

MOBk01-vt -16.

Anna Johansson, anna.eira.kristina@gmail.com, 0760-622250

*Äggulans fettsyrekomposition hos talgoxe (*Parus major*) i relation till honans kondition, kullstorlek och plats i läggningssekvensen*

Handledare: Martin N Andersson och Caroline Isaksson

Tidskriftsmall: Journal of avian biology

Äggulans fettsyrekomposition hos talgoxe (*Parus major*) i relation till honans kondition, kullstorlek och plats i läggningssekvensen

Abstract

Äggulans komposition av fettsyror påverkar fostrets utveckling och ungens chanser till överlevnad efter kläckning. Detta är en följd av lipidernas roll som anti-inflammatoriska ämnen, energiresurser och nödvändiga komponenter för utveckling av organ och nervsystem. Tidigare studier har visat att kompositionen av fetter påverkas av honans tillgång på dessa fetter i hennes föda, och de ägg som honan lägger först har högre andel lipider och antioxidanter (såsom karotenoider) vilket kan ha betydelse för ungararnas överlevnad fram till flyggålder. Genom att analysera kompositionen av fettsyror i gulan från 93 ägg i 11 kullar och jämföra denna efter ordningen äggen är lagda, mellan honor med avseende på deras kondition samt med avseende på hur stor kullen är ville jag undersöka om dessa faktorer påverkade kompositionen av fetter och därmed potentiellt de kläckta ungararnas framgång. Andelen fleromättade fettsyror minskade med läggsekvensen och enkelomättade fettsyror ökade, det vill säga de sist lagda äggen hade mindre fleromättat och mer enkelomättat fett. Då fleromättade fetter krävs för att kunna tillgodogöra sig fettlösliga karotenoider samt är av betydande vikt för utveckling av t ex. hjärta, lever, immunförsvar, retina och nervsystem finns det även anledning att anta att sammansättningen har en positiv betydelse för de ungar från tidigt lagda ägg och en negativ betydelse för de ägg som kläcks från de sista äggen i kullen. **Mina resultat** tyder på att det finns en trend att investera en större proportion fleromättade fetter i de tidigt lagda äggen, och en större proportion enkelomättade fetter i de senare lagda. Det verkar också som att proportionen av den för fosterutvecklingen viktiga dokosaheksaensyran minskar med kullstorleken, vilket kan tyda på en avvägning mellan kullstorlek och kvalitet på äggen. Det hittades ett negativt samband för kullstorlek och proportionen omega3-fettsyror, och ett positivt för kullstorlek och omega6-fettsyror. Något signifikant samband mellan kompositionen av fettsyror och honans kondition hittades inte.

Inledning

Då investering i ungar innebär en kostnad för föräldrarna, måste en avvägning göras mellan antal och kvalitet på avkomma (Daan et al., 1997). Man kan tala om två olika reproduktionsstrategier; r- och K-strategier, där r-strategin innebär liten investering från per unge från föräldrarna, få reproduktionstillfällen och stora kullar. K-strategin innebär stor investering per unge från föräldrarna, återkommande

reproduktionstillfällen och färre antal ungar (Sadava et al., 2014). Då talgoxar och fåglar i allmänhet investerar mycket i sin avkomma och är K-strateger kan man resonera att den höga kostnaden hos föräldrar borde leda till en mer riktad investering; antingen mot de ungar som har störst chans (*brood reduction theory*) eller för att kompensera för de svagare (*brood survival theory*) (Slagsvold et al., 1984). När man talar om investering i kvalitét av fågelägg har det visat sig att sammansättningen av fetter och näringsämnen i ägget är av större vikt än storleken (Nager et al., 2000, Krist et al. 2004). Storleken har visats öka med äggläggningsssekvensen hos talgoxar, (You et al., 2009) där de sista äggen är störst och har störst mängd vatteninnehåll (Nager et al., 2000).

En talgoxhona producerar i genomsnitt 8-11 ägg per säsong, vilket har visat sig vara en avvägning av maximal produktion avkomma per år, maximal överlevnad hos avkomma och maximal produktion avkomma under honans livstid (Krebs et al., 1993, You et al., 2009). Det finns ett samband mellan honans livslängd och storleken på hennes kullar; där fler ägg per kull innebär en större påfrestning och ökad risk för honan att inte överleva till nästa säsong (Visser et al., 2001). Att producera ägg, ruva äggen och försörja ungarna med mat har visat sig vara tre lika kostsamma processer för honan (Stevenson et al., 2000).

Äggulan hos höns utgör den huvudsakliga energikällan för fågelembryot. Spjälkning av lipiderna i äggulan svarar för en stor del av denna energi, men lipiderna är också viktiga beståndsdelar i utvecklingen av olika vävnader hos embryot (Speake et al., 1998). Fetterna distribueras mycket noga efter behov till olika vävnader under olika utvecklingsstadier (Speake et al., 1998). Äggens kvalitét, främst totalt lipidinnehåll i gulan, har visat sig vara av stor betydelse för flygg-framgång, kanske för att höga halter utav lipider ger ungen en extra energiresurs efter kläckning (Nager et al., 2000). Mängden lipider och näringsämnen avtar i gulan ju senare i frekvensen ett ägg är lagt, och det gör också ungens chanser att klara sig till flygg ålder (Nager et al., 2000, Krist et al., 2003). Mängden lipider i gulan verkar vara av särskild betydelse för tiden fram tills ungen lämnar boet (Nager et al., 2000), och ägg lagda senare i frekvenser verkar ha generellt sämre utsikter (Nager et al., 2000)

Äggulan i ett hönsägg består till 33 % av lipider, vilka i äggulan förekommer i esterform, vanligen som triglyceroler (66.1%) eller fosfolipider (24.7%) (Speake et al., 1998, Pappas et al., 2007). Under fosterutvecklingen spjälkas 50 % av fetterna genom β -oxidation (med viss variation mellan arter) (Papas et al., 2007) för att förse fostret med energi. Resterande 50 % återfinns i det färdiga fostret som energireserv (fettvävnad), inkorporerade i cellmembran, komponenter i signalsubstanser, och i hjärna, lever och hjärta (Lin et al., 1991).

Fettsyror delas traditionellt upp efter antalet dubbelbindningar i molekylen; i mättade (SFA), enkelomättade (MUFA) och fleromättade fettsyror (PUFA). Omättade fettsyror har inga dubbelbindningar mellan kolatomerna, enkelomättade har en dubbelbindning och fleromättade har två eller flera dubbelbindningar. Fleromättade fettsyror delas i sin tur upp i omega-3 (ω 3) och omega-6 (ω 6) fettsyror, där siffran syftar på placeringen av dubbelbindningen räknat från molekylen metylgrupp (Holum, 1998). Både mättade och enkelomättade fettsyror kan syntetiseras i levern. Mättade fetter kan syntetiseras ur kolhydrater. Linolsyra (ω 6) och alfa-linolensyra (ω 3) är essentiella fettsyror, övriga fleromättade fettsyror kan syntetiseras ur dessa; ω 6-fettsyror ur linolsyra och ω 3-

fettsyror ur alfa-linolensyra. (Speake et al., 1998). Molekylernas struktur och antal dubbelbindningar ger fettsyrorna vissa egenskaper. Enkelomättade fetter är generellt fasta i rumstemperatur. Fleromättade fettsyror är generellt flytande i rumstemperatur, och inkorporeras bland annat i cellernas membran för att göra dem mer flexibla och permeabla (Surai, 2002). Dubbelbindningarna gör också fetterna känsliga för oxidation; ju fler dubbelbindningar, desto högre benägenhet att oxidera och ge upphov till fria radikaler. De fleromättade fettsyrornas närvaro i cellmembranet gör cellens membran utsatta för oxidativa skador med exempelvis mutationer i DNA som följd (Surai, 2002).

Man har sett att förändringar i sammansättningen av fleromättade ω 6-fettsyror i äggulan kan påverka graden av oxidativ stress på vävnaden hos fostret (Bautista-Ortega et al., 2009). Analyser av äggula hos silltrut (*Larus fuscus*) har visat att tidigare lagda ägg inom kullen har högre halt av antioxidanter (karotenoider och vitamin E), vilket gör embryot mer motståndskraftigt mot oxidativ stress (Royle et al., 1999, Saino et al., 2002). Samma trend har observerats för karotenoiden lutein hos talgoxar (*Parus major*) (Marri och Richner, 2014), vilket påverkade flygg-framgång positivt.

Vid en inflammatorisk respons frigörs bland annat reaktiva syreföreningar för att skada den angripande patogenen (Sorci, G och Faivre, 2009). Vid en sådan respons kan även värddjurets egna vävnader skadas, då de fria radikalerna kan oxidera lipider, proteiner och nukleinsyror (Surai, 2002). Under en inflammatorisk respons har PUFA olika roller; ω 3-fettsyror har en anti-inflammatorisk effekt och ω 6-fettsyror har en pro-inflammatorisk effekt (Calder, 2006). Därför spelar kvoten av ω 6- och ω 3-fettsyror under en inflammatorisk respons en roll när det kommer till hur stora de oxidativa skadorna på vävnaderna blir, där en högre kvot ger mer oxidativa skador. Dessutom gör de fleromättade fettsyrornas dubbelbindningar att de är benägna att oxideras (Surai, 2002). Desto längre en inflammatorisk respons pågår, desto större risk för oxidativa skador hos värddjuret (Constantini och Møller, 2009). Kostnaden av en immunrespons har visat sig göra avtryck senare i livet, där reproduktiv framgång (Bonneaud et al., 2003) och tillväxt (Soler et al., 2003) är faktorer som påverkats negativt.

Honans nivå av oxidativ stress kan påverka vilka fettsyror som överförs till äggulan. Honans metabolism ökar med 27 % under parningssäsongen (Giordano et al., 2015). En naturlig restprodukt vid förbränning (liksom vid en inflammatorisk respons) är fria radikaler (Surai, 2002), vilket kan leda till oxidativ stress och skador på nukleinsyror, lipider och proteiner (Giordano et al., 2015). Skyddsmekanismer mot oxidativ stress finns i kroppen i form av enzymer, vitaminer och DNA-reparationsmekanismer (Surai, 2002). Det finns ett negativt samband mellan oxidativ stress hos honan och nivåerna av antioxidanter i hennes ägg (Giordano et al., 2015). Antioxidanter behövs under den prenatala utvecklingen av fostret, som ett skydd mot de fria radikaler som bildas under förbränningen av fetter i gulan. Foster med höga halter av antioxidanter har en större reproduktiv framgång senare i livet, och låga nivåer av antioxidanter har en negativ påverkan på fosterutvecklingen (Giordano et al., 2015).

Då samtliga fetter som finns i gulan kommer ifrån modern, vare sig syntetiserade eller essentiella, speglar detta antagligen tillgången på dessa fetter i hennes föda (Ajuyah et al., 2003). Höns som får foder med solros- och fiskolja (vilka är rika på ω 3- och ω 6-fettsyror) får kycklingar med högre halter utav den för hjärnutvecklingen viktiga fettsyran dokosaheksaensyra (DHA) än de som inte får foder rikt på fleromättade fetter

(Ajuyah et al., 2003). I jämförelser av rurala och urbana populationer av talgoxar har det visat sig att rurala, som sannolikt har större tillgång på föda med höga halter av ω 6- och ω 3-fettsyror, också har högre halter av dessa fettsyror i sina ägg (Toledo et al., opubl.). Det har också visat sig finnas dietära begränsningar för hur många ägg en hona kan lägga (Bolton 1992).

DHA, är en ω 3-fettsyra som är en viktig komponent i utvecklingen utav fostrets nervsystem och retina (Anderson et al., 1989). Arakidonsyra (AA) är en ω 6-fettsyra som är viktig i utveckling utav hjärna, hjärta och lever (Speake et al., 1998). Nivåerna av dessa två fettsyror i gulan återfinns i stor utsträckning hos ungen, vilket tyder på att de förbränns i mycket liten utsträckning. Det finns en preferens upptag av DHA och AA från gula till foster hos hönor (Maldjian et al., 1996), kanske för att säkerställa att det finns tillgängligt för utveckling av hjärna och retina oavsett nivåer av dessa ämnen i gulan. Hos rör- och sothöna finns ingen preferens för upptag av DHA och AA till gulan, vilket kanske kan bero på att rör- och sothönors kost naturligt innehåller höga halter av dessa ämnen, och därmed också deras ägg (Pappas et al., 2007).

I de här analyserna jämförs sammansättningen utav fettsyror hos ägg ifrån vilda talgoxar för att undersöka om de skiljer sig åt beroende på honans kondition, kullens storlek och ordningen i vilken äggen inom en kull är lagda. Hypotesen för äggläggningsssekvensen är att det skulle kunna finnas en riktad investering i tidigare eller senare lagda ägg för att förstärka alternativt jämna ut fördelarna de tidigast lagda äggen/ungarna ofta har. Hypotesen för kullstorleken är att det borde finnas en avvägning mellan kvalitén på äggen och antal ägg i kullen, där de kullar med färre ägg skulle ha större proportioner av fleromättade fettsyror, och de kullar med fler ägg skulle ha mindre proportioner av dessa fettsyror. Hypotesen för honans kondition är att en hona i bättre kondition antingen skulle investera i fler ägg per kull, eller ägg av bättre kvalitet än en hona i sämre kondition. De fettsyror som kommer undersökas är arakidonsyra (AA) och dokosahexaensäyra (DHA). Utöver det undersöks grupper utav fettsyror: mättade fettsyror, enkelomättade fettsyror, fleromättade fettsyror, ω 6-fettsyror samt ω 3-fettsyror. Dessutom undersöks kvoten ω 6/ ω 3-fettsyror, då den skulle kunna säga något om den oxidativa stressen vid en inflammatorisk respons.

Material och Metod

För att kunna jämföra olika fettsyreprofiler för olika ägg och kullar extraherades lipider ur varje gula. Dessa bestämdes sedan med hjälp utav gaskromatografi/masspektrometri (GC/MS). Därefter beräknades mängden av varje fettsyra genom att arean under varje topp på kromatogrammet beräknades. Proportionen av varje fettsyra beräknades för varje individ, samt medelvärde för varje kull. Totalt analyserades 20 fettsyror för varje individ, varav 5 var mättade fettsyror, 6 var enkelomättade, och 10 var fleromättade. 5 av dessa var ω 6-fettsyror och resterande 4 var ω 3-fettsyror.

Fältarbete

Äggen samlades in under våren 2015 i Tyskland av forskare vid P Max Planck institutet (Michaela Hau och hennes grupp). Då talgoxar lägger ett ägg om dagen samlades äggen in dagligen och ersattes av ett "dummie egg". När honan började ruva var kullen

komplett och ersättningsäggen togs bort. Honan vägdes med en "Pesola balancer" och hennes tars mättes med skjutmått. Alla ägg knäcktes och äggulan separerades från äggvitan. Äggulan delades upp i olika eppendorfrör och dessa förvarades i -20°C frys tills de transporterades till Lunds Universitet. Sammanlagt samlades ägg in från elva kullar.

Extraktion av fettsyror

Ca 5 mg äggula från varje ägg vägdes upp. Då mängden av varje fettsyra sedan beräknades i enheten $\mu\text{l}/\text{mg}$ gula var mängden gula per prov mindre viktig. 50 μl chloroform:metanol (2:1) tillsattes (med internstandard metyl *cis*-10-heptadecenoate: 333ng/ μl) till varje prov. Provet lämnades sedan i en timme vid rumstemperatur för total lipidextraktion. Efter det avdunstades lösningsmedlet under N_2 . 100 μl KOH/Me (0.5M) tillsattes därefter, varpå basmetanolys föregick vid 40°C i en timme för att konvertera fettsyror till mosvarande metylestrar som kan analyseras med GC/MS. Därefter tillsattes 90 μl HCl/Me för att neutralisera KOH. Kvar fanns nu en lösning med metylestrar och vatten. 300 μl heptan tillsattes därefter för att extrahera fettsyremetylestrarna. Det understa skiktet i provet, det vill säga vattnet, togs bort med hjälp av pipett. Därefter tillsätts 200 μl vatten varpå provet vortexas och det nedersta skiktet pipetteras bort. På det viset "tvättas" provet så att eventuella restprodukter försvinner och endast metylestrar lösta i heptan finns kvar i provet. Detta steg upprepas 2-4 gånger efter behov, tills lösningen som är kvar är helt klar. Na_2SO_4 tillsattes till provet för att binda upp eventuellt vatten som kan finnas kvar i provet efter den sista "tvätten". Efter det pipetterades lösningen med heptan och metylestrar till ett nytt rör och späddes i heptan 10-30 gånger. Efter detta analyserades provet i en Agilent 6890 gaskromatograf kopplad till en massdetektor.

Analys av kromatogram

Kromatogrammen analyserades sedan med hjälp av programmet *GC-MS Data Analyses 35 (Agilent)*. Genom att jämföra retentionstiden och masspektra för internstandard och de extraherade metylestrarna kunde varje ämne bestämmas. Därefter beräknades arean under varje topp för att på så sätt kunna bestämma hur mycket av varje ämne som fanns i provet. Arean under respektive topp beräknades för totalt 93 individer och 20 olika metylestrar. Därefter beräknas totalmängden fettsyra ($\mu\text{g}/\text{mg}$ gula) genom att kvoten FA/internstandard multipliceras med mängden internstandard per prov (16.65 μg). Därefter beräknades också andelen av varje fettsyra (% av totala fettsyreinnehållet) för varje prov, samt totala mängden fettsyror, totala mängden samt proportionen av mättade, omättade, fleromättade, ω 3-fettsyror, ω -6 fettsyror, samt kvoten ω -6/ ω -3.

Statistiska tester

På grund utav den lilla statistiska populationen (n=9 för honans kondition, n=11 för antalet kullar) gjordes linjära regressioner för varje faktor separat. Ordningen äggen lades i testades mot både proportion och absolutvärdet för samtliga fettsyror (FA), MUFA, total PUFA, ω 6- och ω 3- PUFA respektive, och proportion och absolutvärde DHA och AA. Dessutom gjordes en regression för kvoten ω -6/ ω -3. Samma tester gjordes för kullstorlek, men där användes istället medelvärdet för kullen som helhet för att undvika pseudoreplikation. För tester mot honans kondition (vilken räknades ut enl. massa/tarslängd³) användes istället också medelvärdet för hennes kull som helhet. Det gjordes också en regression för honans kondition mot storleken på hennes kull. Dessutom gjordes en regression för proportionen DHA och övriga ω 3-fettsyror, och för AA och övriga ω 6-fettsyror. SPSS (IBM) användes för alla statistiska tester.

Resultat

Honans kondition

Det fanns inga signifikanta samband mellan proportion utav någon utav fettsyror eller grupperna utav fettsyror. Det fanns heller inget samband mellan honans kondition och storleken på hennes kull.

Kullstorlek

Det fanns ett negativt signifikant samband mellan totala mängden SFA och antalet ägg i kullen ($p=0,001$) (se fig. 1). Det fanns ett signifikant positivt samband mellan proportionen MUFA och kullstorlek ($p<0,001$) (se fig. 2). Det fanns inget signifikant samband mellan PUFA och kullstorlek, däremot för $\omega 6$ (positivt, $p=0,036$) (se fig. 3) och $\omega 3$ (negativt, $p=0,006$) (se fig. 4) var för sig. Det fanns inget signifikant samband mellan kullstorlek och kvoten $\omega 6/\omega 3$. Det fanns inget signifikant samband mellan proportionen AA och kullstorlek. För proportionen DHA fanns inget signifikant negativt samband. Absolutvärdet av den sammanlagda mängden FA ökade med kullstorlek, se fig. 5 ($p=0,036$).

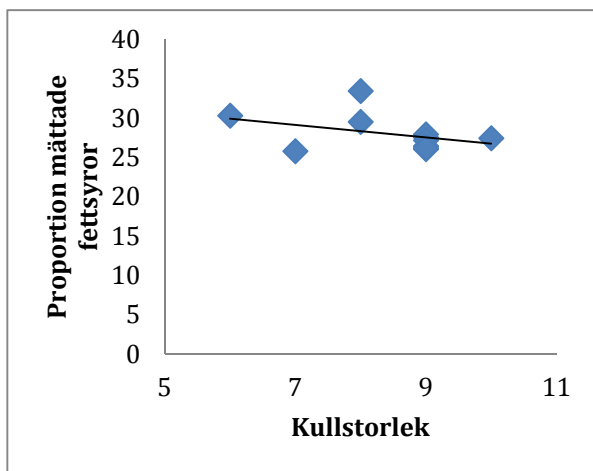


Fig.1. Proportionen mättade fettsyror (SFA) minskar ju större kullen är. $R^2= 0,117$ $p=0,001$

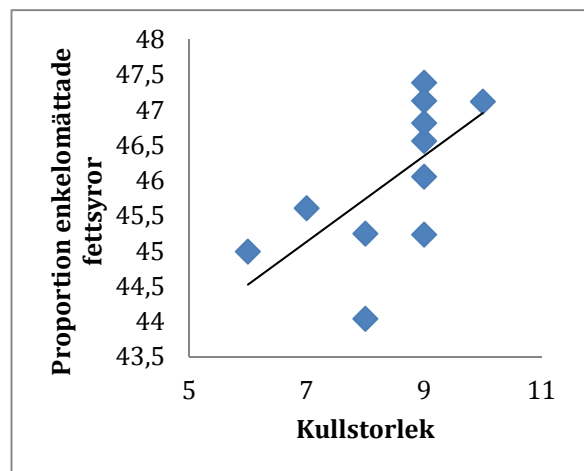


Fig. 2. Proportionen enkelomättade fettsyror ökar ju större kullen är. $R^2=0,248$ $p<0,001$

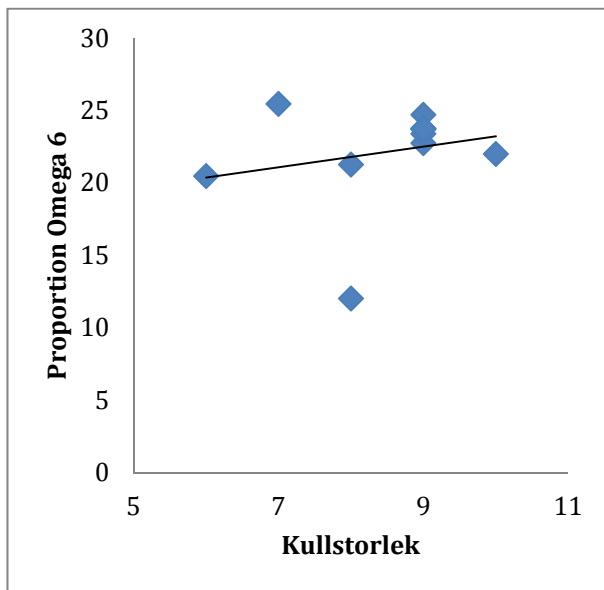


Fig. 3. Proportionen ω 6-fettsyror ökar ju större kullen är. $R^2=0,047$ $p=0,036$

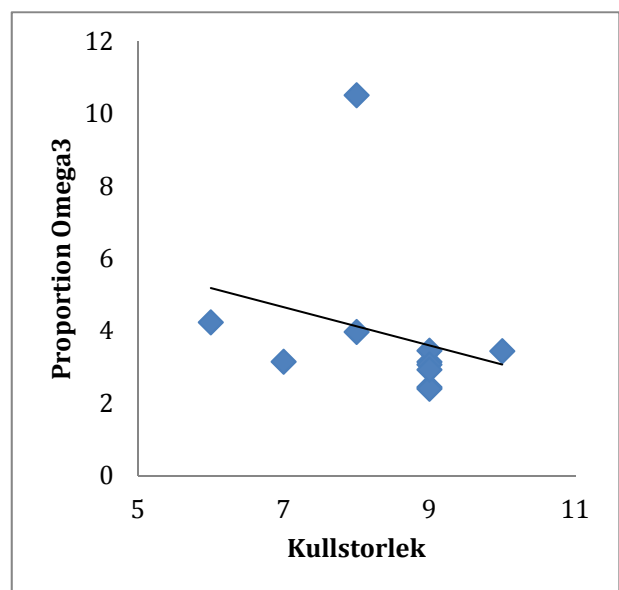


Fig. 4. Proportionen ω 3-fettsyror minskar ju större kullen är. $R^2=0,071$ $p=0,006$

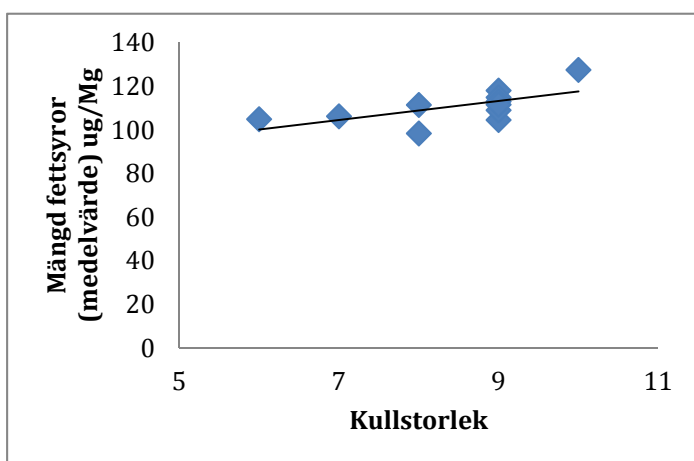


Fig. 5. Absolutvärdet av samtliga fettsyror (μ g fettsyror/mg äggula) ökade med kullstorlek. Värderna är medelvärden för kullarna. $p=0,036$, $R^2=0,401$

Ordning vilken äggen inom en kull är lagda

Det fanns inget signifikant samband mellan proportionen SFA och när i ordningen ägget var lagt. Det fanns ett positivt samband mellan proportion MUFA och ordning ($p=0,012$) (fig. 6), och ett negativt mellan proportion PUFA och ordning ($p=0,001$) (fig. 7). Däremot fanns det inget signifikant samband mellan ordning och proportionerna ω 6-fettsyror och ω 3-fettsyror var för sig, eller för kvoten ω 6/ ω 3. Det fanns ett signifikant negativt samband ($p<0,001$) mellan proportionen AA och ordningen inom kullen (fig. 8). Det fanns också ett negativt samband för ägglägningsordningen och proportionen DHA ($p=0,002$) (fig. 9).

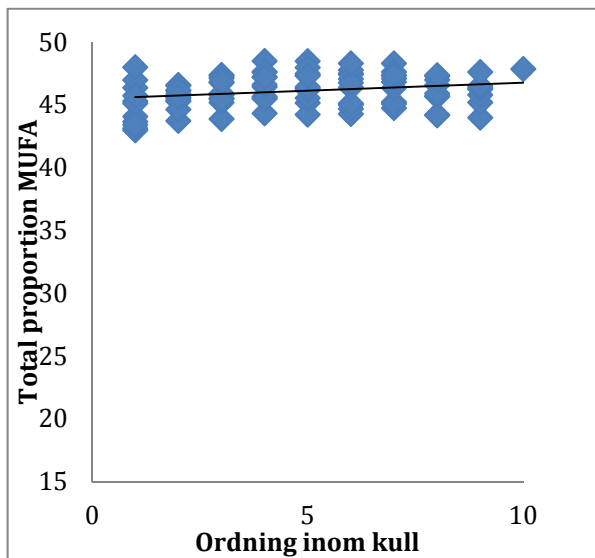


Fig 6. Proportionen av MUFA ökade med plats i läggningssekvensen inom en kull. $p=0,017$ $R^2=0,061$

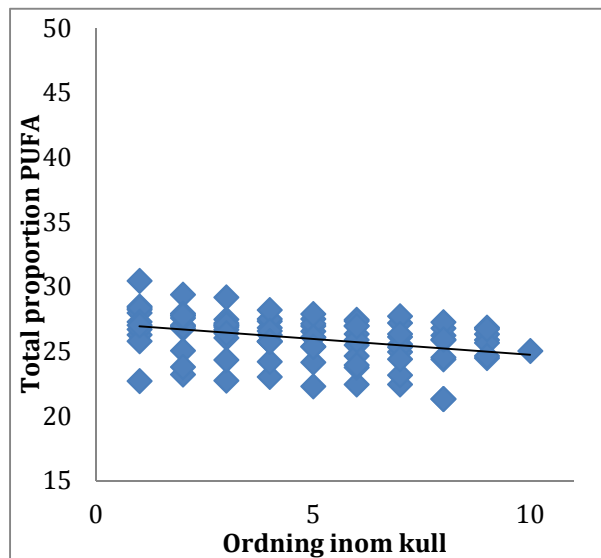


Fig. 7. Proportionen av PUFA minskade med plats i läggningssekvensen inom en kull. $p=0,001$ $R^2=0,123$

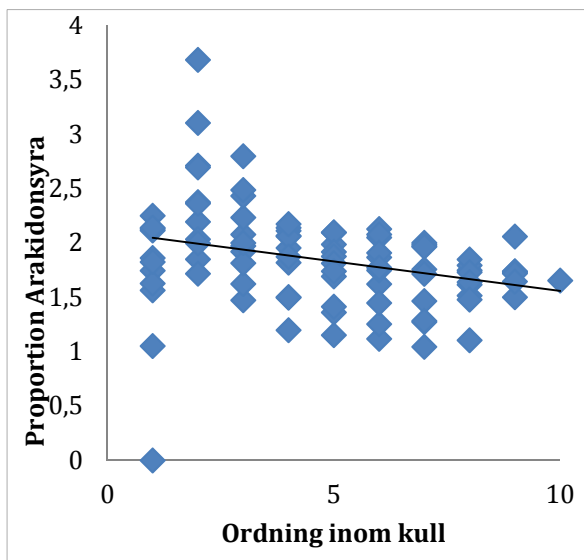


Fig. 8. Proportionen Arakidonsyra avtar med plats i läggningssekvensen inom en kull. $p<0,001$ $R^2=0,192$

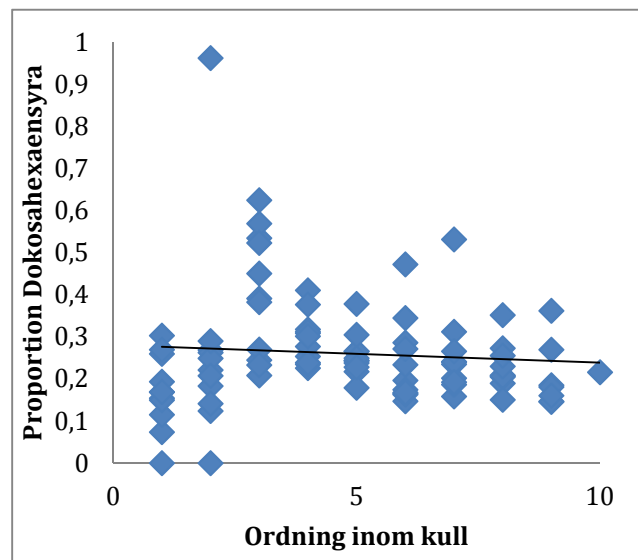


Fig. 9. Proportionen Dokosaheksaensyra avtar med plats i läggningssekvensen inom en kull. $p=0,002$ $R^2=0,101$

DHA och AA

Det fanns ett signifikant positivt samband mellan proportion $\omega 6$ PUFA och proportionen AA ($p<0,001$) (fig. 10), det vill säga när proportionen $\omega 6$ minskar eller ökar gör också AA det, men inget signifikant samband mellan DHA och $\omega 3$ PUFA (Fig. 11).

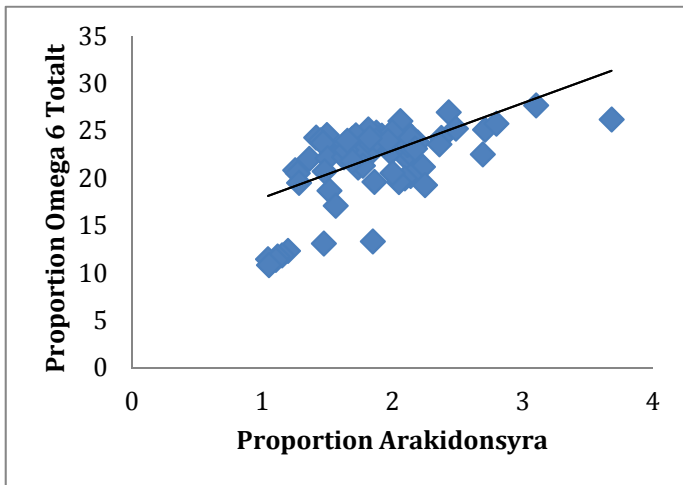


Fig. 10. Proportionen Arakidonsyra ökade då proportionen av samtliga ω 6-fettsyror ökade. $p < 0,001$ $R^2 = 0,343$

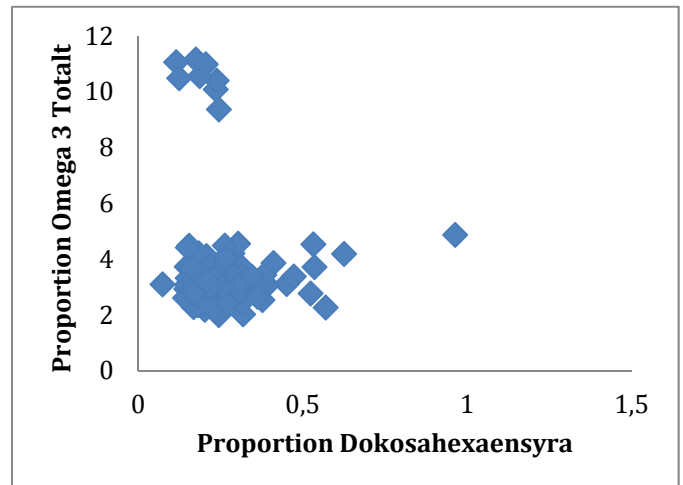


Fig. 11. Proportionerna Dokosaheksaensyra ökade inte då proportionen av samtliga ω 3-fettsyror ökade. $p = 0,316$ $R^2 = 0,011$

Diskussion

Allmänt om resultaten kan sägas att läggningsssekvensen verkar vara den faktor som har störst påverkan på fettsyrekompositionen i gulan. Ju längre bak i kullsekvensen ett ägg är lagt; desto mindre proportioner av de viktiga fleromättade fettsyrorerna i allmänhet och även de enskilda fettsyrorerna AA och DHA. Honans kondition verkar inte ha någon betydelse varken för storleken på kullen eller hur profilen utav fettsyror i hennes ägg ser ut, baserat på detta underlag.

Då varje test är gjort med enskilda regressioner användes medelvärdet för varje kull för testerna på kullstorlek och honans kondition för att undvika pseudoreplikat. Detta gjorde att det blev en liten statistisk population ($n = 11$ kullar) något som kanske kan ligga bakom en låg statistisk power och de höga p -värdena för dessa resultat. Det fanns inte heller data för alla honor, vilket gjorde den statistiska populationen för regressioner på honans kondition ännu mindre ($n = 9$). Därför gjordes scatter plots för dessa tester för att se om det gick att urskilja några trender. Dessa tydde dock inte heller på några starka samband mellan någon av fettsyrorerna eller grupperna utav fettsyror. Att inga signifikanta samband hittades är trots allt ett överraskande resultat då produktionen av ägg är en kostsam process för honan (Stevenson et al., 2000, Visser et al., 2001, Giordano et al., 2015), och hennes kondition borde säga något om hennes förmåga att producera många/högkvalitativa ägg. Man skulle också kunna resonera att en hona i bättre kondition skulle investera i mer utav de "dyrbara" DHA och AA i sina ägg, eller i de dietärt begränsade fleromättade fetterna överlag. Kanske skiljde sig inte honornas kondition åt tillräckligt mycket för att en effekt skulle synas i resultaten.

Det verkar finnas en ökande proportion MUFA ju senare i ordningen inom kullen ett ägg är lagt ($p < 0,001$) (fig. 6), och en minskande proportion PUFA ($p = 0,001$) (fig. 7). Detta

kan tolkas som att honans reserver av PUFA sinar ju fler ägg hon lägger och att proportionen MUFA därmed ökar som en följd av detta. MUFA kan syntetiseras "dag för dag" från kolhydrater via mättat fett (palmitinsyra och stearinsyra), medan PUFA endast kan syntetiseras vid tillgång på de essentiella LA och ALNA. Det skulle också kunna tolkas som en investering enligt *brood reduction*, där honan hellre investerar mer i de ägg som har störst chans att överleva fram tills de blir flygga, det vill säga de tidigast lagda inom kullen. (Slagsvold et al., 1984, Nager et al., 2000). Det kan också vara så att proportionen MUFA dras upp av sambandet mellan en ökande mängd MUFA med kullstorlek, se fig. 2.

Regressionen för DHA och honans kondition gav inget signifikant samband, det gjorde inte heller regressionen för kullstorlek och proportion DHA. Däremot fanns det ett negativt samband mellan ordningen på lagda ägg ($p=0,002$) det vill säga ju senare i ordningen ägget är lagt inom en kull, desto mindre proportion av DHA (se fig.9). Detta kan möjligtvis tyda på en större investering i de ägg med störst fitness senare i livet, vilket de tidigare lagda äggen ofta har (Krist et al., 2004, Nager et al., 2000, You et al., 2009). Då varken honans kondition eller kullens storlek verkar innebära några begränsningar för att investera i DHA i gulan ligger det i linje med teorin om *brood reduction*. Den minskande andelen DHA med plats i läggordningen går i linje med hur proportionen PUFA minskar för varje ägg (fig. 7), och hur MUFA ökar (fig. 6). Även detta tyder på att fler "dyra" fleromättade fetter investeras i de ägg med störst chans att nå flygg ålder, och att fler "billiga" enkelomättade fyller ut de som är senare lagda. DHA minskade oberoende av sammanagda proportionen ω 3-fettsyror (se fig. 11), vilket skulle kunna tyda på en selektiv fördelning av just DHA. Det vill säga även om det inte fanns någon begränsning i mängden tillgängliga ω 3-fettsyror, fördelades ändå DHA med fördel till de tidigast lagda äggen inom kullen. Kullstorleken hade ingen signifikant betydelse för proportionen DHA, men scatter plot tydde på en negativ trend.

Tidigare studier har visat att äggstorleken ökar med läggningssekvensen och att proportionen lipider minskar, men proportionen av vatten ökar (Nager et al., 2000). Detta skulle även kunna vara trenden för dessa kullar, där den totala mängden mättade fettsyror minskar med kullstorlek (se fig. 1). Absolutvärdet av samtliga fettsyror ökar däremot med kullstorlek (se fig. 5). Då detta absolutvärde är ett medelvärde för kullen som helhet, skulle det kunna vara så att vid god tillgång på föda läggs större kullar, men proportionen av dessa fetter blir trots allt mindre per ägg- som en följd av att de sist lagda äggen får så mycket lägre proportioner jämfört med de första (Nager et al, 2000). Det finns inga data på hur många gram gula som totalt fanns i äggen, vilket gör det svårt att dra några slutsatser när det kommer till absolutvärdena.

Hur de olika fettsyrorerna i gulan tas tillvara på är noggrant reglerat och skiljer sig åt mellan arter. För arter som kungspingvin (*Aptenodytes patagonicus*), där ruvningen och kläckningen är påfrestande processer, används hela 80% av fetterna till förbränning, medan motsvarande andel för sothöna (*Fulica atra*) och rörhöna (*Gallinula chloropus*) är 56-59% (Pappas et al., 2007). Det finns även en reglering för vilka specifika fettsyror som förbränns. Sterol och fosfolipidgrupper är inte tillgängliga för förbränning (Pappas et al., 2007). Fosfolipider bygger upp cellmembran och steroler är komponenter i hormoner och andra signalsubstanser (Holum, 1998). Mängden DHA och AA som finns i äggulan förbränns i mycket liten utsträckning (Pappas et al., 2007).

AA minskade med ägglägningsordning inom kullen (se fig. 8). AA är viktigt för utveckling av hjärta, lever och muskelvävnad hos fostret. (Speake et al., 1998), och en mindre mängd AA i gulan borde därför ha en negativ inverkan på fostrets utveckling och senare fitness. Då AA är en biosyntesprodukt av linolsyra liksom övriga ω 6-fettsyror testades huruvida det fanns ett samband mellan ökade proportioner AA och ökade proportioner av ω 6-fettsyror överlag (se fig. 10). Det fanns ett signifikant positivt samband, vilket kan tyda på att det kanske snarare finns en preferens för upptag av linolensyra eller ω 6-fettsyror generellt än AA specifikt. När det kommer till kullstorlek hittades inga signifikanta samband men en scatter plot tydde på en negativ trend, vilket står i konflikt med regressionen mellan ω 6-fettsyror och kullstorlek, som tydde på ett positivt samband.

Alla tester gjordes även mot absolutvärdet av alla fettsyror och grupper av fettsyror (μ g fettsyra/mg äggula), men då inga data om hur stora ägg eller äggulor varje ägg hade säger det inte så mycket om fettsyreprofilerna i varje ägg (undantaget kvot ω 6/ ω 3).

Det hittades ett negativt samband för proportionen ω 3-fettsyror med kullstorlek ($p=0,036$) (se fig. 4), vilket ligger i linje med teorin om avvägning mellan kvalitet på och antal avkomma. Ett positivt samband mellan proportionen ω 6-fettsyror med kullstorlek hittades ($p=0,006$) (se fig. 3), vilket tyder på att ägg från dessa kullar skulle vara mer utsatta för oxidativ stress vid en immunrespons. Inget signifikant samband hittades för kvoten ω 6/ ω 3 (här användes absolutvärdet). Ägglägningssekvensen verkar inte heller spela någon roll för kvoten av ω 6/ ω 3 eller de enskilda proportionerna av ω 6- och ω 3-fettsyror.

Slutsatser

Trots en relativt liten statistisk population tycks det finnas en tendens till att investera färre fleromättade fettsyror och viktiga fettsyror som DHA och AA i senare lagda ägg inom en kull. Huruvida detta är en fråga om tillgång på dessa ämnen i honans föda eller en investering i de ägg som troligast kommer kläckas och överleva tills de når flygg ålder är svårt att svara på. Klart är att varken honans kondition eller kullstorlek verkar ha någon nämnvärd negativ påverkan på proportionerna av fleromättade fettsyror, i alla fall inte mot det underlag som finns för denna studie.

Referenser

- Ajuyah Y, Wang H, Sunwoo G. och Cherian J.S. 2003. Maternal Diet with Diverse Omega-6/Omega-3 Ratio Affects the Brain Docosahexaenoic Acid Content of Growing Chickens. *Biol Neonate*. 84: 45–52 DOI: 10.1159/000071443
- Anderson, G.J., Connor, W.E., Corliss, J.D. och Lin, D.S., 1989. Rapid modulation of the n-3 docosahexaenoic acid levels in the brain and retina of the newly hatched chick. *J. Lipid Res*. 30: 433–441.
- Bautista-Ortega J., Goeger D. E., och Cherian G. 2009. Egg yolk omega-6 and omega-3 fatty acids modify tissue lipid components, antioxidant status, and ex vivo eicosanoid production in chick cardiac tissue. *Poultry Science*. 88:6: 1167-1175 DOI:10.3382/ps.2009-00027
- Bolton, M., Houston D. och Monaghan, P. 1992. Nutritional constraints on egg formation in the lesser black-backed gull: an experimental study. *Journal of Animal Ecology*. 61:521-532
- Bonneaud, C., Mazuc, J., Gonzalez, G., Haussy, C., Chastel, O., Faivre, B., Sorci, G., 2003. Assessing the cost of mounting an immune response. *Am. Nat.* 161: 367–379.
- Calder, P.C. 2006. n3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases, *Am. J. Clin. Nutr.* 83:1505–1519.
- Casasole, G., Costantini, D., Cichoń M. och Rutkowska, M. J. 2016. The effect of maternal immunization on female oxidative status, yolk antioxidants and offspring survival in a songbird. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 194: 56–61
- Costantini, D., Møller, A.P., 2009. Does immune response cause oxidative stress in birds? A meta-analysis. *Comp Biochem Physiol A* 153: 339–344.
- Daan S och Tinbergen JM. 1997. Adaptation of life histories. In: *Behavioral ecology: An evolutionary approach*. Oxford, Blackwell. pp. 311–3.
- Giordano, M., Costantini D., Pick, J. L. och Tschirren, B. 2015. Female oxidative status, egg antioxidant protection and eggshell pigmentation: a supplemental feeding experiment in great tits *Behav Ecol Sociobiol*. 69: 777–785
- Holum, J. R. 1998. *Fundamentals of general, organic and biological chemistry*. Wiley, sixth ed. pp. 546-550
- Halliwell, B.H., och Gutteridge, J.M.C. 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*. fourth ed. Oxford University Press, Oxford
- Krebs, J. R. och Davies, N. B. 1993. *An introduction to behavioral ecology*. Blackwell science, third ed. pp.15-18
- Krist, M., Remeš, V., Uvírová, L., Nádvorník P. och Bureš, S. 2004. Egg size and offspring performance in the collared flycatcher (*Ficedula albicollis*): a within-clutch approach. *Oecologia* 140: 52–60
- Lin, D.S., Connor, W.E. och Anderson, G.J., 1991. The incorporation of n-3 and n-6 essential fatty acids into the chick embryo from egg yolks having vastly different fatty acid compositions. *Pediatr. Res*. 29: 601–605.

- Maldjian, A., Farkas, K., Noble, R.C., Cocchi, M. och Speake, B.K., 1995. The transfer of docosahexaenoic acid from the yolk to the tissues of the chick embryo. *Biochim. Biophys. Acta* 1258: 81–89.
- Maldjian, A., Cristofori, C., Noble, R. C och Speake, K., B. 1996. Fatty Acid Composition of Brain Phospholipids from Chicken and Duck Embryos *Comp. Biochem. Physiol.* 115B: 153-158
- Marri, V. och Richner, H. 2014. Yolk carotenoids increase fledging success in great tit nestlings *Oecologia* 176: 371–377. DOI 10.1007/s00442-014-3051-2
- Marri., V och Richner, H. 2014. Immune response, oxidative stress and dietary antioxidants in great tit nestlings. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 179 (2015) 192–196.
- Nager, R. G., Monaghan, P. och Houston, D. C. 2000. Within-Clutch Trade-Offs between the Number and Quality of Eggs: Experimental Manipulations in Gulls. *Ecology*. 81:5: 1339-1350
- Pappas, A. C., Karadas F., Wood N. A. R. och Speake, B. K. 2007. Metabolic fates of yolk lipid and individual fatty acids during embryonic development of the coot and moorhen. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 147: 102–109
- Sadava, D., Hillis, D., Heller, C., och Berenbaum, M. 2014. *Life The science of biology*. MA, USA. pp. 1156-1162
- Saino N, Bertacche V, Ferrari RP, Martinelli R, Møller AP, och Stradi R. 2002. Carotenoid concentration in barn swallow eggs is influenced by laying order, maternal infection and paternal ornamentation. *Proc R Soc Lond B*. 269: 1729–1733
- Soler, J.J., de Neve, L., Perez-Contreras, T., Soler, M., Sorci, G., 2003. Trade-off between immunocompetence and growth in magpies: an experimental study. *Proc. R. Soc. B* 270: 241–248.
- Sorci, G., Faivre, B., 2009. Inflammation and oxidative stress in vertebrate host-parasite systems. *Phil. Trans. R. Soc. B* 364: 71–83
- Speake, B. K, Alison M. B. Murray, A. M. B. och Noble, R. C. 1998. Transport and transformations of yolk lipids during development of the avian embryo. *Prog. Lipid Res.* 37:1: 1-32
- Stevenson, I. R. och Bryant, D. M. 2000 Climate change and constraints on breeding. *Sature*. 406: 366-367.
- Surai, P. F. 2003. *Natural Antioxidants in Avian Nutrition and Reproduction*. Nottingham university press, Nottingham.
- Slagsvold T., Sandvik R. och Lorentsen MH. On the adaptive value of intra-clutch egg-size variation in birds. *Auk*. 101: 685–97.
- Toledo., A., Andersson, M., Wang, H., Salmon, P., Watson, H., Burdge., G. och Isaksson, C., The Science of Nature Fatty acid profiles of great tit (*Parus major*) eggs differ between urban and rural habitats, but not between coniferous and deciduous forests, opubl.
- You, Y., Feng, J., Wang, H., Wang, J., Dong, C., Su, X., Sun, H., Gao, W. 2009. Variation in egg size and nestling growth rate in relation to clutch size and laying sequence in great tits *Parus major* *Progress in Natural Science*. 19: 427–433

