

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra zoologie**

**Laboratoř pro výzkum biodiverzity**



## **Investice do reprodukce a obrany hnízda u vrubozobých**

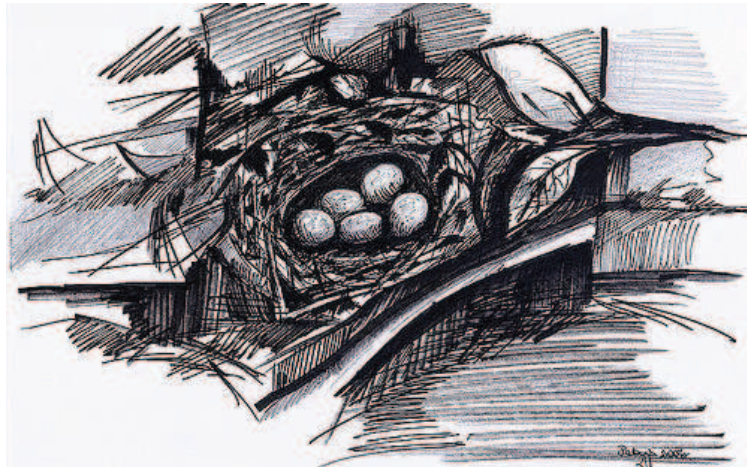
**Disertační práce**

**Veronika Javůrková**

**Školitel: Doc. Tomáš Albrecht, PhD**

**Konzultant: Mgr. Jakub Kreisinger, PhD**

**Praha 2011**



Prohlašuji, že tuto disertační práci jsem vypracovala samostatně a přiložené publikace vzniklé v autorském kolektivu jsou zde uvedeny se souhlasem všech spoluautorů. Dále prohlašuji, že veškeré použité zdroje a literatura jsou v práci řádně citovány a žádná ze součástí této disertační práce nebyla využita k získání jiného nebo obdobného akademického titulu.

V Praze, 22.7. 2011

.....

Publikace č. 1 (Příloha 1) je zde uvedena se souhlasem prvního autora Jakuba Kreisingera

V Praze, 22.7. 2011

.....

## Poděkování

Jen o málo věcech člověk může s určitostí tvrdit, že je vytvořil on sám. Na tomto místě bych proto ráda poděkovala těm, bez kterých by tato práce nikdy nemohla vzniknout.

Mé velké dík patří především mému školiteli Tomovi Albrechtovi a to nejen za jeho odborné vedení, ale také za trpělivost a nadšení, kterými mě vždy dokázal inspirovat. Dále bych ráda poděkovala Jakubovi Kreisingerovi za neocenitelnou pomoc při úpravách rukopisů, za statistiku a taky za veškerý jeho čas, který mi kdy věnoval...Děkuji také Pavlovi Stopkovi, Pavlovi Munclingerovi a všem členům katedry za vytvoření zázemí pro práci celého našeho týmu.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala všem svým kolegům a to především Michalovi Vinklerovi za jeho neocenitelné rady a konzultace ať už odborné, či osobní. Pokud nechci na někoho zapomenout, tak to jsou především mí přátelé a celá má rodina. Proto děkuji také jim, že mi dokázali být kdykoliv jsem to potřebovala velkou oporou a za to že jsou.

# OBSAH

Souhrn	1
Summary	2
Cíle práce	3
Úvod	
Mimo-párové paternity a vnitrodruhový hnízdní parazitizmus	4
- alternativní reprodukční strategie	
<i>Mimopárové paternity</i>	4
<i>Vnitrodruhový hnízdní parazitizmus</i>	6
Investice do obrany hnízda	8
<i>Antipredační vigilance vs. investice do reprodukce</i>	8
<i>Ultimátní a proximátní interpretace únikového chování kořisti</i>	10
Mechanismy obrany snůšky v před-inkubačním období u vrubozobých	11
<i>Částečná inkubace snůšky</i>	11
<i>Zakrývání snůšky hnízdním materiálem</i>	12
Seznam publikací	14
Výsledky a Diskuze	15
Závěr	15
Citovaná Literatura	20
Přílohy	32

## Souhrn

Investice do reprodukce patří mezi jedny z hlavních komponent utvářejících životní historii druhu. Reprodukční úspěšnost však často závisí na faktorech prostředí vytvářejících omezení, která nelze jasně predikovat. Z hlediska teorie „bet-hedging“ je pro udržení dlouhodobého fitness jedince zásadní využívání smíšených strategií, které nestálost těchto vlivů prostředí během jednotlivých reprodukčních pokusů eliminují. Predace je jedním ze zásadních faktorů určujících reprodukční úspěšnost jedince a její role v evoluci alternativních reprodukčních strategií, mimo jiné také vnitrodruhového hnízdního parazitizmu a mimo-párových paternit je bezpochyby zásadní. Za investice do reprodukce lze ve smyslu trade-off mezi současným a budoucím reprodukčním pokusem, neboli zbytkovým reprodukčním potenciálem, považovat také behaviorální mechanismy související s obranou hnízda. Přestože existuje množství studií, které popisují trade-off mezi investicí do obrany hnízda vs. rodiče, práce podrobně sledující faktory utvářející adaptivní vzorce chování u konkrétních antipredačních strategií spojených s obranou hnízda jsou ojedinělé. Podobně bylo doposud věnováno velmi málo pozornosti odhalování mechanismů souvisejících s obranou snůšky v před-inkubačním období u druhů, které z důvodu dosažení synchronního líhnutí odkládají inkubaci snůšky až do doby její kompletnosti. V době kladení vajec je tak snůška kromě zvýšeného rizika predace vystavena také sub-optimálním teplotám a zvýšené pravděpodobnosti proniknutí patogenů do vnitřních struktur vejce, které mohou redukovat životaschopnost embrya. V souvislosti s výše nastíněnou problematikou, předkládám zde disertační práci, která je souborem publikací, které studují výše uvedené aspekty reprodukční biologie a antipredačního chování u kachny divoké (*Anas platyrhynchos*). V jednotlivých studiích předložených v rámci této disertační práce se konkrétně podařilo: a) popsat výskyt a distribuci vnitrodruhového hnízdního parazitizmu a mimo-párových paternit v přirozené populaci kachny divoké a diskutovat faktory, které mohou tyto alternativní reprodukční strategie ovlivňovat; b) prokázat důležitý vliv vegetačního zakrytí hnízda, světelné denní periody a spánkové pozice na antipredační vigilanci během spánku u inkubující kachny divoké; c) navrhnout a experimentálně testovat alternativní teoretický model pro interpretaci únikového chování kořisti, založený na zcela proximálním přístupu; d) prokázat, že částečná inkubace snůšky a zakrývání snůšky prachovým peřím v před-inkubačním období u vrubozobých neovlivňuje riziko proniknutí mikrobiální infekce do vejce. Avšak částečná inkubace má zásadní vliv na líhivost, a spolu se zakrýváním snůšky a přítomností bakteriální infekce zásadně ovlivňuje fenotyp mláděte.

## Summary

Investment in reproduction is considered to be crucial component of life history traits. Reproductive success is however constrained by generally unpredictable environmental conditions. Based on “*bet hedging*” theory, individuals are forced to eliminate such unpredictability via the mixed strategy to maximize their long-term fitness. Predation represents underlying factor affecting individual reproductive success, and it undoubtedly lies behind the evolution of alternative reproductive strategies such as extra-pair paternity and conspecific brood parasitism. Behavioral mechanisms related to nest defense are thought to be investment in reproduction in accordance with trade-off between actual and residual reproductive value. Despite the extensive interest in the principles associated with parental investment into the nest defense, studies describing in detail the pattern of particular antipredator strategies are rare. Similarly, mechanisms responsible for maintenance of egg-viability during prolonged egg-laying period in species delayed the onset of incubation are poorly understood. In accordance with mentioned themes, this thesis includes publications aimed at aspects of reproductive biology and antipredator behavior in Mallards (*Anas platyrhynchos*). Particular publications concretely documented: a) occurrence and distribution of conspecific brood parasitism and extra-pair paternity in breeding population of Mallards, and discussed potential factors affecting them; b) underlying role of nest vegetation concealment, time of day and sleeping postures on sleep/vigilance behavior in incubating Mallards; c) proposed theoretical model solely based on proximate approach considering predator-mediated visual stimuli, vegetation cover and predator’s moving pathway as model’s parameters; d) intermittent incubation and clutch covering by nest lining feathers have no effect on the probability of bacterial trans-shell infection, however we revealed trans-shell infection, intermittent incubation and clutch covering significantly affect offspring phenotype and documented beneficial effect of intermittent incubation on hatchability of eggs.

## Cíle práce

V souvislosti s nastíněnou problematikou se jednotlivé předložené publikace zabývají skupinou vrubozobých konkrétně reprezentovanou modelovým druhem kachny divoké (*Anas platyrhynchos*). Důvody, proč byl ke studiu jednotlivých reprodukčních a antipredačních strategií zvolen tento druh jsou především tyto: často synchronní hnízdění ve vysokých hnízdních hustotách (Peters et al. 2003; Murray et al. 2010, Albrecht & Klvaňa 2004); typická uniparentální péče a produkce prekociálních, synchronně se líhnoucích mláďat (Cramp & Simmons 1977); vysoká míra predace snůšek (Albrecht & Klvaňa 2004; Elmberg & Gunnarsson 2007; Kreisinger & Albrecht 2008) a častá predace dospělců ze strany terestrických predátorů (Hoekman et al. 2002; Benešová 2006).

S ohledem na evoluční význam uvedených aspektů predace a hnízdní biologie ve využívání alternativních reprodukčních (Pöysä & Pesonen 2007; Lima 2009) a antipredačních strategií (Montgomerie & Weatherhead 1988; Caro 2005), je tato disertační práce konkrétně zaměřena na tyto cíle:

- stanovit míru a distribuci EPP a CBP v přirozené hnízdní populaci kachny divoké a diskutovat faktory, které mohou intenzitu využívání EPP a CBP u vrubozobých ovlivňovat
- zhodnotit faktory působící na antipredační vigilanci během spánku u inkubující kachny divoké ve smyslu trade-off mezi investicemi samice do současného a budoucího reprodukčního pokusu
- diskutovat paradigma ultimátního pohledu na proces rozhodování kořisti pro únikové chování a navrhnout alternativní teoretický model založený na zcela proximátním přístupu, využívajícím vizuální stimuly vyvolané predátorem a faktory které tyto stimuly ovlivňují jako parametry modelu
- zhodnotit funkci a význam částečné inkubace a zakrývání snůšky prachovým peřím v před-inkubačním období na pravděpodobnost mikrobiální infekce snůšky a posoudit vliv tohoto chování na udržování životaschopnosti embrya

## Úvod

### **Mimo-párové paternity a vnitrodruhový hnízdní parazitizmus - alternativní reprodukční strategie**

#### Mimopárové paternity

Dlouhou dobu uvažované paradigma, předpokládající, že většina ptačích druhů je jak sociálně, tak geneticky monogamních (*sensu* Lack 1968) bylo vyvráceno na základě studií využívajících molekulárně-genetických přístupů, které spolehlivě prokazují, že u více než 70% druhů ptáků existuje reprodukční strategie využívající mimo-párové paternity (EPP) (Griffith et al. 2002). Při ní lze v hnízdě sociálně monogamního páru nalézt mláďata, jejichž otec není identický s tím, s nímž samice tvoří sociální svazek (Møller 1986; Bennet & Owens 2003). Přestože v posledních dvaceti letech bylo věnováno snaze o odhalení biologické a evoluční podstaty této alternativní reprodukční strategie velké úsilí (např. Westneat & Sargent 1996; Griffith et al. 2002; Linstedt et al. 2007), konzistentní názor na význam uvažovaných environmentálních, sociálních a genetických faktorů na vnitrodruhové a mezidruhové rozdíly ve využívání EPP u ptáků doposud neexistuje.

Značnou neucelenost lze nalézt také v taxonomickém zařazení druhů, jimž je věnována při studiu problematiky EPP pozornost. Ta je primárně zaměřena na sociálně monogamní pěvce (Griffith et al. 2002) s velmi omezeným počtem studií sledujících výskyt EPP v populacích prekociálních druhů ptáků, včetně vrubozobých (ale viz Peters et al. 2003, Kraaijeveld et al. 2004; Ležalová-Piálková 2010). Přitom právě specifika v reprodukční biologii „nepěvců“, konkrétně vrubozobých, mohou mít zcela jiné konsekvence na distribuci a prevalenci EPP. V současnosti se uvažuje, že usměrňující selekce působící na udržování mechanismů, které zabraňují mimo-párovým aktivitám je silnější, než nepřímá selekce, která by měla mimo-párové chování zvýhodňovat (Arnqvist & Kirkpatrick 2005). U vrubozobých existují behaviorální adaptace (Cunningham 2003), včetně vnitřních pre-kopulačních mechanismů (Brennan et al. 2010), kterými se samice brání často násilným (McKinney & Stolen 1982; McKinney et al. 1983, 1984) mimo-párovým kopulacím (EPC). Toto specifikum v reprodukčním chování vrubozobých může jednak posouvat tradiční interpretaci výhod EPP na fitness samice, ale také způsobovat rozdílný efekt faktorů, které se podílejí na změnách v distribuci EPP v běžných reprodukčních systémech, např. u sociálně monogamních pěvců. Přestože výhody EPP pro



samec, vyjádřené vyšším reprodukčním úspěchem v podobě většího počtu mláďat jsou zřejmé jak v systémech s biparentální, tak uniparentální péčí (Møller & Birkhead 1993; Møller & Cuervo 2000), v případě druhů, kde se samec na výchově mláďat nepodílí nejsou výhody EPP na fitness samice tak zřejmé. U vrubozobých jsou také díky častému využívání násilných kopulací omezeny výhody vyplývající z „hypotézy dobrých genů“ (Jennions & Petrie 2000; Westneat & Stewart 2003; Forstmeier 2007), jelikož neumožňují samici vybírat a preferovat pro EPC kvalitního samce (Cunningham 2003). Navíc dostupné studie naznačují, že je EPC pro samici nevýhodné, ať už z důvodu vysokého rizika zranění samice samcem během kopulace (McKinney et al. 1978), tak z hlediska rizika přenosu patogenů, které může být díky přítomnosti kopulačního orgánu samců vysoké (Sheldon 1993). Z těchto důvodů se u vrubozobých vyskytují proti-strategie. U samic v podobě již zmíněného odmítání EPC (viz Cunningham 2003), u samců je pak pro udržení paternity ve vlastním hnízdě výhodné hlídání sociální partnerky („*mate guarding*“), či zvýšená frekvence kopulací v rámci sociálního páru (Sorenson 1994). Z kontextu vyplývá, že u vrubozobých je EPP pro samici neadaptivní a efektivita využívání zmíněných proti-strategií může být značně ovlivněna faktory jako je synchronnost hnízdění jednotlivých párů v populaci, či hustota a struktura hnízdní populace. Avšak díky nedostatku studií nelze tyto předpoklady zcela podpořit

Přestože efekt synchronnosti hnízdění a hustoty hnízdní populace na EPP se v rámci různých studií nejeví jako konzistentní (Westneat & Sherman 1997; Bennett & Owens 2002), některé z nich prokazují, že mohou na vnitrodruhové úrovni zodpovídat za rozdíly jak ve frekvenci EPC (např. Møller 1991; Møller & Birkhead 1992), tak v míře EPP (např. Morton et al. 1990). V interakci s „*mate guarding*“ strategií, kdy je sociální partner během fertilní periody své partnerky neustále v její blízkosti, může vyšší synchronnost hnízdění limitovat samce v příležitosti účastnit se EPC (Møller & Birkhead 1991) a podílet se tak na EPP. Naopak vysoká hustota hnízdní populace může efektivitu „*mate guarding*“ strategie snižovat a zvyšovat tak výskyt EPP (Birkhead & Biggins 1987; Thusius et al. 2001; Vaclav & Hoi 2002; Arlt et al. 2004).

Pro hnízdní populace vrubozobých je častý nevyrovnaný poměr pohlaví ve prospěch samců (Lehikoinen et al. 2008; Blums & Mednis 1996) s velkým podílem nespárovaných jedinců, což pravděpodobně vede ke značným individuálním rozdílům v reprodukčním úspěchu samců (Grant & Grant 1987; Møller 1992). Zvýšené riziko predace hnízd i dospělců může rovněž působit na zvyšování frekvence EPP v populaci ve smyslu zvyšování fitness samce, který pomocí EPP kompenzuje ztrátu vlastního hnízda (např. Rodrigues 1996). Jakkoliv jsou

implikace těchto faktorů na pravděpodobnost výskytu EPP zřejmé, studie, které by testovaly jejich efekt na míru a distribuci EPP v populaci vrubozobých jsou ojedinělé (ale viz Peters et al. 2003).

### Vnitrodruhový hnízdní parazitizmus

Na rozdíl od mezidruhového hnízdního parazitizmu, který využívá přibližně 1% ptačích druhů (Johnsgard 1997; Davies 2000), byl vnitrodruhový hnízdní parazitizmus (CBP) prokázán jako poměrně častá reprodukční strategie, především u prekociálních či semi-prekociálních druhů ptáků včetně vrubozobých (Yom-Tov 2001). Potencionální efekt na zvýšení fitness, který vyplývá z této reprodukční strategie, kdy parazit umísťuje vejce do hnízda hostitele stejného druhu, a zcela mu přenechává veškeré rodičovské investice, je zřejmý (viz Ahlund & Andersson 2001). Přesto je úspěšnost CBP závislá na faktorech, které stojí na pozadí selekce pro využívání různých alternativ v rámci CBP (Lyon & Eadie 2008; Jaatinen et al. 2011). Tyto alternativy vyplývají ze skutečnosti, že CBP může být využíván jak hnízdicími, tak nehnízdícími samicemi, kde v případě hnízdicích samic nemusí být pevně stanoveny role hosta a parazita (Sayler 1992; Lyon & Eadie 2008). Ve skutečnosti tak může CBP v populaci setrvávat jako alternativní či smíšená reprodukční strategie (viz Sorenson 1992; Davies 2000). I když je flexibilita ve využívání různých strategií v rámci CBP připisována na vrub individuálními rozdíly v kvalitě samice (Ahlund & Andersson 2001; Jaatinen et al. 2011; ale viz např. Reichart et al. 2010), studie, která by prokazovala v rámci CBP striktní parazitizmus („*lifelong parasites*“ sensu Lyon & Eadie 2008) neexistuje. Je tedy zřejmé, že CBP je jedinci využíván spíše jako smíšená reprodukční strategie. Ve smyslu „*bet-hedging*“ teorie tedy může CBP eliminovat rozdíly způsobené nepředvídatelnými fluktuacemi faktorů prostředí (např. rapidní nárůst predančního tlaku v populaci), čímž může z dlouhodobého hlediska zvyšovat fitness jedince (Seger & Brockmann 1987; Philippi & Seger 1989) a podílet se tak na udržování stability celé populace.

Predace hnízd je považována za jeden ze zásadních faktorů ovlivňujících prevalenci CBP v hnízdní populaci (Pöysä & Pesonen 2007). V tomto případě samice eliminuje ztrátu vlastního reprodukčního pokusu či neschopnost náhradního hnízdění pomocí CBP označovaného jako tzv. „*best of a bad job*“ strategie (Feare 1991; Jackson 1993; Jacot et al. 2009). CBP může být v populaci s vysokou hnízdní predací využívána také jako strategie umožňující rozložit riziko predace snůšky rozmístěním vajec do více hostitelských hnízd (Bulmer 1984; Petrie & Møller

1991). Navíc, bylo prokázáno, že parazitické samice mohou k CBP preferovat hnízdo hostitele, které je k predaci méně náchylné (Pöysä 1999a,b, 2006). Přestože některé studie vliv predace, respektive ztráty vlastního hnízda na výskyt CBP v populaci vrubozobých neprokázaly (např. Reichart et al. 2010), v jiných byl efekt predace na CBP zřejmý (Pöysä 1999a,b, 2006).

Hnízdní denzita je jeden z dalších faktorů, které mohou významně ovlivňovat výskyt CBP (Eadie & Fryxell 1992; Semel & Sherman 2001). V případě, že je samice limitována nedostatkem vhodných míst k hnízdění, může také volit již zmíněnou „*best of a bad job*“ strategii (Davies 2000), čímž eliminuje neschopnost účastnit se vlastního reprodukčního pokusu. Podobně je hnízdní denzita určující v pravděpodobnosti nalezení hnízda parazitem (Pöysä 1999a,b, 2003; Ruxton 1999), což se považuje za jeden ze zásadních argumentů, vysvětlující vysoký podíl CBP v populacích koloniálně hnízdících druhů (Lank et al. 1990; Waldeck et al. 2004; Ležalová-Piálková 2010). Přestože byl efekt hnízdní denzity na frekvenci CBP u vrubozobých prokázán, jsou tyto studie omezeny na druhy hnízdící v dutinách, jejichž dostupnost je v hnízdním habitatu často omezena (Lyon & Eadie 2008). U ostatních druhů vrubozobých hnízdících terestricky v otevřených typech habitatu nelze limitace ze strany nedostatku vhodných míst k hnízdění očekávat (Owen & Black 1990). Situace se však může zásadně měnit u populací vrubozobých hnízdících ve fragmentovaných biotopech zemědělské krajiny, kde působením „okrajového efektu“ vzrůstá predace snůšek (viz např. Hoover et al. 1995, Robinson et al. 1995) a hnízdění je často omezeno na ostrovní deponie rybníků, čímž dochází ke zvyšování hnízdní denzity. Průvodním jevem také může být hustotně závislá predace hnízd (Lloyd 2006; Gunnarsson & Elmberg 2008), která jak už bylo zmíněno, může podíl CBP v hnízdní populaci ovlivňovat. Jaký je podíl CBP v populacích vrubozobých hnízdících ve velkých hustotách v prostorově omezeném habitatu však nebylo doposud extenzivně studováno.

Pro úspěšnost CBP je také zásadní správné načasování umístění parazitického vejce do hnízda hostitele (např. Odell & Eadie 2010). Parazit by měl preferovat hostitelské hnízdo samice, která je ve stejné fázi kladení snůšky. Lze tedy očekávat, že vysoký stupeň synchronního hnízdění jednotlivých samic v populaci bude podíl CBP zvyšovat, což bylo v mnoha studiích prokázáno (Peters et al. 2003; Reichart et al. 2010).

Z dostupných studií je zřejmé, že využívání a udržování CBP jako časté alternativní reprodukční strategie u vrubozobých může být posilováno mimo jiné jejich životními strategiemi jako jsou prekocialita a věrnost hnízdišti (Jaatinen et al. 2011). Vzhledem k tomu, že podíl a využívání CBP může výrazně ovlivňovat dynamiku populace ve smyslu udržování její stability (de Valpine & Eadie 2008, ale viz Semel & Sherman 2001), stanovení faktorů, které se podílejí

na změnách ve využívání této alternativní reprodukční strategie na úrovni populací je nejen pro tyto druhy zásadní.

### **Investice do obrany hnízda**

Za důležitou součást rodičovských investic do daného reprodukčního pokusu lze považovat projevy chování spojené s obranou hnízda („*nest defense*“) (Trivers 1972). Ty jsou tradičně definovány jako behaviorální mechanismy primárně využívané v procesu obrany snůšky či mláďat před predátorem, avšak zvyšující pravděpodobnost zranění nebo smrti rodiče (Montgomerie & Weatherhead 1988). U mnoha těchto behaviorálních projevů spojených s obranou hnízda, kdy k přímé interakci s predátorem nedochází, však nemusí být ztráty a výhody z tohoto chování takto jasně definovány, a k jejich interpretaci musí být hlouběji uvažovány faktory stojící na pozadí trade-off mezi současným a budoucím reprodukčním pokusem (*sensu* Trivers 1972). Ve smyslu této definice mohou být jako součást rodičovských investic do obrany snůšky považovány antipredační vigilance a únikové chování (Caro 2005).

V následujících kapitolách se omezím na stručné uvedení těchto jednotlivých antipredačních strategií tak, aby se v kontextu držely tématu předložených publikací, které se zabývají antipredační vigilancí během spánku u inkubujícího jedince a ultimátními a proximátními mechanismy stojícími na pozadí procesů vyvolávajících únikovou reakci kořisti.

#### *Antipredační vigilance vs. investice do reprodukce*

Kognitivní schopnosti živočichů jsou limitovány na vnímání pouze omezeného množství stimulů přicházejících z prostředí (Clark & Dukas 2003; Phelps 2007). V důsledku toho dochází k vytváření adaptivních vzorců chování, které jedinci umožní alokovat jeho pozornost mezi různé aktivity, aby docházelo k optimalizaci fitness (Dukas 2004). Z hlediska eliminace rizika predace, která představuje pro jedince zásadní omezení (Ricklefs 1969; Martin 1993), je tzv. antipredační vigilance primárním mechanismem, umožňujícím odhalit přítomnost predátora a zvýšit tak pravděpodobnost přežití kořisti (Cowlshaw 1998; Cresswell et al. 2003). Nicméně, jakkoliv je antipredační vigilance pro jedince a jeho fitness zásadní, její udržování musí být alternováno s ostatními aktivitami. Z důvodu zásadních konsekvencí na fitness jedince je trade-off mezi antipredační vigilancí a aktivitami spojenými se získáváním potravy nejčastěji studovaným mechanismem (Lima & Dill 1990; Beauchamp 2007). Méně pozornosti bylo

věnováno studiu antipredační vigilance v souvislosti se spánkem, (ale viz Gauthier-Clerc et al. 1994, 2000; Fuchs et al. 2006) a studie, které by v tomto kontextu studovaly antipredační vigilanci během reprodukční fáze jsou ojedinělé (Dominguez 2003).

Spánek je „aktivita“, která výrazně omezuje pozornost jedince a snižuje jeho vnímavost vůči stimulům přicházejícím z prostředí (Campbell & Tobler 1984; Amlaner & Ball 1994). Na druhou stranu má zásadní funkci v udržování optimální funkce neurálního systému (Siegel 2003; Cirelli 2005) a metabolických procesů (Berger & Phillips 1995). U některých druhů ptáků bylo prokázáno, že spánková deprivace může mít negativní vliv na uchovávání energetických rezerv v organismu (Pravosudov & Grubb 1998; Deswames et al. 1984). Z toho důvodu může mít u druhů s uniparentální péčí a vysokými energetickými náklady do reprodukce trade-off mezi spánkem a vigilancí zásadní roli. Avšak kromě energetické bilance je pro inkubujícího jedince důležitá jeho obrana před predátory. U ptáků je během spánku k tomto účelu využíván tzv. vigilantní spánek („vigilant sleep“), při kterém dochází ke střídání period, kdy jsou oči zavřené („*interscan*“ periody) a otevřené („*scan*“ periody) (Lendrem 1984; Amlaner & Ball 1994). Navíc u ptáků existuje mechanismus spánku, který zajišťuje střídání očí, které jsou během „*scan*“ period využívány (tzv. „*unilateral slow-wave sleep*“), a kdy k neurální interpretaci dochází vždy pouze v kontralaterální hemisféře mozku (Rattenborg et al. 2000).

Úroveň trade-off mezi spánkem a vigilancí může být posouvána vlivem působení environmentálních faktorů. Například efektivita „*scan*“ period může být silně závislá na kvalitě vizuálního stimulu. Potom faktory, jako denní perioda, či intenzita vegetačního zakrytí mohou způsobovat změny jednak v celkové vigilanci (Whittingham et al. 2004; Bednekoff & Lima 2005), tak také ve frekvenci a délce „*scan*“ intervalů (Fernández-Juricic & Tran 2007; Fernández-Juricic & Beauchamp 2008). Na druhou stranu může světelná perioda dne ovlivňovat distribuci a aktivitu predátorů, kdy lze během tmavé denní periody předpokládat zvýšenou aktivitu především terestrických, olfaktoricky se orientujících predátorů, kteří představují vyšší riziko pro dospělé (Lima 1988; Bednekoff & Ritter 1994). Naopak ve dne by mělo docházet k redukci v aktivitě savčích predátorů a k nárůstu aktivity vizuálně se orientujících, především ptačích predátorů, kteří představují riziko pro snůšku (viz např. Schaefer 2004). Nicméně je nutno podotknout, že v závislosti na typu habitatu, může docházet ke změnám v incidenci různých typů predátorů, jejichž aktivita nemusí být denní dobou omezena (Thompson 2007; Teunissen et al. 2008; Weidinger 2008, 2010).

Vegetační zakrytí a jeho vliv na úroveň antipredační vigilance může být rovněž interpretován dvěma způsoby. Jednak může omezovat kvalitu zpracování vizuálního podnětu

během „scan“ period (Whittingham et al. 2004; Bednekoff & Blumstein 2009) nebo se může jedinec, nacházející se v hustější vegetaci cítit bezpečněji díky redukci jeho nápadnosti vůči predátorovi. Tento efekt může být navíc posilováno přítomností kryptického zbarvení kořisti (Lazarus & Symonds 1992).

Přestože byl efekt těchto faktorů na změny v antipredační vigilanci během spánku v několika studiích prokázán (Gauthier-Clerc et al. 1994, 2000; Fernández-Juricic & Tran 2007), práce, která by detailně studovala tyto faktory u terestricky hnízdícího inkubujícího jedince, a tedy v souvislosti s rodičovskými investicemi do obrany snůšky, není dostupná.

### Ultimátní a proximátní interpretace únikového chování kořisti

V tradičním pojetí teorie optimální únikové vzdálenosti je moment rozhodnutí kořisti, kdy uniknout před predátorem, funkcí vzájemného vztahu ztrát a výhod z této reakce (Ydenberg & Dill 1986; Cooper & Frederick 2007; 2010). Toto paradigma ultimátního přístupu k hodnocení procesu rozhodování kořisti však začíná být v posledních několika letech přehodnocováno (viz např. Domenici 2010; Hemmi & Pfeil 2010).

Důvodem je vzrůstající počet prací, které prokazují, že rozhodování jedince obecně nemusí být nutně v souladu s „optimality“ modely, které předpokládají maximalizaci fitness, ale že v procesu rozhodování se u ptáků může uplatňovat hedonistická motivační složka (Kacelnik & Abreu 1998; Kacelnik & Bateson 1996; Wilke & Todd 2010), předchozí zkušenosti (Pompilio & Kacelnik 2005, Aw et al. 2011) či behaviorální syndromy (Sih et al. 2004; Jones & Godin 2010). Jelikož tyto studie poukazují na spíše heuristickou povahu ultimátních „optimality“ modelů, které neumožňují parametrizovat výhody a ztráty vyjadřující fitness jež tyto modely definuje, začínají se objevovat tendence zahrnovat do interpretace únikového chování živočichů také proximátní mechanismy (např. Dill 1974; Hemmi 2005; Smolka et al. 2011).

Proximátní přístup v hodnocení únikové reakce je založen na vizuálních stimulech zprostředkovaných predátorem (tzv. „looming stimuli“) (Glantz 1974; Nalbach 1990). Přestože byla úniková reakce vyvolaná „looming stimuli“ extenzivně studována především u bezobratlých (Holmqvist & Srinivasan 1991; Hemmi 2005, Hemmi & Pfeil 2010), nejnovější studie prokazují přítomnost specifických neuronů a pozitivní korelaci jejich aktivity intenzitou únikové reakce také u obojživelníků (Yamamoto et al. 2003), ptáků (Liu et al. 2008) a savců (Liu et al. 2011). Na základě těchto studií lze tedy předpokládat, že pokud je úniková reakce závislá na kvalitě

vizuálních stimulů, měly by faktory ovlivňující kvalitu těchto stimulů způsobovat rozdíly v načasování únikové reakce.

Nejčastěji studovanými faktory ovlivňujícími intenzitu únikové reakce definovanou jako vzdálenost mezi kořistí a predátorem v momentě, kdy kořist únik zahájí (tzv. FID – „*flight initiation distance*“), jsou směr přístupu predátora a kvalita vegetačního zakrytí kořisti (viz Stankowich & Blumstein 2005, pro review). Stejně jako u antipredační vigilance, může být prokázán vliv vegetačního zakrytí na snižování FID interpretován jako omezení efektivity zpracování vizuálních stimulů (Lazarus & Symonda 1992; Boyer et al. 2006), nebo se může jedinec v husté vegetaci cítit bezpečněji a únikovou reakci odkládat (Albrecht & Klvaňa 2004). V případě směru přístupu predátora ke kořisti jsou implikace pro změny v FID založené na blízkosti trajektorie pohybu predátora s lokalizací kořisti. Pokud se tedy predátor pohybuje přímo ke kořisti, pravděpodobnost jejího nalezení se zvyšuje spolu s FID (Broom & Ruxton 2005). Z hlediska vizuálního vnímání však přímost pohybu predátora může vyvolávat různou intenzitu „*looming stimuli*“. Předchozí studie prokazují, že přímo se pohybující predátor vyvolává symetricky se zvětšující retinální obraz a intenzivnější únikovou reakci ( Hemmi 2005; Hemmi & Pfeil 2007). Naopak retinální obraz predátora, který kořist transversálně míjí, nevyvolává tak intenzivní vizuální stimul, jelikož se pouze posouvá do stran a kořist tedy reaguje slaběji (např. Holmqvist & Srinivasan 1991). Budeme-li v tomto kontextu uvažovat vzájemnou interakci těchto faktorů, lze očekávat, že u přímého přístupu predátora bude vegetační zakrytí ovlivňovat „*looming stimuli*“ a tím i FID kořisti, kdežto v případě transversálního přístupu se efekt vegetačního zakrytí neprojeví.

Přestože se může zdát tato kauzalita mezi FID a kvalitou vizuálních stimulů zřejmá a intuitivní, teoretický model, který by využíval tyto proximální mechanismy jako parametry modelu nebyl dosud v teorii únikového chování kořisti dosud navržen.

## **Mechanismy obrany snůšky v před-inkubačním období u vrubozobých**

### Částečná inkubace snůšky

U vrubozobých se podobně jakou u většiny prekociálních druhů ptáků předpokládá, že zahajují inkubaci až po snesení posledního vejce do snůšky (např. Cramp & Simmons 1977). Tímto mechanismem by mělo být dosaženo synchronního líhnutí mláďat (Wang & Beissinger 2009). V období kladení je tedy snůška těchto druhů vystavena jednak vysokému riziku predace

(Benešová 2006; Kreisinger & Albrecht 2008), ale také okolním vlivům prostředí, které mohou snižovat životaschopnost zárodku a ovlivňovat tak reprodukční úspěšnost (Beissinger et al. 1999; Cook et al. 2005a,b; Godard et al. 2007). Přestože se jako nejčastější příčina této snížené životaschopnosti zárodku a líhivosti uvažuje dlouhodobé vystavení snůšky působení suboptimálních teplot z okolí (Beissinger et al. 2005; Wang & Beissinger 2009), v současnosti se předpokládá, že tato omezení mohou souviset především s rizikem mikrobiální infekce vnitřních struktur vejce (např. Cook et al. 2003; Godard et al. 2007). Přestože bylo v několika posledních letech věnováno této problematice mnoho pozornosti (Cook et al. 2005a,b; Wang et al. 2011; Ruiz-de-Castañeda et al. 2011), funkce mechanismů, u kterých se předpokládá, že dokážou v před-inkubačním období tato omezení eliminovat nebyla doposud zcela objasněna.

U několika druhů vrubozobých bylo prokázáno, že samice částečně inkubuje snůšku již v průběhu kladení vajec, a že doba pobytu samice na hnízdě se s velikostí snůšky zvyšuje (Loos & Rohwer 2004). Pro význam tohoto chování byla navržena hypotéza kombinující dvě funkce tohoto chování. První z nich předpokládá, že částečná inkubace má antipredační funkci, jelikož přítomnost samice na hnízdě výrazně redukuje dobu, po kterou je snůška vystavena zvýšenému riziku predace (Clark & Wilson 1985; Cervencel et al. 2011). Druhá vychází z predikce, že přítomnost samice na hnízdě pomáhá udržovat životaschopnost embrya (Arnold 1987; Rohwer, 1988; Arnold & Rohwer 1991). Primárním mechanismem zajišťujícím tuto funkci by mělo být udržování teploty vhodné pro správný embryonální vývoj (Wang & Beissinger 2009), nicméně existují studie, které prokazují, že inkubace může výrazně redukovat růst mikroorganismů na povrchu vejce (Cook et al. 2005a; Shawkey et al. 2009). Navíc se ukazuje, že inkubační teplota tvoří optimum pro aktivitu antimikrobiálních proteinů přítomných ve vaječném bílku (Tranter & Board 1984; Rehault-Godbert et al. 2010), čímž může výrazně ovlivňovat přítomnost mikroorganismů uvnitř vejce. I když byl efekt inkubace v tomto smyslu nastíněn, studie, která by experimentálně testovala tuto antimikrobiální funkci částečné inkubace v před-inkubačním období neexistuje.

#### Zakrývání snůšky hnízdním materiálem

Pro vrubozobé je typické, že během přestávek v inkubaci a v době nepřítomnosti samice na hnízdě je snůška zakrývána hnízdním materiálem (Caldwell & Cornwell 1975). Význam tohoto mechanismu je nejčastěji spojován s kryptickou funkcí, kdy hnízdní výstelka zakrývá u



vrubozobých jinak velmi nápadnou snůšku, čímž redukuje pravděpodobnost jejího nalezení vizuálně se orientujícími predátory (Kreisinger & Albrecht 2008; Weidinger 2001). Pro některé druhy ptáků je typické, že součástí jejich hnízdní výstelky je peří, které je sbíráno z okolí hnízda (Dawson et al. 2011). Avšak u vrubozobých je hnízdní výstelka z převážné části tvořena prachovým peřím pocházejícím z těla samice (Caldwell & Cornwell 1975). Jak je známo, peří je u těchto druhů pravidelně ošetřováno výměšky dobře vyvinuté uropygiální žlázy, která produkuje vosky a oleje se silným antibakteriálním a antifungicidním účinek (Shawkey et al. 2003). Kromě toho se v peří nachází množství specifických bakterií (např. *Bacillus licheniformis*), které jsou schopné produkovat látky antibiotické povahy (Simlot et al. 1972; Soler et al. 2010, 2008). Přítomnost těchto bakterií v peří a hnízdní výstelce tak může jednak interferovat s ostatními mikroorganismy na povrchu vejce a snižovat tak jejich diverzitu a antimikrobiální látky mohou přímo omezovat jejich proliferaci (Soler et al. 2010; Peralta-Sanchez et al. 2010). Oba tyto mechanismy tak mohou snižovat pravděpodobnost infekce vnitřních struktur vejce. Nicméně, přestože existují studie prokazující pozitivní korelaci mezi množstvím peří v hnízdní výstelce a reprodukčním úspěchem (např. Peralta-Sanchez et al. 2011), funkce zakrývání snůšky hnízdním materiálem s vysokým podílem prachového peří na pravděpodobnost proniknutí infekce do vnitřních struktur vejce však nebyla doposud experimentálně testována.

## Seznam publikací

### Publikované práce:

Kreisinger, J., Munclinger, P., **Javůrková, V.** and Albrecht, T. 2010. Analysis of extra-pair paternity and conspecific brood parasitism in mallards *Anas platyrhynchos* using non-invasive techniques. *Journal of Avian Biology*, 41: 551-557 (**Příloha 1**)

**Javůrková, V.**, Hořák, D., Kreisinger, J., Klvaňa P. and Albrecht, T. 2011. Factors affecting sleep/vigilance behaviour in incubating Mallards. *Ethology* 117(4): 345-355 (**Příloha 2**)

### Submitované manuskripty:

3) **Javůrková, V.**, Šizling, A. L., Kreisinger, J. and Albrecht, T. 2011. An alternative theoretical approach to escape decision-making: the role of visual cues (submitováno 7/2011 do *PLoS ONE*)

4) **Javůrková, V.**, Albrecht, T., Mrázek, J. and Kreisinger, J. 2011. Do intermittent incubation and covering of clutch by nest lining feathers affect trans-shell infection in ground nesting precocial birds? (submitováno v srpnu 2011 do *Functional Ecology*)

## Výsledky a Diskuze

Vzhledem k tomu, že veškeré výsledky jsou podrobně diskutovány v jednotlivých publikacích předložených v rámci této disertační práce, omezím se v následující části textu pouze na jejich stručné shrnutí.

### **[1] Analysis of extra-pair paternity and conspecific brood parasitism in mallards *Anas platyrhynchos* using non-invasive techniques**

Kreisinger, J., Munclinger, P., Javůrková, V. and Albrecht, T. (2010) *Journal of Avian Biology*, 41: 551-557

Tato publikace shrnuje výsledky sledující současný výskyt a distribuci dvou alternativních reprodukčních strategií; vnitrodruhového hnízdního parazitismu (CBP) a mimo-párových paternit (EPP) v přirozené populaci kachny divoké (*Anas platyrhynchos*). K těmto účelům byl využit genetický materiál pocházející jednak z peří samice, které je u vrubozobých součástí hnízdní výstelky, tak z vaječných zárodečných obalů, které po vylíhnutí mládřat v hnízdě zůstávají. Díky tomuto molekulárně-genetickému přístupu bylo možné v rámci jednotlivých hnízd rozlišit mezi těmito reprodukčními strategiemi a posoudit tak jejich prevalenci a distribuci v hnízdní populaci.

Z výsledků vyplývá, že 24% ze všech analyzovaných hnízd obsahovalo alespoň jedno parazitické mládě a 10,1% ze všech mládřat pochází z CBP. Tyto hodnoty CBP jsou téměř dvojnásobné v porovnání s pozorovanou mírou CBP u jiných druhů vrubozobých (Sayler 1992; Peters et al. 2003). V naší studii tuto vyšší frekvenci CBP připisujeme na vrub vysokým hnízdním denzitám ve sledované populaci. Nicméně diskutujeme i metodologický artefakt způsobený preferencí samic pro hnízda méně náchylná k predaci (např. Pöysä & Pesonen 2007), čímž se nám do analýzy dostala primárně tato hnízda s vysokým podílem CBP. Molekulární data rovněž umožnily prokázat, že většina parazitických samic kladla pouze do jednoho hnízda a parazitické samice nebyly z řad lokálně hnízdicích samic, což poukazuje na to, že byla tato strategie v naší populaci využívána buďto jako „best of bad job“ strategie samicemi, které nejsou schopné zahnízdit, či se CBP účastnily samice z jiné, vzdálenější hnízdní populace. Důležitým zjištěním rovněž je, že pravděpodobnost být parazitován v rámci populace nebyla náhodná. Jaké jsou příčiny této nenáhodné distribuce CBP, které diskutujeme blíže v článku, se nám však díky

omezenému množství dat nepodařilo s určitostí stanovit. Vliv synchronnosti hnízdění ani datum začátku hnízdění neměly na míru CBP vliv.

Analýza EPP prokázala, že 9,3% neparazitických mlád'at pochází z EPP a jedno nebo více mimo-párových mlád'at (EPY's) bylo detekováno ve 48% analyzovaných hnízd. Tyto hodnoty se na rozdíl od CBP shodují s mírou EPP pozorovanou u jiných druhů vrubozobých, ale i přesto patří z dosud doložených mezi nejvyšší. Dále se podařilo prokázat, že otcové mimo-párových mlád'at jsou téměř výhradně samci z lokální populace. Avšak na rozdíl od CBP byl prokázán náhodný výskyt EPP v rámci populace, což poukazuje na fakt, který vyplývá i z předchozích studií (Møller & Ninni 1998; Kraaijeveld et al. 2004), že pravděpodobnost účastnit se mimo-párových kopulací u samce a ztratit paternitu ve vlastním hnízdě se u námi studovaného druhu v rámci populace nemění, což nejspíše souvisí s neschopností samice se mimo-párovým kopulacím bránit.

## **[2] Factors affecting sleep/vigilance behaviour in incubating Mallards**

Javůrková, V., Hořák, D., Kreisinger, J., Klvaňa P. and Albrecht, T. (2011). *Ethology* 117(4): 345-355

Tato studie je zaměřena na posouzení faktorů, které se podílejí na změnách ve vigilanci během spánku u inkubující kachny divoké (*Anas platyrhynchos*). K této podrobné analýze bylo využito celkem 17 kontinuálních 48hodinových videozáznamů inkubující samice na hnízdě. Nejprve byly tyto nahrávky zpracovány na základě sestaveného etogramu, který umožnil přesně stanovit délku a distribuci jednotlivých spánkových period během dne. Náhodná sekvence těchto period pak byla využita pro samotnou analýzu antipredační vigilance (celková délka+frekvence „scan“ intervalů) v závislosti na vegetačním zakrytí hnízda, světelné denní periodě a spánkové pozici. Z výsledků prezentovaných v této studii vyplývá, že se zvyšující se hustotou vegetačního zakrytí hnízda, které je na straně oka využívaného ke „scan“ intervalům se zvyšuje také celková vigilance, a to bez ohledu na světelnou periodu dne a spánkovou pozici. Naopak průměrné vegetační zakrytí hnízda vigilanci neovlivňovalo. Tento výsledek je v opozici se studii, interpretujícími snížení vigilance v přítomnosti hustého vegetačního krytu díky tomu, že se kořist cítí bezpečněji (viz. např. Watts 1990; Lazarus & Symonds 1992). Naopak, tento výsledek jasně prokazuje, že i v případě kryptického jedince působí hustá vegetace jako překážka pro vizuální vnímání podnětů z okolí (viz také Arenz & Leger 1997; Whittingham et al. 2004; Bednekoff & Blumstein 2009).

Kromě toho se nám podařilo prokázat snižování celkové vigilance i frekvence „scan“ intervalů během tmavé denní periody s opačným trendem využívaným během dne. Tento výsledek opět potvrzuje předpoklad, že během tmavé denní periody, kdy je vizuální vnímání omezeno, by měla být vigilance redukována (Beauchamp & McNeil 2003; Beauchamp 2007; Fernández-Juricic & Tran 2007). Na základě těchto výsledků lze tedy potvrdit, že více než zvýšené riziko predace ze strany savčích, terestrických predátorů, které by mělo vigilanci během tmavé denní periody zvyšovat (Lima 1988; Beauchamp & McNeil 2003), hraje efektivita zpracování vizuálních stimulů v antipredační vigilanci během spánků u tohoto kryptického, terestricky hnízdícího druhu důležitější roli.

Zajímavým pozorováním v naší studii je také přizpůsobování vigilance spánkovým pozicím v závislosti na denní periodě. Zatímco v noci byly samice více vigilantní během „rest“ pozice (spánek se zobákem na hrudi) a méně během „skapulární“ pozice (zobák uložen na zádech), ve dne byl tento trend opačný, avšak nesignifikantní. Přestože pro využívání jednotlivých spánkových pozic se usuzuje na termoregulační funkci (Reebs 1986; Wellmann & Downs 2009), v naší studii jsme tento předpoklad neprokázali, jelikož samice preferovaly tuto pozici v noci, kdy je okolní teplota nižší. Proto se přikláníme k interpretaci, že spánková pozice může poukazovat na „intenzitu“ spánku, kdy „rest“ pozice je využívána jako bdělejší forma spánku (viz. Amlaner & Ball 1994; Fuchs et al. 2006), což bylo v naší studii potvrzeno vyšší vigilancí v této pozici během noci.

### **[3] An alternative theoretical approach to escape decision-making: the role of visual cues**

Javůrková, V., Šizling, A. L., Kreisinger, J. and Albrecht, T. (2011) (submitováno 7/2011 *PLoS ONE*)

Tento předložený manuskript představuje fúzi teoretického a experimentálního přístupu pro hodnocení únikové reakce kořisti. Zmíněné výsledky předchozí publikace, které prokázaly zásadní roli vegetace ve zpracování vizuálních stimulů nás přivedly k přehodnocení tradičních teoretických modelů uvažujících především adaptivní mechanismy v procesu rozhodování kořisti k únikové reakci. V této práci jsme navrhli nový teoretický model, založený na zcela proximální interpretaci únikového chování jako procesu vyvolaného vizuálními podněty způsobenými přibližujícím se predátorem. Jako parametry modelu jsme použily tzv. „*looming stimuli*“ neboli

retinální obraz přibližujícího se objektu, vegetační zakrytí a směr přístupu predátora (viz např. Hemmi 2005, Hemmi & Pfeil 2010). Pro otestování modelu jsme použili experimentální data sledující únikovou vzdálenost (FID – *flight initiation distance*) u inkubující kachny divoké a prokázali shodu parametrů modelu s experimentálními daty. V souladu s predikcemi modelu jsme v experimentu prokázali interakci vegetačního zakrytí a směru přístupu predátora. Kořist přizpůsobovala svou únikovou reakci stupni vegetačního zakrytí pouze v případě přímého přístupu predátora směrem ke kořisti. Během transversálního přístupu predátora nebyl efekt vegetace patrný. Tyto závěry poukazují na fakt, že i komplexní situace uvažující interakci více faktorů v procesu rozhodování kořisti kdy uniknout lze interpretovat pomocí zcela proximálního přístupu. Vzhledem k tomu, že proměnné v námi navrhovaném modelu lze na rozdíl od tradičních ultimátních modelů jasně parametrizovat, považujeme náš model za parsimonější alternativu k tradičním, dosud využívaným adaptivním teoriím interpretujícím únikové chování kořisti.

#### **[4] Do intermittent incubation and covering of clutch by nest lining feathers affect trans-shell infection in ground nesting precocial birds?**

Javůrková, V., Albrecht, T., Mrázek, J. and Kreisinger, J. (2011) (submitováno 8/2011 *Functional Ecology*)

V této studii jsme se zaměřili jednak na testování mechanismů, které mohou redukovat pravděpodobnost proniknutí mikroorganismů do vnitřních struktur vejce a dále pak na vliv přítomnosti bakteriální infekce (dále BI) ve vejci na jeho líhivost a fenotyp mláďat.

K tomuto účelu jsme použili fertilní vejce kachny divoké (*Anas platyrhynchos*) z komerční odchovny, které jsme exponovali v přirozených podmínkách hnízdního habitatu po dobu, odpovídající průměrné před-inkubační periodě pro tento druh (Krapu *et al.* 2004). Použitý dvou-faktoriální experimentální design nám umožnil testovat efekt zakrývání snůšky hnízdním materiálem, který byl odebírán z aktivních hnízd kachny divoké a částečnou inkubací, kdy byla část vajec denně umístována do inkubátoru na dobu, která odpovídala době, zjištěné v předchozí studii (viz Loos & Rohwer 2004). Na rozdíl od všech předchozích prací (Cook *et al.* 2003; Godard *et al.* 2007; Wang *et al.* 2011) jsme pro kvantitativní a kvalitativní hodnocení přítomnosti BI použili zcela molekulární přístup (RT-PCR a DGGE). V této práci jsme prokázali, že jak částečná inkubace, tak zakrývání snůšky hnízdním materiálem v před-inkubačním období, nemá vliv na pravděpodobnost proniknutí BI do vejce. Rovněž se nám nepodařilo prokázat vliv

přítomnosti či intenzity BI na líhnivost vajec. Tento výsledek je v rozporu s předchozími studiemi, které prokazují sníženou líhnivost a vysokou incidenci BI ve vnitřních strukturách vejce (Cook et al. 2003; Godard et al. 2007). Nicméně tyto studie vychází z experimentů, kde líhnivost a přítomnost BI je hodnocena na dvou nezávislých experimentálních skupinách snůšek. Naopak naše studie nám umožnila testovat přímou závislost přítomnosti BI a líhnivosti. Dalším faktem pro nepřítomnost vztahu mezi BI a líhnivostí je, že riziko mikrobiální infekce, může mít zásadní konsekvence na životaschopnost embrya především v tropech, kde je výrazný vlhkostní a teplotní gradient, který může riziko proniknutí BI do vejce usnadňovat (Cook et al. 2003; 2005a,b). Naopak u druhů mírného pásma byla prokázána snížená incidence mikroorganismů na povrchu i uvnitř vejce (Ruiz-de-Castañeda et al. 2011; Wang et al. 2011). Avšak je nutno podotknout, že tyto studie jsou založené na čistě kultivačních technikách. Vezmeme-li v úvahu fakt, že ve skutečnosti je pouze 1% bakterií vyskytujících se v prostředí kultivovatelných (Amann et al. 1995; Shawkey et al. 2009), nemohou být výsledky těchto studií použity pro jakékoliv obecné vyvozování rozdílů v riziku přítomnosti BI mezi tropy a mírným pásmem. Navíc, 62% námi detekovaných bakterií nebylo v laboratoři dosud kultivováno a většina z nich (33%) byla zastoupena čeledí Streptococcaceae s minimem obligátně patogenních kmenů běžně nalezených ve zkažených nevylíhlých vejcích (např. Dockstater 1952; Cook et al. 2003). V naší studii jsme však prokázali zásadní vliv částečné inkubace na líhnivost vajec, která spolu s přítomností BI a zakrýváním snůšky ovlivňovala také fenotyp mlád'at. Detailnější diskuzi těchto výsledků lze nalézt v příloženém manuskriptu. Je však nutno podotknout, že naše studie je první, která přímo testuje vliv přítomnosti BI na líhnivost vajec a fenotyp mlád'at a blíže studuje funkci a význam částečné inkubace a zakrývání snůšky v pre-inkubačním období na reprodukční úspěšnost temperátních, prekociálních druhů ptáků.

## **Závěr**

Tato disertační práce postupně shrnuje a diskutuje problematiku týkající se alternativních reprodukčních strategií, antipredačního chování spojeného s obranou hnízda a mechanismů podílejících se na udržování životaschopnosti snůšky v před-inkubačním období u vrubozobých. Kromě vnitrodruhového hnízdního parazitizmu, který je u vrubozobých předmětem extenzivního zájmu, bylo jednotlivým aspektům reprodukční biologie a antipredačního chování u této skupiny doposud věnováno velmi málo pozornosti. Tato disertační práce a především publikace v ní obsažené tedy přispívají k odhalování mechanismů souvisejících se specifiky v reprodukční biologii a antipredačními strategiemi spojenými s obranou hnízda u vrubozobých.

## Citovaná literatura

- Ahlund, M., & Andersson, M.** 2001. Brood parasitism: Female ducks can double their reproduction. *Nature*, **414**, 600-601.
- Albrecht, T., & Klvana, P.** 2004. Nest crypsis, reproductive value of a clutch and escape decisions in incubating female mallards *Anas platyrhynchos*. *Ethology*, **110**, 603-613.
- Amann, R., Ludwig, W., & Schleifer, K.** 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.*, **59**, 143-169.
- Amlaner, C. J. & Ball, N. J.** 1994. Avian sleep. In: Principles and Practices of Sleep Medicine (Kryger, M. H., Roth, T. & Dement, W. C., eds). W. B. Saunders, Philadelphia, pp. 81-94.
- Arenz, C. L. & Leger, D. W.** 1997. Artificial visual obstruction, antipredator vigilance, and predator detection in the thirteen-lined ground squirrel (*Spermophilus tridecemlineatus*). *Behaviour* 134, 1101—1114.
- Arlt, D., Hansson, B., Bensch, S., Torbjörn Von Schantz, & Hasselquist, D.** 2004. Breeding Synchrony Does Not Affect Extra-Pair Paternity in Great Reed Warblers. *Behaviour*, **141**, 863-880.
- Arnqvist, G., & Kirkpatrick, M.** 2005. The evolution of infidelity in socially monogamous passerines: the strength of direct and indirect selection on extrapair copulation behavior in females. *The American Naturalist*, **165 Suppl 5**, S26-37.
- Aw, J. M., Vasconcelos, M., & Kacelnik, A.** 2011. How costs affect preferences: experiments on state dependence, hedonic state and within-trial contrast in starlings. *Animal Behaviour*, **81**, 1117-1128.
- Ball, N. J., Shaffery, J. P., Opp, M. R., Carter, R. L. & Amlaner, C. J.** 1985. Asynchronous eye-closure of birds. *Sleep Res.* 14, 87.
- Beauchamp, G.** 2007. Exploring the role of vision in social foraging: what happens to group size, vigilance, spacing, aggression and habitat use in birds and mammals that forage at night? *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, **82**, 511-525.
- Beauchamp, G. & McNeil, R.** 2003. Vigilance in Greater Flamingos foraging at night. *Ethology* 109, 511-520.
- Bednekoff, P. A. & Blumstein, D. T.** 2009. Peripheral obstructions influence marmot vigilance: integrating observational and experimental results. *Behav. Ecol.* 20, 1111-1117.
- Bednekoff, P. A. & Lima, S. L.** 2005. Testing for peripheral vigilance: do birds value what they see when not overtly vigilant? *Anim. Behav.* 69, 1165—1171.



- Bednekoff, P. A. & Ritter, R.** 1994. Vigilance in Nxai Pan springbok, *Antidorcas marsupialis*. *Behaviour* 129, 1-11.
- Benešová, O.** 2009. Variabilita v míře predace a antipredačním chování kachny divoké (*Anas platyrhynchos*) v závislosti na vzdálenosti refugia. Master thesis. Charles University in Prague, Prague.
- Bennett P.M., Owens I. P. F. 2002. *Evolutionary Ecology of Birds: Life Histories, Mating Systems and Extinction*. Oxford, UK: Oxford Univ. Press. 278 pp.
- Berger, R. J. & Phillips, N. H.** 1995. Energy conservation and sleep. *Behav. Brain Res.* 69, 65-73.
- Birkhead, T. R., & Biggins, J. D.** 1987. Reproductive Synchrony and Extra-pair Copulation in Birds. *Ethology*, 74, 320-334.
- Blums, P., & Mednis, A.** 1996. Secondary sex ratio in Anatinae. *Auk*, 113, 505-511.
- Moller, A.** 1992. Sexual selection in the monogamous barn swallow (*Hirundo-rustica*). 2. Mechanisms of sexual selection. *Journal Of Evolutionary Biology*, 5, 603-624.
- Boyer, J., Hassa, L., Lurie, M., & Blumstein, D.** 2006. Effect of visibility on time allocation and escape decisions in crimson rosellas. *Australian Journal Of Zoology*, 54, 363-367.
- Brennan, P. L. R., Clark, C. J., & Prum, R. O.** 2010. Explosive eversion and functional morphology of the duck penis supports sexual conflict in waterfowl genitalia. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 277, 1309 -1314.
- Broom, M., & Ruxton, G.** 2005. You can run - or you can hide: optimal strategies for cryptic prey against pursuit predators. *Behavioral Ecology*, 16, 534-540.
- Bulmer, M. G.** 1984. Risk avoidance and nesting strategies. *Journal of Theoretical Biology*, 106, 529-535.
- Caldwell, P. J., & Cornwell, G. W.** 1975. Incubation Behavior and Temperatures of the Mallard Duck. *The Auk*, 92, 706-731.
- Campbell, S. S. & Tobler, I.** 1984: Animal sleep: a review of sleep duration across phylogeny. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 8, 269—300.
- Caro, T.M. 2005. Antipredator defenses in birds and mammals. University of Chicago Pres. pp. 591.
- Cervenci, A., Esser, W., Maier, M., Oberdiek, N., Thyen, S., Wellbrock, A., & Exo, K.M.** 2011. Can differences in incubation patterns of Common Redshanks *Tringa totanus* be explained by variations in predation risk? *Journal of Ornithology*. DOI: 10.1007/s10336-011 0696-z
- Cirelli, C.** 2005. A molecular window on sleep: changes in gene expression between sleep and

wakefulness. *Neuroscientist* 11, 63—74.

**Clark, A. B., & Wilson, D. S.** 1985. The Onset of Incubation in Birds. *The American Naturalist*, **125**, 603-611.

**Cook, M. I., Beissinger, S. R., Toranzos, G. A., & Arendt, W. J.** 2005a. Incubation reduces microbial growth on eggshells and the opportunity for trans-shell infection. *Ecology Letters*, **8**, 532-537.

**Cook, M. I., Beissinger, S. R., Toranzos, G. A., Rodriguez, R. A., & Arendt, W. J.** 2003. Trans-shell infection by pathogenic micro-organisms reduces the shelf life of non-incubated bird's eggs: a constraint on the onset of incubation? *Proceedings. Biological Sciences of The Royal Society*, **270**, 2233-2240.

**Cook, M., Beissinger, S., Toranzos, G., Rodriguez, R., & Arendt, W.** 2005b. Microbial infection affects egg viability and incubation behavior in a tropical passerine. *Behavioral Ecology*, **16**, 30-36.

**Cooper, W., & Frederick, W.** 2007. Optimal flight initiation distance. *Journal Of Theoretical Biology*, **244**, 59-67.

**Cooper, W., & Frederick, W.** 2010. Predator lethality, optimal escape behavior, and autotomy. *Behavioral Ecology*, **21**, 91-96.

**Cowlshaw, G.** 1998. The role of vigilance in the survival and reproductive strategies of desert baboons. *Behaviour*, **135**, 431-452.

Cramp, S. & Simmons, K.E.L. (Eds). 1977. The birds of the western Palearctic, Vol. I. Oxford: Oxford University Press.

**Cresswell, W., Lind, J., Kaby, U., Quinn, J. L., & Jakobsson, S.** 2003. Does an opportunistic predator preferentially attack nonvigilant prey? *Animal Behaviour*, **66**, 643-648.

**Cunningham, E. J. A.** 2003. Female mate preferences and subsequent resistance to copulation in the mallard. *Behavioral Ecology*, **14**, 326 -333.

**Davies N. B.** 1991. Mating systems. In: *Behavioural Ecology: an Evolutionary Approach* (eds JR Krebs, NB Davies), 3rd edn, Blackwell Scientific Press, Oxford. pp. 263-294

**Davies, N. B.** 2000. Cuckoos, Cowbirds and Other Cheats. London: T. & A.D. Poyser.

**McKinney F, Cheng KM, Bruggers DJ,** 1984. Sperm competition in apparently monogamous birds. In: Sperm competition and the evolution of animal mating systems (Smith RL, ed). Orlando: Academic Press; 523–545.

**Dawson, R. D., O'Brien, E. L., & Mlynowski, T. J.** 2011. The price of insulation: costs and benefits of feather delivery to nests for male tree swallows *Tachycineta bicolor*. *Journal of Avian*

*Biology*, **42**, 93-102.

**de Valpine, P., & Eadie, J. M.** 2008. Conspecific brood parasitism and population dynamics. *The American Naturalist*, **172**, 547-562.

**Dewasmes, G., Cohen-Adad, F., Koubi, H., & Le Maho, Y.** 1984. Sleep changes in long term fasting geese in relation to lipid and protein metabolism. *The American Journal of Physiology*, **247**, R663-671.

**Dill, L.** 1974. Escape Response Of Zebra Danio (*Brachydanio rerio*) .1. Stimulus For Escape. *Animal Behaviour*, **22**, 711-722.

**Dockstater, W. B.** 1952. Aerobic microorganisms found to be predominant in spoiled eggs. Ph.D. dissertation, Washington State University, Pullman, WA.

**Domenici, P.** 2010. Context-Dependent Variability in the Components of Fish Escape Response: Integrating Locomotor Performance and Behavior. *Journal Of Experimental Zoology Part A-Ecological Genetics* **313A**, 59-79.

**Dominguez, J. D.** 2003. Sleeping and Vigilance in Black-Tailed Godwit. *J Ethol*, **21**, 57-60.

**Dukas, R.** 2004. Causes and consequences of limited attention. *Brain Behavior and Evolution*, **83**,197-210.

**Eadie, J. M., & Fryxell, J. M.** 1992. Density Dependence, Frequency Dependence, and Alternative Nesting Strategies in Goldeneyes. *The American Naturalist*, **140**, 621-641. *Evolution*, **62**, 201-211.

**Feare, C.** 1991. Intraspecific Nest Parasitism In Starlings *Sturnus vulgaris* - Effects Of Disturbance On Laying Females. *Ibis*, **133**, 75-79.

**Ferna´ndez-Juricic, E. & Tran, E.** 2007: Changes in vigilance and foraging behaviour with light intensity and their effects on food intake and predator detection in house finches. *Anim. Behav.* **74**, 1381-1390.

**Fernández-Juricic, E. & Beauchamp, G.** 2008. An experimental analysis of spatial position effects on foraging and vigilance in brown-headed cowbird flocks. *Ethology* **114**, 105-114.

**Forstmeier, W.** 2007. Do Individual Females Differ Intrinsically in Their Propensity to Engage in Extra-Pair Copulations? *PLoS ONE*, **2**,

**Fuchs, T.** 2006. Daytime naps in night-migrating birds: behavioural adaptation to seasonal sleep deprivation in the Swainson's thrush, *Catharus ustulatus*. *Animal Behaviour* **72**, 951-958.

**Gauthier-Clerc, M., Tamisier, A., & Cézilly, F.** 2000. Sleep-vigilance trade-off in Gadwall during the winter period. *The Condor*, **102**, 307.

**Glantz, R.** 1974. Defense reflex and motion detector responsiveness to approaching targets –

motion detector trigger to defense reflex pathway. *Journal Of Comparative Physiology*, **95**, 297-314.

**Godard, R. D., Morgan Wilson, C., Frick, J. W., Siegel, P. B., & Bowers, B. B.** 2007. The effects of exposure and microbes on hatchability of eggs in open-cup and cavity nests. *Journal of Avian Biology*, **38**, 709-716.

**Godard, R. D., Morgan Wilson, C., Frick, J. W., Siegel, P. B., & Bowers, B. B.** 2007a. The effects of exposure and microbes on hatchability of eggs in open-cup and cavity nests. *Journal of Avian Biology*, **38**, 709-716.

**Grant, B. R., & Grant, P. R.** 1987. Mate choice in Darwin's Finches. *Biological Journal of the Linnean Society*, **32**, 247-270.

**Griffith, S. C., Owens, I. P. F., & Thuman, K. A.** 2002. Extra pair paternity in birds: a review of interspecific variation and adaptive function. *Molecular Ecology*, **11**, 2195-2212.

**Gunnarsson, G., & Elmberg, J.** 2008. Density-dependent nest predation – an experiment with simulated Mallard nests in contrasting landscapes. *Ibis*, **150**, 259-269.

**Gunnarsson, G., & Elmberg.** 2007. Manipulated density of adult mallards affects nest survival differently in different landscapes. *Canadian Journal Of Zoology/revue Canadienne De Zoologie*, **85**, 589-595.

**Hemmi, J.** 2005. Predator avoidance in fiddler crabs: 2. The visual cues. *Animal Behaviour*, **69**, 615-625.

**Hemmi, J., & Pfeil, A.** 2010. A multi-stage anti-predator response increases information on predation risk. *Journal Of Experimental Biology*, **213**, 1484-1489.

**Hoekman, S. T., Mills, L. S., Howerter, D. W., Devries, J. H., & Ball, I. J.** 2002. Sensitivity Analyses of the Life Cycle of Midcontinent Mallards. *The Journal of Wildlife Management*, **66**, 883-900.

**Hoi, H., & Václav.** 2010. Importance of colony size and breeding synchrony on behaviour, reproductive success and paternity in house sparrows *Passer domesticus*. *Folia Zoologica*, **51**, 35-48.

**Holmqvist, M., & Srinivasan, M.** 1991. A visually evoked escape response of the housefly. *Journal of Comparative Physiology A*, **169**,

**Hoover, J. P., Brittingham, M. C., & Goodrich, L. J.** 1995. Effects of Forest Patch Size on Nesting Success of Wood Thrushes. *The Auk*, **112**, 146-155.

**Jaatinen, K., Lehtonen, J., & Kokko, H.** 2011. Strategy selection under conspecific brood parasitism: an integrative modeling approach. *Behavioral Ecology*, **22**, 144 -155.

- Jackson, W. M.** 1993. Causes of Conspecific Nest Parasitism in the Northern Masked Weaver. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **32**, 119-126.
- Jacot, A., Valcu, M., van Oers, K., & Kempenaers, B.** 2009. Experimental nest site limitation affects reproductive strategies and parental investment in a hole-nesting passerine. *Animal Behaviour*, **77**, 1075-1083.
- Jennions, M. D., & Petrie, M.** 2000. Why do females mate multiply? A review of the genetic benefits. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, **75**, 21-64.
- Johnsgard, P. A. 1997. *The Avian Brood Parasites: Deception at the Nest*. Oxford: Oxford University Press.
- Jones, K. A., & Godin, J.-G. J.** 2010. Are fast explorers slow reactors? Linking personality type and anti-predator behaviour. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **277**, 625 -632.
- Kacelnik, A., & Bateson, M.** 1996. Risky theories - The effects of variance on foraging decisions. *American Zoologist*, **36**, 402-434.
- Kacelnik, A., & Brito e Abreu, F.** 1998. Risky Choice and Weber's Law. *Journal of Theoretical Biology*, **194**, 289-298.
- Kraaijeveld, K., Carew, P. J., Billing, T., Adcock, G. J., & Mulder, R. A.** 2004. Extra pair paternity does not result in differential sexual selection in the mutually ornamented black swan (*Cygnus atratus*). *Molecular Ecology*, **13**, 1625-1633.
- Kreisinger, J., & Albrecht, T.** 2008. Nest protection in mallards *Anas platyrhynchos*: untangling the role of crypsis and parental behaviour. *Functional Ecology*, **22**, 872-879.
- Lack D. 1968. *Ecological Adaptations for Breeding in Birds*. London: Methuen. pp. 409
- Lank, D. B., Rockwell, R. F., & Cooke, F.** 1990. Frequency-Dependent Fitness Consequences of Intraspecific Nest Parasitism in Snow Geese. *Evolution*, **44**, 1436-1453.
- Lazarus, J. & Symonds, M.** 1992: Contrasting effects of protective and obstructive cover on avian vigilance. *Anim. Behav.* **43**, 519-521.
- Lazarus, J., & Symonds, M.** 1992. Contrasting effects of protective and obstructive cover on avian vigilance. *Animal Behaviour*, **43**, 519-521.
- Lehikoinen, A., Christensen, T., Ost, M., Kilpi, M., Saurola, P., & Vattulainen, A.** 2008. Large-scale change in the sex ratio of a declining eider *Somateria mollissima* population. *Wildlife Biology*, **14**, 288-301.
- Lendrem, D. W.** 1984: Sleeping and vigilance in birds: II. An experimental study of the barbery dove (*Streptopelia risoria*). *Anim. Behav.* **32**, 243—248.

- Ležalová-Piálková, R.** 2010. Molecular evidence for extra-pair paternity and intraspecific brood parasitism in the Black-headed Gull. *Journal of Ornithology*, **152**, 291-295.
- Lima, S. L.** 2009. Predators and the breeding bird: behavioral and reproductive flexibility under the risk of predation. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, **84**, 485-513.
- Lima, S. L.** 1988: Vigilance during the initiation of daily feeding in dark-eyed juncos. *Oikos* **53**, 12-16.
- Lima, S. L., & Dill, L. M.** 1990. Behavioral decisions made under the risk of predation: a review and prospectus. *Canadian Journal of Zoology*, **68**, 619-640.
- Lindstedt, E., Oh, K., & Badyaev, A.** 2007. Ecological, social, and genetic contingency of extrapair behavior in a socially monogamous bird. *Journal Of Avian Biology*, **38**, 214-223.
- Liu, R., Niu, Y., & Wang, S.** 2008. Thalamic neurons in the pigeon compute distance-to collision of an approaching surface. *Brain Behavior And Evolution*, **72**, 37-47.
- Liu, Y.-J., Wang, Q., & Li, B.** 2011. Neuronal responses to looming objects in the superior colliculus of the cat. *Brain, Behavior and Evolution*, **77**, 193-205.
- Lloyd, P.** 2006. Density-dependent nest predation: a field test. *African Journal of Ecology*, **44**, 293-295.
- Loos, E. R., & Rohwer, F. C.** 2004a. Laying-Stage Nest Attendance and Onset of Incubation in Prairie Nesting Ducks. *The Auk*, **121**, 587-599.
- Lusignan, A. P., Mehl, K. R., Jones, I. L., & Gloutney, M. L.** 2010. Conspecific Brood Parasitism in Common Eiders (*Somateria mollissima*): Do Brood Parasites Target Safe Nest Sites? *The Auk*, **127**, 765-772.
- Lyon, B. E., & Eadie, J. M.** 2008. Conspecific Brood Parasitism in Birds: A Life-History Perspective. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, **39**, 343-363.
- Martin, T. E.** 1993. Nest Predation and Nest Sites. *BioScience*, **43**, 523-532.
- McKinney, F., & Stolen, P.** 1982. Extra-pair-bond courtship and forced copulation among captive green-winged teal (*Anas crecca carolinensis*). *Animal Behaviour*, **30**, 461-474.
- McKinney, F., Barrett, J., & Derrickson, S. R.** 1978. Rape among mallards. *Science (New York, N.Y.)*, **201**, 281-282.
- McKinney, F., Derrickson, S. R., & Mineau, P.** 1983. Forced Copulation in Waterfowl *Behaviour*, **86**, 250-294.
- Moller, A.** 1991. Density-dependent extra-pair copulations in the swallow *hirundo-rustica*. *Ethology*, **87**, 316-329.
- Møller, A. P.** 1986. Mating systems among European passerines: a review. *Ibis*, **128**, 234- 250.

- Møller, A. P., & Birkhead, T. R.** 1993. Certainty of paternity covaries with paternal care in birds. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **33**, 261-268.
- Møller, A. P., & Cuervo, J. J.** 2000. The evolution of paternity and paternal care in birds. *Behavioral Ecology*, **11**, 472-485.
- Møller, A. P., & Ninni, P.** 1998. Sperm competition and sexual selection: a meta-analysis of paternity studies of birds. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **43**, 345-358.
- Møller, A., & Birkhead, T.** 1991. Frequent copulations and mate guarding as alternative paternity guards in birds - a comparative-study. *Behaviour*, **118**, 170-186.
- Møller, A., & Birkhead, T.** 1992. A pairwise comparative method as illustrated by copulation frequency in birds. *American Naturalist*, **139**, 644-656.
- Montgomerie, R. D., & Weatherhead, P. J.** 1988. Risks and Rewards of Nest Defence by Parent Birds. *The Quarterly Review of Biology*, **63**, 167-187.
- Morton, E., Forman, L., & Braun, M.** 1990. Extrapair fertilizations and the evolution of colonial breeding in purple martins. *Auk*, **107**, 275-283.
- Nalbach, H.** 1990. Visually elicited escape in crabs. *Frontiers In Crustacean Neurobiology*, 165-172.
- Odell, N. S., & Eadie, J. M.** 2010. Do wood ducks use the quantity of eggs in a nest as a cue to the nest's value? *Behavioral Ecology*, **21**, 794-801.
- Owen, M., & Black, J. M.** 1990. *Waterfowl ecology*. Tertiary level biology series, Blackie, Glasgow and London. pp. 204.
- Peralta-Sanchez JM, Møller AP, Martin-Platero AM, Soler JJ.** 2010. Number and colour composition of nest lining feathers predict eggshell bacterial community in barn swallow nests: an experimental study. *Functional Ecology* **24**: 426-433.
- Peters, J. L., Brewer, G. L., & Bowe, L. M.** 2003. Extrapair paternity and breeding synchrony in gadwalls (*Anas strepera*) in north dakota. *The Auk*, **120**, 883.
- Petrie, M., & Møller, A. P.** 1991. Laying eggs in others' nests: Intraspecific brood parasitism in birds. *Trends in Ecology & Evolution*, **6**, 315-320.
- Phelps, S.** 2007. Sensory ecology and perceptual allocation: new prospects for neural networks. *Philosophical Transactions Of The Royal Society B-Biological Sciences*, **362**, 355-367.
- Pompilio, L. & Kacelnik, M.** 2005. State-dependent learning and suboptimal choice: when Starlings prefer long over short delays to food. *Animal Behaviour*, **70**, 571-578.
- Pöysä, H.** 1999b. Conspecific nest parasitism is associated with inequality in nest predation risk in the common goldeneye (*Bucephala clangula*). *Behavioral Ecology*, **10**, 533-540.

- Pöysä, H.** 1999a Public information and conspecific nest parasitism in goldeneyes: targeting safe nests by parasites. *Behavioral Ecology*, **17**, 459 -465.
- Pöysä, H.** 2003. Parasitic common goldeneye ( *Bucephala clangula* ) females lay preferentially in safe neighbourhoods. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **54**, 30-35.
- Pöysä, H., & Pesonen, M.** 2007. Nest predation and the evolution of conspecific brood parasitism: from risk spreading to risk assessment. *The American Naturalist*, **169**, 94-104.
- Pravosudov, V. V. & Grubb, T. C.** 1998 Management of fat reserves in tufted titmice *Baeolophus bicolor* in relation to risk of predation. *Animal Behavior*. **56**, 49–54.
- Rattenborg, N. C., Amlaner, C. J. & Lima, S. L.** 2000: Behavioural, neurophysiological and evolutionary perspectives on unihemispheric sleep. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **24**, 817-842.
- Reebs, S. G.** 1986: Sleeping behavior of black-billed magpies under a wide range of temperatures. *Condor* **88**, 524-526.
- Rehault-Godbert, S., Baron, F., Mignon-Grasteau, S., Labas, V., Gautier, M., Hincke, M. T., & Nys, Y.** 2010. Effect of Temperature and Time of Storage on Protein Stability and Anti-Salmonella Activity of Egg White. *Journal of Food Protection®*, **73**, 1604-1612.
- Reichart, L., Anderholm, S., Munoz-Fuentes, V., & Webster, M.** 2010. Molecular identification of brood-parasitic females reveals an opportunistic reproductive tactic in ruddy ducks. *Molecular Ecology*, **19**, 401-413.
- Ricklefs, R. E. 1969. An analysis of nesting mortality in birds. Smithsonian contributions to zoology,, no. 9, Smithsonian Institution Press, Washington DC. pp 1-48.
- Robinson, S. K., Thompson, F. R., Donovan, T. M., Whitehead, D. R., & Faaborg, J.** 1995. Regional Forest Fragmentation and the Nesting Success of Migratory Birds. *Science*, **267**, 1987 - 1990.
- Rodrigues, M.** 1996. Song activity in the chiffchaff: Territorial defence or mate guarding? *Animal Behaviour*, **51**, 709-716.
- Rohwer, F. C., & Freeman, S.** 1992. Why conspecific nest parasitism is more frequent in waterfowl than in other birds: a reply to M. D. Sorenson. *Canadian Journal of Zoology*, **70**, 1859-1860.
- Ruiz-de-Castañeda, R., Vela, A. I., Lobato, E., Briones, V., & Moreno, J.** 2011. Bacterial Loads on Eggshells of the Pied Flycatcher: Environmental and Maternal Factors. *The Condor*, **113**, 200-208.
- Sayler, R. D.** 1992. Ecology and evolution of brood parasitism in waterfowl. In: Batt, B. D. J., Afton, A. D., Anderson, M. G., Ankney, C. D., Johnson, D. H., Kadlec, J. A. and Krapu,



- G. L. (eds), Ecology and management of breeding waterfowl. Univ. of Minnesota Press, pp. 290-322.
- Seger, J. & Brockmann, H. J.** 1987 What is bet-hedging? In Oxford surveys in evolutionary biology, vol. 4 (eds P. H. Harvey & L. Partridge), pp. 182–211. Oxford, UK: Oxford University Press.
- Seger, J., & Philippi.** 1989. Hedging one's evolutionary bets, revisited. *Trends in Ecology & Evolution*, **4**, 41-44.
- Semel B., & Sherman P.W.** 2001. Intraspecific parasitism and nest-site competition in wood ducks. *Animal Behaviour*, **61**, 787-803.
- Shawkey, M. D., Firestone, M. K., Brodie, E. L., & Beissinger, S. R.** 2009. Avian Incubation Inhibits Growth and Diversification of Bacterial Assemblages on Eggs. *PLoS ONE*, **4**, e4522.
- Shawkey, M. D., Pillai, S. R., & Hill, G. E.** 2003. Chemical warfare? Effects of uropygial oil on feather-degrading bacteria. *Journal of Avian Biology*, **34**, 345-349.
- Sheldon, B. C.** 1993. Sexually Transmitted Disease in Birds: Occurrence and Evolutionary Significance. *Philosophical Transactions: Biological Sciences*, **339**, 491-497.
- Schaefer.** 2004. Video monitoring of shrub-nests reveals nest predators. *Bird Study*, **51**, 170-177.
- Siegel, J. M.** 2003: Why we sleep. *Sci. Am.* 289, 92—97.
- Sih, A., Bell, A., & Johnson, J. C.** 2004. Behavioral syndromes: an ecological and evolutionary overview. *Trends in Ecology & Evolution*, **19**, 372-378.
- Simlot, M.M., Specht, D. & Pfaender, P.** 1972. Antibiotics producing enzymes of *Bacillus licheniformis*. Hoppe-Seylers Zeitschrift für Physiologische Chemie, 353, 759.
- Smolka, J., Zeil, J., & Hemmi, J. M.** 2011. Natural visual cues eliciting predator avoidance in fiddler crabs. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. doi: 10.1098/rspb.2010.2746
- Soler JJ, Martín-Vivaldi M, Peralta-Sánchez JM, Ruiz-Rodríguez M.** 2010. Antibiotic-producing bacteria as a possible defence of birds against pathogenic microorganisms. *Open Ornithology Journal* **2**: 29–36.
- Soler, J. J., Martín-Vivaldi, M., Ruiz-Rodríguez, M., Valdivia, E., Martín-Platero, A.M., Martínez-Bueno, M., Peralta-Sánchez, J. M., & Méndez, M.** 2008. Symbiotic association between hoopoes and antibiotic-producing bacteria that live in their uropygial gland. *Functional Ecology*, **22**, 864-871.
- Sorenson, L. G.** 1994. Forced extra-pair copulation and mate guarding in the white-cheeked

pintail: timing and trade-offs in an asynchronously breeding duck. *Animal Behaviour*, **48**, 519-533.

**Stankowich, T., & Blumstein, D.** 2005. Fear in animals: a meta-analysis and review of risk assessment. *Proceedings Of The Royal Society B-Biological Sciences*, **272**, 2627-2634.

**Teunissen, W., Schekkerman, H., Willems, F., & Majoer, F.** 2008. Identifying predators of eggs and chicks of Lapwing *Vanellus vanellus* and Black-tailed Godwit *Limosa limosa* in the Netherlands and the importance of predation on wader reproductive output. *Ibis*, **150**, 74-85.

**Thompson, F. R.** 2007. Factors affecting nest predation on forest songbirds in North America. *Ibis*, **149**, 98-109.

**Thusius, K. J., Dunn, P. O., Peterson, K. A., & Whittingham, L. A.** 2001. Extrapair paternity is influenced by breeding synchrony and density in the common yellowthroat. *Behavioral Ecology*, **12**, 633 -639.

**Tranter, H. S., & Board, R. G.** 1984. The influence of incubation temperature and pH on the antimicrobial properties of hen egg albumen. *The Journal of Applied Bacteriology*, **56**, 53-61.

**Trivers, R.L.** 1972. Parental investment and sexual selection. In *Sexual selection and the descent of man*. Ed. B. Campbell. Chicago, Aldine. 136-179.

**Waldeck, P., Hagen, J. I., Hanssen, S. A., & Andersson, M.** 2011. Brood parasitism, female condition and clutch reduction in the common eider *Somateria mollissima*. *Journal of Avian Biology*, **42**, 231-238.

**Wang, J. M., & Beissinger, S. R.** 2009. Variation in the onset of incubation and its influence on avian hatching success and asynchrony. *Animal Behaviour*, **78**, 601-613.

**Watts, B. D.** 1990. Cover use and predator-related mortality in song and savannah sparrows. *Auk* **107**, 775-778.

**Weidinger, K.** 2001. Does egg colour affect predation rate on open passerine nests? *Behavioral Ecology And Sociobiology*, **49**, 456-464.

**Weidinger, K.** 2008. Nest monitoring does not increase nest predation in open-nesting songbirds: inference from continuous nest-survival data. *The Auk*, **125**, 859-868.

**Weidinger, K.** 2010. Foraging behaviour of nest predators at open-cup nests of woodland passerines. *Journal Of Ornithology*, **151**, 729-735.

**Wellmann, A. E. & Downs, C. T.** 2009. A behavioural study of sleep patterns in the malachite sunbird, Cape white-eye and fan-tailed widowbird. *Anim. Behav.* **77**, 61-66.

**Westneat, D. F. & Stewart, I. R. K.** 2003. Extra-pair paternity in birds Causes, Correlates, and Conflict. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, **34**, 365-396.

- Westneat, D. F., & Craig Sargent, R.** 1996. Sex and parenting: the effects of sexual conflict and parentage on parental strategies. *Trends in Ecology & Evolution*, **11**, 87-91.
- Westneat, D. F., & Sherman, P. W.** 1997. Density and extra-pair fertilizations in birds: a comparative analysis. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **41**, 205-215.
- Whittingham, M. J., Butler, S. J., Quinn, J. L. & Cresswell, W.** 2004: The effect of limited visibility on vigilance behaviour and speed of predator detection: implications for the conservation of granivorous passerines. *Oikos* 106, 377—385.
- Wilke, A., & Todd, P. M.** 2010. Past and present environments: the evolution of decision making. *Psicothema*, **22**, 4-8.
- Yamamoto, K., Nakata, M., & Nakagawa, H.** 2003. Input and output characteristics of collision avoidance behavior in the frog *Rana catesbeiana*. *Brain Behavior And*
- Ydenberg, R., & Dill, L.** 1986. The economics of fleeing from predators. *Advances In The Study Of Behavior*, **16**, 229-249.
- Yom-Tov, Y.** 2001. An updated list and some comments on the occurrence of intraspecific nest parasitism in birds. *Ibis*, **143**, 133-143.

## **PŘÍLOHY 1 – 4**

## **PŘÍLOHA 3**

## **An alternative theoretical approach to escape decision-making: the role of visual cues**

Veronika Javůrková <sup>1)\*</sup>, Arnošt Leoš Šizling <sup>2)</sup>, Jakub Kreisinger <sup>1)</sup> and Tomáš Albrecht <sup>1)3)</sup>

<sup>1)</sup> Department of Zoology, Biodiversity Research Group, Charles University in Prague, Viničná 7, 128 44, Praha 2, Czech Republic

<sup>2)</sup> Center for Theoretical Study, Charles University and Academy of Sciences of the Czech Republic, Jilská 1, 110 00, Praha 1, Czech Republic

<sup>3)</sup> Institute of Vertebrate Biology v. v. i., Academy of Sciences of the Czech Republic, Květná 8, 603 65 Brno, Czech Republic

Veronika Javůrková <sup>1)\*</sup> Corresponding author

e-mail: [veronika.javurkova@gmail.com](mailto:veronika.javurkova@gmail.com)

phone: +0420 224911845

fax: +0420 224911841

Arnošt Leoš Šizling <sup>2)</sup> (e-mail: [arnost.l.sizling@seznam.cz](mailto:arnost.l.sizling@seznam.cz))

Jakub Kreisinger <sup>1)</sup> (e-mail: [jakubkreisinger@seznam.cz](mailto:jakubkreisinger@seznam.cz))

Tomáš Albrecht <sup>1)3)</sup> (e-mail: [albrecht@ivb.cz](mailto:albrecht@ivb.cz))

## **Abstract**

Escape enables prey to avoid an approaching predator. Theoretical models considering ultimate explanations based on costs/benefits paradigm have been traditionally used to interpret escape decision-making process. These ultimate approaches however suffer from inseparable extra-assumptions due to inability to accurately parameterize model's variables and their interactive relationships. In this study we therefore propose mathematical model using the intensity of predator-mediated visual stimuli as a basic cue for escape response. We consider looming stimuli (i.e. expanding retinal image of moving predator), vegetation cover, and directness of predator's moving trajectory including its interactive effect as model variables, and fitted them to experimental data examining flight initiation distance (FID - i.e. distance when escape begins) of incubating Mallards. As predicted by the model, vegetation concealment and directness of predator's trajectory interacted - FID decreased with increasing vegetation concealment during direct predator's approach towards the prey but not during a tangential one. Thus we show that the simple proximate expectation that only involves visual processing of the moving predator may explain interactive effects of environmental and predator-induced variables on prey's escape response. We assume that our alternative proximate approach offers plausible and in principal more parsimonious explanation for variation in FID than the traditional ultimate one and should be considered as an interpretation tool in future studies focused on prey escape behavior.

## **Introduction**

Accurate timing of escape, determined by flight initiation distance (FID, i.e. distance between prey and predator when escape begins), enables the prey to avoid lethal encounter with an approaching predator. In accordance with the theoretical optimality model [1,2] and its extended versions [3-5], the prey adjust FID to costs/benefits ratio in order to achieve maximal fitness. Numerous studies have demonstrated reduced FID in situations when the risk of predation was low and/or the cost of escape high, reviewed by [6]. In these cases the measures of FID provided relatively strong arguments supporting the optimality paradigm. However, because it is extremely difficult to obtain precise estimates of fitness consequences of decision-making (i.e. optimality model parameters) in nature, most of empirical studies do not properly evaluate the sufficiency of gained empirical data for the optimality models [7]. Therefore, there is no well established complementary interpretation framework to the dominating view on FID in terms of economic rationality derived from normative models available now.

The decision-making is inherently a function of cognitive, physiological and neurobiological processes at the proximate level [8-10]. However, heuristics or rule of thumbs logic which are used during the decision-making process by the prey do not always correspond with the economic rationality assumed by most of the optimality models [11-13]. These aspects are predominantly considered as a “black box” in evolutionary based studies about decision-making [14]. Nevertheless, incorporating a proximate insight to the theoretical model of decision-making process might be a fruitful strategy stimulating theoretical as well as empirical progress in this field since it may provide parallel frameworks (i.e. not necessary mutually exclusive) for interpretation of several phenomena [12,15-17].

Behavioral decision making and adopted anti-predator behavior highly depends on the acquisition of acoustic or visual signals from the environment [8,18,19]. Visual perception quality was particularly identified as a predictor of inter-specific variability in anti-predator



performance such as vigilance [20,21], predator detection [22], and most recently also escape response [23]. Nowadays, there are only few studies which explore escape behavior incorporating proximate explanations and considering the escape response triggered by visual stimuli [24-28]. These studies consider the escape behavior as elicited by looming stimuli, i.e. projection of the angle subtended by an approaching predator's frontal profile into the retinal image, and the escape response as generated by the threshold size or/and speed of the "looming image" on the retina [26,29,30]. Moreover, the intensity of looming stimuli was observed to mirror the intensity of firing level of neurons associated with the escape response [9,31-34]. It means that the visual stimuli alone may activate the escape response and are therefore suitable as the proximate interpretation of the escape decision-making process.

Ultimate approach has traditionally been used to explain changes in FID in relation to changing vegetation cover or the directness of predator's trajectory [6]. Nonetheless, the vegetation cover and the directness of predator's trajectory should also affect the visual acuity as well as the imaging of an approaching predator, i.e. they affect the looming stimuli. Many studies documented shorter FID of individuals situated in habitats surrounded by dense vegetation [35-37]. Although this effect of the vegetation cover on FID is usually considered to be associated with a decrease in perceived risk due to prey's inconspicuousness [38], vegetation cover may impede the sufficient processing of the visual information from the environment [39-41]. Yet, this obvious proximate explanation is generally underestimated in the context of FID.

Similarly, the effect of directness of predator's trajectory on FID may be interpreted in two ways. Broom and Ruxton [5] suggested that the prey should flee either immediately after predator is detected or stay motionless and rely on its crypsis. The "remaining" strategy is more advantageous when predator's trajectory bypasses prey's position, since it intuitively decreases the probability of being detected by the predator. Based on ultimate explanation, the prey perceives the predator approaching tangentially as less risky. However, the proximate view

proposes that visual processing of the directly moving object (i.e. a predator) is more accurate because it appears as symmetrically two-dimensional (transversal/horizontal), magnifying the “looming image” on the retina [10]. In contrast to that, the retinal image of tangentially moving predator precludes symmetrical appearance of circuit angle of the retinal image because it shifts from the right side to the left side and vice versa whereas its expansion is none or weak [42]. Logically, if the visual information about the tangentially moving predator is less complex, the location of predator's position is less precise and prey may delay its flight initiation [10,26]. Based on these proximate predictions, the vegetation cover, which is supposed to constrain the quality of visual acquisition, may have stronger effect on the escape decision-making in case of directly, rather than tangentially, approaching predator.

This study proposes a mathematical model assuming only simple visual processing of the approaching predator by the prey. Based on model predictions, we examined escape decision making in incubating Mallards (*Anas platyrhynchos*) approached by a human. The data revealed negative correlation between FID and nest vegetation concealment when the prey was approached directly. On the contrary, we did not observe any effect of vegetation concealment on FID during the tangential approach. We suggest that the proximate assumption, using the proposed model as a tool, provides sufficient explanation of the effect of vegetation cover and the directness of predator's trajectory on escape decision-making of the prey without the need to incorporate unknown consequences of FID on prey's fitness/survival.

## **Methods**

### *Model and Theory*

We assumed that the prey's escape decision-making during tangential and/or direct predator's moving pathway is triggered by the changes in geometry of its visual signal. We further assume

that this signal is caused by different visual projections of the predator. The proposed mathematical model evaluates escape decision-making for the direct and tangential predator's moving pathway depending on variability in vegetation concealment facing the moving predator. We fitted this model to experimental data regarding the differences between FIDs for the direct and tangential approach; particularly, to the relationship between vegetation concealment and FID for direct approach minus FID for tangential approach. Since identical FID-concealment relationships may originate from a variety of relationships between particular FIDs (e.g. negative correlation between FIDs difference and the vegetation concealment can result from decreasing or increasing of particular FIDs and decreasing FID-concealment relationships), we rejected the model in case that it failed to predict one or both the FID-concealment relationships, thus we parameterized the model using data on differences between particular FIDs.

The proposed model assumes that prey reacts to symmetrically magnifying predator's frontal profile ignoring its lateral drifting [10,26,42]. Hence, the cue for flee is triggered by apparent difference between frontal profile size ( $\Delta A$ ) before and after the predator moves of  $\Delta d$ , which obeys:

$$\Delta A = (1 - c)A_0 \left( \frac{1}{(d - \Delta d \cos \alpha)^2} - \frac{1}{d^2} \right) \quad (1)$$

where  $A_0$  is the actual size of the predator's frontal profile;  $c$  is nest vegetation concealment expressed as the proportion of the predator which can be seen by the prey (i.e. nest vegetation concealment from the direction of predator's approach; see below);  $d$  is distance to the prey before the predator moves to the distance  $\Delta d$  (called a 'step', see below); and  $\alpha$  is the angle between the direct pathway towards the prey and predator's trajectory (see Fig. 1 for details). The 'step'  $\Delta d$  is actually a distance passed by the moving predator between two focal points which is perceived by the prey as a risk cue. Consequently,  $\Delta d$  is rather than a step a measure of the intensity of risk cue caused by the moving predator which increases with predator's speed.

As we intuitively supposed, there is no signal to flee for the prey in case of the exclusively tangential approach ( $\alpha$  equals one,  $\cos \alpha = 0$  and  $\Delta A = 0$  in eq 1). The same prediction applies if the prey is absolutely covered by vegetation ( $c = 1$ ). On the other hand, increasing directness of the predator's approach ( $\cos \alpha$  nears the one), and decreasing vegetation concealment ( $c$  nears the zero) cause that the predator's apparent size ( $\Delta A$ ) becomes more affected by predator's speed ( $\Delta d$ ). Put in other words, the higher speed of the predator ( $\Delta d$ ) leads to more intense cue to flee ( $\Delta A$ ).

In the scheme of field experimental design (see Fig 1 for details), the angle,  $\alpha$ , varied with the type (tangential/direct) of predator's approach toward the mallard's nest. The variation depends on a minimum distance between the linear trajectory of the predator and the nest,  $d_{\min}$ , and follows:

$$\cos \alpha = \sqrt{1 - \left(\frac{d_{\min}}{d}\right)^2} \quad (2)$$

If we predict that the change in the apparent predator's profile size ( $\Delta A$ ) triggers escape response (i.e.  $\Delta A$  does not essentially vary among individuals) then the model suggests FID as a function of vegetation concealment,  $c$ , and three parameters,  $\Delta A/A_0$ ,  $\Delta d$  and  $d_{\min}$ , thus

$$FID = f_{\Delta A/A_0, \Delta d, d_{\min}}(c) \quad (3)$$

In order to take the prey's individuality into account, we included an individual specific term  $I$  to the FID ( $FID = f_{\Delta A/A_0, \Delta d, d_{\min}}(c) + I$ ). That means that some individuals react before (and some after) reaching the critical value of  $c$ . Since there is no reason for zero mean value of the individuality, the modeled FID obeys:

$$FID = f_{\Delta A/A_0, \Delta d, d_{\min}}(c) + \bar{I} \quad (4)$$

where  $\bar{I}$  is a mean value of bias in prey's individuality. The model for difference between direct and tangential FIDs then obeys:

$$\Delta FID = FID_{dir} - FID_{transv} = f_{\Delta A/A_0, \Delta d, 0}(c) - f_{\Delta A/A_0, \Delta d, 1}(c) \quad (5)$$

The reason is that models for the direct and tangential approaches differ in their  $d_{min}$  ( $d_{min} = 0$  and  $d_{min} = 1$  for direct and tangential approach, respectively) whereas the mean individuality remains constant. The eq 5 was fitted to data on differences between the FIDs, by varying randomly  $\Delta A/A_0$  and  $\Delta d$  (between 0 and 1, and  $d_{min}$  and 1, respectively) to get minimum sum of square residuals (see Fig 2). Afterwards, the parameters  $\Delta A/A_0$  and  $\Delta d$  were used to compute particular relationships between FIDs for direct and tangential approaches and vegetation concealment (eq 4; bisection method, see [43], and [http://en.wikipedia.org/wiki/Bisection\\_method](http://en.wikipedia.org/wiki/Bisection_method); see Fig 3 for result). The mean individual reaction,  $\bar{I}$ , was extracted from data about direct approach because this information missed from the data on differences between FIDs (eq 5). Since  $\bar{I}$  only shifts the two tested particular relationships without deforming them (eq 4), it does not affect the strength of the test.

### *Experiments*

#### *Ethics statement*

Field experiment was carried out with permission no. 162 (15/2/2006) issued by the Ministry of Environment, on behalf of the government of Czech Republic.

#### *Study area and model species*

Field research was carried out from April to July during 2006 and 2007 at four selected fishponds (area polygon covered 18 km<sup>2</sup>) situated in the Třeboň Biosphere Reserve (49°9' N, 14°43' E). We used Mallards, cryptically colored ground nesting dabbling duck as a model

species. The typical nesting habitat was represented by ten artificial fishpond islands (5-30 m wide, 100-300 m long) where all experimental nests were located. Vegetation on these islands mainly consisted of the common reed (*Phragmites communis*), sedge grass (*Calamagrostis epigeos*), growths of nettle (*Urtica dioica*) and bent-grass (*Carex* spp.). Field study was carried out under permission no. 162 (issued 15/2/2006 by Ministry of Environment).

### *Field procedures*

We searched for Mallards' nests by slow systematic walking which disturbed incubating hens, thus enabling us to localize the nests. We determined nest site vegetation characteristics for each nest by using a checkerboard-patterned (5 x 5 cm squares) plastic cube (20 x 20 x 20 cm) placed on a top of the nest see [38], for details. In order to obtain a nest vegetation concealment from the direction of experimental predator's approaches (see below), the percentage of squares covered with vegetation viewed at 0.5 meter away from this direction on level corresponding to female's head position was scored (hereafter called "nest vegetation concealment"). We estimated the incubation stage for each clutch by using a candler [44] to eliminate observed effect of the current reproductive stage on FID [38,45]. It enabled us to experimentally approach only nests in the same incubation stage (12-15 days). The nests found in advanced incubation stages were excluded from the experiment. In order to avoid confounding effect of nest parasitism, we excluded nests containing parasitic eggs of other species (e.g., the Tufted Duck *Aythya fuligula* and the Gadwall *Anas strepera*), moreover, we also excluded nests completely covered with vegetation (hundred percent concealment) for there is no looming stimuli to model in this case (see Model and Theory). All experimental nests (n = 17) represent a random subsample from four different study areas (see above).

### *Experimental design*

Each nest was approached directly and tangentially by the same observer (VJ) simulating the predator. All experiments were done between 10:00 and 16:00 (CET). We recorded flight initiation distance (FID) for each approach ( $\pm 10$  cm), i.e. distance from the predator (observer) to the nest at the moment when a female started to flee. Direct approach was performed by slow (0.5 m/s) walking toward the nest with predator's sight targeted to the nest position. Due to observed effect of bypass distance on FID [37], we standardized tangential approach by setting minimum perpendicular distance from the nest ( $d_{\min}$ , in Fig 1) equal to one meter and by slow (0.5 m/s) walking along the trajectory. Predator's sight was turned away from the nest position to avoid a confounding effect of predator's eye-gaze on prey's response [46]. Individual type of experimental approaches was applied in random sequence and interval between both experimental approaches to identical nest was not longer than four days, which enabled us to keep the incubation stage in the same phase during particular experimental approaches. In order to avoid the effect of starting distance (i.e. distance between predator and prey when the approach begins) on FID [47], we kept the equal starting distances during both experimental approaches to identical nests.

### **Results**

The modeled relationship (eq 5) fitted to data on difference between FIDs decreases with vegetation concealment (Fig 2). Models of particular relationships between vegetation concealment and FIDs for direct and tangential approaches showed decreasing and constant curves (Fig 3a). None of the residuals between fitted and observed FIDs showed significant bias, using standard test for correlation ( $p \approx 0.73$ ,  $p \approx 0.14$  and  $p \approx 0.55$  for direct, tangential, and difference between both of these approaches, respectively) (see Fig 3b). Since there was also no evidence for significant second order polynomial for particular approaches ( $p \approx 0.93$ ,  $p \approx 0.12$

and  $p \approx 0.29$ , respectively), we did not reject the proposed model and considered it as an appropriate proximate interpretation of escape decision-making.

Experimental data showed significant decrease for relationships between (i) vegetation concealment and difference between FIDs ( $p \approx 0.021$ ) and (ii) between the vegetation concealment and FID for direct approach ( $p \approx 0.011$ ), just as our model predicted. There were no significant relationships between the vegetation concealment and FID for tangential approach ( $p \approx 0.9$ ). Furthermore, the plot of FID for direct approach against the difference between particular FIDs (Fig 3c) showed linear relationship ( $p < 0.00001$ ) with slope of one ( $CI_{0.95} \approx \{0.68; 1.22\}$ ). Therefore, the FID for tangential approach is independent of FID for the direct approach as predicted.

## **Discussion**

The escape decision-making has long been interpreted mainly in terms of theory based on the ultimate, fitness costs/benefits balance paradigm [1,2]. The usage of mathematical models based strictly on an ultimate explanations for interpretation of the behavioral decision-making process is widely adopted by most of the behavioral ecologists [3,4,6]. This kind of approach has certain heuristic power, for example, the observed inter - and intra-specific variability in escape response to identical risk factors is widely interpreted through their multiple (i.e. additive or interactive) effects [4, 48-50]. These ultimate variables, however, cannot be measured directly and are considered as hidden or latent variables which can only be correlated with observable behavior [7]. Such limitations of the ultimate approaches are taken into account in the most recent theoretical studies which incorporate the proximate insight into the interpretation of the decision-making processes during the mate choice [51] as well as decision to flee [52].

Accordingly, with respect to the mentioned theoretical background, it is right to assume that the



proximate explanations based on strictly parameterized variables are biologically relevant and in fact more parsimonious than any ultimate considerations [53].

There are several studies confirming that individuals primarily use the information from their sensory system [8,19,54] and that visually guided animals are able to precisely distinguish between false and relevant visual signal in the environment [55,56]. Surprisingly, even though we are getting empirical evidence of the escape response being closely linked with proximate cognitive and/or physiological mechanisms [9,34,57], this fact has been mostly ignored in theoretical models that evaluated the escape decision-making [3-5]. To our knowledge, our study is first that proposes theoretical model predicting prey escape behavior based on looming stimuli and involving the environmental and predator-induced factors as model variables. Including the interactive effect of given factors affecting visual processing of an approaching predator, we show that even relatively complex pattern of escape responses under conditions where various risk factors interact, can be explained by a simple proximate mechanism.

The experimental data were consistent with the model predictions about the effect of vegetation cover and the directness of predator's approach interaction - FID increased with decreasing vegetation concealment during the direct but not during the tangential predator's approach (see Fig. 3a). These results can be interpreted with respect to the model predictions in which different contribution of the vegetation concealment to visual processing of the direct vs. the tangential predator's moving pathway is considered (eq 5; Fig. 1b).

Although previous studies have documented that FID decreased with increasing vegetation concealment and interpreted these findings in terms of the protective function of dense vegetation for the prey [36-38,49], we suggest that the degree of the vegetation cover limits the visual stimuli input [41,58], thereby affects FID. Moreover, our empirical data showed linear relationship between FIDs for the direct approach and differences between particular FIDs (see Fig. 3c). Altogether, this is in line with our model predictions that the visual stimuli

triggered by the directly moving predator are different than the stimuli triggered by the tangentially approaching one [10,26,42].

Support for our proximate insight into the escape decision-making is also provided by several studies demonstrating that variations in the escape response are driven by certain constraints such as capacity of the visual system [23,26,28,34] or responsiveness of the vision-related neurons [9,34,59]. Besides, Jabłoński and Strausfeld [60] used the looming stimuli that are incurred by bird predator to insect prey for modeling of the evolution of contrastive pattern within the bird's plumage, which seems to be crucial to foraging success in flush-pursuing birds. This fact in our opinion indicates that proximate insight per se may have predictive value for evolution of the observed ultimate consequences.

Although we provide simple explanation for the effects of environmental and predator-induced factors on FID, we note that the proximate approach may be limited in explanation of the escape response by a refuging prey or in more complex risk situations where many factors must be taken into account [61,62]. Nevertheless, in our study we show that the incorporation of proximate expectations into the theoretical models of the escape decision-making may help to reach nowadays neglected, simple, but more parsimonious and useful tool to explain within-population variations in the prey escape behavior.

### **Acknowledgements**

We thank Petr Haflant for his helpful comments on previous versions of the manuscript and reviewing English. We certify that all of the field experiments were permitted and carried out in accordance with ethical standards in Czech Republic.

## References

1. Ydenberg R, Dill L (1986) The economics of fleeing from predators. *Adv Stud Behav* 16: 229-249.
2. Lima S, Dill L (1990) Behavioral decisions made under the risk of predation - a review and prospectus. *Can J Zool* 68: 619-640.
3. Cooper W, Frederick W (2007) Optimal flight initiation distance. *J Theor Biol* 244: 59-67.
4. Cooper W, Frederick W (2010) Predator lethality, optimal escape behavior, and autotomy. *Behav Ecol* 21: 91-96
5. Broom M, Ruxton G (2005) You can run - or you can hide: optimal strategies for cryptic prey against pursuit predators. *Behav Ecol* 16: 534-540.
6. Stankowich T, Blumstein D (2005) Fear in animals: a meta-analysis and review of risk assessment. *P R Soc B* 272: 2627-2634.
7. Louâpre P, van Alphen JJM, Pierre J-S (2010) Humans and Insects Decide in Similar Ways. *PLoS ONE* 5: e14251.
8. Phelps S (2007) Sensory ecology and perceptual allocation: new prospects for neural networks. *Philos. T R Soc B.Sciences* 362: 355-367.
9. Liu R, Niu Y, Wang S (2008) Thalamic neurons in the pigeon compute distance-to-collision of an approaching surface. *Brain Behav Evol* 72: 37-47.
10. Hemmi J, Pfeil A (2010) A multi-stage anti-predator response increases information on predation risk. *J Exp Biol* 213: 1484-1489.
11. Reboresda J, Kacelnik A (1991) Risk sensitivity in starlings - variability in food amount and food delay. *Behav Ecol* 2: 301-308.
12. Kacelnik A, Bateson M (1996) Risky theories - The effects of variance on foraging decisions. *Am Zool* 36: 402-434.
13. Kacelnik A, Abreu F (1998) Risky choice and Weber's law. *J Theor Biol* 194: 289-298.

14. Hutchinson JMC, Gigerenzer G (2005) Simple heuristics and rules of thumb: Where psychologists and behavioural biologists might meet. *Behav Process* 69:97-124.
15. Feyerabend P (1988) Knowledge and the role of theories. *Philos Soc Sci* 18: 157-178.
16. Marsh B, Kacelnik A (2002) Framing effects and risky decisions in starlings. *P Natl Acad Sci USA* 99: 3352-3355.
17. Giske J, Mangel M, Jakobsen P, Huse G, Wilcox C, Strand E (2003) Explicit trade-off rules in proximate adaptive agents. *Evol Ecol Res* 5:835-865.
18. Cronin TW (2005) The role of vision in predator–prey interactions. In: Barbosa P, Castellanos I, editors. *Ecology of Predator–Prey Interactions*. New York: Oxford University Press. pp. 105-138.
19. Blackwell B, Fernandez-Juricic E, Seamans T, Dolan T (2009) Avian visual system configuration and behavioural response to object approach. *Anim Behav* 77: 673-684.
20. Guillemain M, Duncan P, Fritz H (2001) Switching to a feeding method that obstructs vision increases head-up vigilance in dabbling ducks. *J Avian Biol* 32: 345-350.
21. Guillemain M, Martin G, Fritz H (2002) Feeding methods, visual fields and vigilance in dabbling ducks (Anatidae). *Funct Ecol* 16: 522-529.
22. Tisdale V, Fernandez-Juricic E (2009) Vigilance and predator detection vary between avian species with different visual acuity and coverage. *Behav Ecol* 20: 936-945.
23. Møller A, Erritzøe J (2010) Flight Distance and Eye Size in Birds. *Ethology* 116: 458-465.
24. Dill L (1974) Escape response of zebra danio (*Brachydanio rerio*) .1. Stimulus for escape. *Anim Behav* 22: 711-722.
25. Dukas R, Kamil A (2001) Limited attention: the constraint underlying search image. *Behav Ecol* 12: 192-199.
26. Hemmi J (2005) Predator avoidance in fiddler crabs: 2. The visual cues. *Anim Behav* 69: 615-625.

27. Quinn J, Cresswell W (2005) Escape response delays in wintering redshank, *Tringa totanus*, flocks: perceptual limits and economic decisions. *Anim Behav* 69: 1285-1292.
28. Smolka J, Zeil J, Hemmi JM (2011) Natural visual cues eliciting predator avoidance in fiddler crabs. *P R Soc B*. Available: <http://rspb.royalsocietypublishing.org/content/early/2011/04/12/rspb.2010.2746.abstract>. Accessed 2011 July 5.
29. Glantz R (1974) Defense reflex and motion detector responsiveness to approaching targets - motion detector trigger to defense reflex pathway. *J Comp Physiol* 95: 297-314.
30. Nalbach H (1990) Visually elicited escape in crabs. *Adv Lif Sci*: 165-172.
31. Yamamoto K, Nakata M, Nakagawa H (2003) Input and output characteristics of collision avoidance behavior in the frog *Rana catesbeiana*. *Brain Behav Evol* 62: 201-211.
32. Preuss T, Osei-Bonsu P, Weiss S, Wang C, Faber D (2006) Neural representation of object approach in a decision-making motor circuit. *J Neurosci* 26: 3454-3464.
33. Santer R, Rind F, Stafford R, Simmons P (2006) Role of an identified looming-sensitive neuron in triggering a flying locust's escape. *J Neurophysiol* 95: 3391-3400.
34. Oliva D, Medan V, Tomsic D (2007) Escape behavior and neuronal responses to looming stimuli in the crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda : Grapsidae). *J Exp Biol* 210: 865-880.
35. Burger J, Gochfeld M (1981) Discrimination of the threat of direct versus tangential approach to the nest by incubating Herring and Great black-backed gulls. *J Comp Physiol Psych*. 95: 676-684.
36. Cuadrado M, Martin J, Lopez P (2001) Camouflage and escape decisions in the common chameleon *Chamaeleo chamaeleon*. *Biol J Linn Soc* 72: 547-554.
37. Cooper W (2003) Risk factors affecting escape behavior by the desert iguana, *Dipsosaurus dorsalis*: speed and directness of predator approach, degree of cover, direction of turning by

- a predator, and temperature. *Can J Zool* 81: 979-984.
38. Albrecht T, Klvaňa P (2004) Nest crypsis, reproductive value of a clutch and escape decisions in incubating female mallards *Anas platyrhynchos*. *Ethology* 110: 603-613.
  39. Lazarus J, Symonds M (1992) Contrasting effects of protective and obstructive cover on avian vigilance. *Anim Behav* 43: 519-521.
  40. Boyer J, Hassa L, Lurie M, Blumstein D (2006) Effect of visibility on time allocation and escape decisions in crimson rosellas. *Aust J Zool* 54: 363-367.
  41. Javůrková V, Hořák D, Kreisinger J, Klvaňa P, Albrecht T (2011) Factors Affecting Sleep/vigilance Behaviour in Incubating Mallards. *Ethology* 117: 345-355.
  42. Holmqvist MH, Srinivasan MV (1991) A visually evoked escape response of the housefly. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 169:451-459.
  43. Vitásek E (1987) *Numerické metody*. Praha SNTL: Nakladatelství technické literatury. 512 p
  44. Weller MW (1956) A simple field candler for waterfowl eggs. *J Wildlife Manage* 20: 111-113.
  45. Montgomerie RD, Weatherhead, PJ (1988) Risks and rewards of nest defence by parent birds. *Q Rev Biol* 63: 167-187.
  46. Carter J, Lyons N, Cole H, Goldsmith A (2008) Subtle cues of predation risk: starlings respond to a predator's direction of eye-gaze. *P R Soc B* 275: 1709-1715.
  47. Blumstein D (2003) Flight-initiation distance in birds is dependent on intruder starting distance. *J Wildlife Manage* 67: 852-857.
  48. Smith ME, Belk MC (2001) Risk assessment in western mosquito fish (*Gambusia affinis*): do multiple cues have additive effects. *Behav Ecol Sociobiol* 51:101–107.
  49. Cooper W, Perez-Mellado V, Baird T, Baird T, Caldwell J, et al. (2003) Effects of risk, cost,

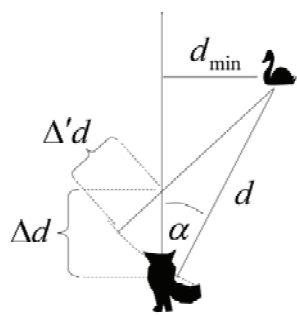
- and their interaction on optimal escape by nonrefuging Bonaire whiptail lizards, *Cnemidophorus murinus*. *Behav Ecol* 14: 288-293.
50. Cooper W (2009) Fleeing and hiding under simultaneous risks and costs. *Behav Ecol* 20: 665-671.
  51. Castellano S, Cermelli P (2011) Sampling and assessment accuracy in mate choice: A random-walk model of information processing in mating decision. *J Theor Biol* 274:161-169.
  52. Domenici P (2010) Context-dependent variability in the components of fish escape response: integrating locomotor performance and behavior. *J Exp Zool Part A* 313A: 59-79.
  53. Omlin M, Reichert P (1999) A comparison of techniques for the estimation of model prediction uncertainty. *Ecol Model* 115: 45-59.
  54. Dukas R (1998) Constraints on information processing and their effects on behaviour. In: Dukas R, editor. *Cognitive Ecology*. Chicago: University of Chicago Press. pp. 89-127.
  55. Fleishman L (1992) The influence of the sensory system and the environment on motion patterns in the visual-displays of anoline lizards and other vertebrates. *Am Nat* 139: 36-61.
  56. Fleishman L, Pallus A (2010) Motion perception and visual signal design in *Anolis* lizards. *P R Soc B* 277: 3547-3554.
  57. Paglianti A, Domenici P (2006) The effect of size on the timing of visually mediated escape behaviour in staghorn sculpin *Leptocottus armatus*. *J Fish Biol* 68: 1177-1191.
  58. Devereux C, Whittingham M, Fernandez-Juricic E, Vickery J, Krebs J (2006) Predator detection and avoidance by starlings under differing scenarios of predation risk. *Behav Ecol* 17: 303-309.
  59. Fotowat H, Gabbiani F (2007) Relationship between the phases of sensory and motor activity during a looming-evoked multistage escape behavior. *J Neurosci* 27: 10047-10059.
  60. Jablònski PG, Strausfeld NJ (2000) Exploitation of an ancient escape circuit by an avian

predator: prey sensitivity to model predator display in the field. *Brain Behav Evol* 56:94-106

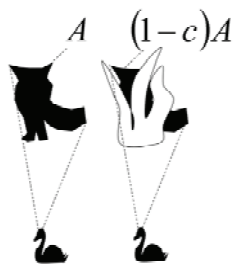
61. Stankowich T, Coss RG (2006) Effects of predator behavior and proximity on risk assessment by Columbian black-tailed deer. *Behav Ecol* 17:246-254.
62. Cooper W (2009) Fleeing and hiding under simultaneous risks and costs. *Behav Ecol* 20:665-671.



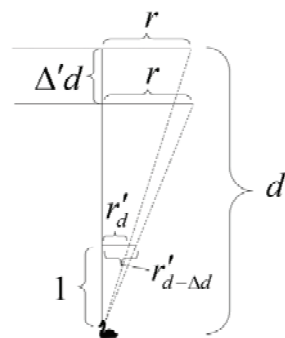
**Figure 1.** Relationships between predator's frontal profile size, predator-prey distances and what the prey can actually see. (A) If a predator, at a predator-prey distance  $d$ , moves along a trajectory that bypasses the prey at distance  $d_{\min}$ , then each step of  $\Delta d$  shifts the predator of  $\Delta'd$  ( $\cong \Delta d \cos \alpha$ ) towards the prey. In the case of direct movement,  $d_{\min} = 0$ ; hence,  $\alpha = 0$  and  $\Delta'd = \Delta d$ . (B) The prey does not see the whole predator frontal profile size ( $A$ ), but a portion  $(1-c)A$  where  $c$  corresponds to the actual vegetation concealment that covers the prey's view. Predator's frontal profile size ( $A$ ), is calculated as a product of a profile shape specific coefficient ( $\kappa$ ) and square of an effective diameter ( $r$ ) (i.e.  $A \cong \kappa r^2$ ). (C) The prey can virtually see the predator as if it was placed on a screen at distance one (see '1' in the fig). Consequently, the virtual size of the predator's frontal profile corresponds to apparent diameters  $r'_d$  and  $r'_{d-\Delta'd}$ , for the distances  $d$  (before a step) and  $d - \Delta'd$  (after the "step"), respectively. Geometrically,  $r'_d/1 = r/d$  and  $r'_{d-\Delta'd}/1 = r/(d - \Delta'd)$ ; hence, the virtual sizes of the predator's frontal profiles follow  $A'_d = \kappa r'^2_d = \kappa r^2/d^2 = A_0/d^2$ , where  $A_0$  is the actual size of the predator's frontal profile. Similarly,  $A'_{d-\Delta'd} = A_0/(d - \Delta'd) = A_0/(d - \Delta d \cos \alpha)$ . The eq 2a follows as it captures the increase in the apparent frontal profile size when stepping forward (i.e. it covers the difference  $A'_{d-\Delta'd} - A'_d$ ).



A

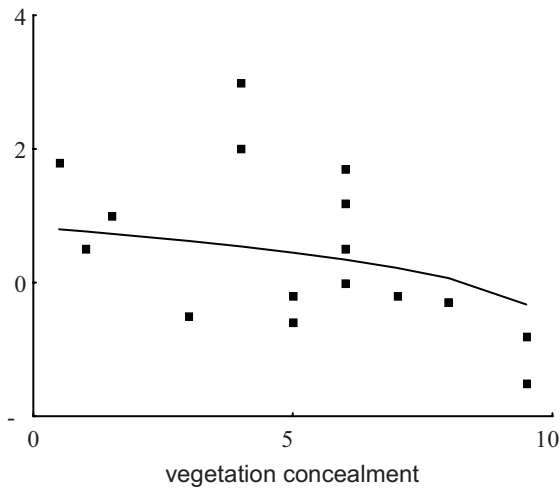


B

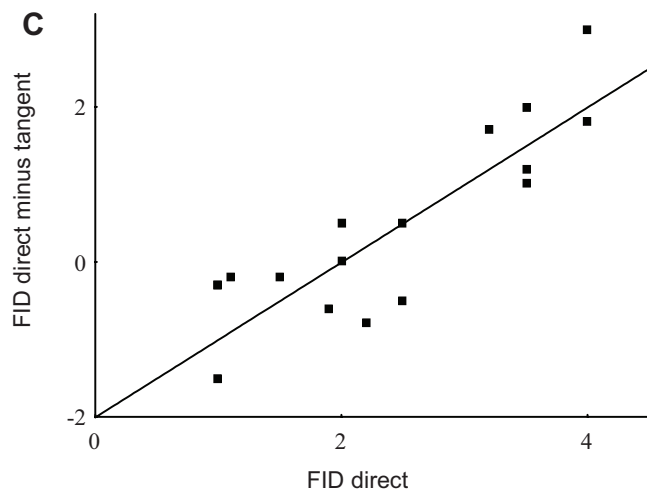
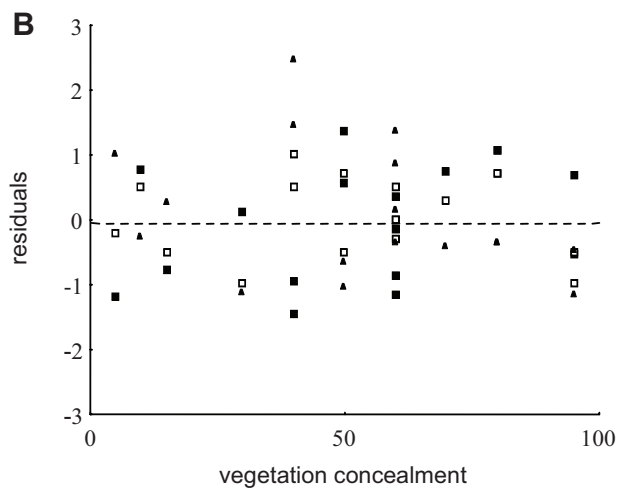
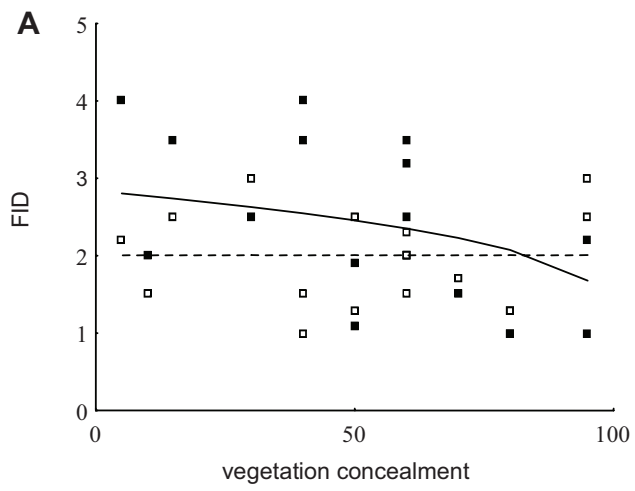


C

**Figure 2.** Observed (squares) and modeled (solid line) relationships between the nest vegetation concealment and differences between the two types of FIDs (direct minus tangential approach).



**Figure 3.** Particular relationships and their residuals: (A) FIDs/vegetation concealment relationships for the tangential (observed-empty squares, modeled-dashed line) and the direct (observed-solid squares, modeled-solid line) approaches. (B) Neither residuals between data and models for the tangential approach (empty squares) and the direct approach (solid squares), nor the direct minus the tangential approaches (triangles) show significant bias. (C) Observed (squares) and modeled (line) relationships between FID for the direct approach and difference between FIDs for the two sorts of approaches.



## **PŘÍLOHA 4**

**Do intermittent incubation and covering of clutch by nest lining feathers affect trans-shell infection in a ground nesting precocial bird?**

Veronika Javůrková <sup>1)\*</sup>, Tomáš Albrecht <sup>1)2)</sup>, Jakub Mrázek <sup>3)</sup> and Jakub Kreisinger <sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> *Department of Zoology, Biodiversity Research Group, Charles University in Prague, Viničná 7, 128 44, Praha 2, Czech Republic*

<sup>2)</sup> *Institute of Vertebrate Biology v. v. i., Academy of Sciences of the Czech Republic, Květná 8, 603 65 Brno, Czech Republic*

<sup>3)</sup> *Institute of Animal Physiology and Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, 142 20 Prague, Czech Republic*

\* Corresponding author:

e-mail: javurko1@natur.cuni.cz

phone: +0420 224911845

fax: +0420 224911841

Correspondence: Department of Zoology, Faculty of Science, Charles University in Prague,  
Viničná 7, 128 44, Praha 2, Czech Republic

## **Summary**

**1.** Microbial infection is considered to be critical source of hatching success in birds. Persistence of diverse bacteria on the eggshell may facilitate microbes to invade the egg content and interfere with developing embryo. Despite the existence of various mechanisms considered to eliminate risk of microbial infection, possible antibacterial role of intermittent incubation and clutch covering by nest lining during the egg laying period, when eggs are mostly susceptible to bacterial trans-shell infection (hereafter “BTSI”), remains unresolved.

**2.** Here we used for the first time culture-independent PCR based methods to measure quantitative and qualitative indices of BTSI of experimentally exposed fertile mallard’s eggs that were either untreated or treated by intermittent incubation, covering by nest lining, and combination of both. Hatching success of experimental eggs and offspring quality were subsequently assessed.

**3.** Data revealed that eggs originating from identical artificial nests had both similar bacterial diversity, and the probability of being infected. Neither intermittent incubation, nor clutch covering had the effect on the probability of BTSI. Similarly, none of these factors affected bacterial diversity of infected eggs.

**4.** Hatching success was twice as high in intermittently incubated eggs than in un-incubated ones but BTSI had no effect on hatchability. However, infection seemed to have effect on embryo developments, since ducklings that hatched from infected and intermittently incubated eggs had reduced weight compared to un-infected and non-incubated eggs, respectively. Contrariwise, ducklings from covered eggs were heavier in comparison to ducklings that hatched from uncovered eggs.

**5.** This study provides to our knowledge the first evidence of relationship between the BTSI, egg viability and offspring phenotype in birds by using of culture-independent methods.

## Introduction

Interaction of macroorganisms with ubiquitous bacteria is thought to be driving force that lies behind the evolution of immunity genes (Wlasiuk & Nachman 2010), regulation of population densities (Robar *et al.* 2010), or evolution of diverse life history traits (Cook *et al.* 2005a,b; Wang, Firestone & Beissinger 2011). Most recently, exposure of the clutch to the risk of microbial infection has been suggested as a crucial factor influencing egg viability and hatching success in birds (Cook *et al.* 2003, 2005b; Godard *et al.* 2007). As a result, there has evolved a wide range of physiological, morphological and behavioral traits considered to mitigate detrimental effect of microbes on hatching success. These include various mechanisms such as maternal transfer of antimicrobials into the albumen (e.g. Saino *et al.* 2002; Shawkey *et al.* 2008; D'Alba *et al.* 2010.), and optimization of clutch size (Beissinger, Cook & Arendt 2005; Cooper *et al.* 2005). However, the function of the nest characteristics (Peralta-Sanchez *et al.* 2010; Peralta-Sanchez, Møller & Soler 2011) and/or incubation pattern (Godard *et al.* 2007; Ruiz-de-Castañeda *et al.* 2011) to prevent microbially caused hatching failure remains prevailing subjects of recent studies aimed at this field.

The incubation of a clutch has been documented as a crucial mechanism reducing microbial growth on the eggshell (Cook *et al.* 2005a; Shawkey *et al.* 2009). It most likely decreases a probability of microbes to invade egg content (hereafter BTSI - bacterial trans-shell infection) (Cook *et al.* 2003,2005b; Godard *et al.* 2007). However, many bird taxa delay the onset of incubation until the last or penultimate egg is laid to avoid costs resulting from asynchronous hatching (e.g. Wiebe, Wiehn & Korpimäki 1998; Wang & Beissinger 2009). Hence, the question arises how these species eliminate the constrain of increased risk of BTSI due to extended pre-incubation period. Several alternative strategies have been proposed.



Empirical studies focused on domestic fowl documented that maintenance of eggs with periodic dozens of incubation temperatures during pre-incubation period increase hatching success (Meijerhov 1992; Fassenko et al. 2001; Reijrnik *et al.* 2009). It may coincide with short term periodic warming of uncompleted clutch by parents during egg-laying period (hereafter “intermittent incubation”) which seems to be prevailing for many of bird taxa (see Arnold 1993; Anderson 1997; Loos & Rohwer 2004). Although many hypotheses have been postulated to explain higher hatching success of intermittently incubated eggs (e.g. Wang & Beissinger 2009), several studies showed that incubation temperature (i.e.  $\sim 37^{\circ}\text{C}$ ) enhances the activity of egg-white antimicrobials (Tranter & Board 1984; Arn *et al.* 2010). Moreover, lysozymes that are only egg-white antimicrobials with bacteriolytic activity particularly against gram-positive stains (e.g. Tizard 1991; Kudo 2000) could also affect diversity of BTSI’s bacteria. However, whether intermittent incubation prevents incidence and community structure of BTSI still remains to be tested.

Covering of clutch by nest lining feathers and nest site selection represent another potential mechanism reducing the probability of trans-shell infection. Clutch covering known for many birds (Salonen & Penttinen 1988; Prokop & Trnka 2010) is usually expected to provide insulation of a clutch against unstable ambient temperatures (e.g. Pinowski *et al.* 2006; Prokop & Trnka 2010, Dawson, O’Brien & Mlynowski 2011), or to reduce the risk of clutch to be predated by visually oriented predators (Weidinger 2001, Kreisinger & Albrecht 2008). Yet, apart from these functions, feathers incorporated in the nest lining may provide barrier for BTSI resulting in increased hatching success (see Peralta-Sanchez, Møller & Soler 2011). Such mechanism is inherent in the presence of antibiotic and antimicrobial substances produced by beneficial and feather degrading bacteria (Simlot, Specht & Pfaender 1972; Soler *et al.* 2010) that are moreover able to outcompete other bacterial strains on the eggshell (Simlot, Specht & Pfaender 1972; but see Shawkey *et al.* 2009). In addition, uropygial gland waxes known for their strong bactericidal

activity (e.g. Shawkey, Pillai & Hill 2003) could improve antimicrobial properties of nest lining feathers. Despite this potential, the effect of covering of clutch by nest lining feathers on the risk and bacterial composition of BTSI has not been evaluated.

Altitudinal temperature gradient (Cook *et al.* 2003, Godard *et al.* 2007), and moisture profile of the breeding habitat (e.g. D'Alba, Oborn & Shawkey 2010) have been observed to enhance the eggshell microbial growth. Hence, the microhabitat humidity/temperature ratio influencing the eggshell water vapor conductance and condensation of liquid water on the eggshell could also affect the risk of trans-shell infection (e.g. Bruce & Drysdale 1994). In that case, clutch covering may additionally act as physical barrier against eggshell moisture thereby preventing the bacteria transmission.

Despite the growing interest in the effect of BTSI and hatching success in birds during past years, many aspects are still poorly resolved. First, there is apparent taxonomic and latitudinal bias towards the tropical and cavity-nesting species (Cook *et al.* 2003; 2005a,b), and little effort has been paid to temperate birds (but see Wang, Firestone & Beissinger 2011; Ruiz-de-Castañeda *et al.* 2011). Inasmuch as clutches in open-cup nests were observed to suffer from higher microbial load than cavity nest's ones (Godard *et al.* 2007), constraints related to the threat of BTSI for temperate open-cup nesters still remain unknown. Second, the research of complex bacterial community was generally based on direct microbial cultivations (e.g. Cook *et al.* 2005a,b), which however provided considerably biased view compared to PCR based methods (Shawkey *et al.* 2009), as only limited spectrum of environmental microbes may be lab-cultivated (see Amann, Ludwig & Schleifer 1995). Finally, most empirical evidence on the association between the rate of trans-shell infection and hatching success is derived from independent experimental subgroups (i.e. one group for assessment of BTSI and second for evaluation of hatching success) which however does not allow to evaluate a direct causality between the incidence and intensity of trans-shell infection, egg hatchability and hatchling'

phenotype. Our study attempts to overcome these methodical drawbacks by exposing semi-artificial nests containing mallard's eggs to conditions of natural breeding habitats. Our experimental design allowed to evaluate the effects of (1) intermittent incubation typical for Mallards (Loos & Rohwer 2004), and (2) covering of clutch by nest lining feathers (Caldwell & Cornwell 1975) on the probability and community structure of BTSI, egg hatchability and offspring quality. Moreover, the PCR based quantitative and qualitative analyses of BTSI using harmlessly (e.g., Finkler, Van Orman & Sotherland 1998) removed egg-white samples allowed us to directly evaluate how BTSI affects hatching success and offspring quality of particular experimental eggs. Our study is to our knowledge the first directly evaluating several functional hypotheses concerning the association between intermittent incubation and BTSI and the effect of both on egg-viability and offspring quality in open-cup ground nesting temperate zone birds.

## **Materials and methods**

### FIELD EXPERIMENT

Experimental fertile mallard's eggs ( $n = 160$ ) obtained from commercial hatchery (Rybářství Třeboň, a.s, Kachní farma Mokřiny) were within 24-h of laying measured (length and width  $\pm 0.1$  mm) and cleaned with 70% EtOH to eliminate the initial eggshell bacterial assemblage. Clutches contained four mallard's eggs in semi-artificial nests ( $n = 40$ ) were exposed under the condition of typical breeding habitat for that species in Dívčice, Doudleba, Czech Republic ( $49^{\circ}6'N, 14^{\circ}18'E$ ) during June 2010. Exposure time was 9 days which is likely to be mean length of egg-laying period in mallards observed under natural condition (e.g. Krapu *et al.* 2004).

Individual nests formed as shallow ground hollow laid out with nest-lining feathers were randomly placed in breeding habitat of Mallards. Particular eggs in each experimental nest were assorted following balanced  $2 \times 2$  design; i.e. 2 eggs were covered by nest lining material

previously gathered from active mallard's nest, 2 eggs remained uncovered, and 1 egg from each of these subgroups (i.e. covered/uncovered) was daily exposed to incubation temperature in the incubator (OvaEasy 190 Advance, Brinsea Products Inc., USA) to mimic the intermittent incubation during egg-laying period. Thus, each nest represented quaternion containing four distinct experimental groups of eggs: (1) covered-incubated (CI) ; (2) covered-unincubated (CU) ; (3) uncovered-incubated (UI); (4) uncovered-unincubated (UU).

Individual eggs from CI and UI groups were handled in sterile rubber gloves and placed into the sterile plastic boxes during daily transferring from the nest to the incubator a vice versa. To maintain identical egg turning and manipulation pattern also in non-incubated experimental eggs (i.e. from CU and UU groups), we turned them twice daily over 180<sup>0</sup>, wearing a sterile gloves. Duration of daily exposure of experimental eggs in the incubator corresponded to the observed pattern of intermittent incubation during egg-laying period in Mallard (*Anas platyrhynchos*) (see Loos & Rohwer 2004) (see Appendix A, for details). Intermittently incubated eggs were in total exposed to 45 hours of incubation at 37.6 °C and relative humidity of 60 %. Incubator was disinfected before each experimental incubation.

Nest lining material used for clutch covering and as a base material for simple experimental nests was gathered from several randomly chosen active mallard nests. We removed less than 25% of nest lining material from particular active mallard nests to avoid nest desertion and reproductive failure of breeding hen. Hence, a mixture of individually collected nest lining material was used for experimental clutch covering.

Since redundant liquid water on the eggshell was documented to enhance microbial growth (D'Alba, Oborn & Shawkey 2010), which may, moreover, facilitate trans-shell infection (Board & Tranter 1995), each clutch was sheltered by plastic transparent roof placed 10cm above the ground to protect eggs against accidental rainfall during their overall exposure. Similarly, to deter clutch predation, each experimental nest was fenced by wire mesh.

## LABORATORY PROCEDURES

### *Egg-white sampling*

To determine the occurrence of trans-shell infection, eggs were transported to the laboratory after the outdoor treatment, cleaned with 70% EtOH and egg-white samples were obtained. Since we simultaneously needed to determine hatchability of experimental eggs, eggshell on the blunt end of each egg was gently perforated with 22G (0.7x40 mm) sterile needle (Terumo) and 300  $\mu$ L of egg-white sample was removed into the 0.5 ml sterile syringe (Braun). Based on previous studies such procedure has no effect on eggs hatchability (see Finkler, Van Orman & Sotherland 1998). Egg-white samples were placed into the sterile cryo-tubes and stored at -20  $^{\circ}$ C. Needle perforation of the eggshells were glued up by gel adhesive (Super Attak, Loctite) and eggs were placed into the incubator with automatic egg turning to assess hatchability. Incubation temperature and relative humidity was held at 37.6  $^{\circ}$ C and 60 %, respectively except the eggs hatching when relative humidity was increased on 80% (e.g. Prince, Siegel & Cornwell 1969; Stubblefield & Toll 1993). Finally, weight (+- 0.1g) and tarsus length (+- 0.1mm) of hatched ducklings were recorded.

### *Bacterial DNA extraction*

Total genomic DNA from egg-white was extracted in flow box using of EliGene MTB Isolation Kit (Elisabeth Pharmacon s.r.o., CR), the highly sensitive diagnostic kit for both G + and G- bacterial strains. Briefly, egg-white samples were thawed, vortexed for 1 min and 50  $\mu$ L of egg-white was removed to the sterile plastic tube with 200  $\mu$ L of M1 kit's solution. Thereby diluting egg-white samples were centrifugated at 17 000 x g for 10 min, supernatant was removed and isolation was performed following isolation kit's protocol.

## *Molecular techniques*

### *Real-time PCR*

The occurrence of trans-shell infection was based on the targeting of 16S rRNA in DNA samples from egg-white and performed with a LightCycler system (Roche, Mannheim, Germany). The FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche) and universal primer sets including forward primer Uni331 (5' - TCCTACGGGAGGCAGCAGT - 3') and reverse primer Uni797 (5' GACTACCAGGGTATCTATCCTGTT - 3') (Nadkarni *et al.* 2002) was used for PCR amplification. The efficiency of PCR amplification was checked for various primer concentration and annealing temperatures. The optimal amplification conditions were achieved with 0.5  $\mu$ M final concentration of each primer, and the annealing temperature of 58  $^{\circ}$ C. The PCR reaction was performed in triplicates in a total volume of 10  $\mu$ L contained 5  $\mu$ L of FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche), 3  $\mu$ L of PCR H<sub>2</sub>O, 0.5  $\mu$ L of each primer in concentration 5  $\mu$ M and 1  $\mu$ L of DNA template. The reaction conditions for amplification of DNA were The amplification conditions were one cycle of 94 $^{\circ}$ C for 15 s and then 45 cycles of 94 $^{\circ}$ C for 3 s, 50 $^{\circ}$ C for 10 s, and 74 $^{\circ}$ C for 35 s at the transition speed S-9, and finally one cycle of 74 $^{\circ}$ C for 2 min and 45 $^{\circ}$ C for 2 s. To determine the specificity of amplification, analysis of product melting was performed after each amplification. The melting curve was obtained by slow heating with a 0.1 $^{\circ}$ C/s increment from 65 $^{\circ}$ C to 95 $^{\circ}$ C, with fluorescence collection at 0.1 $^{\circ}$ C intervals. Serial dilutions ( $10^{-1}$  –  $10^{-9}$ ) of purified genomic DNA from *Streptococcus bovis* were used to construct calibration curves for quantification of bacterial DNA concentration, expressed as number of bacterial cells per 1 mL of albumen.

### *PCR – DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis)*

Eubacterial DNA amplification was realized by targeting 16S rRNA gene sequences with universal bacterial primers 338GC (5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG

CCG CCG CCG CCG CAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG - 3') and RP534 (5'- ATT ACC GCG GCT GCT GG - 3'). PCR assay was performed with the following amplification program: 3 minutes of denaturation step at 94°C, 35 cycles consisting of 1 min at 94°C, 30 seconds at 55°C, 1 minute at 72°C, and the final elongation step at 72°C for 10 minutes (Muyzer *et al.* 1993). The PCR mixture contained 2 µL of DNA template, 0.5 µL of each primer (10 µM), 15 µL of ReadyMix Taq PCR Reaction Mix (Sigma-Aldrich, Germany) and 12 µL of sterile H<sub>2</sub>O. All 30 µL of PCR mixture was used in the DGGE analysis.

Products from PCR were then processed by DGGE on the DCode™ Universal Mutation Detection System (Biorad, USA) on 9% polyacrylamide gel with 35-60% denaturing gradient. The electrophoresis was realized in 7 L of 1x TAE buffer for 18 hours at 55 V and 60°C (Fischer & Lerman, 1983). Thereafter, gels were stained in 50 mL of 1x TAE with SYBR Green I dye (0.001%) for 30 minutes and visualized by UV light on Vilber Lourmat System (France).

## STATISTICS

Our data did not fulfill criterion of statistical non-independence since individual eggs were clumped into 40 quaternions (i.e. 40 nests) during the outdoor exposition. Therefore, Generalized Mixed Effect Models (GLMM) with quaternion identity treated as random intercept were used in most cases to take this source of spatial non-independence into account.

We evaluated factors underlining observed variation in (A) probability and intensity of bacterial infection, (B) probability of hatching success and (C) measures of ducklings' phenotype using GLMM framework, where following explanatory variables (i.e. intermittent incubation [yes or no], clutch covering [yes or no], and bacterial infection and their two-way interactions were considered (see Table 1-3, for particular models). Explanatory variables were treated as categorical with the exception of bacterial infection that was included both as categorical (i.e.

infected vs. uninfected egg) or as continuous variable (i.e. log of number of bacterial cells per 1mL of albumen +1). Analyses using bacterial infection as categorical and continuous variable provided quantitatively and qualitatively same results. Therefore, we present only analyses where bacterial infection was assumed as categorical variable. Factors associated with bacterial community structure were analyzed using permutation Mantel test.

Ad A: Quantitative RT-PCR data on bacterial loads were far from Poisson or normal distributions, due to high number of eggs that were not infected. Therefore, in the first step, we analyzed differences between uninfected vs. infected eggs (i.e. binary response variable) using GLMM with logit link function and binomial error structure. Further analyses were performed on the subset of infected eggs (bacterial load based on quantitative RT-PCR data  $> 1$ ;  $n = 78$ ) using GLMM with logit link function and Gaussian error structure. Log transformed data on the intensity of infection were treated as continuous response variable in this analysis.

Ad B: Hatching success was considered as a binary response variable (i.e. 0 vs. 1; unhatched vs. hatched, respectively) in GLMM assuming logit link function and binomial error structure.

Ad C: We evaluate the effect of clutch covering, intermittent incubation and incidence of bacterial infection on (A) the body weight and (B) mean tarsus length of hatched ducklings. We included egg volume computed according to Rohwers' (1988) equation as a covariate into these models.

To test the composition diversity of BTSI, DGGE data were converted to distance matrix in the first step. To test the hypothesis that samples exposed to the same treatment (i.e. clutch covering, intermittent incubation) exhibit similarities in the structure of bacterial community were used Mantel test (10000 permutations). As we failed to standardize measures of DGGE pattern from three different gels, we performed three separate Mantel tests for individual gels. The sum of permutations that exhibited stronger positive correlation compared to correlation observed



between original distance matrices divided by the total number of permutation (corresponding to 30000 for all three gels) was used to compute the overall p values of given test. Factors affecting diversity of bacterial strains observed on DGGE gels was analyzed using GLMM where the response variable correspond to the proportion of strains observed in given sample vs. the maximum number of strains observed on given gel. These models assume binomial distributions of errors and logit link function, and used nest identity nested within gel identity as random effect.

Backward elimination of the non-significant terms in the GLMM was then used to select the best minimal adequate model (MAM), i.e. the most parsimonious with all effects being significant (Crawley 2007), first eliminating non-significant interactions and subsequently non-significant main effects. The significance of a particular explanatory variable is derived from the change in deviance between the model containing this term and the reduced model. There was no hint of over-dispersion in the fitted models; thus we assumed a  $\chi^2$  distribution of difference in deviances, with degrees of freedom equal to the difference in degrees of freedom between the models with and without the term in question (Crawley 2007). The test the significance of the effect of spatial clustering of individual eggs (i.e. quaternion identity) was assessed based on the difference in AIC scores between the MAM GLMM and Generalized Liner Model (GLM) that does not include random intercept and hence not take spatial dependence of samples into account (e.g. Faraway 2006).

All analyzes were performed in Lme4 (Bates & Sarkar 2006) and ade4 (Chessel et al. 2004) statistical packages running under R 2.11.1 (R Development Core Team 2010).

## Results

### PROBABILITY AND INTENSITY OF BACTERIAL TRANS-SHELL INFECTION

Our data revealed neither intermittent incubation, nor clutch covering was significantly associated with the occurrence and intensity of trans-shell infection, respectively (Table 1, Fig. 1). Nevertheless it is worth noting that the elimination of random effect from the GLMM resulted in considerable increase of AIC ( $\Delta$  AIC = 13.4) which indicates the covariation in the probability of trans-shell infection between eggs that originated from the same nest.

### HATCHING SUCCESS

Hatching success was highly significantly affected by the effect of intermittent incubation (Table 2). Intermittently incubated eggs hatched with more than twice higher probability compared to unincubated eggs (Fig. 2). The effects of bacterial infection, as well as of other explanatory variables and their interactions were far from significance, when controlling the model for the effect of intermittent incubation (Table 2). We also did not find any direct association between the probability of hatching and the occurrence of bacterial infection (i.e. direct effect of bacterial infection without statistical control on the effect of intermittent incubation; GLMM:  $\Delta$  d.f. = 1,  $\chi^2$  = 0.001,  $p$  = 0.9718) or between partial incubation and bacterial infection (GLMM:  $\Delta$  d.f. = 1,  $\chi^2$  = 0.340,  $p$  = 0.5598). AIC of GLMM on hatching success was higher by 1.99 compared to GLM that does not take information about spatial clustering of eggs into account. This indicates that there was no significant correlation in the hatching probability of eggs that originated from the same nests.

### OFFSPRING PHENOTYPE

Our data show that body mass of hatched duckling was reduced when the egg was exposed to bacterial infection. Similarly the decrease of body mass was observed in intermittently incubated ducklings (Table 3, Fig. 3 A,B). On the other side, clutch covering during pre-incubation period resulted in the increase of body mass (Table 3, Fig. 3 A). We observed no association between these variables and mean tarsus length (Table 3, Fig. 3 B). The difference in AIC scores between the models containing information on nest identity as a random effect (i.e. GLMM) and the model without random effect was -1.47 and 7.08 in the case of body mass and tarsus length, respectively.

## BACTERIAL COMMUNITY STRUCTURE

Mantel's tests for particular DGGE gels did not reveal the effect of clutch covering (p for individual gels were: 0.9825, 0.6361, 0.1596) and intermittent incubation (p for individual gels were 0.3311, 0.8210, 0.8937) on the diversity of bacterial strains isolated from egg content (Table 4). On the other side, based on Mantel's test, composition of bacterial strains that were detected on DGGE gel tended to be more similar than expected by chance in eggs originating from the same nest (p values were highly significant for 2 gels out of three:  $p = 0.0003$ ,  $p = 0.0018$  and  $p = 0.4389$ , respectively). We did not reveal any association between the bacterial taxonomic diversity based on DGGE data and the interactive or the main effect of intermittent incubation and clutch covering (Table 4).

## Discussion

Wide ranges of adaptations enhancing hatching success are considered to be favored by natural selection (Stenning 1996; Lambrechts *et al.* 2000). Nest attendance during egg-laying (also called "intermittent incubation") known for many birds (Wang & Beissinger 2009) including waterfowl (Loos & Rohwer 2004) may have underlying consequences on reproduction success

of birds that delayed incubation until penultimate egg (Wiebe, Wiehn & Korpimäki 1998). This behavior may be beneficial in sense of reduced probability of nest predation (Kreisinger & Albrecht 2008; Cervencik et al. 2011), or brood parasitism (Kendra, Roth & Tallamy 1988) by decreasing of period when clutch remains unattended during egg-laying. Similarly, nonstructural nest lining that is used for clutch covering during incubation recesses in many bird species (Götmark & Ahlund 1984; Salonen & Penttinen 1988) has been proposed to increase nesting success due to its cryptic role (e.g. Kreisinger & Albrecht 2008) or due to thermo insulation function (Prokop & Trnka 2010, Dawson, O'Brien & Mlynowski 2011). Incubation of clutch could also improve hatching success due to the reduction of the growth of eggshell bacteria (Beissinger, Cook Arendt 2005; Cook *et al.* 2005a; Shawkey *et al.* 2009, but see Wang, Firestone & Beissinger 2011) and feathers included in nest lining has been shown to increase hatching success (Peralta-Sanchez *et al.* 2010; Peralta-Sanchez, Møller & Soler 2011) possible due to its antimicrobial properties related to presence of beneficial bacteria (see Soler *et al.* 2010) or preen gland substances (). In this study, we have experimentally demonstrated that although the intermittent incubation and clutch covering by nest lining had no effect on incidence, and community structure of BTSI, intermittent incubation affected hatching success, and it along with BTSI and clutch covering had the effect on body mass of newly hatched Mallard ducklings. Hence, to our knowledge we as a first directly measured the effect of mechanisms considered to affect BTSI and hatching success and evaluated causality between BTSI, hatching success and offspring phenotype.

### *INTERMITTENT INCUBATION*

Previous experiments performed mostly under artificial on poultry have suggested that intermittent incubation during egg storage period improve hatching success (Meijerhov 1992; Fassenko et al. 2007). In line with these results we found that UI and CI eggs hatched with more

than twice higher probability compared to UU and CU eggs (Fig. 2). This is a reasonable difference compared to 5-7% increase of hatching success in eggs under intermittent incubation treatment in previous studies (Reijrnik *et al.* 2009; Fasenکو *et al.* 2001a,b), however, it could be explained by differences in overall duration of intermittent incubation treatment in our and these studies (45 vs. 6 h, respectively).

We also found that ducklings hatched from intermittently incubated eggs had decreased body mass than un-incubated ones. Intermittent incubation was observed to enhance development of embryo (Fasenکو 2007) and level of developmental stage depends on the amount of exposition to incubation temperatures (Fasenکو 2001a,b; Reijrnik 2009). Consequently we hypothesize that the body mass decrease of intermittently incubated ducklings were caused by increased metabolic rates which was observed to reduce the internal yolk reserves (Boonstra, Clark & Reed 2010).

Intermittent incubation reduces the growth of eggshell bacteria (Beissinger, Cook Arendt 2005; Cook *et al.* 2005a; Shawkey *et al.* 2009, but see Wang, Firestone & Beissinger 2011), possibly via reduction of liquid water on the eggshell (D'Alba, Oborn & Shawkey 2010), an essential substrate enhancing bacterial growth and subsequently the risk of BTSI (Bruce & Drysdale 1991,1994). Alternatively, egg content might be protected against BTSI by egg-white antimicrobials, whose activity is the highest in temperatures that are reached during the clutch incubation (Board & Fuller 1974; Rehault-Godbert *et al.* 2010). Both mechanisms may lead to higher egg hatchability and offspring quality. However, we found no evidence for the effect of intermittent incubation on the incidence or community structure of BTSI in Mallards. The effect of intermittent incubation on maintenance of egg-viability (i.e. hatchability) and offspring body mass is thus mediated via mechanisms independent of BTSI in Mallards and is more probably inherent in developmental temperature-dependent advantage for embryo (e.g., Fasenکو 2007, Reijrnik 2009; Wang & Beissinger 2009).

### *CLUTCH COVERING*

Many bird species use feathers as a nest lining material (). Incorporation of feathers into the nest may have considerable thermo-isolation function (e.g., Hilton *et al.* 2004; Dawson, O'Brien & Mlynowski 2011). Apart from this thermoregulation potential, feathers included in nest lining has been shown to increase hatching success possibly due to its antimicrobial properties related to presence of preen gland substances and/or beneficial bacteria (see Shawkey, Pillai & Hill 2003; Soler *et al.* 2010). However, in contrast to previous studies that evaluated role of composition and amount of nest lining feathers in reproduction success (Peralta-Sanchez *et al.* 2010; Peralta-Sanchez, Møller & Soler 2011), we did not support the beneficial role of clutch covering either on hatching success, or the probability, intensity and diversity of BTSI. We tested the effect of clutch covering in a waterfowl species with generous preen gland (Giraudeau *et al.* 2010), and which uses down feathers from its body as a prevailing nest lining material (Caldwell & Cornwell 1975). Hence, nest lining of waterfowl including feathers that are well-treated by uropygial substances should have strong antimicrobial potential. Therefore our results are with respect to this specificity unexpected.

On the other side, independent of BTSI, body mass of duckling originating from eggs that were covered by nest lining during the pre-incubation period was higher compared to uncovered eggs. This provides evidence that clutch covering by nest material during pre-incubation period may maintain temperatures under physiological zero (or cold torpor) preventing development of embryo (Decuyper & Michels 1992; Ewert 1992). It could therefore reduce the metabolic rate of covered ducklings before hatching, resulting in elevated yolk sac reserves (Boonstra, Clark & Reed 2010).

## *THE EFFECT OF BSTI ON FITNESS*

The risk of BTSI has been recently proposed to be a crucial factor influencing evolution of reproductive strategies in birds by its pronounced effect on hatching success (Cook *et al.* 2003, 2005a,b, Godard *et al.* 2007; Wang & Beissinger 2009). Most studies providing evidence for evolutionary significance of BTSI (i.e. direct effect of BTSI on fitness) have been performed in tropical regions, where pathogens are in general evolutionary force of high significance (Guernire *et al.* 2004, Bell *et al.* 2006; Robar *et al.* 2010). Yet, little is known about the role of BTSI in temperate regions (but see Godard *et al.* 2007; Ruiz-de-Castañeda *et al.* 2011; Wang, Firestone & Beissinger 2011). Despite the high incidence of BTSI (57% of eggs were infected) in our study, we did not find any direct evidence for the effect of BTSI on hatching success in temperate zone breeding Mallard. Our study thus corroborates recent findings (Ruiz-de-Castañeda *et al.* 2011; Wang, Firestone & Beissinger 2011) suggesting lower effect of BTSI on hatching success in temperate compared to tropical birds (see also Cook *et al.* 2003, 2005a). However, our methodical approach based on nondestructive sampling allowed us to analyze not only effect of BSTI on hatching success, but also direct effect of BTSI on the offspring phenotype. We found that BTSI had detrimental effect on body mass of ducklings (2.35g mean decrease of body weight compared to un-infected eggs), but no effect on structural size (measured as tarsus length). Body mass of hatchling in general corresponds with the weight of yolk sack (Bolton 1991; Dawson & Clark 1996) and correlates positively with early survival of hatchling in many waterfowl species including mallard (Arnold *et al.* 1995; Blomqvist *et al.* 1997; Fondel *et al.* 2008). Hence we conclude that BTSI may have biologically important yet non-lethal effect on phenotype during embryogenesis and that the hatching success might be insufficiently rough measure of the fitness effect of BTSI at least in some species.

## Conclusion

. In this study we provide no evidence for the role intermittent incubation and clutch covering on BSTI, yet our findings support the “egg-viability hypothesis” (*sensu* Arnold, Rohwer & Armstrong 1987) postulating that the onset of intermittent incubation during egg-laying represents a mechanism maintaining egg-viability particularly in species where laying large clutches exposes the eggs to ambient conditions (see also Wang & Beissinger 2009; Loos & Rohwer 2004). We have also demonstrated the effect of clutch covering by nest lining and intermittent incubation on offspring body mass. We argued that it is probably due to their role on development of embryo which determines changes in metabolic rates causing differential utilization of internal yolk reserves (Boonstra, Clark & Reed 2010).

However, independent to clutch covering and intermittent incubation we found the effect of BSTI on offspring quality. Our findings thus indicate that neither clutch covering, nor intermittent incubation in mallards evolved as a direct response to BSTI. Yet BSTI itself had detrimental effect on offspring quality expressed as offspring body mass in this ground-nesting precocial bird. Hence, based on our results we assume that direct evaluation of the effect of BSTI on offspring phenotype in future studies is needed for better understand of the causality between microbial load and reproductive success in birds.

## References

- Amann, R., Ludwig, W. & Schleifer, K. (1995) Phylogenetic Identification and in Situ Detection of Individual Microbial Cells Without Cultivation. *Microbiol. Rev.*, **59**, 143-169.
- Arnold, T.W., Rohwer, F.C. & Armstrong, T. (1987) Egg Viability, Nest Predation, and the Adaptive Significance of Clutch Size in Prairie Ducks. *The American Naturalist*, **130**, 643-653.



- Arnold, T.W. (1993) Factors Affecting Egg Viability and Incubation Time in Prairie Dabbling Ducks. *Canadian Journal of Zoology*, **71**, 1146-1152.
- Arnold, T.W., Anderson, M.G., Emery, R.B., Sorenson, M.D. & Sobrino, C.N. de. (1995b) The Effects of Late-Incubation Body Mass on Reproductive Success and Survival of Canvasbacks and Redheads. *The Condor*, **97**, 953-962.
- Blomqvist, D., Johansson, O.C. & Göttmark, F. (1997) Parental Quality and Egg Size Affect Chick Survival in a Precocial Bird, the Lapwing *Vanellus Vanellus*. *Oecologia*, **110**, 18-24.
- Bolton, M. (1991) Determinants of Chick Survival in the Lesser Black-Backed Gull: Relative Contributions of Egg Size and Parental Quality. *Journal of Animal Ecology*, **60**, 949-960.
- Boonstra, T.A., Clark, M.E. & Reed, W.L. (2010) Position in the Sequence of Laying, Embryonic Metabolic Rate, and Consequences for Hatching Synchrony and Offspring Survival in Canada Geese. *The Condor*, **112**, 304-313.
- Bruce J, Drysdale EM (1991) Egg hygiene: routes of infection. In: Tullett SG (ed) Avian incubation. Butterworth Heinemann, Northampton, pp 257-276
- Bruce J, Drysdale EM (1994) Trans-shell transmission. In: Board RG Fuller R (ed) Microbiology of the avian egg. Chapman and Hall, London, pp 63-91
- Caldwell, P.J. & Cornwell, G.W. (1975) Incubation Behavior and Temperatures of the Mallard Duck. *The Auk*, **92**, 706-731.
- Cervencl, A., Esser, W., Maier, M., Oberdiek, N., Thyen, S., Wellbrock, A. & Exo, K.-M. (2011). Can Differences in Incubation Patterns of Common Redshanks *Tringa Totanus* Be Explained by Variations in Predation Risk? *Journal of Ornithology*.

- Clark, R.G. & Dawson, R.D. (1996) Effects of Variation in Egg Size and Hatching Date on Survival of Lesser Scaup *Aythya Affinis* Ducklings. *Ibis*, **138**, 693-699.
- Cook, M.I., Beissinger, S.R., Toranzos, G.A. & Arendt, W.J. (2005a) Incubation Reduces Microbial Growth on Eggshells and the Opportunity for Trans-shell Infection. *Ecology Letters*, **8**, 532-537.
- Cook, M., Beissinger, S., Toranzos, G., Rodriguez, R. & Arendt, W. (2005b) Microbial Infection Affects Egg Viability and Incubation Behavior in a Tropical Passerine. *BEHAVIORAL ECOLOGY*, **16**, 30-36.
- Cook, M.I., Beissinger, S.R., Toranzos, G.A., Rodriguez, R.A. & Arendt, W.J. (2003) Trans-shell Infection by Pathogenic Micro-organisms Reduces the Shelf Life of Non-incubated Bird's Eggs: A Constraint on the Onset of Incubation? *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, **270**, 2233-2240.
- D'Alba, L., Oborn, A. & Shawkey, M.D. (2010) Experimental Evidence That Keeping Eggs Dry Is a Mechanism for the Antimicrobial Effects of Avian Incubation. *Die Naturwissenschaften*, **97**, 1089-1095.
- Dawson, R.D., O'Brien, E.L. & Mlynowski, T.J. (2011) The Price of Insulation: Costs and Benefits of Feather Delivery to Nests for Male Tree Swallows *Tachycineta Bicolor*. *Journal of Avian Biology*, **42**, 93-102.
- Decuypere, E. & Michels, H. (1992) Incubation Temperature as a Management Tool: A Review. *World's Poultry Science Journal*, **48**, 28-38.
- Fasenko, G.M., Christensen, V.L., Wineland, M.J. & Petite, J.N. (2001a) Examining the Effects of Prestorage Incubation of Turkey Breeder Eggs on Embryonic Development and

- Hatchability of Eggs Stored for Four or Fourteen Days. *Poultry Science*, **80**, 132-138.
- Fasenko, G.M. (2007a) Egg Storage and the Embryo. *Poult Sci*, **86**, 1020-1024.
- Fasenko, G., Robinson, F., Whelan, A., Kremeniuk, K. & Walker, J. (2001b) Prestorage Incubation of Long-term Stored Broiler Breeder Eggs: 1. Effects on Hatchability. *Poult Sci*, **80**, 1406-1411.
- Fasenko, G.M. (2007b) Egg Storage and the Embryo. *Poult Sci*, **86**, 1020-1024.
- Fischer S.G. & Lerman L.S. 1983: DNA Fragments Diering by Single Base-pair Substitutions Are Separated in Denaturing Gradient Gels: Correspondence With Melting Theory. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **80**: 1579–1583.
- Giraudeau, M., Czirják, G.Á., Duval, C., Bretagnolle, V., Eraud, C., McGraw, K.J. & Heeb, P. (2010) Effect of Restricted Preen-Gland Access on Maternal Self Maintenance and Reproductive Investment in Mallards. *PLoS ONE*, **5**, e13555.
- Godard, R.D., Morgan Wilson, C., Frick, J.W., Siegel, P.B. & Bowers, B.B. (2007) The Effects of Exposure and Microbes on Hatchability of Eggs in Open-cup and Cavity Nests. *Journal of Avian Biology*, **38**, 709-716.
- Götmark, F. & Ahlund, M. (1984) Do field observers attract nest predators and influence nesting success of common eiders? *Journal of Wildlife Management*, **48**, 381–387.
- Hilton, G.M., Hansell, M.H., Ruxton, G.D., Reid, J.M. & Monaghan, P. (2004) Using Artificial Nests to Test Importance of Nesting Material and Nest Shelter for Incubation Energetics. *The Auk*, **121**, 777-787.
- Kreisinger, J. & Albrecht, T. (2008) Nest Protection in Mallards *Anas Platyrhynchos*:

- Untangling the Role of Crypsis and Parental Behaviour. *Functional Ecology*, **22**, 872-879.
- Lambrechts, M.M., Prieur, B., Caizergues, A., Dehorter, O., Galan, M.J. & Perret, P. (2000b) Risk-taking Restraints in a Bird with Reduced Egg-hatching Success. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, **267**, 333-338.
- Loos, E.R. & Rohwer, F.C. (2004) Laying-Stage Nest Attendance and Onset of Incubation in Prairie Nesting Ducks. *The Auk*, **121**, 587-599.
- .Maidak B.L., Larsen N., McCaughey M.J., Overbeek R., Olsen G.J., Fogel K., Blandy J. & Woese C.R. 1994: The Ribosomal Database Project. *Nucleic Acids Research* **22**(17): 3485–3487.
- Muyzer G., Dewaal E.C. & Uitterlinden A.G. 1993: Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding For 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* **59**(3): 695–700.
- Peralta-Sanchez, J.M., Martin-Platero, A.M., Soler, J.J. & Møller, A.P (2010) Number and Colour Composition of Nest Lining Feathers Predict Eggshell Bacterial Community in
- Peralta-Sanchez, J.M., Møller, A.P. & Soler, J.J. (2011) Colour Composition of Nest Lining Feathers Affects Hatching Success of Barn Swallows, *Hirundo Rustica* (Passeriformes: Hirundinidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, **102**, 67-74.
- Pinowski, J., Haman, A., Jerzak, L., Pinowska, B., Barkowska, M., Grodzki, A. & Haman, K. (2006) The Thermal Properties of Some Nests of the Eurasian Tree Sparrow *Passer Montanus*. *Journal of Thermal Biology*, **31**, 573-581.

- Prince, H.H., Siegel, P.B. & Cornwell, G.W. (1969) Incubation Environment and the Development of Mallard Embryos. *The Journal of Wildlife Management*, **33**, 589-595.
- Prokop, P. & Trnka, A. (2010) Why Do Grebes Cover Their Nests? Laboratory and Field Tests of Two Alternative Hypotheses. *Journal of Ethology*, **29**, 17-22.
- Rehault-Godbert, S., Baron, F., Mignon-Grasteau, S., Labas, V., Gautier, M., Hincke, M.T. & Nys, Y. (2010) Effect of Temperature and Time of Storage on Protein Stability and Anti-Salmonella Activity of Egg White. *Journal of Food Protection*<sup>®</sup>, **73**, 1604-1612.
- Reijrink, I.A.M., Meijerhof, R., Kemp, B., Graat, E.A.M. & van den Brand, H. (2009a) Influence of Prestorage Incubation on Embryonic Development, Hatchability, and Chick Quality. *Poultry Science*, **88**, 2649-2660.
- Ricklefs, R.E. & Wikelski, M. (2002) The Physiology/life-history Nexus. *Trends in Ecology & Evolution*, **17**, 462-468.
- Robar, N., Burness, G. & Murray, D.L. (2010) Tropics, Trophics and Taxonomy: The Determinants of Parasite-associated Host Mortality. *Oikos*, **119**, 1273-1280.
- Rohwer, F.C. (1988) Inter- and Intraspecific Relationships Between Egg Size and Clutch Size in Waterfowl. *The Auk*, **105**, 161-176.
- Ruiz-de-Castañeda, R., Vela, A.I., Lobato, E., Briones, V. & Moreno, J. (2011) Bacterial Loads on Eggshells of the Pied Flycatcher: Environmental and Maternal Factors. *The Condor*, **113**, 200-208.
- Salonen, V. & Penttinen, A. (1988) Factors affecting nest predation in the great crested grebe – Field observations, experiments and their statistical analysis. *Ornis Fennica*, **65**, 13–20.

- Schamber, J.L., Esler, D. & Flint, P.L. (2009) Evaluating the Validity of Using Unverified Indices of Body Condition. *Journal of Avian Biology*, **40**, 49-56.
- Shawkey, M.D., Pillai, S.R. & Hill, G.E. (2003) Chemical Warfare? Effects of Uropygial Oil on Feather-degrading Bacteria. *Journal of Avian Biology*, **34**, 345-349.
- Stenning, M.J. (1996) Hatching Asynchrony, Brood Reduction and Other Rapidly Reproducing Hypotheses. *Trends in Ecology & Evolution*, **11**, 243-246.
- Shawkey, M.D., Firestone, M.K., Brodie, E.L. & Beissinger, S.R. (2009) Avian Incubation Inhibits Growth and Diversification of Bacterial Assemblages on Eggs (ed RL Earley). *PLoS ONE*, **4**, e4522.
- Soler, J.J., Martín-Vivaldi, M., Ruiz-Rodríguez, M., Valdivia, E., Martín-Platero, A.M., Martínez-Bueno, M., Peralta-Sánchez, J.M. & Méndez, M. (2008) Symbiotic Association Between Hoopoes and Antibiotic-producing Bacteria That Live in Their Uropygial Gland. *Functional Ecology*, **22**, 864-871.
- Stoleson, S.H. & Beissinger, S.R. (1999b) Egg Viability as a Constraint on Hatching Synchrony at High Ambient Temperatures. *Journal of Animal Ecology*, **68**, 951-962.
- Stubblefield, W.A. & Toll, P.A. (1993a) Effects of Incubation Temperature and Warm-water Misting on Hatching Success in Artificially Incubated Mallard Duck Eggs. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **12**, 695-700.
- Tranter, H.S. & Board, R.G. (1984) The Influence of Incubation Temperature and pH on the Antimicrobial Properties of Hen Egg Albumen. *The Journal of Applied Bacteriology*, **56**, 53-61.

- Wang, J.M. & Beissinger, S.R. (2009) Variation in the Onset of Incubation and Its Influence on Avian Hatching Success and Asynchrony. *Animal Behaviour*, **78**, 601-613.
- Wang, J.M., Firestone, M.K. & Beissinger, S.R. (2011) Microbial and Environmental Effects on Avian Egg Viability: Do Tropical Mechanisms Act in a Temperate Environment? *Ecology*, **92**, 1137-1145.
- Wiebe, Wiehn & Korpimäki. (1998) The Onset of Incubation in Birds: Can Females Control Hatching Patterns? *Animal Behaviour*, **55**, 1043-1052.
- Wlasiuk, G. & Nachman, M.W. (2010) Adaptation and Constraint at Toll-Like Receptors in Primates. *Molecular Biology and Evolution*, **27**, 2172 -2186.

**Table 1.** GLMM fitting results for quantitative data on bacterial infection. Bacterial infection was treated as binary response in the first step (A: Categorical; i.e. eggs considered as infected or uninfected based on RT-PCR). Further set of models (B: Continuous) was performed only on the subset of eggs confirmed as infected. Log transformed number of bacterial cells per 1mL of albumen was used as continuous explanatory variable. Backward eliminations of non-significant terms were used to select the best minimal adequate model (MAM). Significant factors included in the MAM are in boldface

Response = bacterial infection	A: categorical			B: continuous	
	$\Delta$ d.f	$\chi^2$	p	$\chi^2$	p
clutch covering	1	1.28	0.2581	0.11	0.7448
Intermittent incubation	1	0.53	0.4655	3.08	0.0792
clutch covering:intermit. incubation	1	1.64	0.1997	0.01	0.9265

**Table 2.** GLMM fitting results for the probability of hatching success. Hatching success was treated as a response variable. Backward eliminations of non-significant terms were used to select the best minimal adequate model (MAM). Significant factors included in the MAM are in boldface.

Response = hatching success	$\Delta$ d.f.	$\chi^2$	p
clutch covering	1	1.571	0.2101
<b>intermittent incubation</b>	<b>1</b>	<b>9.0558</b>	<b>0.002619</b>
bacterial infection	1	0.046	0.8303
clutch covering×intermit. incubation	1	1.5764	0.2093
clutch covering×bacterial infection	1	0.8896	0.3456
partial incubation×bacterial infection	1	1.1796	0.2774



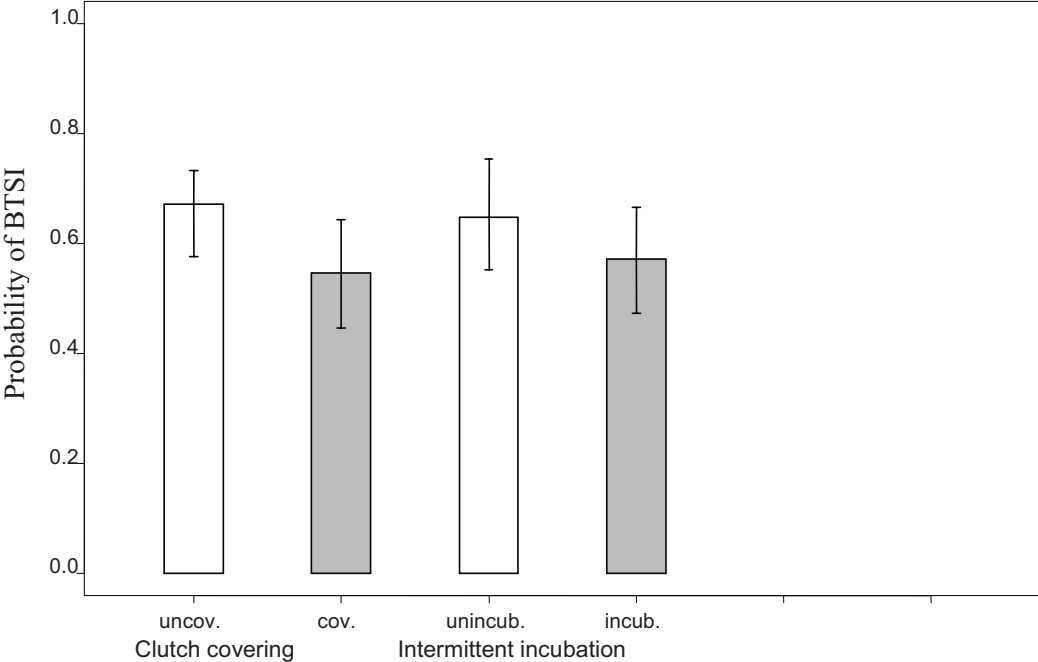
**Table 3.** GLMM fitting results for the offspring phenotype expressed as A) Body mass  
 B) Tarsus length. Backward eliminations of non-significant terms were used to select the best minimal adequate model (MAM). Significant factors included in the MAM are in boldface

Response = phenotype	A) Body mass		b) Tarsus length		
	d.f	$\chi^2$	p	$\chi^2$	p
egg volume	1	<b>45.48</b>	<b>0.0000</b>	<b>9.10</b>	<b>0.0026</b>
clutch covering	1	<b>5.66</b>	<b>0.0173</b>	0.86	0.3534
partial incubation	1	<b>14.13</b>	<b>0.0002</b>	2.59	0.1077
bacterial infection	1	<b>7.35</b>	<b>0.0067</b>	0.14	0.7087

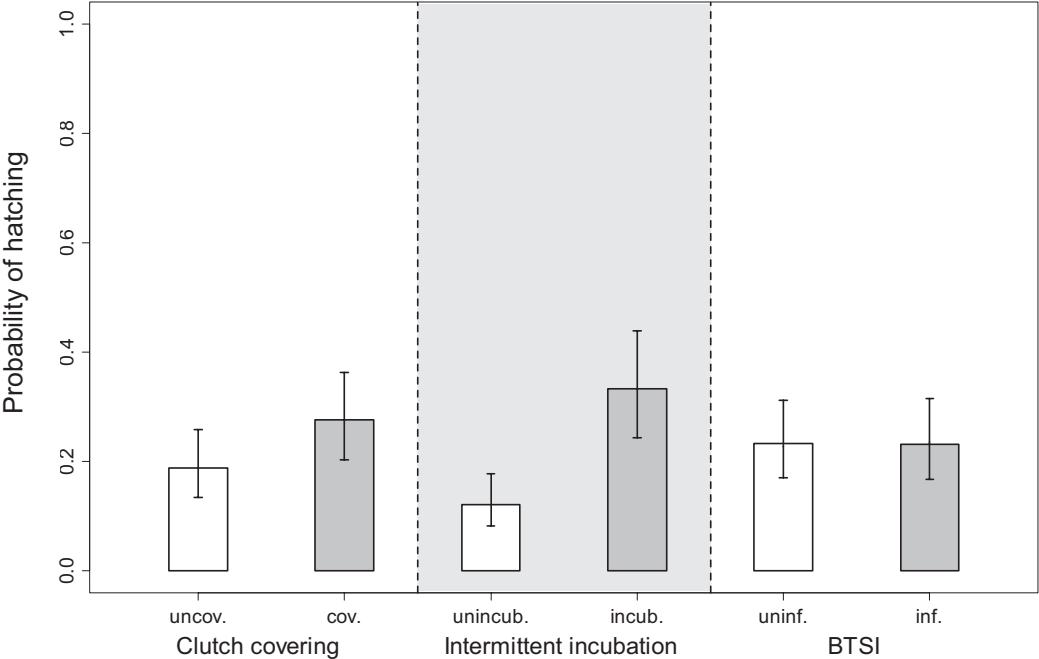
**Table 4.** GLMM fitting results for indices of bacterial community structure detected in egg content based on DGGE data. Backward eliminations of non-significant terms were used to select the best minimal adequate model (MAM). Significant factors included in the MAM are in boldface

Response = community structure	$\Delta$ d.f	$\chi^2$	p
clutch cover	1	0.04	0.8395
partial incubation	1	0.62	0.4312
clutch cover:partial incubation	1	0.51	0.4758

**Figure 1.** The effect of clutch covering and intermittent incubation on the probability of BTSI (bacterial trans-shell infection). Estimates based on GLMM. Error bars correspond to least significant difference. Significant effect indicated by grey background.

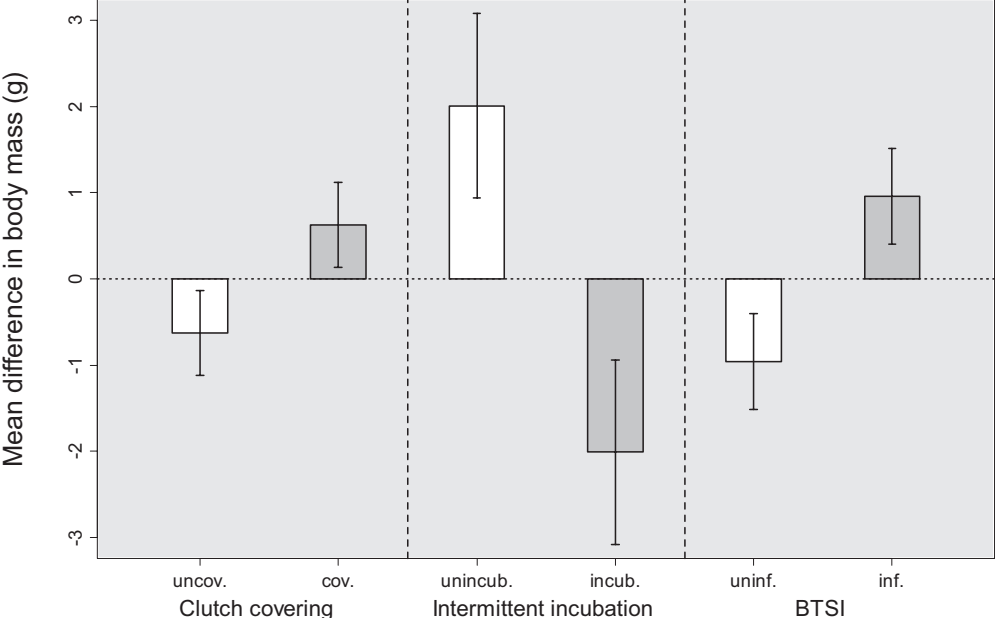


**Figure 2:** The effect of BTSI (bacterial trans-shell infection), clutch covering and intermittent incubation on the probability of hatching. Estimates based on GLMM. Error bars correspond to least significant difference. Significant effect indicated by grey background.

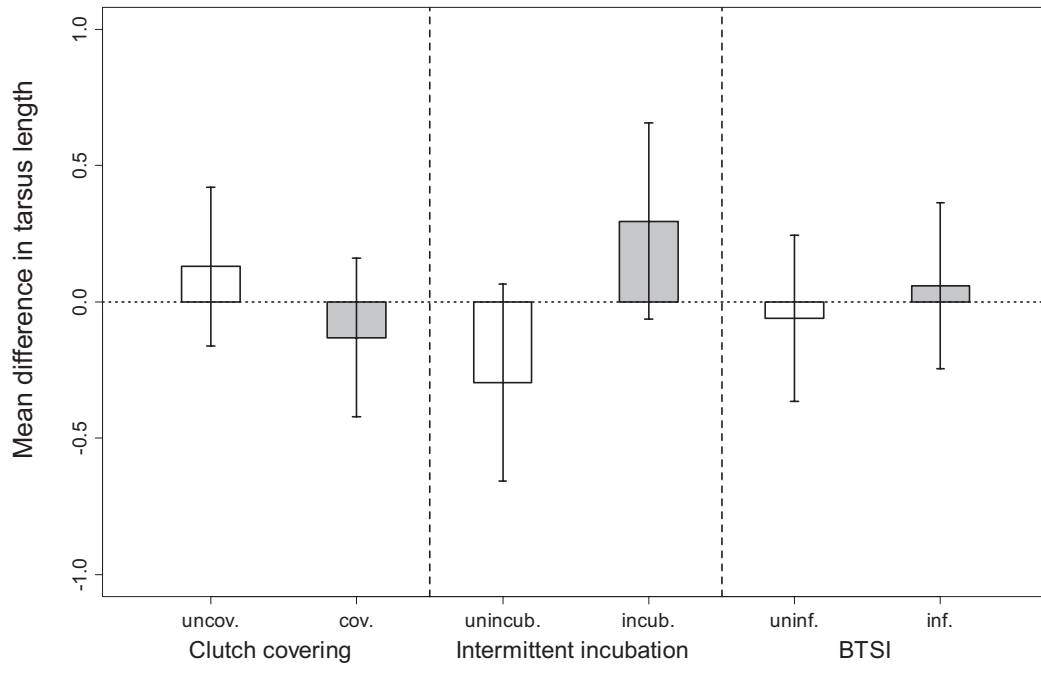


**Figure 3:** The effect of BTSI (bacterial trans-shell infection), clutch covering and intermittent incubation on (A) body mass in (g) and (B) mean tarsus length (mm). Mean difference between two factor level for given explanatory variable are plotted. Estimates based on GLMM after statistical control for egg volume. Error bars correspond to least significant difference. Significant effect indicated by grey background.

A)



B)



## Appendix A

Duration of daily (1-9) exposition of CI (covered-incubated) UI (uncovered-incubated) eggs in artificial incubator

Exposition day	Duration (hours) of incubation in incubator
1	3
2	3
3	3.5
4	3.5
5	4.5
6	5
7	6
8	7
9	8