–917. <https://doi.org/10.1093/beheco/arr091>



- Moe, B., Brunvoll, S., Mork, D., Brobakk, T. E., & Bech, C. (2004). Developmental plasticity of physiology and morphology in diet-restricted European shag nestlings (*Phalacrocorax aristotelis*). *Journal of Experimental Biology*, 207(23), 4067–4076. <https://doi.org/10.1242/jeb.01226>
- Møller, A. P., Arriero, E., Lobato, E., & Merino, S. (2009). A meta-analysis of parasite virulence in nestling birds. *Biological Reviews*, 84(4), 567–588.
- Montalvo, S., & Potti, J. (1992). Breeding dispersal in Spanish pied flycatchers *Ficedula hypoleuca*. *Ornis Scandinavica*, 491–498.
- Morales, J., Moreno, J., Merino, S., Sanz, J. J., Tomás, G., Arriero, E., Lobato, E., & Martínez-De la Puente, J. (2007). Female ornaments in the Pied Flycatcher *Ficedula hypoleuca*: associations with age, health and reproductive success. *Ibis*, 149(2), 245–254.
- Morales, J., Sanz, J. J., & Moreno, J. (2006). Egg colour reflects the amount of yolk maternal antibodies and fledging success in a songbird. *Biology Letters*, 2(3), 334–336.
- Moreno-Rueda, G., & Redondo, T. (2011). Begging at high level simultaneously impairs growth and immune response in southern shrike (*Lanius meridionalis*) nestlings. *Journal of Evolutionary Biology*, 24(5), 1091–1098. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2011.02242.x>
- Moreno-Rueda, G. (2007). Is there empirical evidence for the cost of begging? *Journal of Ethology*, 25(3), 215–222. <https://doi.org/10.1007/s10164-006-0020-1>
- Moreno-Rueda, G. (2010). An immunological cost of begging in house sparrow nestlings. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 277(1690), 2083–2088. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.0109>
- Moreno-Rueda, G. & Redondo, T. (2012). Benefits of Extra Begging Fail to Compensate for Immunological Costs in Southern Shrike (*Lanius meridionalis*) Nestlings. *PLoS ONE*, 7(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044647>
- Moreno-Rueda, G., Redondo, T., Trenzado, C. E., Sanz, A., & Zúñiga, J. M. (2012). Oxidative stress mediates physiological costs of begging in magpie (*Pica Pica*) nestlings. *PLoS ONE*, 7(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040367>



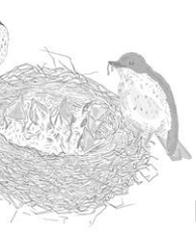
- Moreno, J., Cowie, R. J., Sanz, J. J., & Williams, R. S. R. (1995). Differential response by males and females to brood manipulations in the pied flycatcher: energy expenditure and nestling diet. *Journal of Animal Ecology*, 721–732.
- Moreno, J., Lobato, E., Merino, S., & la Puente, J. (2008). Blue--green eggs in pied flycatchers: an experimental demonstration that a supernormal stimulus elicits improved nestling condition. *Ethology*, 114(11), 1078–1083.
- Moreno, J., Lobato, E., Morales, J., Merino, S., Tomás, G., la Puente, J., Sanz, J. J., Mateo, R., & Soler, J. J. (2006). Experimental evidence that egg color indicates female condition at laying in a songbird. *Behavioral Ecology*, 17(4), 651–655.
- Moreno, J., Merino, S., J. Sanz, J., Arriero, E., Morales, J., & Tomás, G. (2005). Nestling cell-mediated immune response, body mass and hatching date as predictors of local recruitment in the pied flycatcher *Ficedula hypoleuca*. *Journal of Avian Biology*, 36(3), 251–260.
- Moreno, J., Merino, S., Lobato, E., Ruiz-De-Castañeda, R., Martínez-De La Puente, J., Del Cerro, S., & Rivero-De Aguilar, J. (2009). Nest-dwelling ectoparasites of two sympatric hole-nesting passerines in relation to nest composition: an experimental study. *Ecoscience*, 16(3), 418–427.
- Moreno, J., Merino, S., Potti, J., De Leon, A., & Rodríguez, R. (1999). Maternal energy expenditure does not change with flight costs or food availability in the pied flycatcher (*Ficedula hypoleuca*): costs and benefits for nestlings. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 46(4), 244–251.
- Moreno, J., Merino, S., Sanz, J. J., Arriero, E., Morales, J., & Tomás, G. (2005). Nestling cell-mediated immune response, body mass and hatching date as predictors of local recruitment in the pied flycatcher *Ficedula hypoleuca*. *Journal of Avian Biology*, 36(3), 251–260. <https://doi.org/10.1111/j.0908-8857.2005.03413.x>
- Moreno, J., Morales, J., Lobato, E., Merino, S., Tomás, G., & Martínez de la Puente, J. (2005). Evidence for the signaling function of egg color in the pied flycatcher *Ficedula hypoleuca*. *Behavioral Ecology*, 16(5), 931–937.



- Moreno, J., Morales, J., Lobato, E., Merino, S., Tomás, G., & la Puente, J. (2006). More colourful eggs induce a higher relative paternal investment in the pied flycatcher *Ficedula hypoleuca*: a cross-fostering experiment. *Journal of Avian Biology*, *37*(6), 555–560.
- Moreno, J., & Osorno, J. L. (2003). Avian egg colour and sexual selection: does eggshell pigmentation reflect female condition and genetic quality? *Ecology Letters*, *6*(9), 803–806.
- Moreno, J., Osorno, J. L., Morales, J., Merino, S., & Tomás, G. (2004). Egg colouration and male parental effort in the pied flycatcher *Ficedula hypoleuca*. *Journal of Avian Biology*, *35*(4), 300–304.
- Moreno, J., Redondo, A. J., Cantarero, A., Ruiz-de-Castañeda, R., & González-Braojos, S. (2011). Handicapped females receive more feedings during incubation from their mates: support for the female nutrition hypothesis. *Acta Ethologica*, *14*(2), 85.
- Moreno, J., Velando, A., Ruiz-De-Castañeda, R., Cantarero, A., González-Braojos, S., & Redondo, S. (2011). Plasma antioxidant capacity and oxidative damage in relation to male plumage ornamental traits in a montane Iberian Pied Flycatcher *Ficedula hypoleuca* population. *Acta Ornithologica*, *46*(1), 62–67.

N

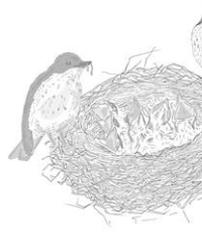
- Navarro, C., Marzal, A., De Lope, F., & Møller, A. P. (2003). Dynamics of an immune response in house sparrows *Passer domesticus* in relation to time of day, body condition and blood parasite infection. *Oikos*, *101*(2), 291–298. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0706.2003.11663.x>
- Noguera, J. C., Morales, J., Pérez, C., & Velando, A. (2010). On the oxidative cost of begging: Antioxidants enhance vocalizations in gull chicks. *Behavioral Ecology*, *21*(3), 479–484. <https://doi.org/10.1093/beheco/arq005>
- Nöldeke, G., & Samuelson, L. (1999). How costly is the honest signaling of need? *Journal of Theoretical Biology*, *197*(4), 527–539.



Norris, C. R., Boothe, D. M., Esparza, T., Gray, C., & Ragsdale, M. (1998). Disposition of cyproheptadine in cats after intravenous or oral administration of a single dose. *American Journal of Veterinary Research*, 59(1), 79–81.

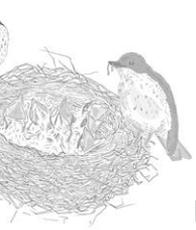
O

- O'Connor, J. A., Robertson, J., & Kleindorfer, S. (2014). Darwin's finch begging intensity does not honestly signal need in parasitised nests. *Ethology*, 120(3), 228–237. <https://doi.org/10.1111/eth.12196>
- Ochoa, D., Redondo, T., & Moreno-Rueda, G. (2019). Mizutama: A Quick, Easy, and Accurate Method for Counting Erythrocytes. *Physiological and Biochemical Zoology*, 92(2), 206–210.
- Camacho, C. 2018. Fine-scale population differentiation: ecological and evolutionary mechanisms involved. Ph.D. Dissertation. Universidad de Sevilla, Spain.
- Osorno, J. L., & Klemming, J. M. (2005). El color azul y verde de los huevos de las aves y la selección sexual. *Quercus*, 229, 44–47.
- Ottosson, U., Bäckman, J., & Smith, H. G. (1997). Begging affects parental effort in the pied flycatcher, *Ficedula hypoleuca*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 41(6), 381–384.
- Ouwehand, J., Ahola, M. P., Ausems, A. N. M. A., Bridge, E. S., Burgess, M., Hahn, S., Hewson, C. M., Klaassen, R. H. G., Laaksonen, T., Lampe, H. M., & others. (2016). Light-level geolocators reveal migratory connectivity in European populations of pied flycatchers *Ficedula hypoleuca*. *Journal of Avian Biology*, 47(1), 69–83.
- Owen, J. P., Nelson, A. C., & Clayton, D. H. (2010). Ecological immunology of bird-ectoparasite systems. *Trends in Parasitology*, 26(11), 530–539. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.06.005>

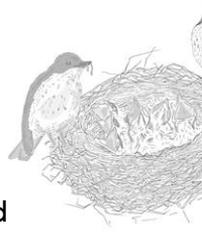


P

- Parker, G A, & Macnair, M. R. (1979). Models of parent-offspring conflict. IV. Suppression: evolutionary retaliation by the parent. *Animal Behaviour*, 27, 1210–1235.
- Parker, G. A., Royle, N. J., & Hartley, I. R. (2002). Begging scrambles with unequal chicks: Interactions between need and competitive ability. *Ecology Letters*, 5(2), 206–215. <https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2002.00301.x>
- Parker, G. A, Royle, N. J., & Hartley, I. R. (2002a). Begging scrambles with unequal chicks: interactions between need and competitive ability. *Ecology Letters*, 5(2), 206–215.
- Parker, G. A, Royle, N. J., & Hartley, I. R. (2002b). Intrafamilial conflict and parental investment: a synthesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 357(1419), 295–307.
- Payne, R. J. H., & Rodríguez-Gironés, M. A. (1998). The origins of parent-offspring signalling. *Journal of Theoretical Biology*, 195(2), 273–279.
- Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy, S., & Sarkar, D. (2012). R Development Core Team (2012). 'nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R Package Version 3.1-105.' *Vienna: R Foundation for Statistical Computing*.
- Pitala, N., Siitari, H., Gustafsson, L., & Brommer, J. E. (2010). Costs and benefits of experimentally induced changes in the allocation of growth versus immune function under differential exposure to ectoparasites. *PLoS ONE*, 5(5), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010814>
- Platt, T. G., & Bever, J. D. (2009). Kin competition and the evolution of cooperation. *Trends in Ecology & Evolution*, 24(7), 370–377.
- Porri, J., & Montalvo, S. (1990). Ocupacion De Areas Con Nidales Por El Papamoscas Cerrojillo (*Ficedula Hypoleuca*). *Ardeola*, 37(June), 1.
- Potti, J., Dávila, J. A., Tella, J. L., Fris, Ó., & Villar, S. (2002). Gender and viability selection on morphology in fledgling pied flycatchers. *Molecular Ecology*, 11(8), 1317–1326. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01545.x>



- Potti, J., & Montalvo, S. (1991). Male colour variation in Spanish pied flycatchers *Ficedula hypoleuca*. *Ibis*, *133*(3), 293–299.
- Potti, J., & Montalvo, S. (1991). Return rate, age at 1st breeding and natal dispersal of pied flycatchers *Ficedula hypoleuca* in central Spain. *Ardea*, *79*(3), 419–428.
- Potti, J., & Montalvo, S. (1993). Polygyny in Spanish pied flycatchers *Ficedula hypoleuca*. *Bird Study*, *40*(1), 31–37.
- Potti, J. (1993a). A male trait expressed in female pied flycatchers, *Ficedula hypoleuca*: the white forehead patch. *Animal Behaviour*.
- Potti, J. (1993b). Environmental, ontogenetic, and genetic variation in egg size of Pied Flycatchers. *Canadian Journal of Zoology*, *71*(8), 1534–1542.
- Potti, J. (1998a). Arrival time from spring migration in male pied flycatchers: individual consistency and familial resemblance. *The Condor*, *100*(4), 702–708.
- Potti, J. (1998b). Variation in the onset of incubation in the pied flycatcher (*Ficedula hypoleuca*): fitness consequences and constraints. *Journal of Zoology*, *245*(3), 335–344.
- Potti, J. (2008). Temperature during egg formation and the effect of climate warming on egg size in a small songbird. *Acta Oecologica*, *33*(3), 387–393.
- Potti, J., & Canal, D. (2011). Heritability and genetic correlation between the sexes in a songbird sexual ornament. *Heredity*, *106*(6), 945–954.
- Potti, J., Canal, D., & Camacho, C. (2014). Ontogenetic variation in the plumage colour of female European Pied Flycatchers *Ficedula hypoleuca*. *Ibis*, *156*(4), 879–884.
- Potti, J., Canal, D., & Serrano, D. (2013). Lifetime fitness and age-related female ornament signalling: evidence for survival and fecundity selection in the pied flycatcher. *Journal of Evolutionary Biology*, *26*(7), 1445–1457.
- Potti, J., Dávila, J. A., Tella, J. L., Frías, Ó., & Villar, S. (2002). Gender and viability selection on morphology in fledgling pied flycatchers. *Molecular Ecology*, *11*(8), 1317–1326.
- Potti, J., & Merino, S. (1994). Heritability estimates and maternal effects on tarsus length in pied flycatchers, *Ficedula hypoleuca*. *Oecologia*, *100*(3), 331–338.



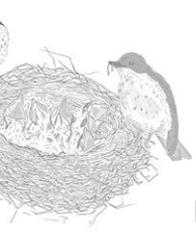
- Potti, J. & Montalvo, S. (1991). Male arrival and female mate choice in Pied Flycatchers *Ficedula hypoleuca* in Central Spain. *Ornis Scandinavica*, 45–54.
- Potti, J., Moreno, J., Merino, S., Frías, O., & Rodríguez, R. (1999). Environmental and genetic variation in the haematocrit of fledgling pied flycatchers *Ficedula hypoleuca*. *Oecologia*, 120(1), 1–8.
- Price, K., Ydenberg, R., & Daust, D. (2002). State-dependent begging with asymmetries and costs: a genetic algorithm approach. In *The evolution of begging* (pp. 21–42). Springer.

Q

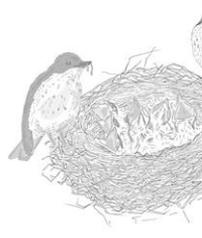
- Queen, J. P., Quinn, G. P., & Keough, M. J. (2002). *Experimental design and data analysis for biologists*. Cambridge university press.
- Quillfeldt, P., Masello, J. F., Strange, I. J., & Buchanan, K. L. (2006). Begging and provisioning of thin-billed prions, *Pachyptila belcheri*, are related to testosterone and corticosterone. *Animal Behaviour*, 71(6), 1359–1369. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2005.09.015>

R

- Redondo, T. & Castro, F. 1992. *Signalling of nutritional need by Magpie nestlings*. *Ethology* 92 193– 204.
- Redondo, T., Ochoa, D., Moreno-Rueda, G., & Potti, J. (2016). Pied flycatcher nestlings incur immunological but not growth begging costs. *Behavioral Ecology*, 27(5). <https://doi.org/10.1093/beheco/arw045>
- Redondo, T., & De Reyna, L. A. (1988). Locatability of begging calls in nestling altricial birds. *Animal Behaviour*, 36(3), 653–661.
- Redondo, T., Gomendio, M., & Medina, R. (1992). Sex-biased parent-offspring conflict. *Behaviour*, 123(3–4), 261–289.
- Reeve, H. K. (1997). Evolutionarily stable communication between kin: a general model. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 264(1384), 1037–1040.

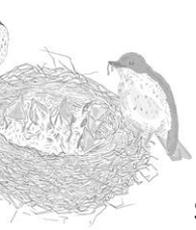


- Rodríguez-Gironés, M. A., Cotton, P. A., & Kacelnik, A. (1996). The evolution of begging: signaling and sibling competition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *93*(25), 14637–14641.
- Rodríguez-Gironés, M. A., Zúniga, J. M., & Redondo, T. (2001). Effects of begging on growth rates of nestling chicks. *Behavioral Ecology*, *12*(3), 269–274.
- Rodríguez-Gironés, M. A., Enquist, M., & Lachmann, M. (2001). Role of begging and sibling competition in foraging strategies of nestlings. *Animal Behaviour*, *61*(4), 733–745.
- Rodríguez-Gironés, M. A. (2002). Feeding experience and relative size modify the begging strategies of nestlings. *Behavioral Ecology*, *13*(6), 782–785. <https://doi.org/10.1093/beheco/13.6.782>
- Romano, A., Rubolini, D., Caprioli, M., Boncoraglio, G., Ambrosini, R., & Saino, N. (2011). Sex-Related effects of an immune challenge on growth and begging behavior of barn swallow nestlings. *PLoS ONE*, *6*(7), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022805>
- Romero, L. M. (2004). Physiological stress in ecology: Lessons from biomedical research. *Trends in Ecology and Evolution*, *19*(5), 249–255. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2004.03.008>
- Royle, N. J., Hartley, I. R., & Parker, G. A. (2002a). Begging for control: when are offspring solicitation behaviours honest? *Trends in Ecology & Evolution*, *17*(9), 434–440.
- Royle, N. J., Hartley, I. R., & Parker, G. A. (2002b). Begging for control: When are offspring solicitation behaviours honest? *Trends in Ecology and Evolution*, *17*(9), 434–440. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(02\)02565-X](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(02)02565-X)
- Royle, N. J., Hartley, I. R., & Parker, G. A. (2004). Parental investment and family dynamics: interactions between theory and empirical tests. *Population Ecology*, *46*(3), 231–241.

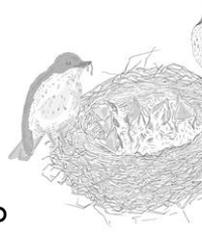


S

- Saino, N., Ninni, P., Incagli, M., Calza, S., Sacchi, R., & Møller, A. P. (2000). Begging and parental care in relation to offspring need and condition in the barn swallow (*Hirundo rustica*). *American Naturalist*, *156*(6), 637–649. <https://doi.org/10.1086/316996>
- Saino, N., Ambrosini, R., Martinelli, R., Ninni, P., & Møller, A. P. (2003). Gape coloration reliably reflects immunocompetence of barn swallow (*Hirundo rustica*) nestlings. *Behavioral Ecology*, *14*(1), 16–22. <https://doi.org/10.1093/beheco/14.1.16>
- Saino, N., Suffritti, C., Martinelli, R., Rubolini, D., & Møller, A. P. (2003). Immune response covaries with corticosterone plasma levels under experimentally stressful conditions in nestling barn swallows (*Hirundo rustica*). *Behavioral Ecology*, *14*(3), 318–325. <https://doi.org/10.1093/beheco/14.3.318>
- Sancho, J. R., Sancho, F. R., Aristondo, L. M. A., Barcenilla, C. P., & Fernández, R. V. (1996). *Atlas de las aves nidificantes de la provincia de Burgos*. Caja de Ahorros del Círculo Católico.
- Sanz, J. J., & Moreno, J. (1995). Experimentally induced clutch size enlargements affect reproductive success in the Pied Flycatcher. *Oecologia*, *103*(3), 358–364.
- Sanz, J. J., & Moreno, J. (2000). Delayed senescence in a southern population of the pied flycatcher (*Ficedula hypoleuca*). *Ecoscience*, *7*(1), 25–31.
- Sanz, J. J. (1998). Effect of habitat and latitude on nestling diet of Pied Flycatchers *Ficedula hypoleuca*. *Ardea*, *86*(1), 81.
- Sanz, J. J. (2001). Latitudinal variation in female local return rate in the philopatric pied flycatcher (*Ficedula hypoleuca*). *The Auk*, *118*(2), 539–543.
- Schmid Hempel, P. (2011). *Evolutionary parasitology the integrated study of infections, immunology, ecology, and genetics* (Issue 574.5249 S2).
- Schwagmeyer, P. L., & Mock, D. W. (2008). Parental provisioning and offspring fitness: size matters. *Animal Behaviour*, *75*(1), 291–298.



- Searcy, W. A., & Nowicki, S. (2005). *The evolution of animal communication: reliability and deception in signaling systems*. Princeton University Press.
- Simon, A., Thomas, D., Blondel, J., Perret, P., & Lambrechts, M. M. (2004). Physiological ecology of mediterranean blue tits (*Parus caeruleus* L.): Effects of ectoparasites (*Protocalliphora* spp.) and food abundance on metabolic capacity of nestlings. *Physiological and Biochemical Zoology*, *77*(3), 492–501. <https://doi.org/10.1086/383512>
- Sirkiä, P. M., & Laaksonen, T. (2009). Distinguishing between male and territory quality: females choose multiple traits in the pied flycatcher. *Animal Behaviour*, *78*(5), 1051–1060.
- Smiseth, P. T., Scott, M. P., & Andrews, C. (2011). Hormonal regulation of offspring begging and mediation of parent-offspring conflict. *Animal Behaviour*, *81*(3), 507–517. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2010.11.029>
- Smits, J. E., Bortolotti, G. R., & Tella, J. L. (1999). Simplifying the phytohaemagglutinin skin-testing technique in studies of avian immunocompetence. *Functional ecology*, *13*(4), 567–572.
- Soler, M., Ruiz-Raya, F., Carra, L. G., Medina-Molina, E., Ibáñez-Alamo, J. D., & Martín-Gálvez, D. (2014). A long-term experimental study demonstrates the costs of begging that were not found over the short term. *PLoS ONE*, *9*(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111929>
- Soler, M., Soler, J. J., Martínez-Íñez, J. G., & Moreno, J. (1999). Begging behaviour and its energetic cost in great spotted cuckoo and magpie host chicks. *Canadian Journal of Zoology*, *77*(11), 1794–1800.
- Sorci, G., & Faivre, B. (2009). Inflammation and oxidative stress in vertebrate host-parasite systems. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *364*(1513), 71–83. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0151>
- Stamps, J. A., Metcalf, R. A., & Krishnan, V. V. (1978). A genetic analysis of parent-offspring conflict. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *3*(4), 369–392.
- Starck, J. M., Ricklefs, R. E., & others. (1998). *Avian growth and development: evolution within the altricial-precocial spectrum* (Issue 8). Oxford University Press on Demand.



Számadó, S. (2011). The cost of honesty and the fallacy of the handicap principle. *Animal Behaviour*, 81(1), 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2010.08.022>

T

Trivers, R. L. (1974). *Parent-Offspring Conflict*. 264, 249–264.

Tschirren, B., Bischoff, L. L., Saladin, V., & Richner, H. (2007). Host condition and host immunity affect parasite fitness in a bird-ectoparasite system. *Functional Ecology*, 21(2), 372–378. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2007.01235.x>

V

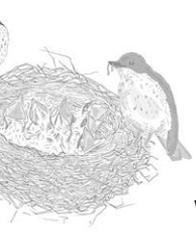
Verhulst, S., & Wiersma, P. (1997). Is Begging Cheap? *The Auk*, 114(1), 134–134. <https://doi.org/10.2307/4089078>

Vézina, F., Love, O. P., Lessard, M., & Williams, T. D. (2009). Shifts in metabolic demands in growing altricial nestlings illustrate context-specific relationships between basal metabolic rate and body composition. *Physiological and Biochemical Zoology*, 82(3), 248–257. <https://doi.org/10.1086/597548>

W

Weathers, W. W. (1996). Energetics of postnatal growth. In *Avian energetics and nutritional ecology* (pp. 461–496). Springer.

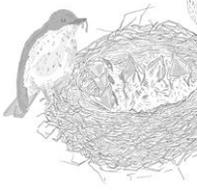
Wells, J. C. K. (2003). Parent-offspring conflict theory, signaling of need, and weight gain in early life. *The Quarterly Review of Biology*, 78(2), 169–202.

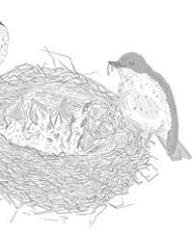


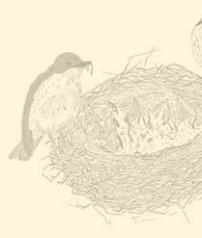
- West, S. A., Pen, I., & Griffin, A. S. (2002). Cooperation and competition between relatives. *Science*, *296*(5565), 72–75.
- Wilson, D. S., & Clark, A. B. (2002). Begging and cooperation: an exploratory flight. In *The evolution of begging* (pp. 43–64). Springer.
- Wright, J., Karasov, W. H., Kazem, A. J. N., Gonçalves, I. B., & McSwan, E. (2010). Begging and digestive responses to differences in long-term and short-term need in nestling pied flycatchers. *Animal Behaviour*, *80*(3), 517–525. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2010.06.015>

Z

- Zahavi, A. (1975). Mate selection—a selection for a handicap. *Journal of Theoretical Biology*, *53*(1), 205–214.
- Zahavi, A., & Zahavi, A. (1999). *The handicap principle: A missing piece of Darwin's puzzle*. Oxford University Press.
- Zuur, A., Ieno, E. N., Walker, N., Saveliev, A. A., & Smith, G. M. (2009). *Mixed effects models and extensions in ecology with R*. Springer Science & Business Media.



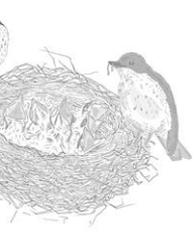




AGRADECIMIENTOS

*“La gratitud se da cuando la memoria se almacena
en el corazón y no en la mente”*

Lionel Hampton

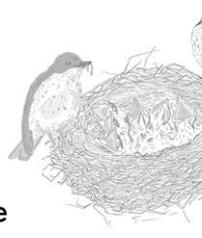


Sin duda alguna este apartado es el más difícil de escribir. Aquí no hay pautas, ni esquemas, ni tablas, ni gráficas, ni modelos. Sin embargo, hay un número casi infinito de datos, de resultados, de efectos que difícilmente pueden medirse o cuantificarse. Esta tesis no es solamente el resultado de un trabajo académico, es también el fruto de todos esos otros factores que nos rodean y que no podemos controlar. Muchos de estos factores tienen en común el haber causado un efecto significativo, el sentimiento de gratitud. Los sentimientos son algo casi inefable, ¿cómo dar cuerpo con palabras al algo tan íntimo, tan interno e intenso? El resultado de describir algo así con palabras no dejará de ser una sombra de ese sentimiento, sin embargo, intentaré que sea una sombra lo más luminosa posible.

A mi madre. Pilar siempre firme en el que apoyarme, mano que siempre ha ayudado a levantarme, siempre dispuesta a escuchar, siempre respetando, guiadora (sigo sin creer que esta palabra del crucigrama no fuese una carambola), siempre haciendo que su amor esté presente. Aunque estemos lejos ella siempre está cerca, a mi lado. Gracias por ser como eres mamá.

A mi padre. Él ya no está para poder ver finalizada esta tesis pero de igual forma siento tu callado sentimiento de orgullo que afloraría por tus húmedos ojos desde la cima de su montaña donde ahora está. Él me transmitió mucho más que la curiosidad y el respeto por la naturaleza, me enseñó a amarla. Sus voces cuando me leía a “Shere”, sus historias de Manolín y Manolón, su felicidad en la naturaleza, siempre estarán conmigo.

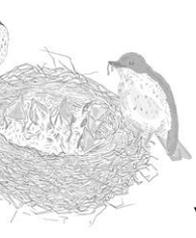
A mi Inmina. Gracias por tanto...por tu luz, por tu amor, por tu alegría, tu paciencia, por dar tanto, por enseñarme tanto, por hacerme ser mejor. Gracias por ser así, por hacer que en medio de la más oscura tormenta salga el sol. Gracias por cuidarme, por mimarme, por escucharme, por entenderme (cosa casi imposible), por el “pulpito”, por los abrazos y las caricias que siempre consiguen tranquilizarme. En ti encontrado no alguien con quien envejecer sino con quien mantener la ilusión de la niñez. Siempre serás mi pequeña.



Gracias también a toda la familia Márquez Linares por haberme adoptado como uno más en las familias y hacer que sea un primo más.

A mis amigos de siempre. Dicen que lo importante de los amigos es que compartan tu mismo desorden mental, en eso he tenido mucha suerte. Por llevar una vida compartiendo risas, tristezas y muchas cosas más. A Pedro, como un hermano desde hace 34 años, a mi Alelín por nuestras “avispas” y por ser ingenieros de la palabra, a Chemita por su locura y poesía, a Darío por nuestras acaloradas discusiones, a Cesitar por ser casi polos opuestos, a Oscarín y su trabajo de mecánico de bicis, a Viky por tu maravilloso dibujo y tus despistes, a Laurina, fotógrafa oficial del grupo, a Luci y su picor de niki, a Marti por sus pulseras de la suerte y porque el koala está en Granada, a Tere y su nariz, a Cosuquina y su vaso torcido, a Dieguito por recogerme en aeropuertos con cartel, a Margo que antes molaba, a Nía y su agresivo apoyo nutricional, a Faes y su brutal sinceridad y, como seguro que alguien se me olvida, a los olvidados por mi dispersa cabeza. Marinita, tu mereces un espacio aparte. Por todo. Por loca, por ponerme de los nervios y sacarme de quicio saludando con la manita, por su obsesión con los cruasanes de bechamel...pero sobre todo por estar siempre ahí, mucho me has escuchado y aguantado y mucho más que te queda. El que avisa no es traidor.

A mis amigos papamosqueros. Son ya muchos años los que llevamos compartidos. Cierto es que nuestra relación no es normal, nos vemos cada día, cada minuto durante dos meses de una forma tan intensa que sería comparable a siameses y luego apenas nos vemos durante el resto del año. Gracias por esos meses. A Potti por sus poéticas pero inigualablemente precisas descripciones de los cantos, a Jesús por hacerme sentir tan valorado laboralmente y sobre todo por ser el mejor público existente para los chistes, a Fran por soportar mis ronquidos y por todas las dudas en identificación de especies, a Jaimelón por su eterna sonrisa, por sus brazos en jarras por la mañana, por el baptisterio y por estar como un roble, a María “la gallega” por sus llamadas eclesiásticas, a O`Cannal por sus líos en los cuadernos, a muchos otros, a Loren, Tomás, Justine, a Alba y Alba, a Marco y Martín por recordarnos la ilusión y alegría de la niñez y sus preguntas y apreciaciones difíciles de responder, a Rocío

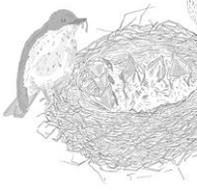


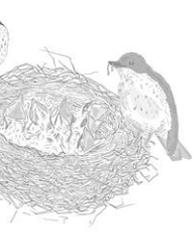
y sus alarmas, a Javi Manzano, Pablo, María Cuenca y, de nuevo, a los que haya podido olvidar. Carlitos, ¿qué decirte a ti? Has sido amigo, sutil mentor, entre risas y payasadas me has formado en el trabajo de campo y siempre te tendré que dar las gracias. Eso sí, no volveré a cerrar los ojos cuando me lo digas bajo ningún motivo.

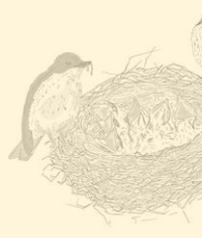
A Gregorio. Por saber darme tiempo y espacio, por aguantar mis llamadas y mis dudas y, muy en especial, por haber logrado remotivar lo que era difícilmente motivable.

A la maravillosa gente de La Hiruela. Gracias por lograr que a pesar de estar lejos de mi domicilio siempre me haya sentido en casa. Gracias a Paco, Elena y Fran por sus bebidas isotónicas después de un largo día de campo, a Pepa y Antonio (pareja mezcla entre calma y odio al Powerpoint), a Belén y Óscar por su música y alegría, a Andrés y su callada amistad, a Javi por su arroz y sus chistes, a Estér y Javi y a todos los demás que son la razón de que La Hiruela sea La Hiruela. Héctor, Silvi, vosotros sois sin duda el corazón del pueblo, fuisteis y sois mi esperada “agua de mayo” de los fines de semana, interminables horas con vosotros que realmente quieres que sean interminables. Gracias.

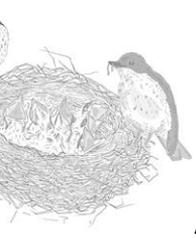
Por último, a mi Gijón y a mi Asturias. Porque su clima, su agreste paisaje, su verde “insultante” se reflejan en como soy.







ANEXOS



Anexo I: Publicaciones derivadas de la Tesis Doctoral como Indicio de Calidad

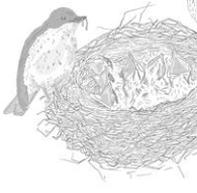
Como resultados de la tesis “Estudio de los costes y la evolución del comportamiento de petición de los pollos de papamoscas cerrojillo (*Ficedula hypoleuca*)”, defendida por el doctorando David Ochoa Castañón, se han publicado los siguientes artículos científicos, todos ellos indexados según el JCR y en las que se indica el Factor de Impacto (FI) y el cuartil (Q), como indicios de su calidad científica.

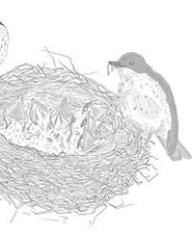
Publicaciones:

1. Redondo, T., **Ochoa, D.**, Moreno-Rueda, G., & Potti, J. (2016). Pied flycatcher nestlings incur immunological but not growth begging costs. *Behavioral Ecology*, 27(5), 1376-1385.
 - a. DOI: <https://doi.org/10.1093/beheco/arw045>
 - b. FI: 3.31
 - c. Cuartil: Q1

2. Moreno-Rueda, G., Redondo, T., **Ochoa, D.**, Camacho, C., Canal, D., & Potti, J. (2016). Nest-dwelling ectoparasites reduce begging effort in Pied Flycatcher *Ficedula hypoleuca* nestlings. *Ibis*, 158(4), 881-886.
 - a. DOI: <https://doi.org/10.1111/ibi.12394>
 - b. FI: 2.28
 - c. Cuartil: Q1

3. **Ochoa, D.**, Redondo, T., & Moreno-Rueda, G. (2019). Mizutama: A Quick, Easy, and Accurate Method for Counting Erythrocytes. *Physiological and Biochemical Zoology*, 92(2), 206-210.
 - a. DOI: <https://dx.doi.org/10.5061/dryad.bk2690n>
 - b. FI: 2.25
 - c. Cuartil: Q1





Programa de Doctorado: Biología Fundamental y de Sistemas

Estudio de los costes y la
evolución del comportamiento
de petición de los pollos de
papamoscas cerrojillo (*Ficedula hypoleuca*)

TESIS DOCTORAL
David Ochoa Castañón
Departamento de Zoología



UNIVERSIDAD
DE GRANADA