

# Taux de caroténoïdes dans les œufs et le plasma des femelles de Goéland leucophée (*Larus michahellis*) nichant dans le golfe de Gabès

Abdessalem HAMMOUDA et Slaheddine SELMI

UR: Ecologie de la Faune Terrestre (UR17ES44). Faculté des Sciences de Gabès, Cité Erriadh Zrig 6072, Gabès – Tunisia

---

## Résumé

Chez les oiseaux, la femelle dépose dans ses œufs diverses substances indispensables pour la survie et le développement des poussins, entre autres des caroténoïdes. Toutefois la quantité de caroténoïdes transférés aux œufs est susceptible de varier, en rapport avec la disponibilité de cette ressource dans le corps maternel. L'objectif de ce travail était d'aborder cette question chez le Goéland leucophée (*Larus michahellis*) nichant dans le golfe de Gabès, dans le sud-est Tunisien. Nos résultats montrent d'abord qu'à l'échelle d'une même couvée, le taux des caroténoïdes dans le jaune diminue avec le rang de ponte de l'œuf, ce qui est conforme avec la tendance générale observée chez les goélands dont la stratégie de reproduction est basée sur la réduction de la nichée. Nos résultats montrent également que le taux des caroténoïdes dans le jaune d'œuf varie entre couvées, parallèlement à la variation du taux plasmatique des caroténoïdes chez les femelles respectives. En effet, le taux des caroténoïdes dans le jaune est positivement corrélé avec celui de la mère, et ce quelque soit le rang de ponte de l'œuf concerné. Ce résultat suggère que seules les femelles qui disposent d'une bonne réserve en caroténoïdes seraient en mesure d'en allouer des quantités importantes à leurs œufs et que la variation intercouvée de la quantité de caroténoïdes déposés dans les œufs refléterait des différences entre les femelles concernant leurs capacités à se procurer et à gérer cette ressource limitée. A cet égard, nous pensons que l'âge de la femelle semble un facteur clé dans la détermination de sa capacité à transférer des caroténoïdes à ses œufs, ce qui nécessite d'être vérifié.

Mots-clés : Caroténoïdes, Jaune d'œuf, Plasma, Goéland leucophée, *Larus michahellis*.

---

## Abstract

In birds, the female deposits in her eggs various substances essential for the survival and development of chicks, such as carotenoids. However the amount of maternal carotenoids transferred to eggs may vary in relation to the availability of this resource in the mother's body. The objective of this study was to address this issue in the Yellow-legged Gull (*Larus michahellis*) nesting in the Gulf of Gabes in southeast Tunisia. Our results first show that at the scale of a brood, the level of yolk carotenoids decreases with egg laying order, which is consistent with the general trend observed in gulls whose reproductive strategy is based on brood reduction. Our results also show that carotenoid level in egg yolk varies between clutches, in parallel with the variation of plasma carotenoid level in the respective females. Indeed, the level of carotenoids in egg yolk is positively correlated with that in the plasma of the corresponding mother, whatever the egg laying order. This result suggests that only females who have a good supply of carotenoids would be able to allocate substantial amounts in their eggs. Inter-clutch variation in the amount of yolk carotenoids would thus reflect differences between females about their ability in obtaining and managing this limited resource. In this regard, we believe that female age seems a key factor in determining its ability to transfer carotenoids in eggs, which needs to be more deeply investigated.

Keywords: Carotenoids, Egg yolk, Plasma, Yellow-legged Gull, *Larus michahellis*;

---

## 1. Introduction

Les caroténoïdes sont des composés essentiels du jaune d'œuf présents à des taux très importants [1, 2]. Ces molécules sont impliquées dans divers processus

physiologiques chez l'embryon, le poussin et l'oiseau adulte [3–7]. En effet, grâce à leur pouvoir antioxydant [8], les caroténoïdes permettent de lutter contre le stress oxydant provoqué par les radicaux libres résultant du métabolisme [7, 9–11]. Ils jouent également un rôle

important dans l'activation et la régulation de la réaction immunitaire [12–15]. Outre ces rôles vitaux, les caroténoïdes constituent la base de la pigmentation jaune, orange et rouge des plumes, du bec et de la peau [14, 16, 17].

Les caroténoïdes présents dans le jaune d'œuf sont d'origine maternelle [18], ils sont transférés aux ovocytes en développement à partir de la circulation sanguine de la mère [19]. Les oiseaux, comme tous les autres animaux, sont incapables de synthétiser ces substances *de novo* et doivent s'en procurer à partir de leur alimentation [19]. Il s'agit par conséquent d'une ressource précieuse et limitée qu'il convient d'en assurer un apport alimentaire continu et d'en optimiser l'allocation aux différentes fonctions demandeuses. C'est ainsi qu'un accès limité de la femelle aux caroténoïdes pourrait causer des conflits entre ses propres besoins et le transfert de ces substances dans les œufs [1, 20, 21]. De ce fait, la quantité de caroténoïdes maternels déposés dans le jaune d'œuf peut varier entre les couvées de la même colonie selon la disponibilité de ces substances pour la mère et la capacité de celle-ci à mobiliser ses provisions. Les femelles ayant les taux plasmatiques les plus élevés en caroténoïdes seraient donc plus en mesure d'en déposer dans leurs œufs que celles qui n'en ont que très peu.

Cette corrélation positive entre le taux des caroténoïdes dans le jaune d'œuf et celui dans le plasma de la mère n'a été démontré que chez un nombre très limitée d'espèces d'oiseaux sauvages, comme la perdrix rouge *Alectoris rufa* [22] et le goéland brun *Larus fuscus* [23]. La généralisation de cette relation nécessite qu'elle soit vérifiée chez d'autres espèces aviaires dans d'autres types d'habitat. Ainsi, l'objectif du présent travail était d'apporter une contribution à cette problématique en examinant cette relation chez le Goéland leucophée (*Larus michahellis*) nichant dans le golfe de Gabès, dans le Sud-Est Tunisien. En utilisant des données sur un échantillon de femelles et sur les couvées qu'elles ont pondues, nous avons voulu vérifier si les œufs les plus riches en caroténoïdes seraient issus des femelles qui en ont les taux plasmatiques les plus élevés. Ce faisant, nous avons également tenu compte de l'effet du rang de ponte des œufs dans les analyses.

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Sites d'études

Les données présentées dans ce travail ont été collectées dans une population de Goéland leucophée nichant dans deux sites de reproduction situés de part et d'autre du golfe de Gabès au sud-est de la Tunisie : Le salin de Sfax au nord (34°42'28"N–10°45'02"E) et l'île de Djerba au sud (33°39'10"N–10°58'59"E).

#### 2.1.1. Espèce étudiée

Le Goéland leucophée est un oiseau de mer colonial qui appartient à la Famille des Laridés de l'Ordre des Charadriiformes. L'espèce niche en colonies denses principalement sur les îles et îlots, mais aussi sur les falaises côtières, dans les marais salants et le long des cours d'eau. Généralement, le Goéland leucophée ne produit qu'une seule ponte, d'un à trois œufs, par an, mais en cas de perte, la femelle produit une ponte de remplacement [24]. Le caractère opportuniste et la plasticité écologique de cet oiseau ont contribué à son extraordinaire expansion et en ont fait l'oiseau marin le plus représenté dans le bassin méditerranéen [25–27].

Cet oiseau est choisi comme modèle d'étude parce qu'étant extrêmement abondant, voire prolifique, il s'apprête très bien à l'échantillonnage sans restrictions. La capture d'individus, la manipulation des couvées, ainsi que le prélèvement des œufs ne présentent aucun danger sur la survie de l'espèce.

#### 2.1.2. Collecte des données

- *Suivi des nids et échantillonnage des œufs*

Dès la ponte des premiers œufs, des nids choisis au hasard ont été marqués par des tiges de bois numérotées et plantées à proximité. Le contrôle de ces nids a été réalisé tous les 1 à 2 jours pour la collecte des œufs fraîchement pondus. Chaque œuf échantillonné a été marqué selon son rang et sa date de ponte, puis remplacé par un œuf en plâtre pour que les femelles n'abandonnent pas leurs nids. Les œufs échantillonnés ont été ramenés au laboratoire le jour même de la collecte. Après séparation de l'albumen, le jaune a été homogénéisé et placé dans un sac en plastique et congelé immédiatement à –20 °C en vue de dosages ultérieurs.

---

- *Capture des oiseaux et prélèvement sanguin*

Une fois la ponte est achevée, nous avons procédé à la capture des parents au moyen de pièges "clapnet" placés directement sur le nid. Pour chacun des individus capturés, un échantillon de sang, d'à peu près 1ml, a été prélevé au niveau de la veine brachiale à l'aide d'une seringue stérile héparinée et une aiguille gauge 26. L'oiseau est par la suite marqué par une tâche de peinture sur le dos, permettant d'éviter qu'il soit échantillonné une deuxième fois, avant d'être relâché. Le sang collecté est conservé pendant quelques heures dans une glacière à +4 °C, puis ramené au laboratoire le jour même de la collecte. L'échantillon de sang est centrifugé à 2 500 rpm pendant 10min. Par la suite le plasma et le culot sont séparés et congelés à -20°C.

- *Dosage des caroténoïdes dans le plasma et le jaune d'œuf*

Le dosage des caroténoïdes dans le plasma et le jaune d'œuf a été déterminé par spectrophotométrie, moyennant un spectrophotomètre Shimadzu UV-1700 (Kyoto, Japan) et de l'acétone comme solvant, selon les protocoles décrits par Cucco et al. [28] et McGraw et al. [29]. En ce qui concerne le plasma, un échantillon de 100µl est d'abord prélevé et dilué dans 1ml d'acétone (dilution 1:10). Le mélange est bien agité au vortex puis centrifugé pendant 10min à 10<sup>4</sup> rpm à +4 °C. La densité optique du surnageant est ensuite mesurée à 450 nm [30]. Pour les œufs, 100 mg de jaune sont prélevés et mélangés dans 1ml d'acétone (1mg jaune d'œuf pour 10µl d'acétone). Le mélange est bien agité au vortex, en présence de billes de verre, et centrifugé pendant 10min à 10<sup>4</sup> rpm à +4 °C. La densité optique du surnageant est ensuite mesurée à 450 nm.

Enfin, les valeurs de densité optique mesurées sont converties en concentrations (exprimées en µg/ml) grâce à une courbe d'étalonnage à partir d'une gamme de référence de différentes concentrations de lutéine pure (Sigma-Aldrich, réf. 95507).

- *Sexage*

Le sexage des individus échantillonnés a été réalisé selon la technique décrite par Griffiths et al. [31]. L'ADN est d'abord extrait à partir du sang en utilisant le kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen) selon les recommandations du fabricant. Il est par la suite amplifié par PCR, en utilisant le couple d'amorces

2550F/2718R (2550F : 5'-GTTACTGATTCGTCTACGAGA-3' et 2718R : 5'-ATTGAAATGATCCAGTGCTTG-3') [32].

Les produits issus de l'amplification sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose puis visualisés sous lampe UV après immersion dans un bain de bromure d'éthidium. L'observation d'une seule bande de 750 pb (correspondant au gène CHD1-Z) indique un mâle, alors que la présence, en plus de la bande de 750 pb, d'une autre bande de 450 pb (correspondant au gène CHD1-W) montre qu'il s'agit d'une femelle.

### 3. Résultats

Au total, nous avons réussi à collecter des échantillons de sang et les œufs de 27 femelles. La concentration en caroténoïdes dans le plasma des femelles échantillonnées varie de 0,77 à 3,86 µg/ml, avec une moyenne ( $\pm$  ES) de 1,91 ( $\pm$  0,14) µg/ml. La concentration en caroténoïdes dans les œufs varie de 0,96 à 46,75 µg/ml, avec une moyenne ( $\pm$  ES) de 13,32 ( $\pm$  0,95) µg/ml. La concentration moyenne en caroténoïdes dans les œufs d'un même nid varie entre 3,46 et 35,54µg/ml avec une moyenne ( $\pm$  ES) de 13,31 ( $\pm$  1,39) µg/ml.

Au sein de la même couvée, le taux de caroténoïdes dans le jaune diminue significativement avec le rang de ponte des œufs ( $F_{2,52} = 15,58$  ;  $P < 10^{-4}$  ; figure 1). Le dernier œuf pondu est remarquablement plus pauvre en caroténoïdes que ses deux prédécesseurs, alors que la différence entre le premier et le deuxième œuf, bien que statistiquement significative, est moins apparente (Figure 1).

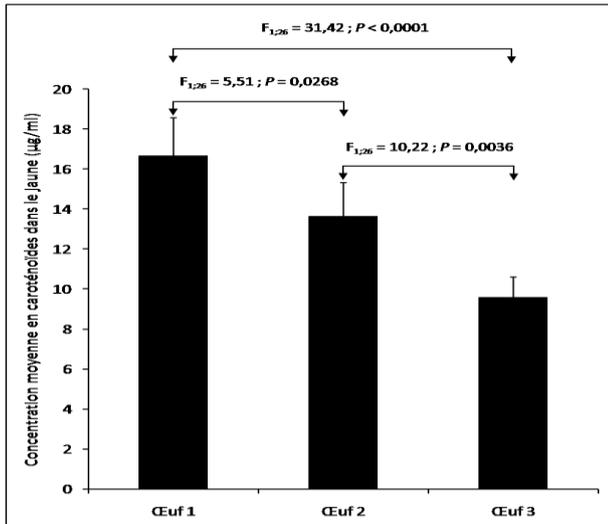


Figure 1 : Variation de la concentration en caroténoïdes dans le jaune en fonction du rang de ponte des œufs. Les barres représentent les erreurs standards chez le Goéland leucophée (*Larus michahellis*) nichant dans le golfe de Gabès (n=27)

Par ailleurs, nos résultats montrent une corrélation positive et significative entre le taux de caroténoïdes plasmatique de la mère et le taux moyen dans ses œufs ( $\beta = 5,63 \pm 1,64$  ;  $F_{1,25} = 11,86$  ;  $P = 0,002$ ). Ils montrent également une corrélation positive et significative entre le taux de caroténoïdes plasmatique de la mère et celui dans ses œuf, quelque soit le rang de ponte (Figure 2)

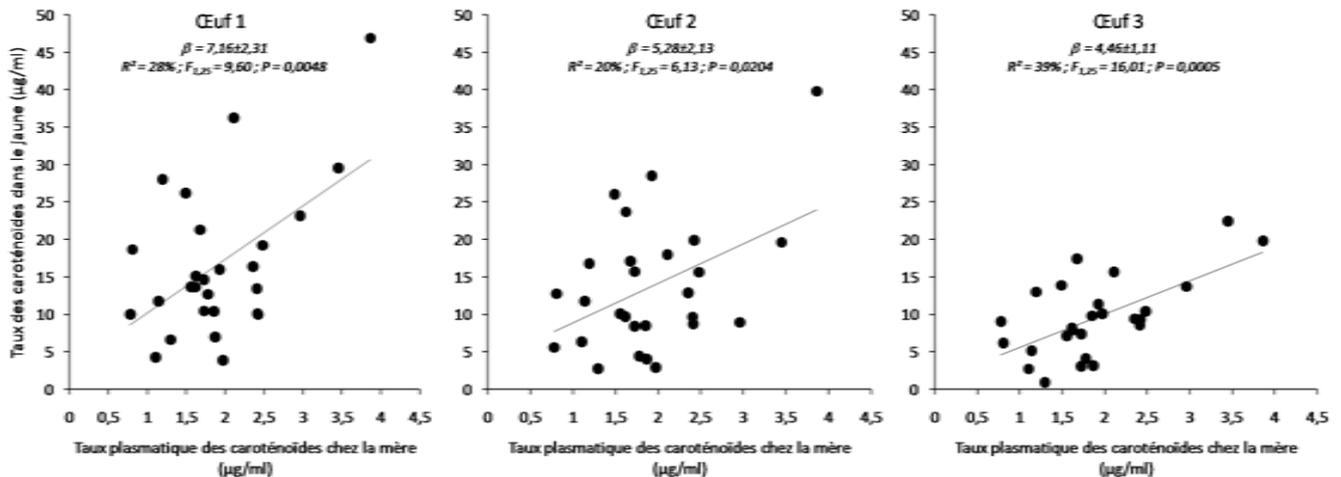


Figure 2 : Variation du taux des caroténoïdes dans les œufs en fonction du taux plasmatique de la mère chez le Goéland leucophée (*Larus michahellis*) nichant dans le golfe de Gabès (n=27)

#### 4. Discussion

Le but de ce travail était d'étudier la variation de la concentration en caroténoïdes du jaune d'œuf, en rapport avec le taux plasmatique de la mère dans une population de Goéland leucophée. Nos résultats montrent que la quantité des caroténoïdes dans le jaune d'œuf varie au sein de la même couvée. Elle varie également entre couvées, parallèlement à la variation du taux plasmatique des caroténoïdes chez les femelles respectives. En effet, le taux des caroténoïdes dans le jaune d'œuf est

positivement corrélé avec celui de la mère, et ce quelque soit son rang de ponte.

A l'échelle d'une même couvée, le taux des caroténoïdes varie en fonction du rang de ponte de l'œuf ; le dernier œuf pondu en contient moins que les deux premiers. Ce constat est en accord avec ce qui a été observé dans d'autres populations de goélands [23, 33, 34]. Étant donné que les caroténoïdes ne peuvent pas être synthétisés *de novo* par les oiseaux [19], ils correspondent à une ressource précieuse et leur transfert au jaune d'œuf

semble représenter un investissement coûteux pour la mère. Celle-ci est donc contrainte d'en optimiser le partage entre ses différents œufs. Sous cet angle de vue, la diminution de la concentration en caroténoïdes avec le rang de ponte de l'œuf pourrait refléter une stratégie de reproduction basée sur la réduction de la nichée [33, 34]. En effet, chez les oiseaux à éclosion asynchrone comme les goélands, la compétitivité du poussin vis-à-vis de sa fratrie, et par conséquent ses chances de survie et sa valeur reproductive pour les parents, diminuent avec son rang d'éclosion, c'est-à-dire avec le rang de ponte de l'œuf dont il est issu [35, 36]. Par conséquent, la mère n'a pas intérêt à investir beaucoup de ressources dans les premiers poussins, qui ont une meilleure valeur reproductive, et améliore leur chance de survie [37–39].

À l'échelle de la colonie, le taux des caroténoïdes dans le jaune d'œuf varie entre les couvées, parallèlement à la variation du taux plasmatique des caroténoïdes chez les femelles respectives. Ce résultat vient conforter notre prédiction que seules les femelles qui disposent d'une bonne réserve en caroténoïdes sont en mesure d'en allouer des quantités importantes à leurs œufs. La variation intercouvée de la quantité de caroténoïdes déposés dans les œufs pourrait donc refléter des différences entre les femelles concernant la gestion de cette ressource limitée et son partage entre leurs besoins vitaux et la nécessité d'en allouer aux œufs. Les femelles semblent donc ajuster d'une façon stricte la quantité des caroténoïdes qu'elles déposent dans leurs œufs en conformité avec leur capacité à en maintenir un taux plasmatique suffisant pour leurs propres besoins vitaux [40–43].

Il est par ailleurs à souligner que la variation observée entre les couvées quant à la quantité de caroténoïdes dans le jaune d'œuf, pourrait refléter un effet de l'âge de la femelle. Théoriquement, l'âge de la femelle pourrait affecter le taux de transfert des caroténoïdes d'au moins deux façons. Tout d'abord, en raison de leur plus grande expérience, les femelles les plus âgées pourraient avoir une meilleure capacité à se procurer des aliments riches en caroténoïdes et/ou à mobiliser leurs propres réserves. Les jeunes femelles semblent souffrir davantage de l'épuisement de leur réserve en caroténoïdes au cours de la formation des œufs et ne peuvent pas maintenir un taux plasmatique assez suffisant que les femelles les plus âgées, ce qui peut entraîner une baisse remarquable dans la quantité de caroténoïdes dans leurs œufs. L'âge de la femelle peut également influencer les possibilités de reproduction future et donc le mode d'allocation des

ressources dans les œufs. Les femelles les plus âgées sont susceptibles d'avoir un faible potentiel de reproduction future que les plus jeunes [44]. En supposant que l'investissement des parents dans la reproduction actuelle est déterminé par la probabilité de survie de la progéniture et le potentiel reproducteur des parents, les femelles âgées devraient présenter un investissement plus important dans la tentative actuelle de reproduction et d'allouer davantage de ressources, entre autre les caroténoïdes, à leurs œufs. Ainsi, des taux relativement élevés de caroténoïdes dans les œufs caractériseraient les femelles les plus âgées.

## 5. Conclusion :

Nous pensons qu'en dépit des limites imposées par son caractère observationnel et corrélatif, notre travail fournit une contribution à la compréhension du transfert maternel des caroténoïdes chez le Goéland leucopnée. Il souligne également la grande complexité des facteurs écologiques qui façonnent les effets maternels chez les oiseaux. D'autres investigations, utilisant des données sur un plus grand nombre de femelles d'âges connus et sur plusieurs saisons, s'avèrent toutefois nécessaires pour mieux appréhender cette problématique.

## Références

- [1] Blount J. D., Surai P. F., Houston D. C. & Møller A. P., Patterns of yolk enrichment with dietary Carotenoids in gulls: the roles of pigment acquisition and utilization, *Functional Ecology*, 16 (2002) 445–453.
- [2] Williamson K. A., Surai P. F. & Graves J. A. Yolk antioxidants and mate attractiveness in the zebra finch, *Functional Ecology*, 20 (2006) 354–359.
- [3] Chew B. P., Role of Carotenoids in the immune response, *Journal of Dairy Science*, 76 (1993) 2804–2811.
- [4] Chew BP, Wong MW & Wong TS. Effects of lutein from marigold extract on immunity and growth of mammary tumors in mice, *Anticancer Research*, 16 (1996) 3689–3694.
- [5] Olson V. A., Owens I. P. F., Costly sexual signals: are carotenoids rare, risky or required ?, *Trends in Ecology & Evolution*, 13 (1998) 510–514
- [6] Surai P. F. & Speake B. K., Distribution of Carotenoids from the yolk to the tissues of the chick embryo. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 9 (1998) 645–651.
- [7] Møller A. P., Biard C., Blount J. D., Houston D. C., Ninni P., Saino N., Surai P. F., Carotenoid-dependent signals: indicators of foraging efficiency, immunocompetence or detoxification ability?, *Avian and Poultry Biology Reviews*, 11 (2000) 137–159
- [8] Lozano G. A., Carotenoids, immunity, and sexual selection: comparing apples and oranges? *American Naturalist*, 158 (2001) 200–203.
- [9] Bendich A., & Olson J. A., Biological actions of Carotenoids, *The FASEB Journal*, 3 (1989) 1927–1932.
- [10] Di Mascio P., Murphy M. E. & Sies H., Antioxidant defense systems: the role of Carotenoids, tocopherols, and thiols, *American Journal of Clinical Nutrition*, 53 (1991) 194S– 200S.

- [11] Canfield L. M., Forage J. W., Valenzuela J.G. Carotenoids as cellular antioxidants. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 200 (1992) 260–265
- [12] Surai P. F., Speake B. K. & Sparks N. H. C., Carotenoids in avian nutrition and embryonic development. 2. Antioxidant properties and discrimination in embryonic tissues, *Journal of Poultry Science*, 38 (2001) 117–145.
- [13] Saino N., Ferrari R. P., Romano M., Martinelli R., Møller A. P., Experimental manipulation of egg carotenoids affects immunity of barn swallow nestlings, *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270 (2003) 2485–2489
- [14] Biard C., Surai P. F., Møller A. P., Effects of carotenoid availability during laying on reproduction in the blue tit, *Oecologia*, 144 (2005) 32–44
- [15] Koutsos E. A., Garcia-Lopez J. C., Klasing K. C., Carotenoids from in ovo or dietary sources blunt systemic indices of the inflammatory response in growing chicks (*Gallus gallus domesticus*), *Journal of Nutrition*, 136 (2006) 1127–1131
- [16] Fox D. L., *Animal Biochromes and structural Colors*. University of California Press, Berkeley, 1976.
- [17] Hill G. E., Inouye CY, Montgomerie R. Dietary carotenoids predict plumage coloration in wild house finches. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 269 (2002) 1119–1124
- [18] Blount J. D., Houston D. C., Møller A. P., Why egg yolk is yellow. *Trends in Ecology & Evolution*, 15 (2000) 47–49
- [19] Goodwin T. W. *The biochemistry of the carotenoids*, Vol 2. Chapman, New York
- [20] Surai P. F., Speake B. K. & Sparks N. H. C., Carotenoids in avian nutrition and embryonic development. Absorption, availability and levels in plasma and egg yolk. *Journal of Poultry Science*, 2001.1984. 38:1–27.
- [21] McGraw KJ, Adkins-Regan E & Parker RS. Maternally derived carotenoid pigments affect offspring survival, sex ratio, and sexual attractiveness in a colorful songbird. *Naturwissenschaften*, 92 (2005) 375–380.
- [22] Bortolotti G. R., Negro J. J., Surai P. F., Prieto P., Carotenoids in eggs and plasma of red-legged partridges: effects of diet and reproductive output. *Physiological and Biochemical Zoology*, 76 (2003) 367–374
- [23] Blount J. D., Surai P. F., Nager R. G., Houston D. C., Møller A. P., Trewby M. L. & Kennedy M. W., Carotenoids and egg quality in the lesser black-backed gull *Larus fuscus*: a supplemental feeding study of maternal effects. *Proceedings of the Royal Society of London B-Biological Sciences*, 269 (2002) 29–36.
- [24] Rubolini D, Romano M, Bonisoli-Alquati A, Saino N., Early maternal, genetic and environmental components of antioxidant protection, morphology and immunity of Yellow-legged Gull (*Larus michahellis*) chicks. *Journal of Evolutionary Biology*, 19 (2006) 1571–1584
- [25] Yésou P & Beaubrun PC. 1995. Le Goéland eucophée *Larus cachinnans*. pp. 328–329 In *Nouvel atlas des oiseaux nicheurs de France 1985–1989* (D. Yeatman–Berthelot & Jarry G. eds) . S.O.F., Paris.
- [26] Thibault J. C, Zotier R, Guyot I. & Bretagnolle V., Recent trends in breeding marine birds of the Mediterranean region with special reference to Corsica, *Colonial Waterbirds*(special publication 1), 19 (1996) 31–40.
- [27] Perennou C, Sadoul N, Pineau O, Johnson A & Hafner H., Gestion des sites de nidification des oiseaux d'eau coloniaux. *MedWet series, Conservation des zones humides méditerranéennes* (Skinner, J. & Crivelli, A. J. eds.), n°4, Tour du Valat, Arles, 114 p. 1996.
- [28] Cucco M, Guasco B, Malacarne G, Ottonelli R., Effects of bcarotene on adult immune condition and antibacterial activity in the eggs of the grey partridge, *Perdix perdix*. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 147 (2007) 1038–1046
- [29] Mc Graw K. J., Tourville E. A., Butler M. W. A., Quantitative comparison of the commonly used methods for extracting carotenoids from avian plasma, *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 62 (2008) 1991–2002
- [30] Zsila F, Bikadi Z, Keresztes Z, Deli J, Simonyi M., Investigation of the self-organization of lutein and lutein diacetate by electronic absorption, circular dichroism spectroscopy, and atomic force microscopy. *The Journal of Physical Chemistry B*, 105 (2005) 9413–9421
- [31] Griffiths R, Double M. C., Orr K, Dawson R. J. G. A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology*, 7 (1998) 1071–1075
- [32] Fridolfsson A. K., Cheng H, Copeland N. G., Jenkins N. A., Liu H. C., Raudsepp T., Woodage T., Chowdhary B., Halverson J. & Ellegren H., Evolution of the avian sex chromosomes from an ancestral pair of autosomes, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95 (1998) 8147–8152.
- [33] Saino N., Bertacche V., Bonisoli-Alquati A., Romano M., Rubolini D., Phenotypic correlates of yolk and plasma carotenoid concentration in yellow-legged gull chicks, *Physiological and Biochemical Zoology*, 81(2008) 211–225
- [34] Rubolini D., Romano M., Navara K. J., Karadas F., Ambrosini R., Caprioli M., Saino N., Maternal effects mediated by egg quality in the yellow-legged gull *Larus michahellis* in relation to laying order and embryo sex, *Frontiers in Zoology*, 8 (2011) 24
- [35] Schwabl H., Mock D.W. & Gieg J.A., A hormonal mechanism for parental favouritism. *Nature*, 386 (1997) 231.
- [36] Gil D., Graves J., Hazon N. & Wells A., Male attractiveness and differential testosterone investment in zebra finch eggs. *Science*, 286 (1999) 126–128.
- [37] Royle N. J., Surai P. F. & Hartley I. R., Maternally derived androgens and antioxidants in bird eggs: complementary but opposing effects?, *Behavioral Ecology*, 12 (2001) 381–385.
- [38] Groothuis T. G., Schwabl H., Determinants of within and amongclutch variation in levels of maternal hormones in black-headed gull eggs, *Function Ecology*, 6 (2002) 281–289
- [39] Rubolini D., Ambrosini R., Romano M., Caprioli M., Fasola M., Bonisoli-Alquati A, Saino N. Within-clutch egg size asymmetry covaries with embryo sex in the Yellow-legged Gull *Larus michahellis*, *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 63 (2009) 1809–1819
- [40] Hörak P., Surai P. F. & Møller A. P., Fat-soluble antioxidants in the eggs of Great Tits *Parus major* in relation to breeding habitat and laying sequence, *Avian Science*, 2 (2002) 1–8.
- [41] Saino N., Bertacche V., Ferrari R. P., Martinelli R., Møller A. P., Stradi R., Carotenoid concentration in barn swallow eggs is influenced by laying order, maternal infection and paternal ornamentation, *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 269 (2002) 1729–1733
- [42] Blount J. D., Carotenoids and life-history evolution in animals, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 430 (2004) 10–15
- [43] McGraw K. J., *The mechanics of carotenoid coloration in birds*, In: Hill G. E., McGraw K. J. (eds) *Bird coloration I. Mechanisms and measurements*. Harvard University Press, Cambridge, MA, (2006) 177–242..
- [44] Stearns S. C., *The evolution of life histories*. Oxford University Press, Oxford. 1992.