

**FYZIOLOGIE METABOLISMU  
KAROTENOIDŮ A JEJÍ VLIV NA  
ORNAMENTÁLNÍ SIGNALISACI ŽIVOČICHŮ**

**Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra zoologie**



**Bakalářská práce**

**Barbora Gabrielová**

**Laboratoř pro výzkum biodiverzity, Praha 2009**

Školitel: Mgr. Tomáš Albrecht, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Michal Vinkler

# **OBSAH:**

Úvod	4
1. Popis karotenoidů	5
1.1. Klasifikace	5
1.2. Struktura	6
2. Fyziologie karotenoidů v těle a čestnost signalizace	10
2.1. Cesta příjmu	10
2.2. Karotenoidy v ornamentech	14
2.2.1. Kde se karotenoidy metabolizují?	17
2.2.2. Karotenoidy, testosteron, cholesterol	18
2.2.3. Signalizace založená na ornamentech pigmentovaných karotenoidy	19
2.2.3.1. Hypotéza antioxidační funkce karotenoidů	21
2.2.3.2. Oxidation handicap hypothesis	22
2.2.3.3. Mají ale karotenoidy antioxidační funkci?	22
2.2.3.4. Alternativní hypotéza funkce karotenoidů	23
3. Karotenoidy a pohlavní výběr	26
3.1. Vliv barvy ornamentu na výběr partnera	26
3.2. Vliv velikosti, či symetrie ornamentu na výběr partnera	28
3.3. Výhody pro samici při výběru na základě ornamentu	29
3.3.1. Přímé výhody	29
3.3.2. Nepřímé výhody	29
Závěr	31
Literatura	32

## **ABSTRAKT**

Předmětem této bakalářské práce je význam a využití karotenoidů v signální ornamentaci především u ptáků. Karotenoidy zastávají několik významných funkcí v těle, přičemž čestnost signální role ornamentů založených na karotenoidních barvivech, byla tradičně přisuzována antioxidační funkci karotenoidů. V poslední době se však objevují názory, že příjem nadměrného množství karotenoidů pro vytvoření nejbarevnějšího ornamentu může organismu spíše uškodit. Deposice karotenoidů do ornamentu není ovládána jen příjmem z potravy, ale i fyziologickými faktory uvnitř organismu. Důležité je, že za neoptimálních podmínek vnitřního prostředí organismu (zvýšený oxidativní stres), tak mohou karotenoidy vytvářet nebarevné deriváty, které jsou velmi reaktivní a pro organismus toxické, karotenoidní barviva v těle pak mohou fungovat jako klasický handicap a signalizovat stav organismu. Cílem této práce je shrnout poznatky o fyziologických funkcích karotenoidů v různých podmínkách prostředí a jejich vliv na expresi ornamentu. Práce je členěna do tří kapitol. První kapitola se věnuje základnímu popisu karotenoidů, jejich klasifikaci a vlastnostem, které vycházejí ze struktury těchto molekul. Druhá kapitola se zabývá fyziologickými aspekty, které vedou k příjmu, metabolizaci a vystavení karotenoidů do ornamentů a dále hypotézami vysvětlujícími čestnost těchto ornamentů. V poslední kapitole se zabývám evidencemi pro výběr partnera založený na ornamentaci pomocí karotenoidů a tím, jaké výhody z takového výběru plynou pro samice.

## **ABSTRACT**

This theses deal with the use and utilization of carotenoids in secondary ornamentation, particularly in birds. Carotenoids have an important role in animal organisms, and the honesty of carotenoid-based signalization has traditionally been ascribed to anti-oxidant functioning of carotenoids. However, this view has been changed recently showing the potentially harmful effect of carotenoids. The deposition of carotenoids in ornamentation is driven not only by carotenoid intake, but also by physiological processes within the organism. Importantly, when the conditions are suboptimal (and the oxidative stress increases) unstable long aliphatic chains of carotenoids derive into highly reactive non-colorful apo-carotenals. Hence carotenoids may act as classical handicaps, potentially harmful to organism, and this view changes our understanding of honesty of carotenoid-based signalization. The theses focus on summarizing the current knowledge on physiological functions of carotenoids and how they affect secondary coloration, and consist of three chapters. In the first one the basic description

of carotenoids is provided, along with an overview of carotenoid classification. The second chapter deals with physiological aspects which affect the carotenoid intake, metabolisation, transport to ornaments, and hypotheses explaining the honesty of carotenoid-based coloration are discussed. In the last, third chapter, the evidence of the role of carotenoids in the process of mate choice is given and potential benefits to females from pairing with highly ornamented mates are discussed.

# ÚVOD

Ačkoli je nepochybné, že ornamenti zastávají signální a informační funkci v rámci druhu, mechanismus této signalizace stále není plně objasněn. Na vzniku a udržení ornamentů se ovšem významnou měrou podílí pohlavní výběr (Darwin, 1871; Andersson, 1994). Výrazné ornamenti se objevují u druhů s pohlavním dimorfismem častěji u samců (Badyaev & Hill, 2000). Snaha o vývoj maximálního ornamentu může být velmi nákladná a mnohdy snižuje životaschopnost svého nositele (Zahavi, 1975). Pak ale zůstává otázkou, proč se samci vyplatí takové znaky udržovat a proč si samice takového samce vybírá.

Aby byly ornamenti využitelné v signalizaci, je třeba, aby byly čestnými signály (honest signals) kvality svého nositele. Aby byly čestné, musí být jejich vývoj, či udržování nákladné (costly). Tímto se zabývá indikátorový model pohlavního výběru (indicator model of sexual selection), který předpokládá, že pokud je signál čestný, a tudíž i nákladný, je pro samici výhodné vybrat si takového samce, kterému přítomnost nákladného znaku nevadí (Zahavi, 1975).

Stále zůstává nevyřešeno, jakou úlohu hrají ornamenti v rámci druhu, a co signalizují. Dle některých názorů ornamenti vznikly a udržují se pomocí kompetice, ať už se jedná o potravu, teritorium, či partnera k rozmnožování, a předpokladem bývá, že větší, složitější či barevnější ornament je signálem dominance a celkově dobrého zdravotního a soubojového stavu (Candolin, 1999). Nebo se ornamenti mohou udržovat díky samičím preferencím pro určitý znak. Zde opět platí předpoklad, že největší, nejsložitější či nejbarevnější ornament je preferován při výběru partnera, neboť takový znak signalizuje dobrý zdravotní stav, dobré předpoklady pro péči o potomstvo a podobně (Hill, 1990).

Barevné ornamenti mohou obsahovat různé pigmenty a každý pigment může signalizovat něco jiného, například melaniny často ukazují na hormonální stav a připravenost k boji, karotenoidy a strukturální barvy naopak zdravotní stav, či schopnost vyhledávat potravu (Mcgraw, Mackillop, Dale & Hauber, 2002). Melaninové ornamenti jsou možná méně citlivými indikátory kondice a kvality jedince než karotenoidy (Badyaev et al., 2000). Ve své práci se zaměřuji právě na karotenoidy a jejich fyziologické funkce v organismu a roli karotenoidních ornamentů v pohlavním výběru.

Následující kapitoly se zabývají 1) poznatky o klasifikaci karotenoidů a popisem jejich struktury a vlastností z ní vyplývajících; 2) fyziologickou funkcí karotenoidů v živočišném těle, funkci v těle se zřetelem na signalizační funkci a čestnost signalizace; 3) roli karotenoidů v pohlavním výběru.

# 1. Popis karotenoidů

Karotenoidy jsou látky, které se vyskytují běžně v přírodě. Některé organismy jsou schopné je endogenně vyrábět – mezi ně patří převážně fotosyntetizující organismy, ale i některé nefotosyntetické eubakterie (Armstrong & Hearst, 1996). Ostatní živočichové je musí získávat z potravy, neboť postrádají enzymy k jejich výrobě. Dnes známe přes 600 druhů karotenoidů, ale ne všechny se objevují v potravě a jsou využívány v organismech (Vershinin, 1999).

Karotenoidy zastávají v organismech mnoho funkcí. U bakterií se podílejí na posílení buněčné membrány (Rottem & Markowitz, 1979), v rostlinách mají funkci při fotosyntéze, fotoprotekci (Demmig-Adams, Gilmore & Adams, III, 1996), jsou také prekursory rostlinných hormonů (Milborrow, 2001) a fungují i jako pigmenty (Badyaev et al., 2000).

Ve své práci se zabývám funkcí karotenoidů u obratlovců (a to především u ptáků).

## 1.1 Klasifikace karotenoidů

Karotenoidy obecně dělíme na karoteny, jejichž molekula není substituovaná, a xantofyly, jejichž molekula obsahuje ve své struktuře kyslík. Tento fakt je příčinou jejich rozdílných vlastností (Britton, 1995).

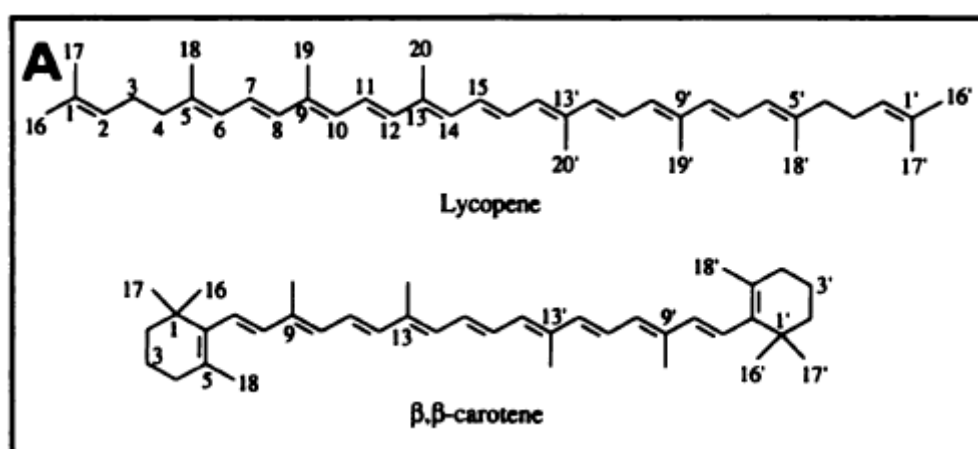
Karoteny jako uhlovodíky jsou nepolární a rozpustné v tucích a patří mezi ně například beta-karoten, známý pro svou provitaminovou aktivitu a obsažený hlavně v kořenu mrkve, listové zelenině a ovoci.

Xantofyly jsou naproti tomu, díky obsahu kyslíku ve své molekule, polárnější než karoteny a dělí se dále do dvou tříd podle obsažené kyslíkové skupiny – hydroxykarotenoidy (obsahují hydroxyl, například lutein) a keto- neboli oxokarotenoidy (obsahují keton, například astaxantin). Xantofyly nemají provitaminovou aktivitu, ale oproti karotenům jsou barevnější (Mortensen & Skibsted, 1997), hydroxykarotenoidy vytvářejí hlavně žluté odstíny a ketokarotenoidy červené odstíny barev.

Kromě těchto dvou tříd můžeme odlišit ještě apo- a norkarotenoidy, kterým v molekule chybí uhlík (apokarotenoidy – na konci, norkarotenoidy – uprostřed molekuly), nejsou to tedy pravé karotenoidy, ale spíše jejich štěpné produkty (Davies, 1985), vznikající například při trávení, či antioxidačních procesech. Karotenoidy jsou velmi náchylné ke štěpení, díky svým dlouhým nestabilním řetězcům. Toto štěpení může být nespecifické (fotooxidace, radikálová oxidace) nebo specifické pomocí enzymu dioxygenasy.

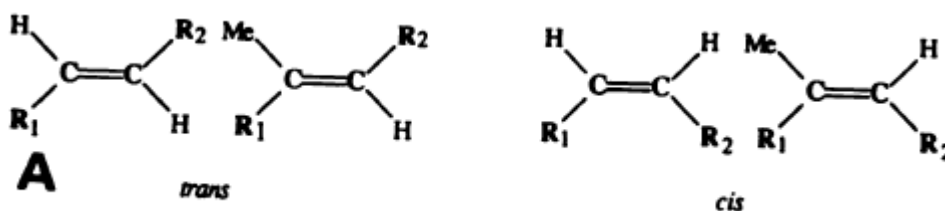
## 1.2 Struktura karotenoidů

Z chemického hlediska patří karotenoidy mezi tetraterpenoidní molekuly, skládající se z osmi pětiuhlíkatých zbytků isoprenu (jedná se tedy o oligomery isoprenu) (Armstrong et al., 1996). Základním stavem je tedy čtyřicet uhlíkových atomů. Jsou to lineární molekuly, jejichž řetězec obsahuje konjugované dvojné vazby (9 – 13). Vyskytují se pouze v několika variantách uhlíkového skeletu – buď jsou ryze alifatické, nebo mají na jednom či obou koncích cykly (pětičlenné či šestičlenné) (Britton, 1995). Tyto cykly mohou být nahrazeny funkční skupinou. Na Obr. 1 jsou naznačeny obě základní varianty molekuly karotenoidů s vyznačením jejich obvyklého číslování.



Obr. 1. Obvyklé číslování molekuly karotenoidu (Britton, 1995).

Jejich vlastnosti jsou odvozeny od jejich struktury. Díky obsahu konjugovaných dvojných vazeb se mohou vyskytovat v různých stereoisomerických formách (geometrická isomerie, cis/trans formy, Obr. 2.), v přírodě jsou nejčastěji v all-trans formě (Hencken, 1992).



Obr. 2. Cis a trans isomery vyskytující se v karotenoidech (Britton, 1995).

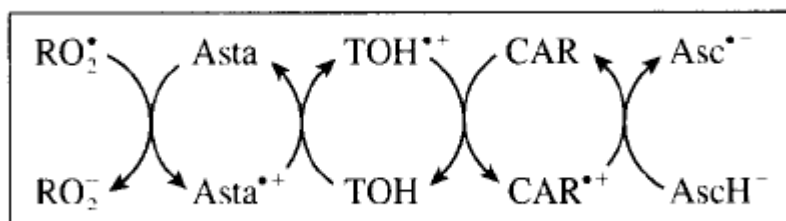
Přítomnost konjugovaných dvojných vazeb vytváří delokalizovaný systém elektronů. Karotenoidy díky tomu mohou zachytit energii, „rozvibrovat“ svojí molekulu a vyzářit tuto energii ve formě tepla. To umožňuje absorbovat energii excitovaných molekul jako je singletový kyslík, či excitovaný chlorofyl a zabránit tak poškození proteinů, DNA či fotosyntetického aparátu, které by jinak tyto vysoce energetické molekuly způsobily (Young & Lowe, 2001) Přítomnost delokalizovaného systému elektronů také způsobuje, že jsou náchylné k napadení radikálem. Největší hustota elektronů je na konci řetězce (C7-C9), nebo na kruhu, pokud je oxidován. Tato místa jsou pak nejčastěji atakována radikály a štěpena. Tím radikál stabilizují a zabraňují poškození jiných molekul. Při tom jsou ale zničeny, anebo je vytvořen karotenoidový radikál (Edge, McGarvey & Truscott, 1997a).

Vznik karotenoidových radikálů se může odehrávat několika způsoby (Britton, 1995), jedná se o:

- 1) oxidaci:  $\text{CAR-e}^- + \text{CAR}\cdot^{++}$ , například  $\text{CAR} + \text{R}\cdot^{++} \rightarrow \text{CAR}\cdot^{++} + \text{R}$
- 2) redukci:  $\text{CAR} + \text{e}^- \rightarrow \text{CAR}\cdot^-$
- 3) odtržení vodíku:  $\text{CAR-H} + \text{R}\cdot \rightarrow \text{CAR}\cdot + \text{RH}$
- 4) vazbu radikálu na karotenoid:  $\text{CAR} + \text{ROO}\cdot \rightarrow (\text{CAR} - \text{OOR})\cdot$

Problémem je, že jak štěpné produkty, mezi něž patří apokarotenoidy (apokarotenaly a apokarotenony) a dále epoxidy a peroxidy, tak karotenoidové radikály mohou působit na jiné molekuly a ničit je (Edge & Truscott, 1997b).

Antioxidační funkci karotenoidů kromě struktury molekuly ovlivňují také interakce s jinými antioxidanty, či parciální tlak kyslíku. Protože při antioxidačních reakcích vznikají jejich štěpné deriváty, nebo radikály, které by mohly napadnout své okolí, je důležité že karotenoidy v organismech nepůsobí samy, ale jsou zde přítomny i jiné antioxidanty, jako jsou třeba vitaminy E a C, nebo antioxidační enzymy. Ty působí synergisticky a předávají si volný elektron až do utlumení jeho energie (Bohm, Edge, Land, McGarvey & Truscott, 1997; Edge et al., 1997b).

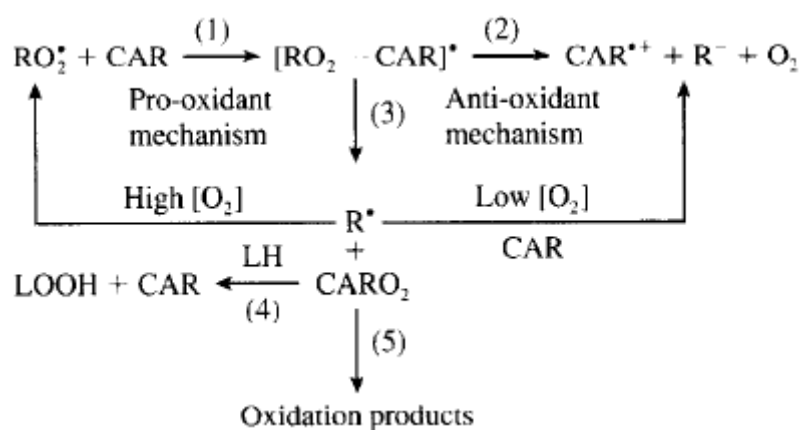


Obr. 3. Schema přenosu elektronu mezi antioxidanty (Edge et al., 1997b); TOH = alfa –



tokoferol (vitamin E), AscH = vitamin C, Asta = astaxantin, CAR = jiné karotenoidy, RO = kyslíkový radikál.

Vysoce delokalizovaný pí systém je odpovědný za to, že jsou karotenoidy tak náchylné k oxidaci i při malém množství kyslíku. Pokud se ale reaktivních radikálů vyskytuje v prostředí hodně, může se antioxidační schopnost zvrátit v prooxidační (Edge et al., 1997b). Větší množství těchto radikálů se vyskytuje při zvýšeném parciálním tlaku kyslíku (Mordi, Walton, Burton, Hughes, Ingold, Lindsay & Moffatt, 1993). In vitro bylo prokázáno, že při zvýšeném parciálním tlaku kyslíku a při vyšších dávkách beta karotenu vzniká víc produktů oxidace a mizí tak ochranný účinek karotenoidů, karotenoidy mají prooxidační účinek (Edge et al., 1997b; Mordi et al., 1993; Siems, Wiswedel, Salerno, Crifo, Augustin, Schild, Langhans & Sommerburg, 2005). Prooxidace při fyziologických podmínkách (in vivo) však zatím nebyla prokázána (Young et al., 2001).



Obr. 4. Schema ukazující možný přechod z antioxidační na prooxidační chování karotenoidů v závislosti na parciálním tlaku kyslíku. CAR = carotenoid, RO = kyslíkové radikály. (Edge et al., 1997b).

Karotenoidy jsou také využívány jako pigmenty a dávají odstíny od žluté po červenou (Armstrong et al., 1996; Britton, 1995). Barevnost je dána přítomností a počtem dvojných vazeb, čím víc jich daná molekula obsahuje. Mohou se samozřejmě kombinovat i s jinými pigmenty, či strukturními barvami. Barva také závisí na druhu a množství karotenoidu přítomného v dané tkáni (Hill, Inouye & Montgomerie, 2002).

Substituenty také ovlivňují vlastnosti karotenoidu. Ptáci a ryby jsou schopní metabolizace přijatých karotenoidů (Obr.5), které potom můžou využít v ornamentu. Většinou se jedná o přidání oxo- nebo hydroxy- skupiny na beta kruh (Davies, 1985; Stradi, Pini &

Celentano, 2001), nebo změnu koncových kruhů, například z beta na epsilon, což vede ke zkrácení řetězce konjugovaných dvojných vazeb a zežloutnutí pigmentu (Davies, 1985), u ptáků tak vzniká žlutý kanáří xantofyl (Davies, 1985; Stradi, Celentano, Boles & Mercato, 1997). Lutein, ale i jiné karotenoidy, které jsou nažloutlé, mohou být ketonizovány (C-H → C=O) na uhlíku C4, což vede k rozšíření konjugovaného řetězce dvojných vazeb a zčervenání molekuly (Stradi, Hudon, Celentano & Pini, 1998). Oxidace koncového kruhu vede kromě toho ke zlepšení antioxidační schopnosti (Davies, 1985). Proto jsou oxidované a pravděpodobně červenější karotenoidy lepšími antioxidanty (Mortensen et al., 1997). Nejlepším antioxidantem je lykopen (Mortensen et al., 1997).

## 2. Fyziologie karotenoidů v těle a čestnost signalizace

Fyziologická funkce karotenoidů je ovlivněna mnoha činiteli a čestnost může být dána mnoha způsoby, jedním z nich je příjem karotenoidů.

### 2.1 Příjem karotenoidů

Živočichové postrádají enzymy k výrobě karotenoidů z jejich obvyklých prekursorů a jsou proto nuceni doplňovat si je potravou (Brush & Power, 1976; Hill et al., 2002).

Strava, ve které jsou karotenoidy přijímány, obvykle ovlivňuje resorpci v trávicím traktu (Parker, 1996). Pokud jsou v rostlinách vázané na protein (Demmig-Adams et al., 1996), musí se před strávením oddělit od svého nosiče, což může ovlivnit účinnost příjmu. Karotenoidy využívají stejné absorpční cesty jako lipidy (Erdman, Bierer & Gugger, 1993). V jejich přítomnosti se karotenoidy lépe vstřebávají (Clark & Furr, 2001; Roodenburg, Leenen, Hof, Weststrate & Tijburg, 2000). Naproti tomu nadměrné množství vlákniny v potravě negativně ovlivňuje procento vstřebených karotenoidů (Yonekura & Nagao, 2009), což může mít vliv na příjem karotenoidů u živočichů, kteří se živí hlavně rostlinnou stravou. Je ale možné, že špatné vstřebávání v přítomnosti vlákniny souvisí s nedostatečným rozmělněním tuhé rostlinné potravy, či nízkou koncentrací obsažených tuků. Vlákna ale pravděpodobně interaguje se žlučovými solemi, což vede k jejich vylučování z těla a je tím snížena absorpce tuků a tím pádem i karotenoidů (Castenmiller & West, 1998).

Pro absorpci karotenoidů je také důležitý mechanický či chemický rozpad potravy, který se odehrává převážně v ústní dutině a žaludku. Po rozmělnění potravy se snáze uvolňují z buněk do lumen střeva a jsou přístupné ke strávení. V lumen se lipofilní karotenoidy rozpouštějí v olejové fázi lipidových kapek při tzv. emulsifikaci (Parker, 1996). V lipidových kapkách jsou v jádře obsaženy karoteny spolu s triacylglyceroly a na povrchu jsou polárnější xantofyly, které se pak snadněji dostávají do micel, zatímco karoteny jsou uzavřeny uvnitř a uvolňují se až po strávení triacylglycerolů pomocí pankreatické kolipáz-dependentní lipázy (Lowe, 1994).

Z lipidových kapek karotenoidy přechází do micel (složení: žlučové soli, volné mastné kyseliny s dlouhými řetězci, monoacylglyceroly a fosfolipidy) (Furr & Clark, 1997). Karotenoidy jsou na rozdíl od tuků absolutně závislé na žlučových solích a micelách. Xantofyly i karoteny se zde vstřebávají stejně. Rozpustnost v micelách je ovšem limitovaná. U lidí bylo pro beta karoten zjištěno, že pokud je ho v potravě nadbytek (více než 20mg/den),

je tato fáze jeho vstřebávání z hlediska míry absorpce limitující, pokud je ovšem beta karotenu v potravě běžné množství (méně než 10 mg/den) pak je pravděpodobně limitující fáze rozpouštění v lipidových kapkách, což ukazuje, že karotenoidy jsou limitovány v příjmu, a nevstřebají se všechny přijaté karotenoidy. Ho et al. ((2007) zjistili pomocí podání značené molekuly beta karotenu (14 C- beta karoten) lidem, že po první dávce bylo 35% uhlíku 14C pocházejícího z beta karotenu vyloučeno v exkrementech, a při dvoutýdenní suplementaci bylo celkem vyloučeno 51% přijatého beta karotenu. Což naznačuje, že organismus karotenoidy ve velkém množství nedokáže využít a zbavuje se jich. Micely se pak dostávají k lipofilní membráně kartáčového lemu epitelu a tam jsou pasivním dějem přijímány do slizničních buněk. Rychlost prostupu do buněk střeva je závislá na koncentračním gradientu (Parker, 1996).

Uvnitř střevní buňky se micely rozpadají a osud karotenoidů dále závisí na jejich struktuře. Pokud obsahují beta-iononový kruh a polyen 11C (například beta karoten) jsou enzymaticky štěpeny na vitamin A, štěpení beta karotenu katalyzuje enzym beta-karoten-15,15'-dioxygenasa za pomoci dvou molekul vody (Olson & Hayaishi, 1965). Nebo je možná cesta postupného štěpení na apokarotenaly až na molekulu vitaminu A (Ho, de Moura, Kim & Clifford, 2007).

Nepozměněné karotenoidy jsou vloženy do lymfatických chylomikronů (Erdman et al., 1993) a odchází s nimi do střevní lymfy, dále do krve a jater, kde jsou navázány na lipoproteiny (složení: na povrchu fosfolipidy a cholesterol, uvnitř silně hydrofobní lipidy), primárně na VLDL (Very Low Density Lipoprotein), poté na LDL (Low Density Lipoprotein) či HDL (High Density Lipoprotein). Většina karotenů se váže na LDL (Erdman et al., 1993), zatímco polárnější xantofyly jsou rovnoměrně rozložené mezi HDL a LDL. Navázány na lipoproteiny se objevují v krvi a dostávají se k cílovým orgánům (Erdman et al., 1993). Cesta příjmu karotenoidů je naznačena na Obr. 5.

Po příjmu z trávicí soustavy a navázání na lipoproteiny jsou karotenoidy odváděny do cílových tkání, v tomto případě ornamentů. V zárodku nového pera se karotenoidy akumulují v lipidových kapkách (Menon & Menon, 2000).

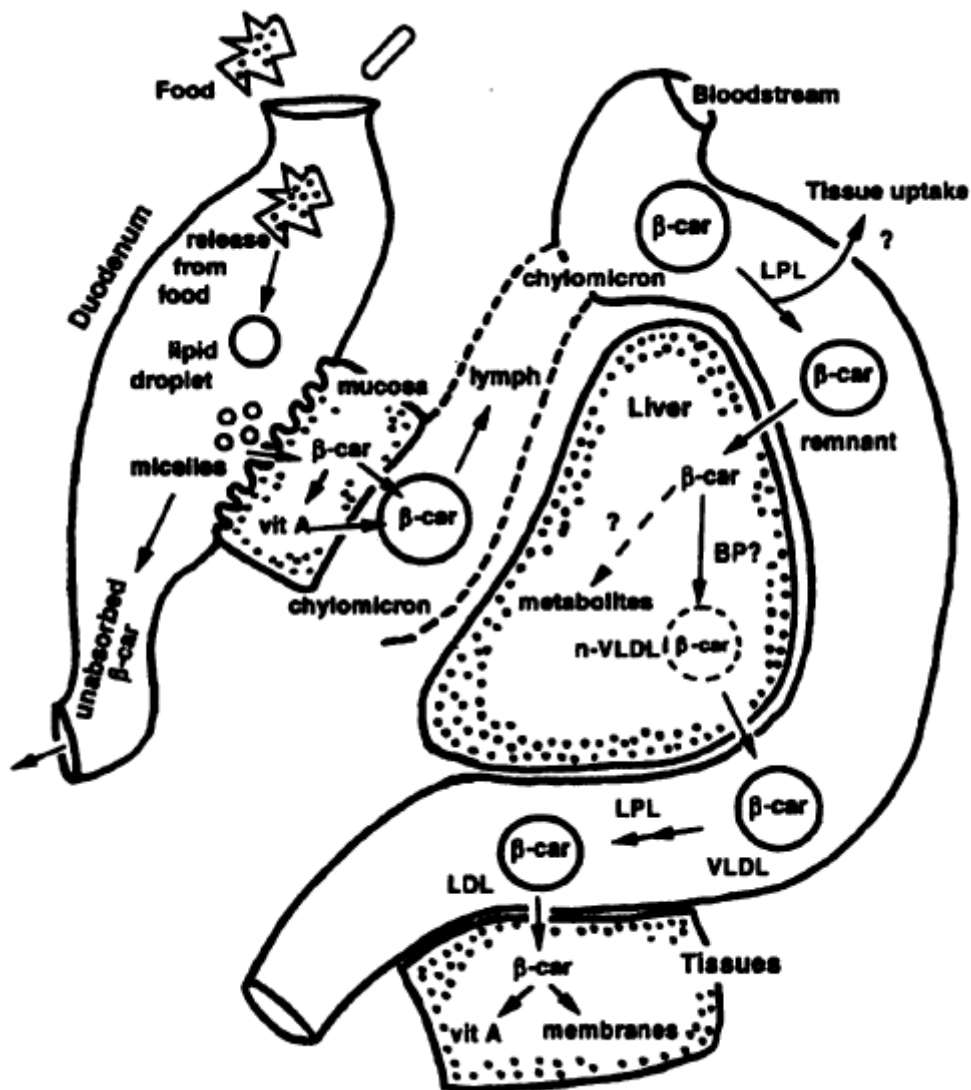
Karotenoidy jsou skladovány převážně v játrech, tukové tkáni, integumentu, svalech, vaječnicích a varlatech (Mcgraw, 2004; Metusalach, Synowiecki, Brown & Shahidi, 1996; Negro, Figuerola, Garrido & Green, 2001; Parker, 1989).

Karotenoidy se vzájemně ovlivňují v absorpci a metabolismu (Tab.1). Pokud je například jednoho druhu více, či se lépe vstřebává, může omezit vstřebávání druhého karotenoidu (White, Peck, Bierer, Gugger & Erdman, 1993). Xantofyly se často vstřebávají na

úkor karotenů (Raila, Schuhmacher, Gropp & Schweigert, 2002; White et al., 1993). Účinnost jejich vstřebávání je lepší i bez přítomnosti karotenů (Clark, Yao, She & Furr, 1998), a vstřebávají se rychleji (Bierer, Merchen & Erdman, Jr., 1995), což může ovlivnit barvu ornamentu.

*Tab.1.* Potenciální interakce karotenoidů (dle Rodriguez a Shao, 2004)

<b>Místo interakce</b>	<b>Výsledky interakce</b>
Střevní lumen	Antagonistické: kompetice o příjem micelami
	Synergistické: zvýšení stability či usnadnění vstupu do micel
Cytosol střevní buňky	Inhibice enzymu štěpícího provitamin A
	Kompetice při vstupu do chylomikronů
Plasma	Výměna mezi lipoproteiny
Tkáně	Inhibice, či zlepšení příjmu či výdaje v tkáních



Obr. 5. Procesy zahrnuté ve vstřebávání a transportu karotenoidů (zde beta karoten), není zde znázorněn potenciální přenos z chylomikronů do HDL, nebo potenciální recyklace LDL- či VLDL-beta karotenu v játrech. beta-car = beta karoten; LDL = low-density lipoproteins; VLDL = very low-density lipoproteins; n-VLDL = nascent VLDL; LPL = lipoprotein lipase; vit A = vitamin A (retinyl ester); BP = binding protein (Parker, 1996).

## **2.2 Karotenoidy v ornamentech**

Karotenoidy představují důležité pigmenty u živočichů i rostlin. Vytvářejí spektrum barev od žluté po červenou. Mnoho zvířat, zvláště ryb a ptáků, využívá tuto vlastnost k vytváření barevných ornamentů, které se mohou uplatnit v pohlavním výběru (Andersson, 1994).

Karotenoidní signály se mohou vyskytovat buď jako zbarvení peří, nebo zbarvení holých částí jako je kůže, zobák, volátka, hřebínky a nohy. Tyto ornamenty mohou ukazovat jiné aspekty samčí kondice (Hill, Hood & Huggins, 2009). V barvě integumentu se prezentuje aktuální koncentrace karotenoidů v potravě a schopnost jejich využití, takový znak koreluje s aktuálním zdravím a schopností příjmu karotenoidů a tyto signály tak dávají příjemci signál o aktuálním stavu jedince (Blount, Metcalfe, Birkhead & Surai, 2003). Naproti tomu peří ukazuje na stav jedince v době posledního pelichání (Hill, 1992; Hill & Montgomerie, 1994a).

Existuje jistá premisa, že pro potřeby ornamentu si zvířata karotenoidy neskladují. Proto by měly být barvy v integumentech dynamické a rychle odpovídající na krátkodobé změny kondice u ptáků (Faivre, Gregoire, Preault, Cezilly & Sorci, 2003; Hill, 2000), a pokud si tedy samci chtějí udržet zbarvení, musí neustále doplňovat karotenoidy z prostředí. Tyto ornamenty jsou tak nejlépe využitelné v pohlavním výběru, neboť samec neustále ukazuje svou aktuální kondici.

Protože ptáci deponují do peří různé karotenoidy, měl by existovat nějaký specifický biochemický mechanismus, který kontroluje expresi barev a může být důležitý pro pochopení nákladů na vznik a signálního obsahu ornamentu (Mcgraw, Hill, Stradi & Parker, 2002). Je možné, že v ornamentu existuje nějaký druh vazebného proteinu, který upřednostňuje přijetí určitého karotenoidu (Mcgraw, Beebee, Hill & Parker, 2003).

Optimální strategií by mohla být akumulace co největšího množství karotenoidů v době pelichání, takže rozdíly ve zbarvení by pak byly výsledkem rozdílu v hledání potravy bohaté na karotenoidy (Mcgraw & Gregory, 2004). Barva ornamentu může totiž skutečně vyjadřovat rozdíly v obsažených pigmentech (Hill et al., 2002; Inouye, Hill, Stradi & Montgomerie, 2001; Saks, McGraw & Horak, 2003). Ve stejném treatmentu (treatment = stejný druh a obsah karotenoidu) exprimovali všichni samci stejnou barvu ornamentu (Hill, 1992). Dle některých výsledků ale existuje variabilita v barvě kvůli rozdílům v příjmu, ne kvůli rozdílům v absorpci (Hill, Montgomerie, Inouye & Dale, 1994b).

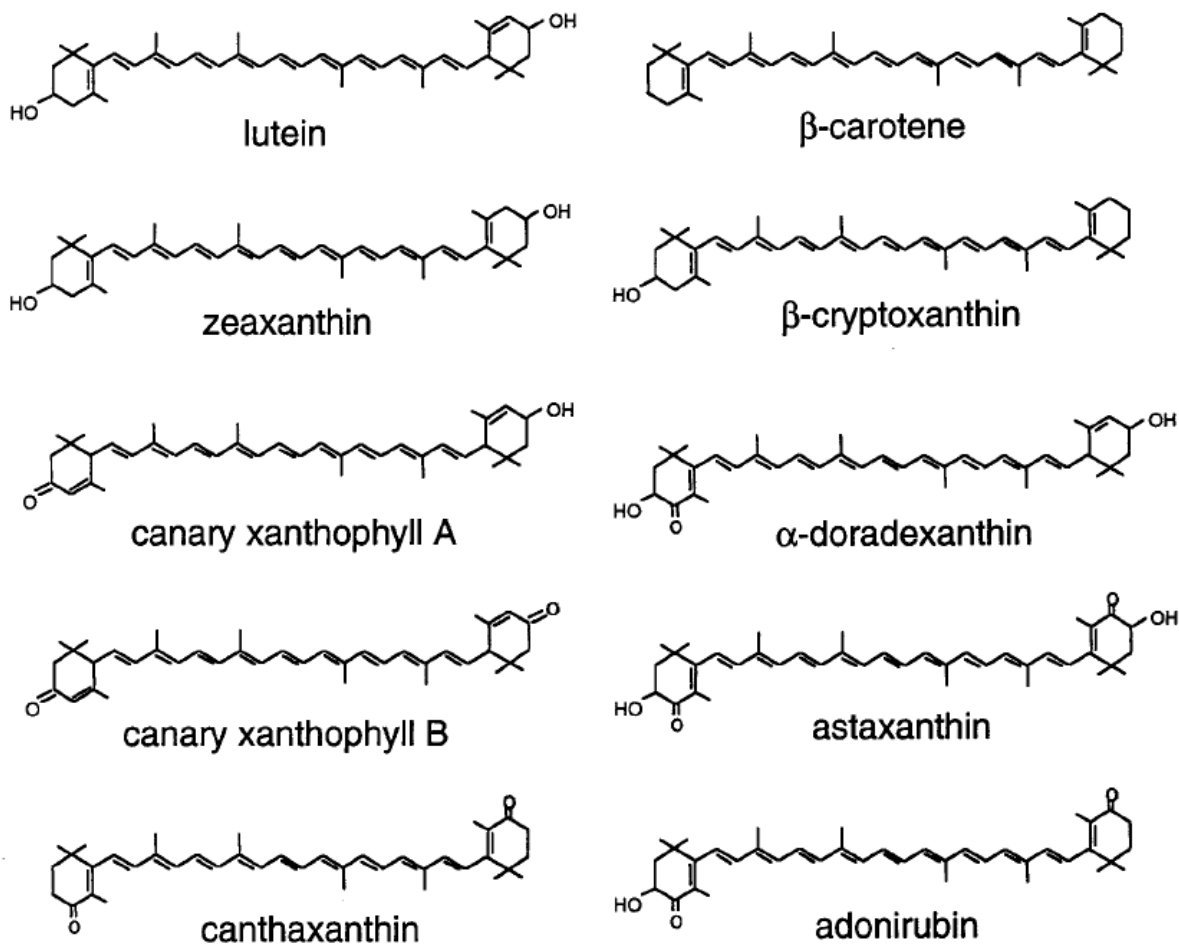
Vývoj ornamentů může být také ovlivňován množstvím potravy, nejen množstvím obsažených karotenoidů. Potrava, která obsahuje karotenoidy, se může lišit od té, která je potřebná k výstavbě kvalitního pera. Pokud je samec v dobré výživné kondici během





Přijaté karotenoidy se také mohou metabolizovat (Davies, 1985; Schiedt, Leuenberger, Vecchi & Glinz, 1985). Jak jsem již uvedla výše, do ornamentů se většinou deponují více oxidované formy přijatých karotenoidů, které jsou také červenější. Oxidace a výroba těchto červených ketokarotenoidů může spotřebovat více energie (Hill, 2000) a proto by metabolizace také mohla být jedním z faktorů, který má vliv na zbarvení ornamentu (Hill, 1996). Řada druhů pěvců například vykazuje ve svém peří žluté karotenoidy jako lutein a zeaxanthin, které se vyskytují v potravě ale také metabolizované karotenoidy jako jsou žluté kanáří xantofyly A a B (Mcgraw et al., 2001) a řada červených ketokarotenoidů, například: 3-hydroxy-echinon, astaxantin, alfa-doradexantin, adonirubin, cantaxantin (Obr.7.) (Mcgraw et al., 2001; Stradi et al., 1997; Stradi et al., 1998).

Mezi jedinci může také existovat určitá věkově specifická využitelnost karotenoidů. Mladí ptáci (s prvním dospělým peřím) například nemetabolizují karotenoidy před vystavením v ornamentu (Inouye et al., 2001). Je otázkou proč tomu tak je. Je možné, že metabolizace může být nákladná a jim se nevyplatí do ní investovat. Výsledky naznačují, že specifická využitelnost karotenoidů existuje i mezi druhy. Pěvci například absorbují více karotenoidů z potravy než hrabaví (Mcgraw, 2005). Lidé dokážou absorbovat pouze 50% přijatých karotenoidů a zbytek je bez užitku vyloučen (Ho et al., 2007) a losos dokonce pouze 10-15% podaných karotenoidů (Buttle, Crampton & Williams, 2001).



Obr. 7. Některé běžné karotenoidy vyskytující se v peří ptáků (Mcgraw et al., 2001)

### 2.2.1. Kde se karotenoidy metabolizují?

Zůstává otázkou, kde se karotenoidy pro potřeby ornamentu metabolizují. Důležitou studovanou přeměnou karotenoidů bylo štěpení beta karotenu na vitamin A, které se může odehrávat v játrech (Wyss, Wirtz, Woggon, Brugger, Wyss, Friedlein, Riss, Bachmann & Hunziker, 2001) a zároveň je prokázáno i v kůži u lidí a myší (Redmond, Gentleman, Duncan, Yu, Wiggert, Gantt & Cunningham, 2001; Zouboulis, 2000), což naznačuje, že se karotenoidy mohou metabolizovat v různých tkáních a pravděpodobně závisí také na druhu živočicha.

Co se týče karotenoidů využívaných v ornamentu, několik prací ukazuje, že hlavním místem jejich přeměny jsou játra (del Val, Senar, Garrido-Fernandez, Jaren, Borrás, Cabrera & Negro, 2009b; Hill, 2000; Schiedt et al., 1985). Pokud by byly metabolizovány v játrech, měly by se již metabolizované deriváty následně objevit v krvi, jako transportním médiu (Mcgraw, 2004). Pokud se zde neobjeví, je možné, že metabolizace se odehrává přímo v cílových tkáních (Mcgraw, 2009; Mcgraw, Nolan & CRINO, 2006). McGraw (2004)

izoloval karotenoidy z peří, případně zobáku, dále krve (transport) a jater (metabolismus) u 11 druhů pěvců, kteří vykazují karotenoidní ornamenty, v době vzniku nových ornamentů a zjistil přítomnost metabolitů karotenoidů v barevných integumentárních tkáních, ale tyto deriváty chyběly v játrech i v krvi. V rostoucích folikulech byla zjištěna přítomnost potravních (nemetabolizovaných) i přeměněných karotenoidů, což naznačuje, že karotenoidy jsou pro přítomnost v ornamentu metabolizovány přímo na místě ve vyvíjejícím se znaku.

Jedním z možných vysvětlení této lokální přeměny karotenoidů může být nákladná výroba oxidovanějších a barevnějších (červenější) forem, které jsou v prostředí vzácnější (Hill, 1996). Pokud by se metabolizovaly v játrech, je možné, že by se při transportu poškodily a ztratily by se tak náklady spojené s jejich přeměnou (Mcgraw, 2004).

Stále tedy není jasné, kde se karotenoidy u ptáků metabolizují. Je možné, že se tak děje v játrech, ač se zde produkty přeměny nenašly, ale to může být tím, že metody použité k detekci karotenoidů byly nevyhovující (del Val, Senar, Garrido-Fernandez, Jaren, Borrás, Cabrera & Negro, 2009a). Je možné, že se metabolizují částečně v játrech a částečně ve vyvíjejícím se znaku v závislosti například na druhu karotenoidu.

### **2.2.2. Karotenoidy, testosteron, cholesterol**

Výrazným rysem sekundárních pohlavních znaků je, že jejich exprese je ovládána pohlavními hormony (Folstad & Karter, 1992). V případě ornamentů, které se vyskytují u samců, se většinou jedná o testosteron. Samci obratlovců, kteří mají sezonní partnerské svazky, vykazují strmý vzrůst hladiny testosteronu před iniciací sexuální aktivity. Hladina pak zůstává zvednutá během období rozmnožování a na konci se dramaticky snižuje (Silverin, 1980).

V rámci ornamentu testosteron působí tak, že zlepšuje zbarvení, či velikost ornamentu, například melaninové zbarvení po přidání testosteronu tmavne (Evans, Goldsmith & Norris, 2000; Gonzalez, Sorci, Smith & de Lope, 2001) a hřebínky či volátka, která jsou barevna hemoglobinem, také tmavnou (Zuk, Johnsen & Maclarty, 1995). V případě karotenoidů přidání testosteronu vede ke zvýšení (upregulaci) produkce lipoproteinů, které fungují jako nosiče karotenoidů v krvi a jedinec tak produkuje barevnější ornament (Mcgraw, Correa & Adkins-Regan, 2006). Hladina testosteronu tak může předpovídat velikost ornamentu (Buchanan, Evans, Goldsmith, Bryant & Rowe, 2001), barvu ornamentu, obsah karotenoidů v krvi i lipoproteinový profil (měřený jako koncentraci cholesterolu v krvi) (Mcgraw et al., 2006).

Pokud testosteron zvyšuje basální metabolismus (Buchanan et al., 2001), zvyšuje se tím i metabolismus tuků a tuková tkáň je jedním z míst kam se karotenoidy ukládají (Negro et al.,

2001) pokud nejsou využity jinde, je tedy možné, že ptáci dovedou využít i skladované karotenoidy, ačkoli obecná představa je jiná (Negro et al., 2001), (Mcgraw, Adkins-Regan & Parker, 2002).

Na druhou stranu je známo, že testosteron působí supresivně na buněčnou i humorální složku imunity (Folstad et al., 1992; Roberts, Buchanan & Evans, 2004). Jiné výsledky však naznačují, že zvýšení hladiny testosteronu posiluje imunitní odpověď (Mcgraw & Ardia, 2007). Testosteron tak nemusí mít vždy přímý negativní vliv na imunitu. Pokud se negativní vliv projeví, může to být následek zvýšené hladiny volných kortikosteroidů, neboť testosteron snižuje hladinu kortikosteroid-vazebných proteinů (Gala & Westphal, 1965).

Samci zebřiček mají horší imunitu než samice, pravděpodobně kvůli vlivu testosteronu (Mcgraw & Ardia, 2005), a samci mají celkově víc karotenoidů v krvi (Mcgraw et al., 2003). Při stejném treatmentu absorbují více karotenoidů než samice.

Hodnoty testosteronu také korelují s agresivitou (Folstad et al., 1992; Ketterson, Nolan, Wolf & Ziegenfus, 1992). Agresivnější jedinci jsou často při kompeticích dominantnější a mohou mít lepší teritorium i lepší partnerku.

Jednou z hlavních složek lipoproteinů je cholesterol (Davis, 1997), který se využívá ke stanovení lipoproteinového stavu. Podávání cholesterolu vedlo k vyšší hladině karotenoidů v krvi a zčervenání zobáku u samců zebřiček, naopak experimentální snížení jeho hladiny mělo opačné následky (Mcgraw & Parker, 2006). Hladina cholesterolu by tak mohla předpovídat hladinu karotenoidů a barvu ornamentu. Produkce lipoproteinů tedy ovlivňuje a reguluje vývoj barevných ornamentů.

Hladinu cholesterolu ovlivňuje několik faktorů, mezi nimi již výše zmíněná interakce s testosteronem a dále například stres. Při stresu se do krve uvolňují stresové hormony – glukokortikoidy. Ty snižují expresi enzymu HMG-CoA reduktázy, který je limitujícím enzymem v syntéze cholesterolu. Stresovaná zvířata s vyššími hladinami glukokortikoidů vykazují nižší aktivitu tohoto enzymu a nižší hodnoty cholesterolu (Ness & Chambers, 2000), který se tak nemůže účastnit přenosu karotenoidů, což vede k ovlivnění barvy ornamentu.

### ***2.2.3. Signalizace založená na ornamentech pigmentovaných karotenoidy***

Karotenoidní ornamenty jsou často popisovány jako čestné signály kvality, které se uplatňují při výběru partnera či kompetici (Olson & Owens, 1998). Podstatou takového signálu je, že přímo indikuje kvalitu svého nositele. Aby byl signál účinný a spolehlivý, musí být čestný. Aby byl čestný, musí být nákladný na vývoj či udržování. Pokud je signál skutečně nákladný,

je limitován pouze na kvalitní samce, kteří si přítomnost tohoto znaku mohou dovolit (Zahavi, 1975).

S čestností signalizace pomocí karotenoidních barviv se pojí následující hypotézy:

#### 1) Hypotéza limitujících karotenoidů

Pokud platí předpoklady, že zvířata nejsou schopná vytvářet ve svém těle karotenoidy de novo, karotenoidy jsou v prostředí vzácné (Hill, 1996) a karotenoidní ornamenty jsou nákladné na výrobu (Hill, 1996; Hill et al., 2002), pak barevnější ornament může signalizovat lepší zdraví a vyhledávací schopnosti potravy obohacené o karotenoidy (Hill, 1992; Lozano, 1994).

Ornament, ve kterém jsou přímo vystavovány žluté nemetabolizované karotenoidy, může být u ptáků čestným signálem (Hill, 1996). Mezi mláďaty sýkory modřinky prospívaly lépe ta, která měla žlutější náprsenku (Johnsen, Delhey, Andersson & Kempnaers, 2003). Přístupnost karotenoidů také limituje expresi sexuálního zbarvení u živorodky duhové (Grether, Hudon & Millie, 1999).

Zajímavé je, že několik prací ukazuje na limitovanou expresi ornamentu. Po překročení určité koncentrace už tělo není schopno karotenoidy dále využívat a nezvyšuje se jejich koncentrace v krvi ani barva ornamentu (Alonso-Alvarez, Bertrand, Devevey, Gaillard, Prost, Faivre & Sorci, 2004a; Doolan, Booth, Allan & Jones, 2008; Grether et al., 1999). Expese ornamentu je tak závislá na dávce (dose-dependent). Grether (1999) to například vysvětluje tím, že při nízké koncentraci karotenoidů v prostředí jsou ryby selektovány k jejich účinnějšímu využití.

2) Je možné, že metabolismus a transport karotenoidů do ornamentů je energeticky náročný, a proto pouze zdraví (kvalitní) jedinci si mohou dovolit investovat do výstavby lepšího ornamentu (Hill, 2000).

Pěvci například vyrábějí množství karotenoidů, které se nevyskytují v potravě (Mcgraw et al., 2001; Stradi et al., 1997). Taková metabolická přeměna může být navíc i velmi energeticky náročná, takže pouze nejlepší jedinci si mohou dovolit být barevní (honesty) (Hill, 1996; Hill, 2000).

3) Karotenoidy jsou užitečné pro své nositele, pravděpodobně díky imunostimulačnímu a antioxidačnímu potenciálu (Alonso-Alvarez, Bertrand, Devevey, Prost, Faivre, Sorci & Loeschke, 2004b; Mcgraw et al., 2007; Peters, 2007). V antioxidačních reakcích jsou barevné karotenoidy přeměněny na nebarevné produkty, které nemohou být využity pro

ornamentaci (Kiokias & Gordon, 2004; Vershinin, 1999) a tudíž představují trade-off mezi jejich fyziologickým využitím a deposicí do ornamentu (Horak, Saks, Ots, Kullissaar, Kollist & Zilmer, 2003; Moller, Biard, Blount, Houston, Ninni, Saino & Surai, 2000).

Níže se budu podrobněji věnovat třetí hypotéze, která předpokládá jistá trade off mezi využitím karotenoidů v ornamentech a využitím ve fyziologických procesech.

#### *2.2.3.1. Hypotéza antioxidační funkce karotenoidů*

Při normální činnosti buněk, zvláště pak buněk imunitního systému, vzniká určité množství volných radikálů, které může pomoci organismu v imunitní obraně proti patogenům. Tyto radikály jsou vysoce reaktivní a nestabilní. Jedná se především o takzvané ROS (= reactive oxygen species, např.: singletový kyslík, peroxid vodíku) a RNS (= reactive nitrogen species, např.: oxid dusnatý) a jejich průběžné vychytávání pomocí takzvaných antioxidantů, je důležité pro udržení optimálního oxidativního stavu a správnou funkci organismu (Edge et al., 1997a). Při zvýšeném množství patogenů, při nemoci či v procesu stárnutí je vytvářeno větší množství těchto reaktivních látek a oxidační stav se může zhoršovat, pokud není přítomno dost antioxidantů, mluvíme o takzvaném oxidativním stresu. Oxidativní stres je obecně výsledkem nerovnováhy mezi produkcí ROS (reactive oxygen species) a antioxidační obranou organismu. (Finkel & Holbrook, 2000).

Existují jisté důkazy, že karotenoidy fungují jako antioxidanty (Young et al., 2001). Pokud mají karotenoidy antioxidační (či imunostimulační) funkci a zároveň jsou využívány jako pigmenty pro zbarvení peří a ornamentů, pak vzniká alokační trade-off mezi jejich deposicí do ornamentu a využitím v antioxidaci. Imunitní systém tak kompetuje s ornamenty o přísun karotenoidů. Pokud je zvíře vystaveno oxidačnímu stresu, pak jsou karotenoidy spotřebovány v antioxidačních procesech a vznikají jejich nebarevné produkty, které se nemohou použít v ornamentu, a ty jsou následkem toho vybledlé (Alonso-Alvarez et al., 2004a).

Samci v lepší kondici tak potřebují relativně méně karotenoidů pro antioxidační reakce a mohou je využít pro zbarvení svých ornamentů, čímž navenek prezentují své zdraví. Skutečnost, že si zvířata neumí karotenoidy vyrobit, zajišťuje přímou signalizaci individuální kvality (Olson et al., 1998). Tuto hypotézu lze testovat podáváním karotenoidů a sledováním intenzity barvy signálu. U zdravých jedinců by se po přidání karotenoidů měla barva ornamentu zlepšovat, co se intenzity týče. U nemocných by naopak měla blednout (Faivre et

al., 2003), nebo zůstat stejná. Kolísání hladiny karotenoidů v krvi přímo ovlivňuje změnu v imunitních funkcích, či zbarvení

#### 2.2.3.2. *Hypotéza oxidativního handicapu (Oxidation handicap hypothesis)*

Pokud přijmeme antioxidační hypotézu, stále zůstává otázkou, co ovlivňuje přítomnost karotenoidu buď v ornamentu, nebo v antioxidační obraně. Tato hypotéza vychází z teorie antioxidační funkce karotenoidů a zároveň hypotézy handicapu, která tvrdí, že signál musí být nefalšovatelný (Zahavi, 1975).

Předpokladem je, že reprodukce, a s ní spojený vývoj ornamentů, je energeticky náročná aktivita (Rogowitz, 1996), která zvyšuje metabolismus (Angilletta & Sears, 2000). Následkem zvýšení metabolismu se zhoršuje i oxidativní stav v organismu a tělo musí vynakládat více prostředků na antioxidační obranu. Zhoršení oxidativního stavu představuje náklady, které jsou spojeny s produkcí ornamentu (Alonso-Alvarez et al., 2004b).

Jak jsem uvedla již v předchozí části kapitoly, exprese ornamentu je ovládána mimo jiné i pohlavními hormony (Folstad et al., 1992). Tím je i testosteron, který na jednu stranu zlepšuje expresi sekundárních pohlavních znaků tím, že zvyšuje přístupnost karotenoidů pro ornament (McGraw et al., 2006). Zároveň však má imunosupresivní efekt (Folstad et al., 1992) a zhoršuje oxidativní stav (Buchanan et al., 2001). Trade off mezi imunitou a ornamentem tak může být zprostředkováno interakcemi mezi testosteronem a karotenoidy (Peters, 2007). Karotenoidy díky své antioxidační funkci či imunostimulační funkci (Chew, 1993; Hughes, 2001; McGraw, Klasing & Dufty Jr, 2006) mohou vyrovnávat tento škodlivý vliv testosteronu. Vývoj ornamentu je pak kompromisem mezi pozitivním vlivem testosteronu na množství karotenoidů a jeho negativním vlivem na imunitu a oxidativní stav.

#### 2.2.3.3. *Mají ale skutečně karotenoidy v organismu antioxidační funkci?*

Správný antioxidant by neměl vytvářet nebezpečné meziprodukty a měl by vyrovnávat a nezhoršovat oxidativní stav (Hartley & Kennedy, 2004). Takovým antioxidantem je například vitamin C či E. Při využití karotenoidů v antioxidačních reakcích vznikají jejich nebarevné a zároveň toxické metabolity, které mohou poškodit organismus, pokud nejsou vychytávány jiným antioxidantem (Edge et al., 1997b; Siems, Sommerburg, Schild, Augustin, Langhans & Wiswedel, 2002). Neprokázalo se, že by karotenoidy samy byly klíčovými molekulami v zachytávání ROS (Costantini & Moller, 2008; Hartley et al., 2004; Perez-Rodriguez, Mougeot, Alonso-Alvarez, Blas, Vinuela & Bortolotti, 2008). Dle některých výsledků naopak

ještě zhoršují oxidativní stav (Kalariya, Ramana, Srivastava & van Kuijk, 2008; Siems et al., 2005).

Je proto pravděpodobné, že v organismu fungují v rámci složitějšího synergistického antioxidačního systému, který obsahuje jiné nebarevné antioxidanty získané z potravy (Edge et al., 1997b; Sies, 1993) nebo endogenně vyrobené (Murphy & Sies, 1991).

#### *2.2.3.4. Alternativní hypotéza funkce karotenoidů (Hartley a Kennedy, 2004)*

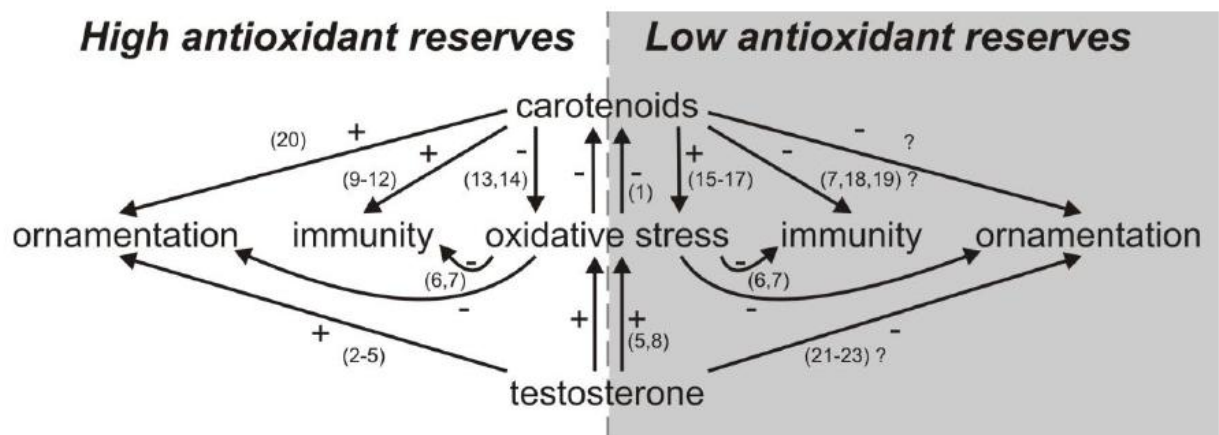
Tato hypotéza bere v potaz i jiné antioxidační molekuly přítomné v organismu. Předpokládá, že karotenoidy nemusí mít antioxidační funkci, ale jejich přítomnost v ornamentu indikuje obsah jiných nebarevných antioxidantů v organismu (Pike, Blount, Lindstrom & Metcalfe, 2007). Při zhoršení oxidativního stavu antioxidační molekuly nestíhají vychytávat všechny volné radikály. Karotenoidy s nimi reagují, jsou štěpeny na nebarevné produkty, které nejsou dostupné a použitelné pro ornamentaci. Tyto produkty rozpadu karotenoidů jsou navíc pro organismus toxické (Siems et al., 2002).

Jejich deprese do ornamentu pak ukazuje na kvalitní nebarevné antioxidační zdroje (Hartley et al., 2004). Karotenoidy by podle této hypotézy měly zastávat jiné funkce v organismu, například imunostimulační nebo funkce při formaci embrya.

Na základě této hypotézy byla navržena nová Carotenoid maintenance hypothesis (Vinkler a Albrecht, 2009, in press), navrhuující, že četnost karotenoidních ornamentů může být udržována rovnováhou mezi pozitivní funkcí karotenoidů a škodlivým vlivem jejich nebarevných štěpných produktů. Tato rovnováha závisí na dostupnosti jiných antioxidačních rezerv, pokud ty jsou malé, pak jsou karotenoidy preferenčně degradovány (Obr...). Opět se počítá s vlivem testosteronu, který zároveň zvyšuje přístupnost karotenoidů pro ornament, ale zároveň zhoršuje oxidativní stav.

Hlavní předpoklad hypotézy je, že jedinci by měli spíše optimalizovat, než maximalizovat, příjem karotenoidů, neboť vysoké dávky karotenoidů mohou být nebezpečné pro organismus. Přítomnost většího množství karotenoidů v organismu může představovat handicap a jen nejlepší jedinci mohou udržovat vysoké hladiny karotenoidů pro rozvinutí nejlepšího ornamentu (Bertrand, Faivre & Sorci, 2006; Pike et al., 2007).





Obr.8. Hypotetický vztah mezi testosteronem a karotenoidy s přihlédnutím k dostupnosti antioxidantních zdrojů. Symboly + a - naznačují předpokládané pozitivní a negativní vztahy (Vinkler a Albrecht, 2009, in press).

Jinými slovy, hypotéza předpokládá, že pro zdravé jedince karotenoidy nepředstavují závažný problém, ale pokud je jedinec podvyživen, nebo nemocen, může pro něj vyšší dávka karotenoidů znamenat velké nebezpečí.

Vystavení karotenoidů do peří proto může být teoreticky strategií jak se vyhnout negativnímu působení karotenoidů v organismu, nicméně růst jakékoli nové tkáně (včetně peří) je nevyhnutelně spojen se zvýšením metabolismu v daném místě a tím i zvýšení oxidačního stresu (Nagy, 2000; Rollo, 2002). Takže vystavení karotenoidů do rostoucích per bez přítomnosti jiných antioxidantů může zhoršit škodlivý vliv na zdraví jedince bez pozitivního vlivu zbarvení. Navíc pokud štěpné produkty karotenoidů inhibují růst, pak může přítomnost karotenoidů narušit i vývoj ornamentu.

Tradiční vysvětlení funkce karotenoidů nemusí být udržitelné, objevují se nové hypotézy, které spíše uvažují v intencích handicapu, a jen experimentální práce může přinést řešení problému.

Vinkler a Albrecht navrhuji následující možnosti testování této hypotézy:

- 1) zvíře bude chováno v sociálním stresu,
- 2) bude dostávat omezené množství potravy,
- 3) bude mít dlouhodobě stimulované imunitní funkce (například podáváním parazitů),
- 4) a zvýšenou metabolickou aktivitu.

Při těchto experimentálních podmínkách se dle nově navržené hypotézy očekává snížení příjmu karotenoidů (zvíře se bude snažit vyhnout potravě bohaté na karotenoidy) a žádný nebo nepříznivý efekt suplementace karotenoidy na rozvinutí ornamentu a na imunitu.

Pokud předpokládáme synergistické působení antioxidantů, pak přidání například vitamínu E či C do potravy by mělo vést ke zlepšení antioxidační obrany organismu a zbarvení.

### **3. Karotenoidy a pohlavní výběr**

Rozhodující předpoklad většiny hlavních modelů pohlavního výběru tvrdí (hlavně indikátorový model pohlavního výběru), že sekundární pohlavní znaky jsou čestnými signály fenotypické, či genetické kvality svých nositelů. Spolehlivost této informace je zajištěna potřebou vysokých nákladů na produkci či udržení takového znaku (Andersson, 1986; Zahavi, 1975). Karotenoidy si zvířata neumí vyrobit a musí je získávat z potravy, což může být náročné na čas a vyhledávací schopnosti jedince, exprese takového znaku je tedy ovlivněna dostupností a příjmem z potravy (Hill et al., 2002; Karino & Haijima, 2004). Kromě toho mají karotenoidy i jiné funkce v organismu a vystupují v určitých trade-off, která jsem zmínila výše a která jsou kondičně závislá (Hill et al., 1994a; Thompson et al., 1997).

Dalším požadavkem tohoto modelu je vysoká variabilita signálu napříč populací a tyto znaky by měly ukazovat dědičnou genetickou variabilitu (Andersson, 1994). Ovšem genetický základ ovlivňuje karotenoidní ornamenty spíše nepřímo, například: enzymy potřebné k absorpci, či metabolizaci karotenoidů (Merila, Kruuk & Sheldon, 2001). Obecné příčiny čestné signalizace byly probrány v předchozí kapitole a zde se zaměřím na evidenci role karotenoidů v pohlavním výběru.

Ačkoli se již dlouho předpokládá, že primární funkcí barevných ornamentů (zvláště u ptačích samců) je přivábit partnera a že jasné zbarvení vzniklo v odpovědi na samičí výběr (Burley & Coopersmith, 1987; Maan, Seehausen, Soderberg, Johnson, Ripmeester, Mrosso, Taylor, van Dooren & Van Alphen, 2004; Pauers, McKinnon & Ehlinger, 2004; Seehausen, Mayhew & Van Alphen, 1999). Tato hypotéza začala být intenzivně studována teprve v nedávné době. Předpokládá se, že různé pigmenty využívané v ornamentu mívají různý informační obsah (Mcgraw et al., 2002). Většinou se například pracuje s melaniny jako signály hormonálního stavu a dominance či bojové připravenosti a měří se velikost či symetrie ornamentu, zatímco karotenoidy jsou považovány za signály vyjadřující vyhledávací schopnosti či zdraví jedince a pracuje se často jen s jejich barvou. Jak jsem ukázala v předchozí kapitole, karotenoidní znaky mohou být ovlivňovány působením mnoha faktorů. Nejdřív se zde budu zabývat důkazy pro funkci karotenoidních ornamentů v samičím výběru.

#### **3.1. Vliv barvy ornamentu na pohlavní výběr**

Jedním z kritérií pro samičí výběr v rámci ornamentu může být jeho barva. Existují různé přístupy jak zkoumat její vliv na výběr partnera. Jako první se uplatňovaly korelační studie, při kterých se sleduje přirozená úroveň barev. To znamená, že není ovlivňována suplementací

přidanými karotenoidy, ani barvením. Při pozorování hýla mexického (*Carpodacus mexicanus*), bylo zjištěno, že samice při výběru partnera preferují samce s barevnějším hrudním ornamentem (Hill, 1990). Podle dalších podobných studií si samice vybírali samce, jejichž ornament byl barevnější (DeKogel & Prijs, 1996; Karubian, 2002).

Korelační studie všeobecně, ale jistě ne univerzálně podporují myšlenku, že karotenoidní zbarvení je využíváno samicemi k výběru partnera. Přesto pokud není s ornamentem manipulováno, nemůžeme vyloučit výběr pro jiný znak, který může pozitivně korelovat se zbarvením ornamentu, namísto výběru pro samotný ornament. Po manipulaci s barvou si samice opět přednostně vybíraly samce s barevnějším ornamentem (Hill, 1990), což byl první přímý experimentální důkaz samičího výběru pro barevnější ornament. Samci byli v těchto pokusech odděleni a nebyli tak vystaveni samičí kompetici, samice si tedy nemohla vybírat podle jejich interakcí, ale musela se spolehnout na některou část vzhledu či chování samotného samce. Stejných výsledků bylo dosaženo i při manipulaci s barvou zobáku u zebřiček (*Taenopygia guttata*), kdy samice preferovaly samce s červenějšími zobáky (Burley et al., 1987).

Při manipulaci pomocí suplementace (přidané karotenoidy v potravě či vodě) samci vykazovali barevnější ornament a opět se potvrdila preference pro samce s nejčervenějším ornamentem (Blount et al., 2003; Hill, 1990; Hill, 1991; Hill, 1992; Hill et al., 1994b). Kromě barvy byl v jednom pokusu sledován i vliv velikosti, zpěvu, aktivity a projevů dominance, ale žádný z těchto znaků signifikantně nekoreloval se samičími preferencemi, což ukazuje, že předmětem výběru byl pouze ornament (Hill, 1990). Samice si dle ornamentu mohou vybírat starší a zkušenější samce pro hnízdění, neboť u některých druhů mají starší samci kvalitnější zbarvení (Kokko & Lindstrom, 1996).

Podle některých prací však neexistuje vztah mezi kvalitou ornamentu a samičím výběrem (Pryke & Andersson, 2003). Karotenoidní ornament by tak u některých druhů mohl mít spíše význam při kompetici (Mcgraw & Hill, 2000; Pryke, Lawes & Andersson, 2001).

Je otázkou, jakou výhodu přináší samcům lepší zbarvení. Pokud samice preferují samce s jasnějšími ornamenty, pak jde o zvýšený pářicí úspěch. Pokud chce samec uspět v rozmnožování a zanechat po sobě co nejvíce potomků, pak nestačí, že on sám je v dobré kondici, ale měl by si pro sebe vybrat také kvalitní partnerku (Hill, 1993), což mu v mírném pásmu zaručí, že může začít hnízdit dříve v sezoně a vychovat tak více potomků. Samci s červenějším či sytější ornamentem začínají hnízdění dřív a mají větší pářicí úspěch (Hill, Nolan & Stoehr, 1999; Mcgraw, Stoehr, Nolan & Hill, 2001). Také barva integumentu - zobáku může být dobrou předpovědí pářicího úspěchu (Omland, 1996a; Omland, 1996b;

Peters, Denk, Delhey & Kempenaers, 2004). Celkově reprodukční úspěch koreluje s ornamentací, Albrecht et al. (2009, in press) navrhuje, že ornamentace koreluje s kvalitou ejakulátu.

Barva skvrny tedy koreluje s reprodukčním úspěchem samců, a to ze dvou důvodů. Jednak samec s červenější skvrnou má větší šanci na přilákání samice a dále lepší samci přitahují lepší samice a tyto páry začnou hnízdit dřív a vyvedou víc mladých.

### **3.2. Vliv velikosti, či symetrie ornamentu na pohlavní výběr**

Dalším kritériem výběru může být velikost či pravolevá symetrie ornamentu. Na velikost skvrny se zaměřují spíše studie melaninů, které předpokládají, že velikost koreluje s dominancí. Je pravděpodobné, že i velikost karotenoidního znaku poskytuje samici jinou informaci o kondici než zbarvení (Badyaev, Hill, Dunn & Glen, 2001). Zatímco zbarvení je ovlivňováno převážně prostředím, velikost skvrny by mohla být záležitostí genetickou, jak je tomu například u pavího očka (*Poecilia reticulata*) (Endler, 1995), takže barva a velikost ukazují jiné informace o kvalitě jedince (Badyaev et al., 2001) s jinou ontogenetickou kontrolou, dědivostí a závislostí na kondici. U ptáků zatím podobná data nebyla získána.

Samice preferují samce s větší skvrnou (Senar, Domenech & Camerino, 2005). Při pozorování volně žijících párů hýla mexického (*Carpodacus mexicanus*) měli spárovaní samci červenější ale také větší a symetričtější skvrnu než nespárovaní (Hill et al., 1999). Pokud si však samice měly vybrat mezi malou, ale jasně zbarvenou skvrnou a velkou vybledlou, vybraly si malou a jasnou (Hill, 1994a). Barva také může souviset spíše se symetrií než s velikostí (Badyaev et al., 2001; Hill, 1998).

Pro zjištění samotného vlivu barvy na samičí výběr navrhnul Hill (1991) experiment, při němž pochytané samce před hnízdní sezonou rozdělil na dvě skupiny, jedné skupině nabarvil ornament na žluto a druhé na červeno a eliminoval tím vliv velikosti i symetrie skvrny. Poté je znovu vypustil do přírody a sledoval jejich pářící úspěch. Po ustavení párů zjistil, že většina samců s červenou skvrnou se spárovala, většina se žlutou skvrnou zůstala sama, navíc samci s červenou skvrnou se párovali dříve. Což potvrzuje, že primárním kritériem výběru partnera je barva a velikost je pouze sekundární kritérium. Samci se proto vyplatí mít spíše malou, ale jasnou skvrnu, pokud má ztížený přístup ke karotenoidům.

### **3.3. Výhody pro samici při výběru podle ornamentu**

Jaké tedy může samice získat výhody, pokud si vybere samce s výraznějším ornamentem? Dle předchozích kapitol je zřejmé, že karotenoidní ornamenti jsou čestným signálem kvality samce. Výběrem partnera s kvalitním a výrazným ornamentem by si samice měla vybrat kvalitního partnera pro rozmnožování. Výhody takového svazku jsou dvojí - přímé a nepřímé.

#### **3.3.1. Přímé výhody**

Samice si mohou vybírat nejlépe ornamentovaného samce, protože umí obhájit nejlepší hnízdící či potravní zdroje. Pokud je druh teritoriální, samice získá přímou výhodu tím, že jí samec nabídne teritorium (Pryke & Lawes, 2004). Teritoria jsou omezenými zdroji, a pokud existuje rozdíl v kvalitě zdrojů, pak samci s nejlepším ornamentem by měli mít nejlepší teritoria a hnízda (Hansen & Rohwer, 1986). Čehož můžou využít samice při výběru partnera. Pokud lépe zbarvený samec obhájí lepší teritorium, vybere si samice barevnějšího samce a získá tím i lepší teritorium. Vztah mezi ornamenti a kvalitou teritoria ale může být udržován i intenzivní samčí kompeticí. V takovém případě je barva ornamentu signálem dominance při obraně teritoria a samice si mohou vybírat samce dle jiného znaku (Pryke, Andersson & Lawes, 2001). Ornamentace pak může sloužit ke kompetici nebo k rozpoznávání jedinců.

Přímé výhody vycházejí hlavně z péče samce o samici sedící na vejcích. Pokud je samec kvalitní nosí samici více potravy (Hill, 1991), a ta může mít větší snůšku (Nager, Ruegger & VanNoordwijk, 1997). Po vylíhnutí mláďat jejich další osud závisí na tom, jak je budou rodiče krmit a chránit, u ptáků je totiž péče obou rodičů zásadní pro úspěšné dokončení hnízdění. Pokud by si samice vybrala nekvalitního samce, snižovala by svůj současný i budoucí reprodukční úspěch, existuje proto silná selekce pro výběr kvalitního partnera a ornament může být v tomto směru relevantním signálem (Hoelzer, 1989). Pokud se totiž v rámci druhu neudrží rodičovské páry v průběhu celého roku, nebo pokud samec hnízdí poprvé, nemůže samice ohodnotit jeho rodičovské investice v předchozích letech a potřebuje využít jiný znak, který by jí ukázal možnosti svého partnera. Takovým znakem může být ornament.

#### **3.3.2. Nepřímé výhody**

Nepřímé výhody zvyšují spíše kvalitu (fitness) potomků nežli samotné samicemi. Podle některých pozorování se synové podobají svým otcům v expresi ornamentu, což může být výsledek jisté dědičné složky ornamentu (Hill, 1991). Otec ale může ovlivnit ornament svých

synů i behaviorálně, pokud je sám kvalitní, má barevný ornament a nosí mláďatům hodně potravy, mohou jim narůst také kvalitně zbarvená pera. Neexistuje tedy přímý důkaz pro dědičnou složku karotenoidního ornamentu u ptáků.

Jednou z nepřímých výhod může být právě přenos „dobrých genů“ (good genes) na své potomky. Všechny samice v populaci si proto budou vybírat atraktivního samce s nejlepším ornamentem, neboť tento samec by měl mít momentálně výhodné alely (Andersson, 1986). Tím že samec má barevnější ornament, může ukazovat na dobrou imunitu či antioxidační obranu. Jelikož je imunita také genetickou záležitostí, může kvalitní ornament znamenat lepší obranu proti nemocem a parazitům (Blount et al., 2003; Hamilton & Zuk, 1982).

Takzvané „dobré geny“ se mohou uplatnit při mimopárových kopulacích, protože pokud samec nepomáhá na hnízdě, tak by neměl samici přinést žádnou přímou výhodu. Positivní vztah mezi barvou ornamentu a procentem mimopárových kopulací byl u některých druhů prokázán (Albrecht et al., 2009, in press; Sundberg & Dixon, 1996). Avšak Hill (1994b) při studiu paternity nezjistil, že by červenější ornament měl vztah k počtu mimopárových kopulací, což naznačuje, že u některých druhů karotenoidní ornament nemusí být při těchto kopulacích významným signálem.

Jinou výhodu související s genotypem představuje hypotéza kompatibilních genů. Žádná studie kompatibility genů se dosud nezabývala barvou jako indikátorem příbuznosti, existují však důkazy že kompatibility je využívána v mimopárových kopulacích (Blomqvist, Andersson, Kupper, Cuthill, Kis, Lanctot, Sandercock, Szekely, Wallander & Kempenaers, 2002). Kompatibilita znamená, že samice hledá genom, který po kombinaci s jejím genomem dává nejživotaschopnější potomstvo. Určitý samec tak může být výhodný pro určitou samici, ale ne pro jinou (jedinci využívají tzv. self referential kriteria výběru partnera). V tomto modelu je ovšem těžké představit si absolutní znak, jakým je barva ornamentu, který by něco takového signalizoval (Mays & Hill, 2004). Výběr pro nejkompatibilnějšího partnera může být skrytý na úrovni buněk či fyziologických funkcí a je nepravděpodobné, že by zde hrála barva (a vůbec ornament) roli (Mays, Albrecht, Liu & Hill, 2008).

Je zřejmé, že vztah karotenoidního zbarvení a pohlavního výběru stále není plně objasněn. U některých druhů hraje toto zbarvení prokazatelnou roli ve výběru partnera, u jiných se zdá, že se uplatňuje spíše v kompetici. Také není jisté, jaký signál poskytuje příjemci a jaká trade off vystupují v jeho produkci. Přesvědčivé jsou ovšem studie manipulující expresi ornamentů a ukazují změnu atraktivity po manipulaci.

## ZÁVĚR:

Ač se fyziologické funkce karotenoidů považují již léta za zřejmé, recentní výsledky ukazují na alternativní vysvětlení jejich funkce v organismech. Není pochyb o tom, že karotenoidy jsou využívány pro deposici do ornamentu, který tak funguje jako čestný signál kvality svého nositele. Existují jistá trade off mezi deposicí karotenoidů do ornamentu a využitím v jiných fyziologických funkcích. Ta se však mezi sebou liší ve vysvětleních funkce karotenoidů v organismu a v mediátorech, která tato trade off mohou zprostředkovávat.

Proto by měla být lépe objasněna funkce testosteronu jako takového zprostředkovatele. Stále totiž chybí experimentální důkazy pro vzrůst příjmu karotenoidů po podání testosteronu, a není plně objasněn mechanismus, kterým testosteron ovlivňuje tuto trade off. Důležitý je také jeho potencionální vliv na degradační produkty karotenoidů.

Jejich deposici do ornamentů či využití v jiných fyziologických funkcích ovlivňuje mnoho faktorů, jako je například: parazitace, jejich dostupnost v prostředí, schopnost příjmu a metabolizace přijatých karotenoidů. Ani po několika desetiletích výzkumu v této oblasti, stále není plně objasněn vliv jednotlivých faktorů na fyziologické funkce karotenoidů.

Obecně se také předpokládá, že karotenoidy zastávají v organismech antioxidační funkci. Tato premisa je však závislá na podmínkách prostředí a interakcích s ostatními molekulami v těle. Ukazuje se, že při zvýšeném tlaku kyslíku, nebo vysoké koncentraci karotenoidů jejich vlastnosti přechází na prooxidační. Při tom můžou v organismech vytvářet reaktivní radikály, které dále poškozují tkáň.

Vinkler a Albrecht (2009, in press) navrhli hypotézu, v níž předpokládají, že skladování karotenoidů ve vysoké koncentraci v organismu může být nebezpečné, kvůli jejich prooxidačním vlastnostem, a to zvláště pokud je zvíře ve špatné kondici. Pokud je v dobré kondici, může mít dostatek karotenoidů pro barevný ornament a negativní vlivy karotenoidů ho příliš neovlivňují. Testování této hypotézy je naznačeno v kapitole o čestné signalisaci. Experimentálním ověřením této hypotézy se budu zabývat ve své diplomové práci, ať už se jedná o její ověření u pěvců (zebříčka, *Taenopygia guttata*) či u hrabavých (koroptyev polní, *Perdix perdix*).



## LITERATURA:

- Albrecht, T., Vinkler, M., Schnitzer, J., Poláková, R., Muclinger, P., & Bryja, J. (2009). Extra-pair fertilizations contribute to selection on secondary male ornamentation in a socially monogamous passerine. *In Press*.
- Alonso-Alvarez, C., Bertrand, S., Devevey, G., Gaillard, M., Prost, J., Faivre, B., & Sorci, G. (2004a). An experimental test of the dose-dependent effect of carotenoids and immune activation on sexual signals and antioxidant activity. *American Naturalist* **164**: 651-659.
- Alonso-Alvarez, C., Bertrand, S., Devevey, G., Prost, J., Faivre, B., Sorci, G., & Loeschcke, V. (2004b). IDEAS AND PERSPECTIVES Increased susceptibility to oxidative stress as a proximate cost of reproduction. *Ecology Letters* **7**: 363-368.
- Andersson, M. (1986). Evolution of Condition-Dependent Sex Ornaments and Mating Preferences: Sexual Selection Based on Viability Differences. *Evolution* **40**: 804-816.
- Angilletta, M. J. & Sears, M. W. (2000). The metabolic cost of reproduction in an oviparous lizard. *Functional Ecology* **14**: 39-45.
- Armstrong, G. A. & Hearst, J. E. (1996). Carotenoids .2. Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *Faseb Journal* **10**: 228-237.
- Badyaev, A. V. & Hill, G. E. (2000). Evolution of sexual dichromatism: contribution of carotenoid- versus melanin-based coloration. *Biological Journal of the Linnean Society* **69**: 153-172.
- Badyaev, A. V., Hill, G. E., Dunn, P. O., & Glen, J. C. (2001). Plumage color as a composite trait: Developmental and functional integration of sexual ornamentation. *American Naturalist* **158**: 221-235.
- Bertrand, S., Faivre, B., & Sorci, G. (2006). Do carotenoid-based sexual traits signal the availability of non-pigmentary antioxidants? *Journal of Experimental Biology* **209**: 4414-4419.
- Bierer, T. L., Merchen, N. R., & Erdman, J. W., Jr. (1995). Comparative Absorption and Transport of Five Common Carotenoids in Preruminant Calves. *J. Nutr.* **125**: 1569-1577.
- Blomqvist, D., Andersson, M., Kupper, C., Cuthill, I. C., Kis, J., Lanctot, R. B., Sandercock, B. K., Szekely, T., Wallander, J., & Kempenaers, B. (2002). Genetic similarity between mates and extra-pair parentage in three species of shorebirds. *Nature* **419**: 613-615.
- Blount, J. D., Metcalfe, N. B., Birkhead, T. R., & Surai, P. F. (2003). Carotenoid modulation of immune function and sexual attractiveness in zebra finches. *Science* **300**: 125-127.
- Bohm, F., Edge, R., Land, E. J., McGarvey, D. J., & Truscott, T. G. (1997). Carotenoids Enhance Vitamin E Antioxidant Efficiency. *Journal of the American Chemical Society* **119**: 621-622.

- Britton, G. (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to function. *Faseb Journal* **9**: 1551-1558.
- Brush, A. H. & Power, D. M. (1976). House Finch Pigmentation - Carotenoid Metabolism and Effect of Diet. *Auk* **93**: 725-739.
- Buchanan, K. L., Evans, M. R., Goldsmith, A. R., Bryant, D. M., & Rowe, L. V. (2001). Testosterone influences basal metabolic rate in male house sparrows: a new cost of dominance signalling? *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **268**: 1337-1344.
- Burley, N. & Coopersmith, C. B. (1987). Bill Color Preferences of Zebra Finches. *Ethology* **76**: 133-151.
- Buttle, L., Crampton, V., & Williams, P. (2001). The effect of feed pigment type on flesh pigment deposition and colour in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquaculture Research* **32**: 103-111.
- Candolin, U. (1999). Male-male competition facilitates female choice in sticklebacks. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **266**: 785-789.
- Castenmiller, J. J. M. & West, C. E. (1998). Bioavailability and bioconversion of carotenoids. *Annual Review of Nutrition* **18**: 19-38.
- Chew, B. P. (1993). Role of Carotenoids in the Immune-Response. *Journal of Dairy Science* **76**: 2804-2811.
- Clark, R. M. & Furr, H. C. (2001). Absorption of canthaxanthin by the rat is influenced by total lipid in the intestinal lumen. *Lipids* **36**: 473-475.
- Clark, R. M., Yao, L. L., She, L., & Furr, H. C. (1998). A comparison of lycopene and canthaxanthin absorption: Using the rat to study the absorption of non-provitamin A carotenoids. *Lipids* **33**: 159-163.
- Costantini, D. & Moller, A. P. (2008). Carotenoids are minor antioxidants for birds. *Functional Ecology* **22**: 367-370.
- Davies, B. H. (1985). Carotenoid Metabolism in Animals - A Biochemists View. *Pure and Applied Chemistry* **57**: 679-684.
- Davis, R. A. (1997). Evolution of processes and regulators of lipoprotein synthesis: From birds to mammals. *J. Nutr.* **127**: S795-S800.
- DeKogel, C. H. & Prijs, H. J. (1996). Effects of brood size manipulations on sexual attractiveness of offspring in the zebra finch. *Animal Behaviour* **51**: 699-708.
- del Val, E., Senar, J. C., Garrido-Fernandez, J., Jaren, M., Borrás, A., Cabrera, J., & Negro, J. J. (2009a). Hepatic conversion of red carotenoids in passerine birds. *Naturwissenschaften* **96**: 989-991.

- del Val, E., Senar, J. C., Garrido-Fernandez, J., Jaren, M., Borrás, A., Cabrera, J., & Negro, J. J. (2009b). The liver but not the skin is the site for conversion of a red carotenoid in a passerine bird. *Naturwissenschaften* **96**: 797-801.
- Demmig-Adams, B., Gilmore, A. M., & Adams, W. W., III (1996). Carotenoids 3: in vivo function of carotenoids in higher plants. *FASEB J.* **10**: 403-412.
- Doolan, B. J., Booth, M. A., Allan, G. L., & Jones, P. L. (2008). Effects of dietary astaxanthin concentration and feeding period on the skin pigmentation of Australian snapper *Pagrus auratus* (Bloch & Schneider, 1801). *Aquaculture Research* **40**: 60-68.
- Edge, R., McGarvey, D. J., & Truscott, T. G. (1997a). The carotenoids as anti-oxidants - a review. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology* **41**: 189-200.
- Edge, R. & Truscott, T. G. (1997b). Prooxidant and antioxidant reaction mechanisms of carotene and radical interactions with vitamins E and C. *Nutrition* **13**: 992-994.
- Endler, J. A. (1995). Multiple-Trait Coevolution and Environmental Gradients in Guppies. *Trends in Ecology & Evolution* **10**: 22-29.
- Erdman, J. W., Bierer, T. L., & Gugger, E. T. (1993). Absorption and Transport of Carotenoids. *Carotenoids in Human Health* **691**: 76-85.
- Evans, M. R., Goldsmith, A. R., & Norris, S. R. A. (2000). The effects of testosterone on antibody production and plumage coloration in male house sparrows (*Passer domesticus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* **47**: 156-163.
- Faivre, B., Gregoire, A., Preault, M., Cezilly, F., & Sorci, G. (2003). Immune activation rapidly mirrored in a secondary sexual trait. *Science* **300**: 103.
- FIGUEROLA, J. O. R. D. & SENAR, J. C. (2005). Seasonal changes in carotenoid- and melanin-based plumage coloration in the Great Tit *Parus major*. *Ibis* **147**: 797-802.
- Finkel, T. & Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* **408**: 239-247.
- Fitze, P. S. & Richner, H. (2002). Differential effects of a parasite on ornamental structures based on melanins and carotenoids. *Behav. Ecol.* **13**: 401-407.
- Folstad, I. & Karter, A. J. (1992). Parasites, Bright Males, and the Immunocompetence Handicap. *American Naturalist* **139**: 603-622.
- Furr, H. C. & Clark, R. M. (1997). Intestinal absorption and tissue distribution of carotenoids. *Journal of Nutritional Biochemistry* **8**: 364-377.
- Gala, R. R. & Westphal, U. (1965). Studies on Sex Difference in Corticosteroid-Binding Activity of Rat Serum. *Federation Proceedings* **24**: 574-&.
- Gonzalez, G., Sorci, G., Smith, L. C., & de Lope, F. (2001). Testosterone and sexual signalling in male house sparrows (*Passer domesticus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* **50**: 557-562.

- Grether, G. F., Hudon, J., & Millie, D. F. (1999). Carotenoid limitation of sexual coloration along an environmental gradient in guppies. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **266**: 1317-1322.
- Hamilton, W. D. & Zuk, M. (1982). Heritable True Fitness and Bright Birds - A Role for Parasites. *Science* **218**: 384-387.
- Hansen, A. J. & Rohwer, S. (1986). Coverable Badges and Resource Defense in Birds. *Animal Behaviour* **34**: 69-76.
- Hartley, R. C. & Kennedy, M. W. (2004). Are carotenoids a red herring in sexual display? *Trends in Ecology & Evolution* **19**: 353-354.
- Hencken, H. (1992). Chemical and Physiological Behavior of Feed Carotenoids and Their Effects on Pigmentation. *Poultry Science* **71**: 711-&.
- Hill, G. E. (1990). Female House Finches Prefer Colorful Males - Sexual Selection for A Condition-Dependent Trait. *Animal Behaviour* **40**: 563-572.
- Hill, G. E. (1991). Plumage Coloration Is A Sexually Selected Indicator of Male Quality. *Nature* **350**: 337-339.
- Hill, G. E. (1992). Proximate Basis of Variation in Carotenoid Pigmentation in Male House Finches. *Auk* **109**: U1-12.
- Hill, G. E. (1993). Male Mate Choice and the Evolution of Female Plumage Coloration in the House Finch. *Evolution* **47**: 1515-1525.
- Hill, G. E. (1994a). Geographic-Variation in Male Ornamentation and Female Mate Preference in the House Finch - A Comparative Test of Models of Sexual Selection. *Behav. Ecol.* **5**: 64-73.
- Hill, G. E. (1994b). Trait Elaboration Via Adaptive Mate Choice - Sexual Conflict in the Evolution of Signals of Male Quality. *Ethology Ecology & Evolution* **6**: 351-370.
- Hill, G. E. (1996). Redness as a measure of the production cost of ornamental coloration. *Ethology Ecology & Evolution* **8**: 157-175.
- Hill, G. E. (1998). Plumage redness and pigment symmetry in the House Finch. *Journal of Avian Biology* **29**: 86-92.
- Hill, G. E. (2000). Energetic constraints on expression of carotenoid-based plumage coloration. *Journal of Avian Biology* **31**: 559-566.
- Hill, G. E., Farmer, K. L., & Beck, M. L. (2004). The effect of mycoplasmosis on carotenoid plumage coloration in male house finches. *Journal of Experimental Biology* **207**: 2095-2099.
- Hill, G. E., Hood, W. R., & Huggins, K. (2009). A multifactorial test of the effects of carotenoid access, food intake and parasite load on the production of ornamental feathers and bill coloration in American goldfinches. *Journal of Experimental Biology* **212**: 1225-1233.

- Hill, G. E., Inouye, C. Y., & Montgomerie, R. (2002). Dietary carotenoids predict plumage coloration in wild house finches. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **269**: 1119-1124.
- Hill, G. E. & Montgomerie, R. (1994a). Plumage Color Signals Nutritional Condition in the House Finch. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **258**: 47-52.
- Hill, G. E., Montgomerie, R., Inouye, C. Y., & Dale, J. (1994b). Influence of Dietary Carotenoids on Plasma and Plumage Color in the House Finch - Intrasexual and Intersexual Variation. *Functional Ecology* **8**: 343-350.
- Hill, G. E., Nolan, P. M., & Stoehr, A. M. (1999). Pairing success relative to male plumage redness and pigment symmetry in the house finch: temporal and geographic constancy. *Behav. Ecol.* **10**: 48-53.
- Ho, C. C., de Moura, F. F., Kim, S. H., & Clifford, A. J. (2007). Excentral cleavage of beta-carotene in vivo in a healthy man. *Am J Clin Nutr* **85**: 770-777.
- Hoelzer, G. A. (1989). The Good Parent Process of Sexual Selection. *Animal Behaviour* **38**: 1067-1078.
- Horak, P., Saks, L., Ots, I., Kullissaar, T., Kollist, H., & Zilmer, M. (2003). Physiological effects of immune challenge in captive greenfinches (*Carduelis chloris*). *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne de Zoologie* **81**: 371-379.
- Hughes, D. A. (2001). Dietary carotenoids and human immune function. *Nutrition* **17**: 823-827.
- Inouye, C. Y., Hill, G. E., Stradi, R. D., & Montgomerie, R. (2001). Carotenoid pigments in male House Finch plumage in relation to age, subspecies, and ornamental coloration. *Auk* **118**: 900-915.
- Johnsen, A., Delhey, K., Andersson, S., & Kempenaers, B. (2003). Plumage colour in nestling blue tits: sexual dichromatism, condition dependence and genetic effects. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **270**: 1263-1270.
- Kalariya, N. M., Ramana, K. V., Srivastava, S. K., & van Kuijk, F. J. G. M. (2008). Carotenoid derived aldehydes-induced oxidative stress causes apoptotic cell death in human retinal pigment epithelial cells. *Experimental Eye Research* **86**: 70-80.
- Karino, K. & Haijima, Y. (2004). Algal-diet enhances sexual ornament, growth and reproduction in the guppy. *Behaviour* **141**: 585-601.
- Karubian, J. (2002). Costs and benefits of variable breeding plumage in the red-backed fairy-wren. *Evolution* **56**: 1673-1682.
- Ketterson, E. D., Nolan, V., Wolf, L., & Ziegenfus, C. (1992). Testosterone and Avian Life Histories - Effects of Experimentally Elevated Testosterone on Behavior and Correlates of Fitness in the Dark-Eyed Junco (*Junco-Hyemalis*). *American Naturalist* **140**: 980-999.

- Kiokias, S. & Gordon, M. H. (2004). Antioxidant properties of carotenoids in vitro and in vivo. *Food Reviews International* **20**: 99-121.
- Kokko, H. & Lindstrom, J. (1996). Evolution of female preference for old mates. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **263**: 1533-1538.
- Lowe, M. E. (1994). Pancreatic Triglyceride Lipase and Colipase - Insights Into Dietary-Fat Digestion. *Gastroenterology* **107**: 1524-1536.
- Lozano, G. A. (1994). Carotenoids, Parasites, and Sexual Selection. *Oikos* **70**: 309-311.
- Maan, M. E., Seehausen, O., Soderberg, L., Johnson, L., Ripmeester, E. A. P., Mrosso, H. D. J., Taylor, M. I., van Dooren, T. J. M., & Van Alphen, J. J. M. (2004). Intraspecific sexual selection on a speciation trait, male coloration, in the Lake Victoria cichlid *Pundamilia nyererei*. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **271**: 2445-2452.
- Mays, H. L., Albrecht, T., Liu, M., & Hill, G. E. (2008). Female choice for genetic complementarity in birds: a review. *Genetica* **134**: 147-158.
- Mays, H. L. & Hill, G. E. (2004). Choosing mates: good genes versus genes that are a good fit. *Trends in Ecology & Evolution* **19**: 554-559.
- Mcgraw, K. J. (2004). Colorful songbirds metabolize carotenoids at the integument. *Journal of Avian Biology* **35**: 471-476.
- Mcgraw, K. J. (2005). Interspecific variation in dietary carotenoid assimilation in birds: Links to phylogeny and color ornamentation. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* **142**: 245-250.
- Mcgraw, K. J. (2009). Identifying anatomical sites of carotenoid metabolism in birds. *Naturwissenschaften* **96**: 987-988.
- Mcgraw, K. J., Adkins-Regan, E., & Parker, R. S. (2002). Anhydrolutein in the zebra finch: a new, metabolically-derived carotenoid in birds. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* **132**: 811-818.
- Mcgraw, K. J. & Ardia, D. R. (2005). Sex differences in carotenoid status and immune performance in zebra finches. *Evolutionary Ecology Research* **7**: 251-262.
- Mcgraw, K. J. & Ardia, D. R. (2007). Do carotenoids buffer testosterone-induced immunosuppression? An experimental test in a colourful songbird. *Biology Letters* **3**: 375-378.
- Mcgraw, K. J., Beebee, M. D., Hill, G. E., & Parker, R. S. (2003). Lutein-based plumage coloration in songbirds is a consequence of selective pigment incorporation into feathers. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* **135**: 689-696.
- Mcgraw, K. J., Correa, S. M., & Adkins-Regan, E. (2006). Testosterone upregulates lipoprotein status to control sexual attractiveness in a colorful songbird. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **60**: 117-122.

- Mcgraw, K. J. & Gregory, A. J. (2004). Carotenoid pigments in male American goldfinches: what is the optimal biochemical strategy for becoming colourful? *Biological Journal of the Linnean Society* **83**: 273-280.
- Mcgraw, K. J. & Hill, G. E. (2000). Plumage brightness and breeding-season dominance in the House Finch: A negatively correlated handicap? *Condor* **102**: 456-461.
- Mcgraw, K. J., Hill, G. E., & Parker, R. S. (2005). The physiological costs of being colourful: nutritional control of carotenoid utilization in the American goldfinch, *Carduelis tristis*. *Animal Behaviour* **69**: 653-660.
- Mcgraw, K. J., Hill, G. E., Stradi, R., & Parker, R. S. (2001). The influence of carotenoid acquisition and utilization on the maintenance of species-typical plumage pigmentation in male American goldfinches (*Carduelis tristis*) and northern cardinals (*Cardinalis cardinalis*). *Physiological and Biochemical Zoology* **74**: 843-852.
- Mcgraw, K. J., Hill, G. E., Stradi, R., & Parker, R. S. (2002). The effect of dietary carotenoid access on sexual dichromatism and plumage pigment composition in the American goldfinch. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* **131**: 261-269.
- Mcgraw, K. J., Mackillop, E. A., Dale, J., & Hauber, M. E. (2002). Different colors reveal different information: how nutritional stress affects the expression of melanin- and structurally based ornamental plumage. *Journal of Experimental Biology* **205**: 3747-3755.
- Mcgraw, K. J., Nolan, P. M., & CRINO, O. L. (2006). Carotenoid accumulation strategies for becoming a colourful House Finch: analyses of plasma and liver pigments in wild moulting birds. *Functional Ecology* **20**: 678-688.
- Mcgraw, K. J. & Parker, R. S. (2006). A novel lipoprotein-mediated mechanism controlling sexual attractiveness in a colorful songbird. *Physiology & Behavior* **87**: 103-108.
- Mcgraw, K. J., Stoehr, A. M., Nolan, P. M., & Hill, G. E. (2001). Plumage redness predicts breeding onset and reproductive success in the House Finch: a validation of Darwin's theory. *Journal of Avian Biology* **32**: 90-94.
- McGraw, K. J., Klasing, K. C., & Dufty Jr, A. M. (2006). CAROTENOIDS, IMMUNITY, AND INTEGUMENTARY COLORATION IN RED JUNGLEFOWL (*GALLUS GALLUS*). *The Auk* **123**: 1161-1171.
- Menon, G. K. & Menon, J. (2000). Avian epidermal lipids: Functional considerations and relationship to feathering. *American Zoologist* **40**: 540-552.
- Merila, J., Kruuk, L. E. B., & Sheldon, B. C. (2001). Natural selection on the genetical component of variance in body condition in a wild bird population. *Journal of Evolutionary Biology* **14**: 918-929.
- Metusalach, Synowiecki, J., Brown, J., & Shahidi, F. (1996). Deposition and metabolism of dietary canthaxanthin in different organs of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L). *Aquaculture* **142**: 99-106.

- Milborrow, B. V. (2001). The pathway of biosynthesis of abscisic acid in vascular plants: a review of the present state of knowledge of ABA biosynthesis. *J. Exp. Bot.* **52**: 1145-1164.
- Moller, A. P., Biard, C., Blount, J. D., Houston, D. C., Ninni, P., Saino, N., & Surai, P. F. (2000). Carotenoid-dependent signals: Indicators of foraging efficiency, immunocompetence or detoxification ability? *Avian and Poultry Biology Reviews* **11**: 137-159.
- Mordi, R. C., Walton, J. C., Burton, G. W., Hughes, L., Ingold, K. U., Lindsay, D. A., & Moffatt, D. J. (1993). Oxidative-Degradation of Beta-Carotene and Beta-Apo-8'-Carotenal. *Tetrahedron* **49**: 911-928.
- Mortensen, A. & Skibsted, L. H. (1997). Importance of Carotenoid Structure in Radical-Scavenging Reactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**: 2970-2977.
- Murphy, M. E. & Sies, H. (1991). Reversible Conversion of Nitroxyl Anion to Nitric-Oxide by Superoxide-Dismutase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**: 10860-10864.
- Nager, R. G., Ruegger, C., & VanNoordwijk, A. J. (1997). Nutrient or energy limitation on egg formation: A feeding experiment in great tits. *Journal of Animal Ecology* **66**: 495-507.
- Nagy, K. A. (2000). Energy costs of growth in neonate reptiles. *Herpetological Monographs* 378-387.
- Negro, J. J., Figuerola, J., Garrido, J., & Green, A. J. (2001). Fat stores in birds: an overlooked sink for carotenoid pigments? *Functional Ecology* **15**: 297-303.
- Ness, G. C. & Chambers, C. M. (2000). Feedback and hormonal regulation of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase: The concept of cholesterol buffering capacity. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **224**: 8-19.
- Olson, J. A. & Hayaishi, O. (1965). Enzymatic Cleavage of Beta-Carotene Into Vitamin A by Soluble Enzymes of Rat Liver and Intestine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **54**: 1364-&.
- Olson, V. A. & Owens, I. P. F. (1998). Costly sexual signals: are carotenoids rare, risky or required? *Trends in Ecology & Evolution* **13**: 510-514.
- Omland, K. E. (1996a). Female mallard mating preferences for multiple male ornaments .1. Natural variation. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **39**: 353-360.
- Omland, K. E. (1996b). Female mallard mating preferences for multiple male ornaments .2. Experimental variation. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **39**: 361-366.
- Parker, R. S. (1989). Carotenoids in Human-Blood and Tissues. *J. Nutr.* **119**: 101-104.
- Parker, R. S. (1996). Carotenoids .4. Absorption, metabolism, and transport of carotenoids. *Faseb Journal* **10**: 542-551.
- Pauers, M. J., McKinnon, J. S., & Ehlinger, T. J. (2004). Directional sexual selection on chroma and within-pattern colour contrast in *Labeotropheus fuelleborni*. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **271**: S444-S447.



- Perez-Rodriguez, L., Mougeot, F., Alonso-Alvarez, C., Blas, J., Vinuela, J., & Bortolotti, G. R. (2008). Cell-mediated immune activation rapidly decreases plasma carotenoids but does not affect oxidative stress in red-legged partridges (*Alectoris rufa*). *Journal of Experimental Biology* **211**: 2155-2161.
- Peters, A. (2007). Testosterone and carotenoids: an integrated view of trade-offs between immunity and sexual signalling. *Bioessays* **29**: 427-430.
- Peters, A., Denk, A. G., Delhey, K., & Kempenaers, B. (2004). Carotenoid-based bill colour as an indicator of immunocompetence and sperm performance in male mallards. *Journal of Evolutionary Biology* **17**: 1111-1120.
- Pike, T. W., Blount, J. D., Lindstrom, J., & Metcalfe, N. B. (2007). Availability of non-carotenoid antioxidants affects the expression of a carotenoid-based sexual ornament. *Biology Letters* **3**: 353-356.
- Pryke, S. R. & Andersson, S. (2003). Carotenoid-based epaulettes reveal male competitive ability: experiments with resident and floater red-shouldered widowbirds. *Animal Behaviour* **66**: 217-224.
- Pryke, S. R., Andersson, S., & Lawes, M. J. (2001). Sexual selection of multiple handicaps in the red-collared widowbird: Female choice of tail length but not carotenoid display. *Evolution* **55**: 1452-1463.
- Pryke, S. R. & Lawes, M. J. (2004). Female nest dispersion and breeding biology of polygynous Red-collared Widowbirds (*Euplectes ardens*). *Auk* **121**: 1226-1237.
- Pryke, S. R., Lawes, M. J., & Andersson, S. (2001). Agonistic carotenoid signalling in male red-collared widowbirds: aggression related to the colour signal of both the territory owner and model intruder. *Animal Behaviour* **62**: 695-704.
- Raila, J., Schuhmacher, A., Gropp, J., & Schweigert, F. J. (2002). Selective absorption of carotenoids in the common green iguana (*Iguana iguana*). *Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular and Integrative Physiology* **132**: 513-518.
- Redmond, T. M., Gentleman, S., Duncan, T., Yu, S., Wiggert, B., Gantt, E., & Cunningham, F. X. (2001). Identification, expression, and substrate specificity of a mammalian beta-carotene 15,15'-dioxygenase. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 6560-6565.
- Roberts, M. L., Buchanan, K. L., & Evans, M. R. (2004). Testing the immunocompetence handicap hypothesis: a review of the evidence. *Animal Behaviour* **68**: 227-239.
- Rogowitz, G. L. (1996). Trade-offs in energy allocation during lactation. *American Zoologist* **36**: 197-204.
- Rollo, C. D. (2002). Growth negatively impacts the life span of mammals. *Evolution & Development* **4**: 55-61.
- Roodenburg, A. J. C., Leenen, R., Hof, K. H. V., Weststrate, J. A., & Tijburg, L. B. M. (2000). Amount of fat in the diet affects bioavailability of lutein esters but not of alpha-carotene, beta-carotene, and vitamin E in humans. *Am J Clin Nutr* **71**: 1187-1193.

- Rottem, S. & Markowitz, O. (1979). Carotenoids Act As Reinforcers of the Acholeplasma-Laidlawii Lipid Bilayer. *Journal of Bacteriology* **140**: 944-948.
- Saks, L., McGraw, K., & Horak, P. (2003). How feather colour reflects its carotenoid content. *Functional Ecology* **17**: 555-561.
- Schiedt, K., Leuenberger, F. J., Vecchi, M., & Glinz, E. (1985). Absorption, Retention and Metabolic Transformations of Carotenoids in Rainbow-Trout, Salmon and Chicken. *Pure and Applied Chemistry* **57**: 685-692.
- Seehausen, O., Mayhew, P. J., & Van Alphen, J. J. M. (1999). Evolution of colour patterns in East African cichlid fish. *Journal of Evolutionary Biology* **12**: 514-534.
- Senar, J. C., Domenech, J., & Camerino, M. (2005). Female siskins choose mates by the size of the yellow wing stripe. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **57**: 465-469.
- Shawkey, M. D., Pillai, S. R., & Hill, G. E. (2009). Do feather-degrading bacteria affect sexually selected plumage color? *Naturwissenschaften* **96**: 123-128.
- Siems, W., Sommerburg, O., Schild, L., Augustin, W., Langhans, C. D., & Wiswedel, I. (2002). beta-Carotene cleavage products induce oxidative stress in vitro by impairing mitochondrial respiration. *Faseb Journal* **16**: 1289-+.
- Siems, W., Wiswedel, I., Salerno, C., Crifo, C., Augustin, W., Schild, L., Langhans, C. D., & Sommerburg, O. (2005). beta-carotene breakdown products may impair mitochondrial functions - potential side effects of high-dose beta-carotene supplementation. *Journal of Nutritional Biochemistry* **16**: 385-397.
- Sies, H. (1993). Strategies of Antioxidant Defense. *European Journal of Biochemistry* **215**: 213-219.
- Silverin, B. (1980). Effects of Long-Acting Testosterone Treatment on Free-Living Pied Flycatchers, *Ficedula-Hypoleuca*, During the Breeding Period. *Animal Behaviour* **28**: 906-912.
- Stradi, R., Celentano, G., Boles, M., & Mercato, F. (1997). Carotenoids in bird plumage: The pattern in a series of red-pigmented *Carduelinae*. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* **117**: 85-91.
- Stradi, R., Hudon, J., Celentano, G., & Pini, E. (1998). Carotenoids in bird plumage: the complement of yellow and red pigments in true woodpeckers (*Picinae*). *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* **120**: 223-230.
- Stradi, R., Pini, E., & Celentano, G. (2001). Carotenoids in bird plumage: the complement of red pigments in the plumage of wild and captive bullfinch (*Pyrrhula pyrrhula*). *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* **128**: 529-535.
- Sundberg, J. & Dixon, A. (1996). Old, colourful male yellowhammers, *Emberiza citrinella*, benefit from extra-pair copulations. *Animal Behaviour* **52**: 113-122.

- Thompson, C. W., Hillgarth, N., Leu, M., & McClure, H. E. (1997). High parasite load in house finches (*Carpodacus mexicanus*) is correlated with reduced expression of a sexually selected trait. *American Naturalist* **149**: 270-294.
- TSCHIRREN, B., FITZE, P. S., & Richner, H. (2003). Proximate mechanisms of variation in the carotenoid-based plumage coloration of nestling great tits (*Parus major* L.). *Journal of Evolutionary Biology* **16**: 91-100.
- Vershinin, A. (1999). Biological functions of carotenoids - diversity and evolution. *Biofactors* **10**: 99-104.
- White, W. S., Peck, K. M., Bierer, T. L., Gugger, E. T., & Erdman, J. W. (1993). Interactions of Oral Beta-Carotene and Canthaxanthin in Ferrets. *J. Nutr.* **123**: 1405-1413.
- Wyss, A., Wirtz, G. M., Woggon, W. D., Brugger, R., Wyss, M., Friedlein, A., Riss, G., Bachmann, H., & Hunziker, W. (2001). Expression pattern and localization of beta,beta-carotene 15,15'-dioxygenase in different tissues. *Biochemical Journal* **354**: 521-529.
- Yonekura, L. & Nagao, A. (2009). Soluble Fibers Inhibit Carotenoid Micellization in Vitro and Uptake by Caco-2 Cells. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **73**: 196-199.
- Young, A. J. & Lowe, G. M. (2001). Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **385**: 20-27.
- Zahavi, A. (1975). Mate Selection - Selection for A Handicap. *Journal of Theoretical Biology* **53**: 205-214.
- Zouboulis, C. C. (2000). Human Skin: An Independent Peripheral Endocrine Organ. *Hormone Research* **54**: 230-242.
- Zuk, M., Johnsen, T. S., & Maclarty, T. (1995). Endocrine-Immune Interactions, Ornaments and Mate Choice in Red Jungle Fowl. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **260**: 205-210.