

SL serien

*Maria Sviland, Henrik Jensen,
Børge Moe, Åsa Borg*

Gråspurv, farskap og forskningsmetoder



Trondheim

Program for
lærerutdanning

Skolelaboratoriet
for matematikk, naturfag
og teknologi

Nr. 13
Mai 2007

Tidligere utgitt i SLserien

*Nr. 1, aug. 2003: Jan Ove Rein: **Hold og stell av vandrende pinner***

*Nr. 2, okt. 2003: Rossing, Stefansson, Bungum: **Elektronikk for skolen***

*Nr. 3, nov. 2003: Rossing, Kind: **Kreativitet og skaperglede***

*Nr. 4, aug. 2004: Rossing, Fagerli, Dinesen: **Teknologi i skolen, "Bygg et hus"***

*Nr. 5, sept. 2004: Karoliussen: **Fornybare energikilder***

*Nr. 6, apr. 2005: Næss: **Luft og strømminger***

*Nr. 7, des. 2005: Rossing: **Fra elektriske kretser til intelligente hus***

*Nr. 8, apr. 2006: Karoliussen: **Energi for framtiden***

*Nr. 9, juli. 2006: Rossing, Kjeldstad: **Fysikkløypa ved NTNU***

*Nr.10, nov. 2006: Bungum: **Mekaniske leker: Prinsipper og ideer***

*Nr. 11, des. 2006: van Marion: **Feltarbeid i naturfag og biologi***

*Nr. 12, feb. 2007: Rossing, Fagerli: **Varmepumper og solfangere***

GRÅSPURV, FARSKAP OG FORSKNINGSMETODER

ISBN-13 978-82-7923-052-6

ISSN 1503-9242

Trondheim 2007

Layout og redigering: Maria Sviland

Redaktører for SLserien: Torlaug Løkensgard Hoel
Ove Haugaløkken
Sissel Mathiesen

Publikasjoner i skriftserien kan kjøpes
ved henvendelse til:

Program for lærerutdanning (PLU)

NTNU

Låven, Dragvoll Gård

7491 Trondheim

e-post: sissel.kjol.berg@plu.ntnu.no

Telefon: 73 59 19 90

Telefaks: 73 59 10 12

<http://www.plu.ntnu.no/>

Faglige spørsmål rettes til:

**Skolelaboratoriet for matematikk,
naturfag og teknologi (SL)**

NTNU

Realfagbygget, Høgskoleringen 5

7491 Trondheim

Telefon: 73 55 11 43

Telefaks: 73 55 11 40

<http://www.skolelab.ntnu.no>

Rev 1.0 27.04 2007

Gråspurv, farskap og forskningsmetoder

Maria Sviland, Henrik Jensen,
Børge Moe, Åsa Borg

Forord

I Kunnskapsløftet (KL06) introduseres det to nye programfag for videregående skole: ”Geofag” og ”Teknologi og Forskningslære” (ToF). Dette heftet er laget som et undervisningsopplegg i ToF og kombinerer moderne forskning tilknyttet bevarings- og populasjonsøkologi med relevante bioteknologiske teknikker. Dermed kan heftet også være til nytte også i programfag for biologi for videregående skole. Heftet konkretiserer læreplanens intensjoner om naturvitenskapelig arbeidsmetode, den unge forskeren, den unge biologen samt flere biologirelaterte tema i KL06.

Heftet er primært laget for elever, men er også egnet til etter- og videreutdanning for lærere. Seks konkrete og detaljert aktiviteter er beskrevet. Det legges stor vekt på metodisk tilnærming og bruk av teknologi og matematikk for å forstå økologiske prosesser.

Torlaug Løkensgard Hoel Ove Kr. Haugaløkken Sissel W. Mathiesen

Forord

Dette undervisningsopplegget er i hovedsak utviklet for å kunne inngå i programfaget teknologi og forskningslære, men dekker også læreplanmål fra programfaget Biologi. Gjennom arbeid med dette undervisningsopplegget vil elevene få en innføring i et større forskningsprosjekt ved "Population Biology Centre" på Institutt for biologi ved Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU). Elevene vil få konkrete eksempler på bruken av naturvitenskapelige arbeidsmetoder. I tillegg vil elevene få et innblikk i hvordan forskerne på prosjektet arbeider, gjennom praktiske eksempler, videosnutter, labøvelser og regneoppgaver. Undervisningsopplegget har som målsetning å hjelpe skolene med implementering av programfaget teknologi og forskningslære. Det er derfor lagt vekt på bruk av enkelt og rimelig utstyr.

Maria Sviland,
Henrik Jensen,
Børge Moe,
Åsa Borg,
NTNU, mai 2007

Innhold

Forskningsprosjekt på gråspurv	16
Organisering og finansiering av gråspurvprosjektet	17
Planlegging og gjennomføring av et naturvitenskapelig prosjekt	17
Kjønnsrate og størrelse på brystflekken – våre to hovedtemaer	18
Hva skal kart legges og hvordan skal undersøkelsene gjennomføres?	19
Bearbeiding av datamaterialet og skriving av artikkel	20
Hvordan brukes og utvikles hypoteser, teorier og modeller i forskning?	21
Teorier	21
Modeller	22
Hypoteser og prediksjoner	23
Våre hypoteser og prediksjoner	24
To hovedtyper av statistiske tester	26
Hvordan kan empiriske data styrke eller forkaste en hypotese?	27
Hvordan kan forskning utvikles og kvalitetssikres gjennom samarbeid, kritisk vurdering og argumentasjon?	29
Skriving av en vitenskapelig artikkel	29
Struktur i en vitenskapelig publikasjon eller presentasjon	30
Gråspurv og bevaringsbiologi: økologi, matematikk og molekylære metoder	31
Vi beskriver naturen med matematikk	32
Teknikker i molekylærbiologi	33
Kjønnsbestemmelse og farskapsanalyse av gråspurv ved hjelp av PCR og elektroforese	34
Elevaktivitet 1: Kjønnsrate	34
Ekstrahering av DNA	35
Ekstrahering av DNA – fremgangsmåte	36
PCR	37
PCR – fremgangsmåte	40
Elektroforese	42
Elektroforese – fremgangsmåte	43
Påvisning av DNA-fragmentene	45
Påvisning av DNA-fragmentene – fremgangsmåte	46

Elevaktivitet 2: Kjønnbestemmelse	47
Regneoppgaver:	47
Elevaktivitet 3: Tilpassningsatferd	48
Hypotesetesting tilpassningsatferd – fremgangsmåte	48
Elevaktivitet 4: Tolkning av elektroferogram	59
Metoder i felt og på labb	61
Kapillær elektroforese	62
Tolkning av elektroferogram – fremgangsmåte	64
Elevaktivitet 5: Beregning av seleksjon og evolusjonær respons	64
Beregning av evolusjonær respons og seleksjon på brystflekken til gråspurvhaner	64
Beregning av forskjeller i overlevelse og reprodutiv suksess (S)	65
Beregning av arvelig variasjon (h^2)	71
Beregning av forventet evolusjonær respons R	76
Men kan brystflekken bli uendelig stor?	77
Elevaktivitet 6: Gjør rede for dette forskningsprosjektet	77
Referanser	79
Vedlegg 1: Genotyping av 21 hanner og ungene i deres reir	80
Vedlegg 2: Formler	87
Vedlegg 3: Utstyr og reagenser	88

Undervisningsopplegget dekker disse læreplanmålene:

Teknologi og forskningslære X,1

Den unge forskeren

Hovedområdet handler om vitenskapelige undersøkelser i aktuelle emner relatert til helse og miljø, og hvordan disse undersøkelsene planlegges, gjennomføres og presenteres. I tillegg dreier det seg om systematiske målinger og analyse av resultater.

Mål for opplæringen er at eleven skal kunne

- gjøre rede for hvordan et naturvitenskapelig prosjekt planlegges, gjennomføres og etterarbeides før det blir publisert

Læreplanmål: Teknologi og forskningslære 2

Naturvitenskapelige arbeidsmetoder

Hovedområdet handler om sentrale arbeidsmetoder i naturvitenskap. Videre dreier det seg om forholdet mellom empiri og teori og hvordan kunnskap utvikles og publiseres i forskningsmiljøer.

Mål for opplæringen er at eleven skal kunne

- forklare hva som menes med modell, teori og hypotese, og gjøre rede for hvordan de brukes og utvikles i forskning
- drøfte ved å bruke eksempler på hvordan empiriske data kan styrke eller forkaste en hypotese
- gjøre rede for hvordan forskning utvikles og kvalitetssikres gjennom samarbeid, kritisk vurdering og argumentasjon
- gjøre rede for strukturen i en vitenskapelig publikasjon eller presentasjon

Den unge forskeren

Hovedområdet handler om problemformuleringer, planlegging og gjennomføring av vitenskapelige undersøkelser. Eksperimentering, presentasjon og kritisk vurdering av resultater inngår i hovedområdet.

Mål for opplæringen er at eleven skal kunne

- gjøre rede for et forskningsprosjekt i en bedrift eller institusjon, og beskrive problemstillinger, organisering, målestyr, resultater og finansiering

Biologi 1

Funksjon og tilpassing

Hovedområdet handler om at utviklinga av livet på jorda har ført til et mangfold av organismer som viser mange former for tilpassing til ulike levevilkår. Utvalgte trekk frå både bygning, funksjoner, formeiring og atferd hos organismer blir satt i sammenheng med denne utviklingen.

Mål for opplæringen er at eleven skal kunne

- gi eksempler på, og forklar hvordan atferd som kommer av evolusjon, er en del av tilpassinger til omgivelsene

Biologisk mangfold

Hovedområdet handler om det biologiske mangfoldet lokalt og globalt og om at trusler mot mangfoldet er en av de store utfordringene menneskene står overfor. Klassifisering av arter og verdien av variasjon innenfor og mellom populasjoner er en del av hovedområdet, i tillegg til sammenhengen mellom mangfold, habitat og nisjer.

Mål for opplæringen er at eleven skal kunne

- gi eksempler på variasjon innenfor og mellom populasjoner av same art, og forklar hva denne variasjonen har å si

Biologi 2

Den unge biologen

Hovedområdet handler om å bruke biologifaglige arbeidsmåter i økologisk feltarbeid og i undersøkelser og forsøk i laboratoriet.

Mål for opplæringa er at eleven skal kunne

- planlegge å gjennomføre undersøkelser i laboratorium fra alle hovedområdene, rapportere fra arbeidene med og uten digitale verktøy og peke på feilkilder i undersøkelsene

Bioteknologi

Hovedområdet handler om utviklinga innenfor bioteknologi og genteknologi og hvordan det har ført til nye hjelpemiddel og teknikker innenfor medisin, produksjon av mat og biologisk forskning.

Mål for opplæringa er at eleven skal kunne

- gjøre greie for framstilling av genetiske fingeravtrykk, og hvordan de kan brukes i rettsmedisin og i studium av slektskap mellom individ og grupper av organismer

Økologi

Hovedområdet handler om at alle levende organismer er påvirket av andre organismer og av de fysiske og kjemiske omgivelsene der de lever. I tillegg dreier hovedområdet seg om vilkåra som regulerer og påvirker ulike populasjoner i et økosystem. Menneskeskapt miljøproblem er også en del av hovedområdet.

Mål for opplæringa er at eleven skal kunne

- gjør greie for faktorer som regulerer vekst og størrelse av populasjoner og forvaltning av bestander i et bærekraftig perspektiv
- forklare hvordan et økosystem kan endre seg over tid, knytte det til klimaendring og andre miljøproblem

Evolusjon

Hovedområdet handler om hvordan livet på jorda kan ha oppstått, og hovedtrekka i utviklingen fram til i dag. Sentralt i hovedområdet er opphav av nye arter med nye eigenskaper sett i sammenheng med de grunnleggende mekanismene som kan endre den genetiske sammensetningen i populasjoner.

Mål for opplæringa er at eleven skal kunne

- forklare hvordan den genetiske sammensetningen i populasjoner blir endra gjennom mutasjoner, naturlig seleksjon, genetisk drift, genflyt, horisontal genoverføring og endring av kromosomantall
- forklare hvordan molekylærbiologi og genteknikker gir oss ny kunnskap om opphavet til arter og utviklinga av slektskapstre

Forskningsprosjekt på gråspurv

Undervisningsopplegget er laget med bakgrunn i et større forskningsprosjekt på Helgelandskysten, som er en del av ”*Population Biology Centre*” på Institutt for biologi ved Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU). *Population Biology Centre* er et tverrfaglig senter for forskning innen bevaringsbiologi. Siden 1993, har forskerne studert viktige økologiske og evolusjonære prosesser med gråspurv som modellart.

Økt kunnskap om økologiske og evolusjonære prosesser i naturen er viktig fordi vi påfører den raske endringer som dyr og planter ikke klarer å tilpasse seg til. Enkelte mener vår utvikling har skapt en ubalanse mellom mennesker og natur. Vi er i stand til å overføre store mengder kunnskap både mellom og innen generasjoner ved hjelp læring. Dette er en hurtig prosess, og bidrar til store endringer i dyr og planters leveområder. Eksempel på dette er bygging av infrastruktur som veier og hus og påvirkning av klimaet. Dyr overfører kunnskap ved hjelp av gener. Dette er en langsom prosess. For eksempel har mange dyr problemer med å tilpasse seg et varmere klima, og mange kan ikke leve i små habitater som finnes i form av gjenværende øyer mellom vår menneskeskapte infrastruktur. Slik har en rekke dyrearter blitt færre og færre i antall. Mange arter er i dag truet av utrydding. Menneskelig aktivitet har skylden for dette.

Denne ubalansen prøver forskerne å forklare, beskrive og forstå, ved å se på dyrenes evne til å tilpasse seg menneskeskapte endringer i økosystemene. På Helgeland blir gråspurven brukt som modellorganisme for å få svar på slike viktige økologiske og evolusjonære prosesser i naturen. Dette prosjektet har to hovedmål:

- Bevaringsbiologi. Å finne ut hva som påvirker levedyktigheten til små bestander.
- Grunnforskning, knyttet opp mot bevaringsbiologi. Å forstå prosesser som har betydning for bestandssvingninger.

På Helgeland har økologiske og evolusjonære prosesser hos gråspurvene har blitt studert, ved å måle parametere som antall egg og unger i ulike reir, overlevelsen til unger og voksne, spredning av fugler mellom øyene, samt flere morfologiske trekk hos både unger og voksne. I tillegg er slektskap og kjønn hos fuglene kartlagt ved hjelp av genetiske analyser. Teoriene og resultatene fra prosjektet kan brukes i modeller som omfatter en rekke truede dyrearter. Kunnskap om gråspurven på Helgelandskysten kan altså brukes til å forstå hva som styrer levedyktigheten til små bestander. I første del av dette undervisningsopplegget følger en generell

beskrivelse av forskningsprosjektet, mens enkelte deler av prosjektet har fått detaljert omtale lengre bak.

Organisering og finansiering av Gråspurvprosjektet

Gråspurvprosjektet er for øyeblikket finansiert gjennom forskningsprogrammene ”Strategic University Programme in Conservation Biology” og ”Storforsk” fra Norges forskningsråd. Tidligere har prosjektet også vært finansiert gjennom forskningsmidler fra EU. Enkelt personer som har vært knyttet til prosjektet, har fått sin lønn finansiert gjennom personlige stipender, eller strategiske midler, enten fra Norges forskningsråd eller NTNU.

Prosjektmidlene varer oftest bare to eller tre år. Når prosjektperioden er over må det søkes om nye penger, og da må det sendes inn en prosjektsøknad av høy kvalitet. Søknaden bedømmes av en komité av fagfolk innen emnet. Om man får støtte eller ikke, avhenger av kvaliteten på prosjektet det søkes om i forhold til alle de andre søknadene som sendes inn, og av hvor mye penger som finnes. Ofte er det svært vanskelig å få finansiert sitt forskningsprosjekt.

I skrivende stund (våren 2007) er det tilknyttet ti forskere, en doktorgradsstipendiat og fire mastergradsstudenter til gråspurvprosjektet. Bernt-Erik Sæther er prosjektleder. Tre av ti forskerne er ansatt ved Institutt for biologi, mens de andre forskerne er samarbeidspartnere, enten ved Institutt for matematiske fag, eller ved universiteter i Sverige, England og USA. I tillegg blir det leid inn tre - fire personer for å få utført feltarbeidet om sommeren.

Planlegging og gjennomføring av et naturvitenskapelig prosjekt

En naturvitenskapelig undersøkelse planlegges ofte ut fra mangler eller usikkerhet i eksisterende teori, innen et emne eller tema. Problemstillinger for et forskningsprosjekt blir utviklet først og fremst med bakgrunn i hva som mangler av kunnskap på området og hvilken type kunnskap samfunnet anser som viktig å ha. Eksempel på en problemstilling kan være:

- Hvilke prosesser som er viktige for overlevelsen til små bestander?
- Hva skjer med disse bestandene når mennesker påvirker deres leveområder?

Generelt vet vi at små bestander er mer sårbare for å bli utryddet enn store bestander, derfor er det viktig å ha god kunnskap om hvilke prosesser som virker

inn på små bestander. Det er en rekke faktorer som påvirker overlevelsen i bestander. Eksempler er klima, næringstilgang og konkurranse av andre arter. I dette opplegget skal vi se nærmere på hvordan individene i en bestand gjennom tilpassing av sine forplantningsstrategier kan påvirke overlevelsen i bestanden. De konkrete spørsmålene vi skal se på, er:

Kjønnsrate og størrelse på brystflekken - våre to hovedtemaer

Vi skal i dette undervisningsopplegget jobbe med to problemstillinger i forskningsprosjektet på Helgelandskysten. Begge problemstillingene har betydning for overlevelsen til gråspurven.

- Er hunnen i stand til å påvirke kjønnsraten på avkommene for å øke overlevelsen til ungene i reiret?
- Påvirker størrelsen på hannens brystflekk hvor mange av sine gener han fører videre til framtidige generasjoner, og vil dette gjøre at størrelsen på brystflekken vil forandre seg fra generasjon til generasjon?

Andelen unger i et reir, eller andelen individer i en bestand av et bestemt kjønn, kalles på fagspråket kjønnsrate. Med kjønnsrate i denne undersøkelsen mener vi hvor stor andel av individene som er hanner. Kjønnsraten i et kull beregnes ved å dividere antall overlevende hanner med totalt antall overlevende unger i kullet. Kjønnsraten kan variere mellom 0 (ingen hanner) og 1 (kun hanner), men i naturlige bestander er den oftest omkring 0,5 (50% hanner og 50% hunner). Kjønnnet på ungene som overlever til de blir voksne, kan ha stor betydning for vekstraten til små populasjoner og sannsynligheten for at populasjonen vil dø ut.

En svært skjev kjønnsrate har ofte en negativ effekt på vekstraten til populasjonen. I tillegg er det viktig at så mange unger som mulig overlever til de blir voksne og kan produsere egne avkom. Derfor vil forskerne finne ut om det er forskjell i overlevelse hos hanner og hunner, ut i fra om de er født tidlig eller sent på sommeren. Hvis for eksempel hanner overlever bedre når de er født sent, kan hunnen øke overlevelsen til ungene i reiret ved å produsere flere hanner sent på sommeren. Forskerne tror derfor det kan være forskjeller i kjønnsraten hos avkommene som følge av fødselstidspunkt, siden hanner er større enn hunner og trenger større tilgang på næring for å overleve. Næringstilgangen øker som regel utover sommeren.

Variasjon mellom hanner i størrelse på brystflekken kan også påvirke levedyktigheten til populasjonen. Resultater fra tidligere studier har antydnet at størrelsen på den svarte brystflekken hos gråspurvhanen kan ha sammenheng med

hvor mange unger han får. Studiene har vist at hanner med stor brystflekk får flere unger enn hanner med mindre brystflekk. Noen ganger er det bare en, eller noen få av hannene, som får avkom og fører gener videre til framtidige generasjoner. Dette kan føre til tap av genetisk variasjon. Mindre genetisk variasjon i en bestand gjør den mer sårbar ovenfor endringer i miljøet. Forskerne er derfor interessert i å finne ut om variasjon i brystflekkstørrelse leder til variasjon i antall avkom hos gråspurvvene på Helgeland.

For å få svar på om stor brystflekk gir flere avkom, må forskerne finne ut om hannene er far til unger i andre reir enn sitt eget, og om det er vanligst at hanner med store brystflekker er slike "utenomekteskapelige" fedre. Når forskjeller i et trekk gir ulikt antall avkom blant individene, kan mange viktige prosesser påvirkes i små bestander. For eksempel kan større grad av innavl føre til tap av genetisk variasjon og dermed øke sannsynligheten for at populasjonen vil dø ut.

I tillegg vil en bedre forståelse av hvordan et trekk som brystflekken kan endre seg fra generasjon til generasjon, også fortelle noe om hvordan andre trekk kan endre seg over tid. Når forskjeller i et trekk er arvbare, har dette betydning for hvor raskt populasjoner genetisk kan tilpasse seg for eksempel klimaforandringer. Forskerne er interessert i å finne ut om hannenes brystflekkstørrelse er bestemt arv eller miljø for å få en bedre forståelse av evolusjonære prosesser. For eksempel hvis brystflekken er genetisk bestemt, og har sammenheng med hvor mange unger hannene får, kan dette føre til at brystflekkstørrelsene i bestanden øker over tid. Hvor raskt slike endringer kan skje kan gi oss viktig kunnskap om hvor hurtig dyr kan tilpasse seg endringer i leveområder.

Hva skal kartlegges og hvordan skal undersøkelsene gjennomføres?

Når problemstillingen er klar, må man finne ut hvordan undersøkelsene skal gjennomføres. Her kan det være ideer å hente fra litteraturen på området. Ved å se på hvordan tilsvarende undersøkelser har blitt gjort før, kan man få nyttig kunnskap for planleggingen av egne undersøkelser. Noen ganger finnes det ikke litteratur som man kan støtte seg til, da må man planlegge undersøkelsen slik at gyldighet og kvalitet på datamaterialet blir så god som mulig. Dette kan være en svært krevende jobb og gjøres ofte av forskere med lang erfaring.

Når det gjelder vår første problemstilling:

- Er hunnen i stand til å påvirke kjønnsraten på avkommene for å øke overlevelsen til ungene i reiret?

har forskerne kartlagt tre parametere:

- Om gråspurvungene i reiret er født tidlig eller sent på sommeren
- Antall hanner og hunner som er klekket i hvert reir i studieområdet
- Hvor mange som overlever til året etter

Ettersom det er vanskelig å se kjønn til gråspurvungene når de er i reiret, blir det tatt blodprøver av ungene for å finne ut hvilket kjønn de har. Deretter utføres en *kjønnsbestemmelse* ved hjelp av genetiske analyser i laboratoriet. Kjønnsbestemmelse av ungene i reiret må gjøres ved hjelp av genetiske analyser, fordi begge kjønnene hos gråspurv ser helt like ut. Gråspurven utvikler ikke fjærdrakten som er karakteristisk for voksne individer før den er kjønnsmoden. Når antall hunner og hanner i de ulike reirene, samt fødselstidspunkt og overlevelse er bestemt, kan vi finne ut om gråspurvmodrene justerer kjønn ut i fra når på sommeren ungene er født. Kjønnsbestemmelse i laboratoriet kommer vi nærmere inn på senere.

Når det gjelder vår andre problemstilling:

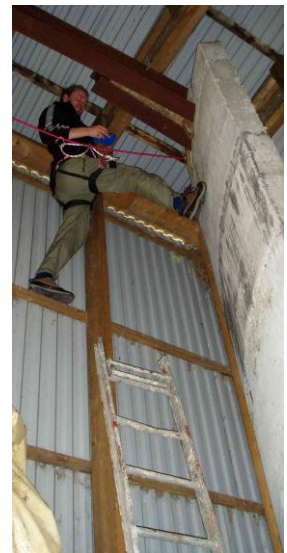
- Påvirker størrelsen på hannens brystflekk hvor mange av sine gener han fører videre til framtidige generasjoner, og vil dette gjøre at størrelsen på brystflekken vil forandre seg fra generasjon til generasjon?

har forskerne samlet inn data om parametere som:

- størrelsen på brystflekken til ulike hanner
- slektskapet mellom fuglene for å avgjøre farskap og antall avkom
- størrelsen på brystflekken til sønner

Ofte har hunnene paret seg med flere hanner, slik at hannen i reiret ikke nødvendigvis trenger å være biologisk far til alle ungene han mater. Genetisk bestemmelse av farskap er derfor viktig. Farskapsanalyser gjøres for å finne ut hvem som er far til hvem slik at vi kan undersøke om det er en sammenheng mellom brystflekkstørrelsen og antall avkom.

Hvis også brystflekkene hos far og sønner har stor grad av sammenheng, vil størrelsen på brystflekken forandre seg fra generasjon til generasjon.



Gråspurven holder ofte til inne i låver og uthus. Det kan ofte være vanskelig å nå de ulike reirene.

Foto: Terje Kolaas

Det blir altså gjort to typer genetiske analyser i dette forskningsprosjektet, kjønnsbestemmelse og farskapsanalyser. Til begge typene av analyser trenger man blodprøver fra hver fugl. Blodprøver og målinger av størrelsen på brystflekken, blir samlet inn ved å fange spurvene i nett. Måling og prøvetaking tar kun noen få minutter og skader ikke fuglene. Når prøvetakingen er unnagjort blir fuglene sluppet fri.

Bearbeiding av datamaterialet og skriving av artikkel

Når prøvene er ferdig analysert og datamateriale er systematisert, kan man se på sammenhenger mellom innsamlede parametere. Ved hjelp av ulike statistikkprogrammer kan man gjøre beregninger og teste hypoteser. Testing av hypoteser er en hjelp for å trekke objektive konklusjoner ut i fra datamaterialet i undersøkelsen. Dette skrives deretter sammen til en vitenskapelig artikkel. Mange av de vitenskapelige artiklene som blir skrevet av forskere blir deretter publisert i vitenskapelige tidsskrifter.



En gråspurv hann som har blitt undersøkt og er klar for å settes fri. Foto: Henrik Jensen

Hvordan brukes og utvikles hypoteser, teorier og modeller i forskning?

Teorier

Begrepet teori brukes mest om større sammenhenger. En teori er et kompleks av sammenhengende antakelser som innbyrdes støtter hverandre og utgjør en forståelsesramme for et emne eller et fagfelt. En teori kan overleve hvis den ikke blir *falsifisert*. Det vil si hvis den ikke blir motbevist av vitenskapen og avløst av nye teorier. De blir til stadighet testet av ulike forskere som er interessert i å se om teoriene er holdbare. Spesielt blir teorier revurdert og testet hvis forskerne har fått mer kunnskap. Hvis man finner ut at en teori ikke stemmer med resten av vitenskapen, er det grunnlag for videre testing av teorien.

Et eksempel på en teori er *evolusjonsteorien*. Den går ut på at de individer som er best tilpasset omgivelsene har størst overlevelse og reproduksjon, og får flest avkom. Disse avkommene vil i sin tur overleve og reprodusere bedre enn andre

individer. Dette kalles naturlig seleksjon. Evolusjonsteorien forutsetter at individer er forskjellige når det gjelder tilpassning til omgivelsene, og at de derfor vil ha ulik overlevelse og reproduksjon. En del av denne variasjonen er genetisk bestemt eller, arvbart som vi gjerne kaller det. Altså må det både foregå en naturlig seleksjon for et trekk og trekket må være arvbart, for at det skal foregå evolusjon.

Teorier kan være på ulike nivåer når det gjelder hvor generelle de er. Evolusjonsteorien er en overordnet teori som er grunnlaget for mye av den biologiske kunnskapen vi har i dag. Et eksempel på en teori som er mindre generell enn evolusjonsteorien, er en av teoriene som gjelder *livshistorien* til en organisme. Denne teorien sier at et individ har en viss mengde ressurser som kan fordeles til ulike aktiviteter og prosesser. Hvis organismen bruker mye ressurser og energi på en aktivitet f. eks. reproduksjon, vil dette gjøre at mengden den kan bruke på en annen aktivitet blir mindre, for eksempel vekst eller overlevelse. Denne teorien sier at organismer har avveininger mellom reproduksjon og overlevelse, eller mellom antall og størrelse på avkom.

I vitenskaplige artikler blir resultatene fra en undersøkelse drøftet i lys av eksisterende teorier innen emnet, og funn fra tidligere publiserte undersøkelser. Resultatene i et forskningsprosjekt kan enten være i tråd med eksisterende teori, eller de kan gå på tvers av eksisterende teori. Dette blir ofte drøftet i diskusjonsdelen av vitenskapelige artikler.

Teorier er stadig i forandring, teoriene utvikles, og gamle avløses med tiden av nye. Enkelte teorier er mer holdbare enn andre, og blir stående lenge før de blir avløst av ny viten. Teorier representerer dagens etablerte kunnskap, og må utvikles i sammenheng med andre teorier innen et fagfelt. Hvis det blir spriker innad i teoriene, eller mellom nært beslektede teorier må en grundig revurdering til. Da kan det hende at noen teorier blir byttet ut med nye teorier som passer bedre inn i sammenhengen. For eksempel er evolusjonsteorien avhengig av at jorden og levende organismer har eksistert tilstrekkelig lenge for at evolusjonen skal ha hatt tid til å virke. Dette blir støttet av det vi vet om geologi, fossiler og astronomi. Disse tre vitenskapelige disiplinene utgjør en større sammenheng av teorier.

Modeller

Tellinger og målinger blir ofte brukt når man skal undersøke en naturlig prosess. Tallverdiene blir satt inn i en *modell*, som er en matematisk formulering av en sammenheng. Ved hjelp av modellene kan man beregne hva som for eksempel vil skje med prosessen man studerer i framtiden, i andre populasjoner, eller i andre

arter. For å få til dette, må vi vite hvordan parametrene i modellen vil endre seg. Motsatt kan vi endre en og en parameter i modellen og se hvordan dette virker in på prosessen vi studerer. Dette kaller vi en *simulering*. Fordelen med simuleringer er at man kan forandre ulike parametere i modellen å finne ut hvordan den påvirker prosessen man studerer. Simuleringer gjør det i dag mulig å studere langt mer komplekse prosesser enn tidligere, for eksempel hvordan temperaturen på Jorden vil endre seg i årene fremover.

Ofte kan vi bruke modeller for å si noe mer generelt om en gitt prosess, for eksempel hvordan vi forventer at en sammenheng mellom to parametere skal være. Et eksempel på en modell for fugler kan være slik: Når en hunn øker antall egg hun legger med 1, reduseres sannsynligheten for at hun overlever til neste år med 10 %. Modeller er forenklinger av naturen og kan derfor gi ufullstendige og usikre beskrivelser eller forståelser av naturlige prosesser. I modeller tar man ofte ikke hensyn til alle parametrene som kan være viktig for prosessen vi studerer.

Det må vurderes nøye hvor mange parametere vi vil ha med i modellene. En modell med mange parametere vil kanskje kunne gi oss en mer sikker beskrivelse eller forståelse av prosessen vi studerer, men det blir ofte vanskeligere å ha kontroll på hvilken innvirkning de ulike parametrene har. Motsatt vil en modell med få parametere gi oss en mer usikker beskrivelse av prosessen vi studerer, men vi vil ha en større grad av kontroll over innvirkningen av de ulike parametrene.

Hypoteser og prediksjoner

Problemstillingen i et forskningsprosjekt er ofte spesifisert ved hjelp av hypoteser. Ut fra en hypotese finner man ut hva man forventer å observere i naturen hvis hypotesen er sann. Disse forventingene kalles prediksjoner. Et enkelt eksempel er følgende: Vi kan sette opp som hypotese at vann fryser ved null grader celsius. En prediksjon er at vi vil kunne observere at det dannes is når temperaturen er null grader. Når et enkelt eksperiment viser at det dannes is når temperaturen er ned i null grader, kan vi si at prediksjonen viste seg å være gyldig. Den støtter opp under hypotesen. Vanligvis nøyer man seg ikke med en enkel observasjon. I naturvitenskapen gjør man vanligvis mange observasjoner, som gir et stort datamateriale. For å kunne foreta en nøyaktig analyse av et stort datamateriale, gjør vi bruk av statistiske tester. Det er prediksjonens gyldighet vi tester når vi behandler de innsamlede dataene med statistiske tester. Disse testene gjør det mulig å analysere og trekke sluttinger fra et datamateriale på en objektiv måte.

Hypoteser settes opp som en mulig forklaring på en prosess vi er interessert i. Ofte blir hypoteser utviklet fordi det ut i fra eksisterende faglitteratur er tvil om de er riktige. Ved hjelp av undersøkelser i felt eller forsøk i laboratoriet, blir data som er relevant for å teste hypotesen samlet inn. Hvilke data man bør samle inn er avhengig prediksjonene som settes opp, og er svært viktig for gyldigheten i undersøkelsen.

Våre hypoteser og prediksjoner

I dette undervisningsopplegget skal vi sette opp to hypoteser med prediksjoner som vi skal bruke for å undersøke våre problemstillinger.

Kjønnsrate

Vår første problemstilling handler om hvorvidt hunnen er i stand til å påvirke kjønnsraten på avkommene, for å øke overlevelsen til ungene i reiret. Hypotesen er:

Hypotese 1

Hunner justerer kjønnet på avkommet for å øke sin egen fitness.

Vi må undersøke om det er forskjell i overlevelse mellom hunner og hanner avhengig av om de blir født tidlig eller sent på sesongen. Andre studier antyder at hanner overlever best hvis de blir født sent på sesongen (fordi de krever mer resurser enn hunner og mengden resurser øker utover i sesongen), mens hunner overlever best hvis de blir født tidlig på sesongen, eller like godt sent og tidlig i sesongen. Hvis dette stemmer også for gråspurvene på Helgeland, forventer vi at hunnene påvirker kjønnsraten til ungene. Ut fra denne hypotesen kan vi sette opp tre prediksjoner for hva vi vil observere i naturen dersom hypotesen er riktig.

Prediksjon 1

Hanner som er født sent på sommeren overlever bedre enn hanner født tidlig på sommeren.

Prediksjon 2

Hunner som er født sent på sommeren overlever dårligere eller like godt som hunner født tidlig på sommeren.

Prediksjon 3

Hunnene legger overvekt av hunnegg tidlig på sommeren og hannegg sent på sommeren.

Hvor mange typer av data tror dere er samlet inn for å undersøke de tre hypotesene over? Først har forskerne kartlagt fødselstidspunkt for ungene i de ulike reirene,

deretter er det tatt en blodprøve fra hver enkelt av ungene i hvert reir, for å bestemme kjønn på disse. Året etter ble overlevelsen til neste sommer kartlagt for alle ungene av begge kjønn. Dette ble gjort ved at fuglene ble merket med metallring på hvert bein. Den ene metallringen hadde et nummer og den andre metallringen hadde unik kombinasjon av fargeringer. Merkingen ble gjort før de ble flygedyktige. Fargeringene gjorde at man kunne observere fuglene med kikkert og finne ut hvilke individer som hadde overlevd til sommeren etter.

Dataene vi bruker i undersøkelsen må i tillegg være samlet inn med gode innsamlingsteknikker. Dette vil øke påliteligheten i undersøkelsen. Hva som er gode teknikker for datainnsamling, vil variere fra undersøkelse til undersøkelse. Når man har lagt dataene inn i datamaskinen, bruker man statistiske tester for å finne ut om undersøkelsen man har gjort kan bekrefte eller avkrefte hypotesene, og derved gi svar på om våre funn gir støtte til prediksjonene vi har.

Brystfleck

Vår andre problemstilling handler om hannenes brystfleck. Spørsmålet er om størrelsen på hannenes brystfleck vil endre seg fra generasjon til generasjon.

Hypotese 1

Det skjer en evolusjon av hannenes brystflekkstørrelse.

Når vi skal undersøke denne hypotesen, må vi finne ut om det er variasjon i brystflekkstørrelsen hos hanner. Fra de målinger som er gjort, vet vi at det er observert store forskjeller i dette trekket mellom hanner. I tillegg må vi finne ut om disse forskjellene leder til ulikt antall avkom, og om brystflekkstørrelsen er arvbar. Dette gir oss to prediksjoner.

Prediksjon 1

Det er en seleksjon på brystflekkstørrelse.

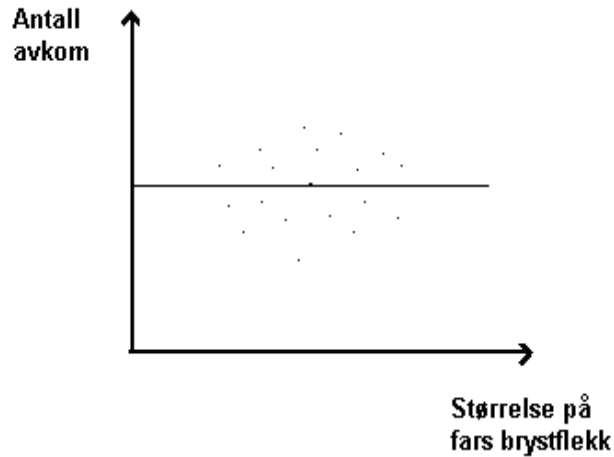
Prediksjon 2

Brystflekkstørrelsen er arvbar.

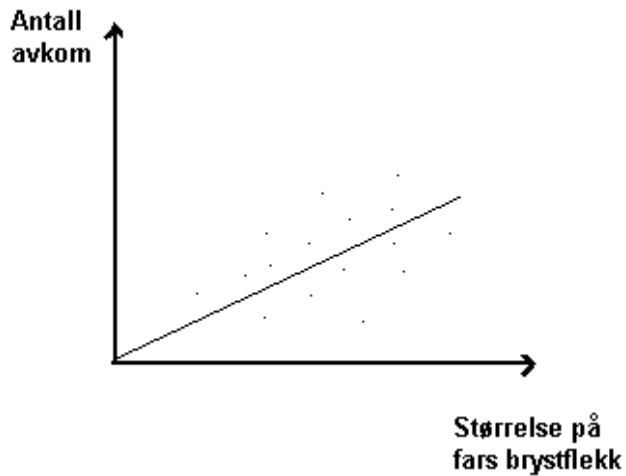
Hvis prediksjonene stemmer, har vi nå parametere som kan brukes til å beregne evolusjon. Det vil si hvor mye brystflekkstørrelsen vil endre seg fra generasjon til generasjon.

To hovedtyper av statistiske tester

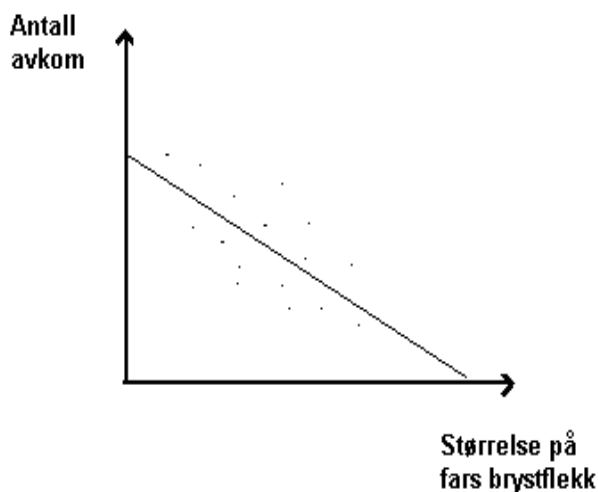
Empiriske data er verdier for ulike parametere som er samlet inn enten fra arbeid i felt eller laboratorium. Det er disse verdiene som blir testet ved hjelp av statistiske tester. Det finnes to viktige typer av statistiske tester:



Ingen sammenheng mellom størrelse på fars brystflekk og antall avkom.



Positiv sammenheng mellom størrelse på fars brystflekk og antall avkom.



Negativ sammenheng mellom størrelse på fars brystflekk og antall avkom.

Den andre gruppen av statistiske tester kan teste om det er forskjell mellom to parametere. En slik test skal dere gjøre i en av oppgavene under, der dere for eksempel skal teste om det er forskjeller i overlevelse hos de to parametere:

- 1) Tidlig fødte hanner
- 2) Sent fødte hanner

T-testen blir også brukt til å finne ut hvorvidt hunnene legger hunnegg tidlig på sommeren og hannegg sent på sommeren. Hvis hanner overlever best sent på sommeren, og mødrene legger overvekt av hunnegg tidlig på sommeren og hannegg sent på sommeren, kan vi si at våre undersøkelser støtter hypotesen om at hunnene er i stand til å regulere kjønnnet på avkommet for å øke deres overlevelse.

Hvordan kan empiriske data styrke eller forkaste en hypotese?

Når vi tester en hypotese statistisk, bruker vi en *nullhypotese* H_0 og en *alternativ hypotese* H_1 . I det følgende er det viktig å skille mellom statistiske hypoteser og vitenskapelige hypoteser. Statistiske hypoteser er egentlig prediksjonene i undersøkelsen vår. Det er derfor prediksjonene vi tester når vi bruker statistiske analyser.

Hypotese 1

Hunner justerer kjønnnet på avkommet for å øke sin egen fitness.

Prediksjon 1

Hanner som er født sent på sommeren overlever bedre enn hanner født tidlig på sommeren.

For denne prediksjonen blir de statistiske hypotesene H_0 og H_1 følgende:

H_0 : Det er ikke forskjeller i overlevelse mellom sent og tidlig fødte hanner.

H_1 : Det er forskjeller i overlevelse mellom sent og tidlig fødte hanner.

En generell regel for å sette opp statistiske hypoteser er at H_0 sier at det ikke er forskjeller mellom grupper, og motsatt at H_1 antar det er forskjeller mellom grupper. Hvis vi tester sammenhenger, vil H_0 si at det ikke er noen sammenheng mellom den avhengige og den uavhengige variabelen og motsatt bekrefter H_1 at det er sammenheng mellom den avhengige og den uavhengige variabelen. Når man bruker en statistisk test, ligger H_0 og H_1 på forhånd inne i dataprogrammene.

Resultatet av testene gir en verdi som kalles signifikanssannsynlighet (P). Ofte bruker man et signifikansnivå på $P = 0,05$ som utgjør en terskelverdi for når testen sier at H_0 er usann og heller gir støtte for H_1 . Dersom vi utfører en statistisk test på dataene fra en undersøkelse, og finner et signifikansnivå større enn $0,05$ ($P > 0,05$) kan vi altså ikke si at H_0 er feil, og dermed konkludere med at H_1 må være sann. Med utgangspunkt i resultatene fra forsøket, variasjonen innen hver gruppe, og antall individer i hver gruppe, forteller altså den statistiske testen at bare ut ifra tilfeldigheter vil vi forvente at flere enn 5 av hundre forsøk vil gi en sammenheng eller forskjell, og dette definerer vi som for usikkert til å si at H_0 er feil.

I motsatt fall, hvis signifikansnivået er mindre enn $0,05$ ($P < 0,05$) kan vi si at H_0 er feil, og at H_1 dermed antagelig er riktig. Men vi kan aldri være helt sikre på at H_1 er riktig! Signifikansnivået forteller oss hvor stor sannsynlighet det er for at H_1 faktisk er feil allikevel. Om signifikansnivået er for eksempel $P = 0,02$ betyr dette at det kun er 2 % sannsynlighet for at H_1 faktisk er feil, og siden $P < 0,05$ sier vi at H_1 er riktig. Dette blir forklart med et praktisk eksempel i forbindelse med regneoppgaven, på s 45.

Hvordan kan forskning utvikles og kvalitetssikres gjennom samarbeid kritisk vurdering og argumentasjon?

Skriving av en vitenskapelig artikkel

Når både genetiske og statistiske analyser er gjort, kan skrivingen av en vitenskapelig artikkel ta til. Slike artikler blir gitt ut i vitenskapelige tidsskrifter, med strenge regler for både innhold og format. De artiklene som tidsskriftene aksepterer, kan leses av andre forskere over hele verden. Slik gir forskningen større kunnskap om viktige prosesser i naturen. Innenfor biologi blir ofte den samme biologiske prosessen undersøkt hos mange ulike arter og organismer. Dette er nødvendig for å kunne si om det er funnet en mekanisme som gjelder generelt, eller om mekanismen bare gjelder for en spesiell art eller den populasjonen som er studert.

Ofte er forskningsprosjekter meget store, og problemstillingene er meget komplekse. Dette gjør samarbeid mellom mange fagfolk nødvendig. Mange forskningsprosjekter gjøres ikke av en eller to forskere alene. Det er ofte vanlig at flere forskere bidrar i prosessen fra data samles inn, analyseres og tolkes, til de beskrives i vitenskapelige artikler. Fordi ulike forskere ofte har forskjellig spesialkompetanse, er det ofte flere forfattere med på de ulike artiklene. Disse forskerne kommer jevnlig sammen og diskuterer metoder og resultater, samt teorier fra andre forskningsgrupper.

Når et manuskript basert på prosjektets resultater er ferdig, blir det sendt inn til internasjonale fagtidsskrifter, der en redaktør sender dem ut til bedømming og nøye gjennomlesing av andre fagfolk. Slike grupper av fagfolk kalles anmeldergrupper. Når manuskriptet har blitt kritisk vurdert av anmeldergruppen, kan det enten bli akseptert for publisering, avvist, eller manuskriptet kan bli sendt tilbake til forfatteren for nye analyser og omskrivninger. Som regel blir bare 15-20% av alle manuskripter som sendes inn til et tidsskrift akseptert. Ofte må det flere runder til med nye analyser og omskrivninger før det godtas og trykkes av tidsskriftet. Forskningsgruppen som arbeider med gråspurv, har publisert til sammen 20 artikler i internasjonale tidsskrifter.

Når artikkelen er trykket i tidsskriftet, blir den gjort tilgjengelig for alle fagfolk som er interessert i å lese den, og den blir på nytt gjenstand for kritisk vurdering. For å få artikkelen anerkjent av andre fagpersoner som god vitenskap, er det blant annet viktig at artikkelen har en grundig argumentasjon for valg av problemstilling, metode og gyldighet av resultatene.

Struktur i en vitenskapelig publikasjon eller presentasjon

Vitenskapelige artikler har ofte samme struktur uavhengig av hvilken fagdisiplin de er skrevet i. Felles for de fleste artikler er at de inneholder et sammendrag med en kort oppsummering av problemstilling og resultater. Deretter kommer en innledning der det vises til hva som er gjort på området fra før av, og hvor det redegjøres for teori og problemstillinger. Her er det ofte viktig å vise at spørsmålet som skal besvares i artikkelen er nye, har generell betydning og er viktig å undersøke. Deretter presenteres metode og resultater i undersøkelsen som er gjort. Dette blir diskutert og satt i lys av annen litteratur på området i diskusjonsdelen som kommer til slutt i artikkelen.

I tillegg er litteraturhenvisninger meget viktig i faglige artikler. Alle teorier og resultater man skriver om i artikkelen som ikke kommer fra ens eget arbeid, må man henvise til fra andre fagartikler. En generell regel er at man må henvise til originalartikkelen, det vil si den som kom med teorien eller det empiriske resultatet først.

Når manuskriptet er skrevet, må man bestemme seg for hvilke vitenskapelig tidsskrift man vil publisere i, og skrive den slik at den passer i layout og struktur med tidsskriftet man har valgt. Hvert tidsskrift har egne redaktørpaneler med spesialkompetanse på ulike fagfelt, de har også forskere som er anmeldere og kan vurdere manuskriptet. Disse bestemmer om artikkelen er av god nok vitenskapelig kvalitet for å publiseres i tidsskriftet. Nedenfor finner dere en oversikt over strukturen i vitenskapelige artikler.

Tittel - Tittelen skal reflektere nøyaktig fokus på artikkelen.

Sammendrag - Kort oppsummering av hensikten med studiet, metoder, resultater og betydningen av resultatene sett i en videre sammenheng. I tillegg skal innledningen motivere leseren for å lese nettopp denne artikkelen!

Innledning – Her skal det gjøres rede for hensikten med artikkelen, man skal gi grunnleggende teori og en begrunnelse for hvorfor man har valgt problemstillingen. Viktig i innledningen er det å få med problemstillingens viktighet i lys av annen forskning som er gjort på emnet. Innledningen skal derfor inneholde en oppsummering av annen litteratur på området.

Metode - Metodekapittelet skal inneholde beskrivelse av antall studieobjekter og begrunnelse for avgrensning av studieområde, valg av studieobjekter osv. I tillegg skal man beskrive hvordan dataene er samlet inn, og hvorfor man har valgt denne

metoden for datainnsamlingen. Her kommer også beskrivelse av analysemetodene som er brukt i laboratoriet dersom dette er utført. Metodekapittelet skal også inneholde beskrivelse av statistiske metoder for hvordan dataene er analysert.

Resultater - Her beskrives resultatene i undersøkelsen med figurer som illustrerer hovedfunnene. Tabeller kan ofte også være nyttige for å illustrere resultater. Litteraturhenvisninger kan også forekomme her. Det er viktig at resultatdelen har en god logisk struktur slik at leseren forstår hvorfor de ulike delene er undersøkt og på hvilken måte de kan fortelle noe om problemstillingen som artikkelen fokuserer på.

Diskusjon - Diskusjonen innledes ofte med en kort oppsummering av resultater. Resultatene i undersøkelsen skal sammenlignes med funn i andre undersøkelser og relevansen av resultatene skal diskuteres opp mot hvordan de passer inn i den grunnleggende teorien og kan gi ny kunnskap til denne. Diskusjonsdelen skal avsluttes med en kort konklusjon.

Litteraturhenvisninger - Litteraturhenvisninger skal listes opp avhengig av tidsskriftets kriterier for litteraturlisten. Ofte er dette alfabetisk, men nummerering etter turordning som referansene blir tatt opp i artikkelen forekommer også.

Appendiks – Noen ganger har man ekstra informasjon. Dette kan for eksempel være beregninger i matematiske modeller, tabeller eller kart som man ønsker å presentere. Dette kan da legges ved som appendiks.

Gråspurv og bevaringsbiologi: økologi, matematikk og molekylære metoder

Lærerveiledning:

Undervisningsopplegget er ment å være en praktisk tilnærming til forskningens verden. Elevene får lære genetiske teknikker som kan brukes i mange sammenhenger. Mer detaljerte forklaringer følger fortløpende i opplegget.

I denne delen av undervisningsopplegget skal vi kombinere kunnskaper i molekylærbiologi, statistikk og økologi for å få svar på ulike problemstillinger knyttet til dette forskningsprosjektet.

En viktig årsak til reduksjon i biologisk mangfold er oppdeling av leveområder. Utbygging har mange steder ført til at dyrenes leveområder har blitt redusert til små

øyer i landskapet. I dette forskningsprosjektet fungerer øyene på Helgelandskysten som stort laboratorium og illustrerer dyrenes gjenværende områder.

Vi beskriver naturen med matematikk

Forskning på gråspurv og matematikk kan gi svar på hvordan menneskelig aktivitet påvirker truede dyrearter. Å bruke truede dyrearter i forskning kan være vanskelig nettopp fordi de er sjeldne, derfor blir gråspurven på Helgelandskysten brukt som *modellart*. Det vil si at den kunnskapen forskerne skaffer seg om gråspurven, kan brukes til å forstå generelle mekanismer om økologien til små bestander.

I mange disipliner innen biologi er matematikk blitt nesten uunnværlig når vi skal beskrive naturen. I dag brukes statistikk og matematisk modellering (det vil si simulering, som beskrevet ovenfor) innen disipliner som medisin, molekylærbiologi, genetik, økologi, evolusjonsteori, bevaringsbiologi etc. Statistikk og matematikk brukes på ulike nivåer fra molekyl- og cellenivå til økosystemnivå. En god forståelse for matematikk kan være viktig hvis man ønsker å gå videre med biologi, fordi kunnskaper om matematikk oftere er blitt en forutsetning for å kunne forstå nyere teori innen økologi, evolusjonsbiologi, genetik og molekylærbiologi. Ofte brukes en type modeller som vi kaller *stokastiske modeller*. Dette er matematiske modeller som beskriver naturen, der tilfeldigheter virker sammen med mer forutsigbare endringer. Eksempler på problemer der slike modeller brukes er:

- Hvor stor er en levedyktig bestand?
- Hvordan finne størrelsen på en bestand når vi bare greier å observere en del av individene?
- Hva er en bærekraftig høsting av dyrearter som for eksempel elg, torsk, laks og rype?
- Hva kan være konsekvenser for miljøet ved utsetting av genmodifiserte organismer?
- Hvordan vil rømt oppdrettslaks påvirke genene til villaksen?
- Hvor raskt vil introduserte arter spre seg?

Denne delen av undervisningsopplegget gir elevene et innblikk i hvordan matematikk og hypotesetesting brukes i biologi. Elevene får både gjøre genetiske analyser i laboratoriet og bruke dette til å gjøre statistiske tester av hypoteser.

Teknikker i molekylærbiologi

I laboratoriedelen av undervisningsopplegget skal elevene lære om genetiske analyser ved å teste kjønn på gråspurvunger. Her blir det brukt teknikker som ekstrahering av DNA, PCR (*polymerase chain reaction*) og elektroforese.

Ekstrahering av DNA gjøres for å få ut DNAet fra cellene. PCR er en teknikk som blir brukt for å lage mange kopier av de delene av DNAet man er interessert i å studere. Dette gjøres for å få tilstrekkelig mengder DNA til å gjøre analyser. Elektroforese går ut på å skille makromolekyler som DNA fra hverandre. I vårt tilfelle skal vi først skille gener som ligger på kjønnskromosomene til gråspurv for å bestemme hvilket kjønn ungene i reiret har, siden skal vi se på andre deler av DNAet som kan hjelpe oss å bestemme hvem som er far til ungene i reiret.

PCR og elektroforese brukes i dag innen en rekke andre fagfelt. Innenfor rettsvesenet brukes teknikkene til identifikasjon av personer i forbindelse med kriminalsaker og til slektskapsundersøkelse i forbindelse med farskaps- og familiegjenforening. I tillegg er det mulig å identifisere forulykkede personer ved hjelp av teknikkene, hvis den forulykkede har levende slektninger. Dette blir benyttet i forbindelse med store branner, naturkatastrofer, terror og krigshandlinger. Innen arkeologi er PCR og elektroforese blant annet brukt til å skille *Homo neandertalis* fra *Homo sapiens*. I denne delen av undervisningsopplegget skal vi bruke PCR og elektroforese for å finne ut kjønn til gråspurvunger i reiret.

Den mest moderne teknikken for å skille DNA av ulike lengder kalles kapillærelektroforese og foregår i en sekvenseringsmaskin. Dette er svært dyrt og avansert utstyr som kun finnes på de mest moderne laboratoriene. I dette undervisningsopplegget har vi laget en teoretisk oppgave der vi bruker resultater fra kapillærelektroforese. Elevene skal lære å tolke utskrifter fra en sekvenseringsmaskin i forbindelse med testing av farskap hos gråspurv. Prinsippene elevene lærer i denne aktiviteten vil være nøyaktig de samme som i familiegjenforeningssaker og farskapsaker hos mennesker.

Kjønnsbestemmelse og farskapsanalyse av gråspurv ved hjelp av PCR og elektroforese.

Elevaktivitet 1: Kjønnsrate

Forskerne tror at forholdet mellom antall hunner og hanner i bestander hos enkelte arter kan være påvirket av miljøet. Blant gråspurv tror man at hunnen er i stand til å påvirke kjønnsraten på avkommene ut fra en rekke ytre faktorer, slik at ungene får best mulig overlevelse. For å undersøke om gråspurvhunnene på Helgeland er i stand til å justere kjønnnet på avkommene skal vi kartlegge sammensetningen av hanner og hunner i ulike reir. I evolusjonsbiologi bruker vi begrepet fitness om det genetiske bidraget et individ har til framtidige generasjoner. Dette kan ofte være vanskelig å måle, derfor bruker vi ofte antall unger som overlever til reproduktiv alder som er et mål for fitness.

Det eksisterer flere vitenskapelige hypoteser for hvilke faktorer som får hunnene til å justere kjønnnet på avkommet.

- En hypotese er at hunnene påvirker kjønnsraten på avkommene dersom det er en skjev kjønnsrate i bestanden. Hvis det er for mange av ett kjønn, lønner det seg for hunnen å produsere det kjønnnet det er for få av. Dette vil øke avkommets sjanse til å finne en partner, og derved øke hunnens fitness.
- En annen hypotese er at gråspurvhunnen påvirker kjønnsraten på avkommene dersom de er paret med en hann med høy kvalitet. Hunner som er paret med hanner av høy kvalitet vil få flere hanner i kullet, enn hunner som er paret med en hann av dårligere kvalitet. Sønnene blir i god kvalitet fordi kvaliteten er genetisk bestemt slik at sønnene arver farens gode gener, dette kan gi en høyere fitness for hunnen.
- En tredje hypotese er at kjønnnet på avkommet kan reguleres av kondisjonen på hunnen. Med kondisjon mener man hvor mye opplagsnæring hunnen har. Forskerne antar at hunner i god kondisjon vil produsere hanner, fordi dette krever mer energi fra hunnen enn å produsere døtre. Bare hunner med mye opplagsnæring forventes å klare kostnaden ved å produsere hanner.
- En fjerde hypotese for når hunnen påvirker kjønnsraten på avkommene, kan være klekketidspunkt. Man tror hunnen kan justere kjønnnet på ungene ut i fra overlevelsen til hunner og hanner i forhold til om de er født sent eller tidlig på sommeren.

Vi skal teste den siste hypotesen. Vi må først gjøre en genetisk kjønnsbestemmelse av gråspurvunger for å finne ut hvor mange hunner og hanner som finnes i hvert reir.

I over 50 % av verdens fuglearter ser kjønnene morfologisk like ut. Det er derfor vanskelig å skille mellom kjønnene. Spesielt gjelder dette når ungene ennå er i reiret. Ved hjelp av molekylærbiologiske teknikker kan man skille gener som befinner seg på de to kjønnskromosomene hos fuglene fra hverandre, og derved finne ut hvilket kjønn de ulike individene har. Kjønskromosomene hos fuglene heter ikke X og Y som hos mennesker, men isteden Z og W. Hos fugler har hunnene to forskjellige kjønnskromosomer Z og W, mens hannene har to like kjønnskromosomer Z og Z. CHD-W genet sitter på W-kromosomet og finnes bare hos hunner. CHD-Z genet sitter på Z-kromosomet og finnes hos begge kjønn. Ved hjelp av elektroforese kan man skille disse to genene fra hverandre. Siden CHD-Z genet er litt lenger enn CHD-W genet, vil resultatet gi to bånd hos hunner og ett bånd hos hanner. Prøvene er hentet fra unger i reiret. DNAet har på forhånd blitt isolert fra en blodprøve ved hjelp av en teknikk som heter Chelex-ekstraksjon. Deretter gjøres PCR og elektroforese. Fremgangsmåter og forklaringer på de ulike teknikkene følger under.

Ekstrahering av DNA

I dette forsøket isolerer vi kjerne-DNA fra en blodprøve hos fuglene ved hjelp av Chelex-ekstraksjon. Denne prosedyren kan brukes på mange ulike typer av biologisk materiale slik som fjær, hår etc. DNAet blir ekstrahert ved at man har prøven opp i en løsning med Chelex. Dette varmes opp, ristes og sentrifugeres. DNAet vil da frigis fra cellekjernen og kan separeres fra resten av cellematerialet. Chelex inneholder blant annet plastkuler og spesielle reagenser som gjør at cellene ødelegges ved oppvarming. Når cellemembranene er løst og blandingen sentrifugeres, vil det frigitte DNAet være i *supernatanten*, det øverste veskelaget i eppendorfrøret. Samtidig vil negativt ladde chelexkuler binde til seg resten av celleinnholdet og finnes nede i eppendorfrøret. Hos fugler inneholder de røde blodlegemene både kjerne-DNA og mitokondrielt DNA (mtDNA). Hos mennesker og andre pattedyr er det kun de hvite blodlegemene som inneholder både kjerne-DNA og mtDNA, mens røde blodlegemer ikke har noen kjerne og derfor ikke inneholder kjerne-DNA. Siden det er mange flere røde blodlegemer enn hvite i blodet blir det mye lettere å få ut en tilstrekkelig mengde kjerne-DNA for analyser når en analyserer fugleblod i motsetning til om en analyserer blod fra pattedyr.

Utstyr og reagenser

Utstyr	Ant. / Mengde
Termostatblokk	1
Sentrifuge	1
Minishaker (Vortexer)	1
Mikropipetter 200µL	1 til hver gruppe
Pipettespisser 200 µl	10 til hver gruppe
Arbeidsplate	1 til hver gruppe
Klokke m/ringing	1
Eppendorfrør 1,5 ml	5 stk

Reagenser	
Chelex-løsning	200 µl
Blodprøve	1 til hver person på gruppen

Bruk av mikropipette

1. Still inn pipetten til ønsket volum ved å vri på toppen av pipetten.
2. Sett på en pipettespiss
3. Trykk ned til første hakk.
4. Slipp sakte opp for å få veske opp i pipetten
5. Trykk helt ned for å få veske ut av pipetten.

Viktig! Skru aldri pipetten under minste volum eller over største volum. Da vil den bli unøyaktig.

Ekstrahering – fremgangsmåte

1. Forarbeid

- Vask arbeidsbenken med 50 % etanol før arbeidet begynner.
- Lag 5 % Chelex løsning ved å veie inn 5g Chelex i 100 ml vann.

2. Chelex og blod fra blod- bufferløsning blandes

- Ha 200 µl chelexløsning i et 1,5 ml eppendorfrør som er merket med navn/nr på prøven. Bruk en 200 µl pipette. Rist glasset før chelexløsningen pipetteres

ut, slik at chelexkulene lettere fanges opp. Klipp av pipettespissen slik at chelexkulene kommer med når dere pipetterer ut chelex-løsning.

- Ta ut et lite ”korn” med blod fra blod-bufferløsningen og ha det opp i et eppendorfrør med chelexløsning. Se etter at det ikke er luftbobler nede i røret. Sett på lokket og rist prøven i noen sekunder på risteren.

3. Varmeblokk - 56 °C, 20 min

- Når alle rørene er klare varmes disse opp til 56°C i 20 min (de kan også stå over natten). Ta ut rørene og rist dem i noen sekunder på risteren. Lag et lite hull i lokket på røret med en tegnestift.

4. Varmeblokk - 96 °C, 8 min

- Varm deretter rørene til 96°C i akkurat 8 minutter. Bruk en ringeklokke til å ta tiden. Ta ut røret og rist i noen sekunder.

5. Sentrifugering

- Sentrifuger ved 12000 rpm i 3 minutter.

6. Pipetter ut 20 µL av supernatanten

- Ta røret ut av sentrifugen og pipetter ut 20 µL av *supernatanten* (det øverste væskelaget). Ha dette i et PCR-rør som dere merker med navn/nr på DNA-prøven. Pass på at ingen av chelex-kulene eller blodrester kommer med i PCR-røret. Cellemembraner og celleorganeller er bundet til Chelex-kulene og ligger i bunnen av røret, under supernatanten.

Vi har nå 20 µL DNA som er klart for PCR reaksjon.

PCR

Lærerveiledning:

I dette forsøket er alle reagensene erstattet med vann. Forsøket blir derved mulig å gjennomføre uten innkjøp av dyre reagenser. Læreren fyller på forhånd 1,5 ml eppendorfrør halvfulle med vann og skriver navnet på reagensene utenpå rørene. PCR-miksen kan ristes ved å holde røret i hånden og riste frem og tilbake noen ganger, dermed erstattes vortexeren. Sentrifugeringen kan på samme måte erstattes ved å slå røret forsiktig mot bordplaten på labbenken. Vesken vil da falle nederst i røret. PCR-maskinen er ikke nødvendig for annet en demonstrasjon, fordi reagensene man bruker ikke er ekte.

PCR er en teknikk som kan lage mange kopier fra DNA-fragmenter man ønsker å analysere. For å synliggjøre DNA-fragmentene på en gel må disse oppkopieres til mer enn en milliard. PCR-teknikken muliggjør analyser med svært små mengder av DNA som utgangsmateriale. I prinsippet er DNA fra en celle nok å få gode resultater, men det anbefales å bruke et nanogram med biologisk materiale i PCR-reaksjonen. Et nanogram er like mye som en prikk fra en blyant på et papir. Selve reaksjonen foregår i en PCR-maskin. Her plasseres DNA-prøven sammen med basene Adenin, Tymin, Cytocin og Guanin, primere, DNA-polymerase, samt en buffer. PCR-reaksjonen består av tre trinn som bestemmes av temperaturen. Denne prosedyren gjentas 30 ganger med fordobling av DNA-trådene i hver syklus. Det som skjer i de tre trinnene er følgende:

1. DNA-prøven varmes opp (90°C - 95°C) og de to DNA-trådene går fra hverandre.
2. Temperaturen senkes og primeren binder seg til de enkle DNA-trådene (40°C - 60°C). Den eksakte temperaturen bestemmes av hvilken type primere som blir brukt. Primerne fungerer som start og stoppsignal for dannelsen av nye DNA kopier langs DNA tråden. Hvilke steder som blir oppformert, er avhengig av hvilke primere som blir brukt.
3. Temperaturen heves til 72°C der enzymet DNA-polymerase fester seg til DNA tråden og setter frie baser sammen til en ny DNA-sekvens på oppskrift fra den opprinnelige DNA-sekvensen. Antallet DNA-sekvenser er nå fordoblet og en ny syklus kan starte. DNA-polymerase ble opprinnelig isolert fra bakterier som lever i varme kilder og fungerer derfor optimalt på 72°C . Dette er en temperatur som er så høy at andre enzymer blir ødelagt.

PCR-teknikken er svært følsom når det gjelder ”forurensning” av prøvene. Ukjente sporstoffer kan virke hemmende på DNA-polymerasen og dermed gi vanskeligheter med oppformeringen. I tillegg kan forurensning av prøven med annet DNA enn det som skal analyseres gi feilaktige resultater. Derfor er det viktig å arbeide sterilt. Utstyret som prøvene blir behandlet med skal på forhånd være *autoklavert*, det vil si oppvarming til ca. 120°C under høyt trykk. Alt arbeidet foregår på steriliserte arbeidsoverflater og laboranten skal ha tilstrekkelig utstyr for å beskytte prøvene fra å bli forurenset med sitt eget DNA. Ofte er det nok med hansker og labfrakk, men i noen laboratorier brukes også hetter og munnbind. Hansker beskytter dessuten prøvene mot at DNaser fra svette i fingertuppene som kan ødelegge DNAet.

PCR-teknikken har i dag utkonkurrert alle andre former for DNA-analyse, fordi den både har blitt hurtigere og mindre arbeidskrevende. Mange av arbeidstrinnene kan automatiseres, og det kan i en og samme reaksjon oppformes mange forskjellige DNA-fragmenter fra den opprinnelige DNA-tråden. I dette forsøket skal vi lage mange kopier av to gener på kjønnskromosomene hos fuglene, CHD-W og CHD-Z, slik at vi er i stand til å se dem på en gel. Vi skal kopiere opp gener som befinner seg på kjønnskromosomene til 5 gråspurvunger som hører til samme reir.

Utstyr og reagenser

Utstyr	Antall
PCR-maskin	1
0,2 ml PCR- rør	5
Kalkulator	3
Vortexer	1
Hullplate	1
Isoporboks, is	1
Mikropipette 10 µl	1
Sentrifuge	1
Eppendorfrør 1,5 ml	1
Pipettespisser	10

Reagenser	Mengde
<i>PCR-mix til 1 DNA-prøve</i>	
DDvann	5.67µl
Simons Buffer	1µl
dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	0.07µl
P (2)	0.6µl
P (8)	0.6µl
Taq DNA Polymerase	0.07µl

<i>Til et PCR-rør</i>	
PCR-miks	8 µl
DNA-ekstrakt	2 µl

Kort beskrivelse av reagensene:

DDvann – destillert, ionisert og *autoklavert* vann. Autoklavert vil si at utstyret er sterilisert ved koking i en spesialkonstruert trykk-koker slik at soppsporer og bakterier dør. En typisk sterilisering foregår i 20 minutter med en temperatur på 121°C og et trykk på 2 bar.

Simons Buffer - Lager passe betingelser for PCR reaksjonen med hensyn på saltholdighet og pH.

dNTP – Frie baser: Adenin, Tymin, Guanin, Cytocin

P(2) og P(8) – primere: korte DNA-sekvenser på 15-20 basepar. P2 og P8 binder seg til DNA-tråden på hver sin side av den delen av DNAet som skal kopieres opp. Disse fungerer som start- og stoppsignal for enzymet Taq DNA polymerase.

Taq DNA polymerase – enzym som er isolert fra bakterien *Thermus aquaticus*. Taq DNA polymerase er et enzym som bygger opp den nye DNA-tråden. Denne leser seg bortover enkeltrådene med DNA og fester på komplementære baser (A-T, G-C).

PCR – fremgangsmåte

1. Blanding av PCR - miks

- Alle reagenser skal stå i frosne arbeidsplater. Det er viktig at både blanding av PCR-miks og blanding av miksen med DNA prøven foregår nedkjølt slik at ikke reaksjonene starter for tidlig.
- Kontroller at dere har alle reagensene til PCR-miksen før dere starter å lage denne. Reagensene er DDvann, Simons Buffer, dNTP, P2, P8, og Taq DNA polymerase.
- Mengden for PCR reagensene i tabellen over er beregnet på en prøve. Beregn hvor mye PCR-miks som trengs til det antallet DNA-prøver dere har. Reagensene ganges opp med en faktor tilsvarende antall DNA-prøver + 1. Vi beregner PCR-miks for en prøve ekstra for å være sikre på å få nok til alle prøvene.
- Lag en liste over reagensene. Skriv opp dette regnestykket og kryss av etter hvert som dere har reagensene oppi PCR-miksrøret.
- Til PCR-miksen brukes et 1,5 ml eppendorfrør. PCR-miks til alle prøvene blandes i samme eppendorfrør. Bruk en pipette med passende størrelse for

volumet på de ulike reagensene og ha dem oppi røret etter tur. Husk å skifte pipettespiss mellom de ulike reagensene. Start med DDvann og avslutt med Taq DNA polymerase. Taq DNA polymerasen starter selve reaksjonen, derfor er det viktig å ha denne oppi til slutt.

- Rist PCR-miks røret godt (5 sek) i en vortexer og sentrifuger deretter røret i 5–10 sek, slik at det ikke henger igjen reagenser på kantene av eppendorfrøret.

2. *Blanding av PCR-miks og DNA-prøve*

- Merk 5 PCR-rør med nummer på DNA-prøven. 1 rør for hver gråspurvunge.
- Ta ut 8µl PCR-miks og ha dette volumet oppi hvert av PCR-rørene. Her trenger dere ikke skifte pipettespiss for hver gang.
- Ha deretter 2 µl DNA-prøve fra de forskjellige fuglene oppi hvert sitt PCR-rør. Her er det veldig viktig enten å skylle pipettespissen i TAE-buffer, eller å skifte pipettespiss mellom hver prøve, slik at ikke prøven bli forurenset med DNA fra de andre prøvene.
- DNA-prøvene er nå klare til å settes inn i PCR-maskinen.

3. *Innstilling av PCR-maskin*

- 94°C 1 min 30 sek
- 30 sykluser med
 - 51°C 45 sek
 - 72°C 45 sek
 - 94°C 30 sek
- 48°C 1 min
- 72°C 5 min
- 4°C deretter.
- Ved 4°C skjer ikke noen mer reaksjoner, derfor kan prøven oppbevares ved denne temperaturen inntil videre analyser skal gjennomføres.

Elektroforese

Lærerveiledning:

I dette forsøket er kun PCR-produktet fra forrige oppgave erstattet med vann. Dersom skolen ikke har gel-elektroforeseapparat, kan det isteden brukes små gjennomsiktige plastkar. Husk å sette disse på et mørkt underlag for å skape kontrast, slik at det er lettere å se hvor man appliserer prøvene. DNA-prøven kan da erstattes med vann, slik at vann og buffer appliseres på gelen.

Metoden brukes til å skille ulike biter av makromolekyler som DNA, RNA, eller proteiner ut i fra størrelsen. I vårt forsøk skal vi arbeide med DNA. Fosforsyregrupper på DNAet blir negativt ladet i basisk løsning, noe som gjør at DNA-fragmentene kan vandre gjennom en gel som er tilsatt spenning. De negativt ladde DNA-fragmentene vil vandre fra den negativt ladde polen til den positivt ladde polen. De ulike DNA-fragmentene kan da skilles ved at små DNA-fragmenter vandrer lettere gjennom porene i gelen enn store DNA-fragmenter. Resultatet blir at bitene fordeler seg mellom den positive og negative polen etter størrelse.

Utstyr og reagenser

Utstyr	Antall
Elektroforesekar	1
Strømkilde	1
Lite plastkar	1
Tynn sprittusj	1
Eppendorfrør 0,5 ml	5
Mikropipette 10 μ l	1
Pipettespisser	10

Reagenser	Mengde
TAE-buffer	50 ml
Agarose 0,8 %	30 ml

<i>Til hver brønn i gelen</i>	
Appliseringsbuffer	1 μ l
PCR-produkt	9 μ l

Kort beskrivelse av reagensene

TAE-buffer – inneholder ioner slik at bufferveska kan lede strøm gjennom gelen. I tillegg lager bufferen passe betingelser for DNA-fragmentenes vandring gjennom gelen med hensyn på saltholdighet og pH.

Agarose 0,8 % - er et polysakkarid som er blandet med vann. Dette polysakkaridet lager porene som DNA-fragmentene vandrer gjennom. Konsentrasjonen av agarose i gelen bestemmer hvor store porer gelen får. Jo større porer jo raskere vandrer DNA-fragmentene og motsatt jo mindre porer jo langsommere vandrer DNAet. Langsom vandring av DNA-fragmentene gjennom gelen gir bedre separasjon.

Appliseringsbuffer – får DNAet til å synke ned i brønnen, samtidig som blåfargen gjør det lettere å se hvilke brønner man har applisert DNA ned i. Appliseringsbufferen vil danne et blått bånd, *veskefront*, som vandrer foran DNA-fragmentene når strømmen settes på.

PCR – produkt – DNA-prøven etter at den har vært i PCR-maskinen. DNA-prøvene har nå svært høy konsentrasjon av de DNA-fragmentene som man er interessert i å se på, mens alt annet DNA har så lav konsentrasjon at det ikke vil være synlig når man fremkaller agarosegelen

Elektroforese - Fremgangsmåte

1. Støping av gel

- Sett støpeformen på et horisontalt underlag. Plasser kammen i støpeformen. Ferdig agaroseblanding helles i støpeformen til ca 5 mm opp på kammene.
- La gelen størkne i romtemperatur i ca 1 time. Mot slutten av tiden kan med fordel sette gelen i kjøleskap, slik at den blir stivere og kammen blir lettere å ta ut. Dersom kammen tas ut for tidlig kan brønnene sige sammen og det blir vanskelig å applisere prøven.
- Når gelen er klar, tar man kammen forsiktig ut, slik at ingen av brønnene følger med kammen opp.

2. Applisering av prøver

- Tegn banene opp på et ark og gjør notater etter hvert som dere appliserer prøvene, se eks. under.

EKS. NOTATER

Bane	Prøve	Applisering	Resultat
Bane 4	Prøve 1	ok	
Bane 5	Prøve 2	Mislykket (lite i brønnen)	
Bane 6	Prøve 3	ok	
Bane 7	Prøve 4	Punkterte gelen	
Bane 8	Prøve 5	ok	
Bane 9	0-prøve	0-prøve	

- Ha 1 µl appliseringsbuffer i hvert av PCR-rørene. Bland forsiktig med pipetten. Her er det viktig å skylle spissen i TAE-buffer eller skifte pipettespiss mellom hver gang dere tilsetter appliseringsbuffer til et nytt PCR-rør. Dersom det henger igjen appliseringsbuffer eller PCR-produkt på kantene i PCR-røret kan dette sentrifugeres kort, slik at vesken samles nederst i røret. Mengden appliseringsbuffer og PCR-produkt bestemmes av volumet på brønnene i agarosegelen. Mengdene i tabellen er tilpasset en 10 µl brønn. Generelt skal appliserings-bufferen utgjøre 10 % av den totale mengden i brønnen.
- Sett gelelektroforese-karet på et mørkt underlag. Sett gelen i gelelektroforese-karet (gjelder ikke for elektroforese-kar der gelen støpes direkte i karet). Brønnene skal stå mot den negative polen. Det er veldig viktig at gelen settes riktig vei i gelelektroforese-karet, ellers vil DNA-fragmentene vandre feil vei. Hell TAE-buffer ned i gelelektroforese-karet slik at gelen dekkes akkurat av bufferen. Gelen er nå klar for applisering av prøver.
- For å kunne anslå omtrent hvor mange basepar de ulike DNA-fragmentene har brukes en DNA-stige som har et DNA-fragment for hvert 50-100 eller 200 basepar. DNA-stigen appliseres ofte i den første brønnen på agarosegelen. I tillegg bør de to neste brønnene ha en kjent prøve, i dette tilfellet en hunn og en

hann. Dersom dere vil bruke en DNA-stige appliseres 10 µl av denne i den første brønnen på gelen, deretter kan kjente prøver appliseres i de to neste brønnene dersom det er ønskelig.

- Ta ut 10 µl med appliseringsbuffer og PCR-produkt fra hvert PCR-rør og appliser dette ned i hver brønn på gelen. Notere nøye hvilken prøve som går i hvilken brønn.
- Hold pipetten loddrett over brønnen når dere appliserer prøvene. Stikk pipettespissen så vidt ned i vesken rett over brønnen, og trykk stempelet forsiktig inn (til første stopp) slik at prøven synker ned i brønnen. Prøven vil på grunn av appliseringsbufferen synke ned i brønnen. Ikke trykk stempelet forbi det første hakket for utpipettering, fordi dette kan presse luftbobler ned i brønnen.
- Etter at prøvene er applisert, monteres lokket og strømmen skrues på. Elektroforesen kjøres ved 70 V til den blå fargemarkøren har beveget seg til ca. 4-5 cm fra brønnene. Dette tar ca 1 time 30 min. Vandringen går raskere ved høyere voltstyrke, samtidig som høyere volt fører til høyere strøm og derved økt varmeutvikling. For høy volt kan gi uskarpe bånd og i verste fall føre til at gelen smelter. I tillegg vil vandringen gå raskere ved mindre konsentrasjon av agarose i gelen, fordi det da er mindre motstand i gelen. Når det gjelder DNA-fragmenter som har lik lengde, må disse kjøres på lavere spenning over lengre tid med noe høyere konsentrasjon av agarose i gelen.

Påvisning av DNA-fragmentene

Utstyr	Mengde
UV-bord	1
Polaroidkamera	1
Kjemikalier	
Etidiumbromid	

Kort beskrivelse av reagensene

Etidiumbromid – er selvlysende i UV-lys og binder seg til DNAet i gelen. Fordi stoffet binder seg så kraftig til DNA molekyler er det kreftfremkallende og må behandles med stor forsiktighet.

Påvisning av DNA-fragmentene – Fremgangsmåte

1. Farging av gelen

- Gelen legges til farging i et bad med etidiumbromid i 2 min. Dette skal gjøres i avtrekkskap!!! Deretter legges gelen til avfarging i et vannbad i 6 min.

2. Visualisering av DNA-fragmentene

- Da er den klar til visualisering i UV-lys.
- Gelen fotograferes med et polaroid kamera (se figur).

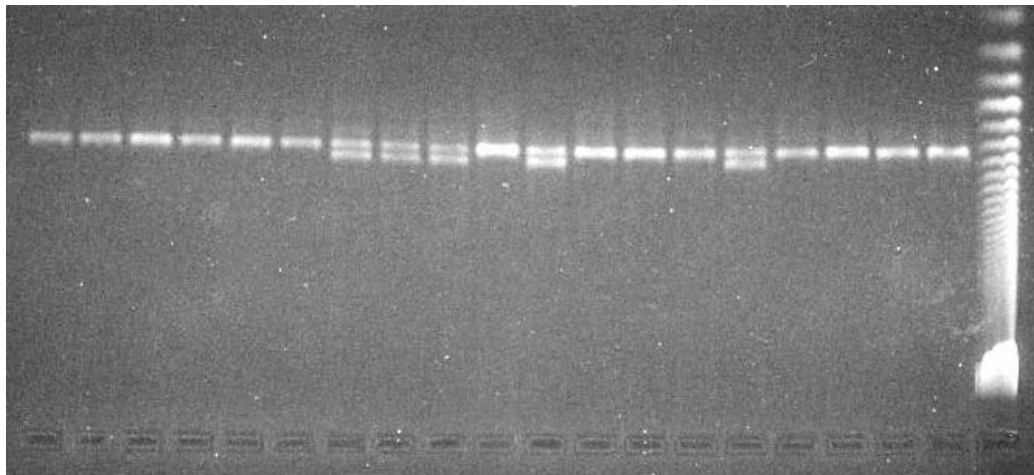
NOTATER EKS.

Utfallet av våre prøver ble:

Bane	Prøve	Loading	Resultat
Bane 1	stige	ok	Ikke vellykket
Bane 2	Kjent prøve =	ok	Hunn
Bane 3	Kjent prøve -	ok	Hunn
Bane 4	Prøve 1	ok	Hann
Bane 5	Prøve 2	Mislykket (lite i brønnen)	Hann
Bane 6	Prøve 3	ok	
Bane 7	Prøve 4	Punkterte gelen	Hunn
Bane 8	Prøve 5	ok	Hann
Bane 9	0-prøve	0-prøve	0-prøve

Lærerveiledning:

I dette forsøket har ikke elevene mulighet til å fremkalle noen gel fordi forsøket ikke er basert på bruk av ekte reagenser. Elevene får isteden utdelt et bilde av hvordan en ferdig fremkalt gel ser ut.



En ferdig fremkalt gel som viser gener på kjønnskromosomene til gråspurv.

Foto: Børge Moe

Elevaktivitet 2: Kjønnsbestemmelse

Bestem kjønn for hver brønn fra venstre mot høyre. Brønnen lengst til høyre viser en DNA-stige. En DNA stige har et bånd på hvert 50 eller 100 basepar. Den gjør det mulig å telle seg fram til omtrent hvor mange basepar DNA-fragmentene man har analysert består av.

Regneoppgaver:

Exel-filer finnes på følgende nettsadresse:

<http://www.plu.ntnu.no/skolelab/publikasjoner.htm#hefte13>

Lærerveiledning:

I denne delen skal elevene bruke tre forskjellige filer med data. Beregningene skal gjøres ved hjelp av Excel hvor elevene vil bli veiledet trinn for trinn i hvordan de skal gjøre de forskjellige beregningene.

Elevaktivitet 3: Tilpassningsatferd

I denne oppgaven skal dere gjøre beregninger for å se om våre data støtter hypotesen:

Hypotese 1

Hunner justerer kjønnet på avkommet for å øke sin egen fitness.

For å finne svar på denne hypotesen vår må vi teste følgende prediksjoner (som også er våre alternative statistiske hypoteser H_1).

Hva blir H_0 for disse prediksjonene?

Prediksjon 1

Hanner som er født sent på sommeren overlever bedre enn hanner født tidlig på sommeren.

Prediksjon 2

Hunner som er født sent på sommeren overlever dårligere eller like godt som hunner født tidlig på sommeren.

Prediksjon 3

Hunnene legger overvekt av hunnegg tidlig på sommeren og hannegg sent på sommeren.

Hvis vi finner ut at hunnen er i stand til å påvirke kjønnsraten på avkommene slik at flest mulig unger overlever, sier vi at hunnen har en *tilpassningsatferd*. Dette er en atferd som øker individets *reproduktive suksess eller fitness som vi kaller det*. Hvilket mål man har for fitness, kan variere. Her blir fitness angitt som antall unger som produseres, og som når 1. års alder, det vil si antall *rekrutter* de produserer.

Hypotesetesting, tilpassningsatferd - fremgangsmåte

Exel-filer finnes på følgende nettsadresse:

<http://www.plu.ntnu.no/skolelab/publikasjoner.htm#hefte13>

Åpne filen *Kjønnsfordeling* og se på de forskjellige dataene for hvert reir. Når man skal gjøre statistiske analyser på et antall *individer* eller et antall reir, ligger alltid de

ulike individene eller reirene loddrett i Excelarket som *kolonner*, mens de ulike målingene som er gjort på hvert individ, eller i hvert reir, ligger vannrett som *rader*. Under ser dere utsnitt av datafilen *Kjønnsfordeling*. En rad tilsvarer et reir med det reirets verdier for hver parameter.

A	B	C	D	E	F	G	H	I
Tidlig fø	Tidlig fø	Tidlig fødte	Tidlig fødte	Tidlig fødte	Tidlig fødte	Tidlig fødte	Tidlig fødte	Tidlig fødte
Reir	Gruppe	AnthannUnger	AnthunnUnger	Kjønnsrate	AnthannRekrutter	AnthunnRekrutter	AndelHannerOverlevd	AndelHunnerOverlevd
6	1,00	1	3	0,25	0	1	0,00	0,33
18	1,00	2	2	0,50	0	0	0,00	0,00
20	1,00	1	3	0,25	0	0	0,00	0,00
23	1,00	3	2	0,60	1	0	0,33	0,00
24	1,00	1	3	0,25	0	0	0,00	0,00
28	1,00	3	1	0,75	0	0	0,00	0,00
32	1,00	2	3	0,40	0	1	0,00	0,33
38	1,00	2	3	0,40	0	1	0,00	0,33

Dere skal undersøke om overlevelsen til ungene i reiret er forskjellig for tidlig og sent fødte hunner og hanner. Dette gjøres ved å bruke en *t-test*. Testen sammenligner gjennomsnittsverdiene i to grupper, og kan fortelle om hvorvidt disse to gruppene er *signifikant* forskjellige eller ikke. De ulike reirene vi vil teste er delt inn i to grupper. Gruppe 1, tidlig fødte individer og Gruppe 2, sent fødte individer. Dere skal sammenligne overlevelse til gruppe 1, tidlig fødte individer med overlevelse til gruppe 2, sent fødte individer. Denne sammenligningen av overlevelse skal gjøres for både hanner og hunner.

Først skal dere beregne gjennomsnittlig overlevelse for *tidlig* og *sent fødte hanner*. Skriv inn *Gjennomsnitt overlevelse tidlig fødte hanner* ved siden av datafeltet og sett markøren i ruten under. Skriv inn `=GJENNOMSNIITT` (i funksjonsfeltet og marker tallene dere vil ha med i dette gjennomsnittet, sett deretter inn) og klikk *Enter*. Gjør det samme for sent fødte hanner. Kolonnene for tidlig og sent fødte hanner finner du i feltet under på Excel-arket.

H	I	J	K	L	M	N
Tidlig fødte	Tidlig fødte					
AndelHannerOverlevd	AndelHunnerOverlevd					
0,00	0,33					
0,00	0,00					
0,00	0,00					
0,33	0,00					
0,00	0,00					
0,00	0,00					
0,00	0,33					
0,00	0,33					

Gjennomsnitt overlevelse tidlig fødte hanner
`=GJENNOMSNIITT(H3:H3:H19)`
`GJENNOMSNIITT(tall1; [tall2]; ...)`

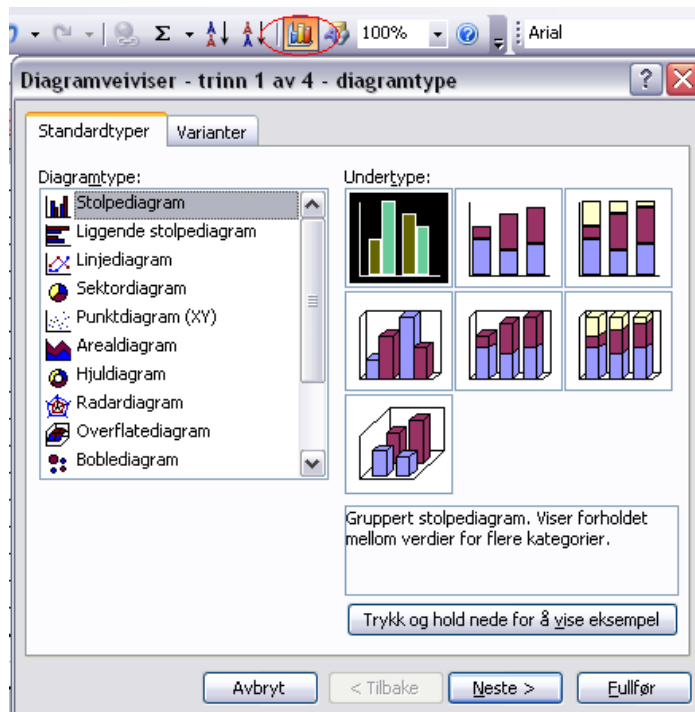
Gjør deretter de samme beregningene for *tidlig* og *sent fødte hunner*. Tallene dere får ut er vist i bildet under.

Tidlig fødte		AndelHunnerOverlevd	
0,33			
0,00		Hanner	
0,00			
0,00		Gjennomsnitt overlevelse tidlig fødte hanner	
0,00		0,03	
0,00		Gjennomsnitt overlevelse sent fødte hanner	
0,33		0,36	
0,33			
0,25			
0,50			
0,75			
0,00			
0,00			
0,00			
0,00			
0,00			
0,00			
0,00			
0,00			

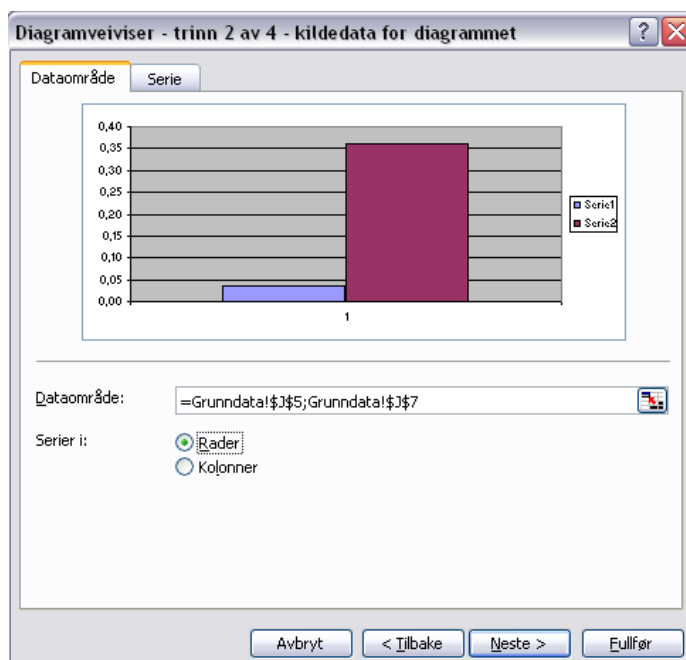
Tidlig fødte		AndelHunnerOverlevd	
0,00			
0,00		Hunner	
0,00			
0,50		Gjennomsnitt overlevelse tidlig fødte hunner	
0,50		0,15	
0,75		Gjennomsnitt overlevelse sent fødte hunner	
0,00		0,17	
1,00			

For å få bedre oversikt over tallene som er funnet skal dere lage en grafisk framstilling av gjennomsnittlig overlevelse. En graf der dere sammenligner *tidlig* og *sent fødte hanner*, og en graf der dere sammenligner *tidlig* og *sent fødte hunner*.

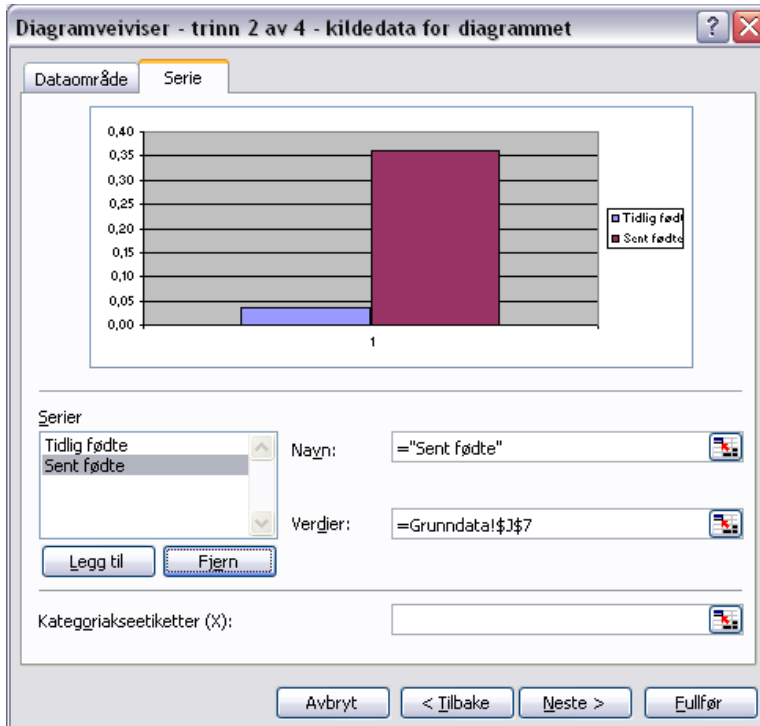
Merk de to tallene dere vil lage grafen ut i fra ved å holde nede *Ctrl* knappen mens dere setter muspekeren i de to feltene dere vil ha med i grafen. Klikk på ikonet for *Diagramveiviser* og dere vil få opp et vindu som vist under.



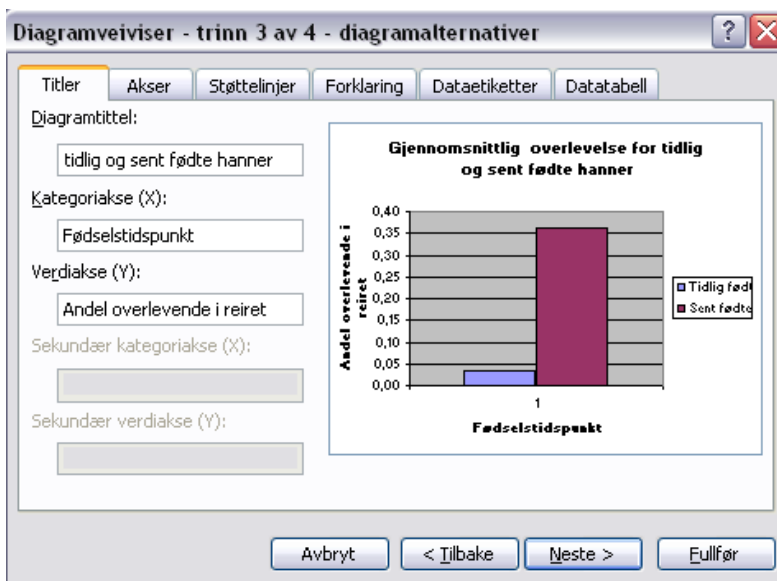
Merk av for *Stolpediagram* og *Undertype* som vist over, og Klikk *neste*.



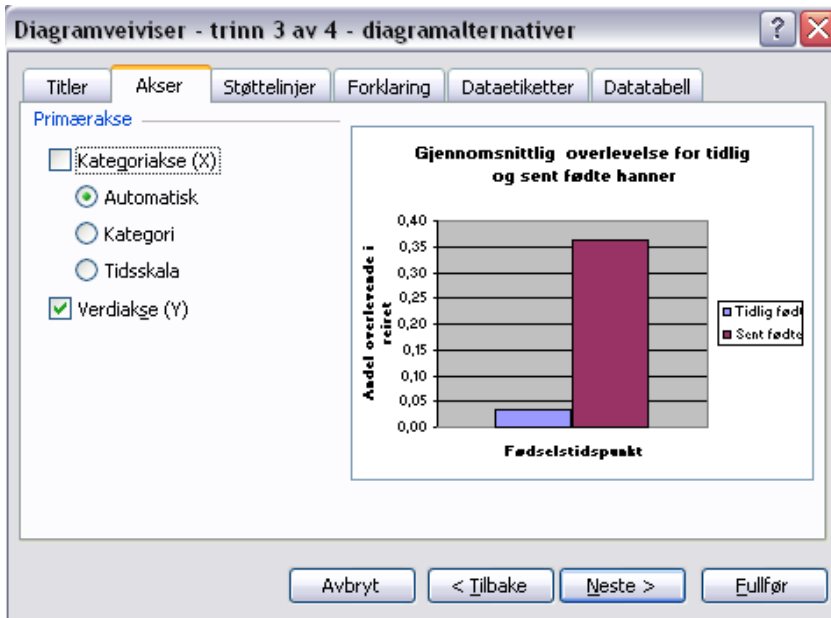
Merk av for *Rader* og klikk på *Serie*.



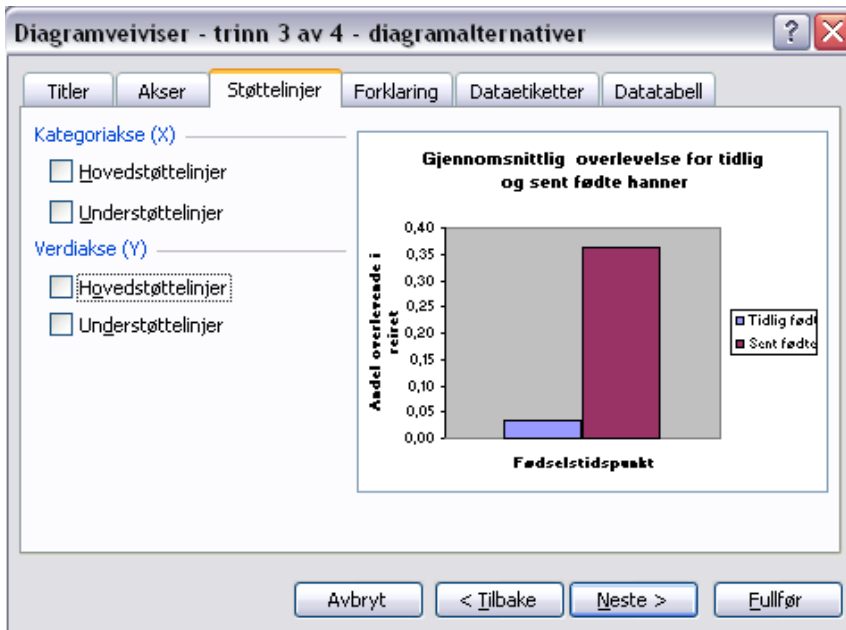
Sett inn *Tidlig fødte* for *serie 1* og *Sent fødte* for *serie 2*. Klikk *Neste*.



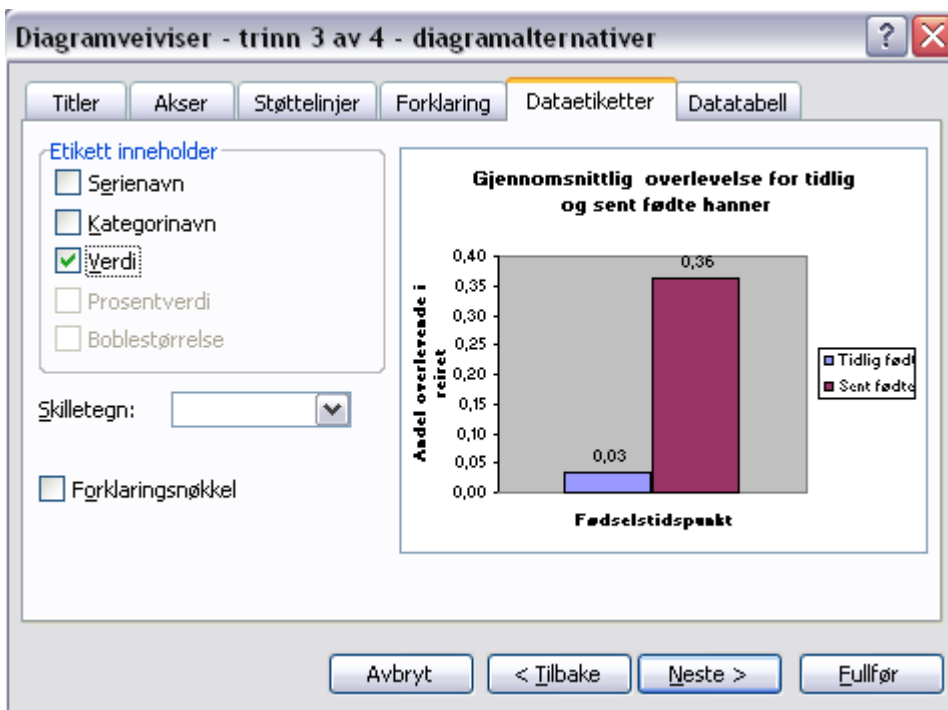
Klikk på *Titler*. Sett inn i *Diagramtittel*: *Gjennomsnittlig overlevelse for tidlig og sent fødte hanner*, *Kategoriakse (X)*: *Fødselstidspunkt* og *Verdiakse (Y)*: *Andel overlevende i reiret*. Klikk *Akser*.



Klikk av *Kategoriakse (X)* slik at tallet på denne forsvinner.



Hvis dere vil ha bort de vannrette strekene i figuren, kan dere klikke på *støttelinjer*. Klikk av *Hovedstøttelinjer* på *Verdiakse (Y)* slik at linjene bak stolpene forsvinner.

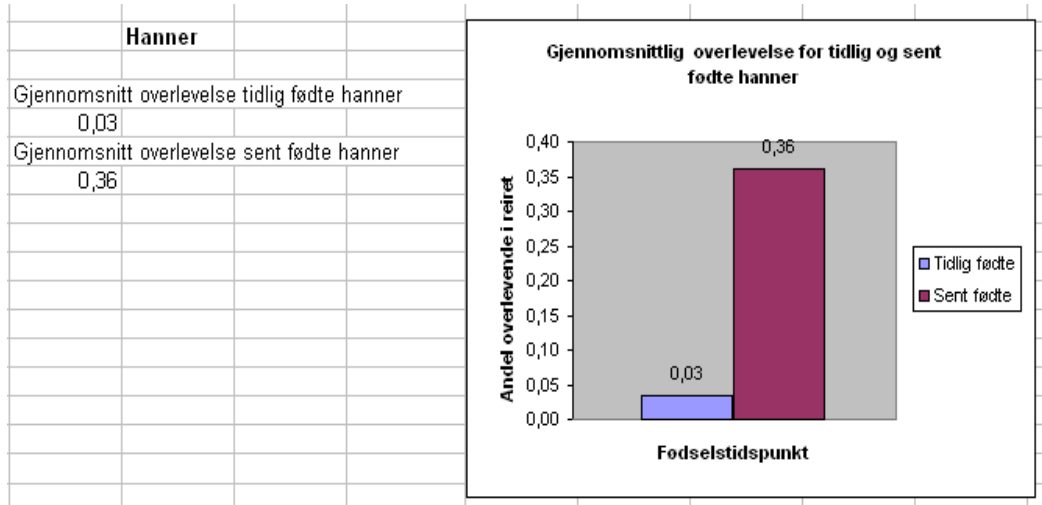


Hvis dere ønsker eksakt y-verdi over hver søyle, kan dere klikke på *Dataetiketter*. Klikk på *Verdi* for å få opp verdien for hver stople som i bildet over.



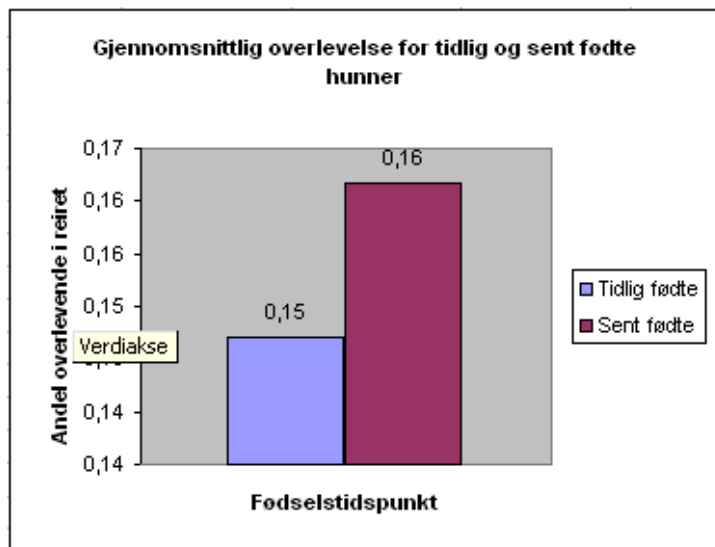
Når dere er fornøyd med stolpediagrammet slik den ser ut kan dere klikke *Neste* og *Fullfør*.

Det er også mulig å gjøre forandringer på stolpediagrammet etter at den er laget på Excel-arket. Blant annet kan dere forandre størrelsen på bildet av søylediagrammet til passende størrelse og dra det dit det passer på Excel-arket.

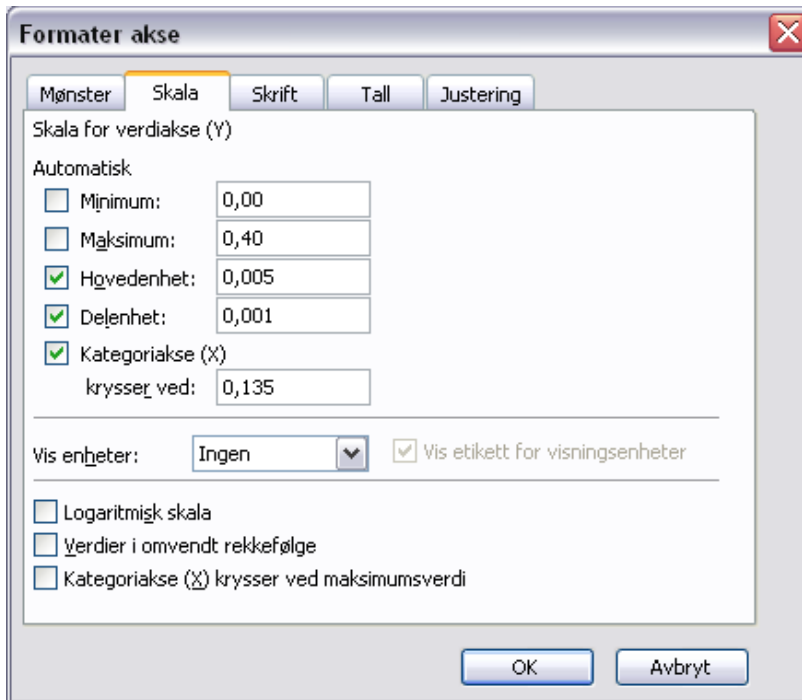


Lag et stolpediagram også for hunner. Merk tallet for *Gjennomsnitt overlevelse tidlig fødte hunner* og tallet for *Gjennomsnitt overlevelse sent fødte hunner* som dere har regnet ut. Begynn i 3. avsnitt på side 36, og gjør samme prosedyre som for hanner: klikk på ikonet for *Diagramveiviser* osv.

For hunner vil figuren se slik ut:

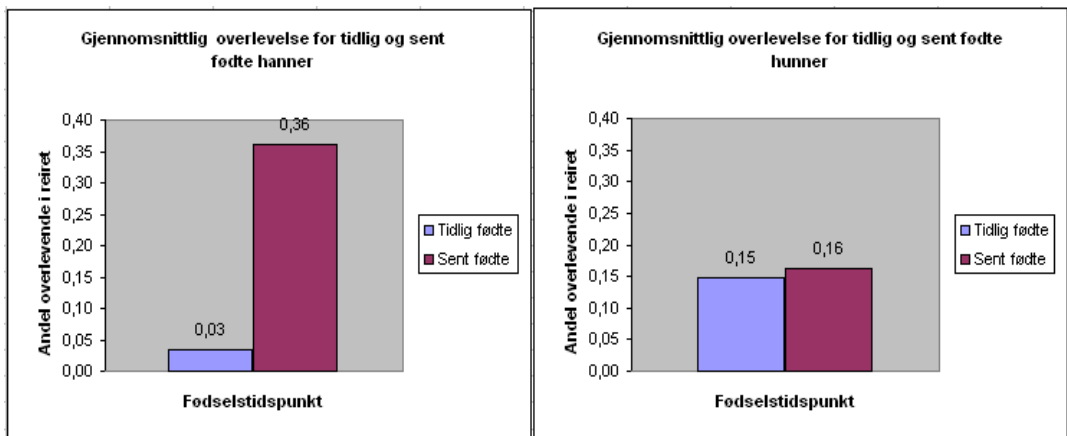


For å gjøre det lettere å sammenligne de to figurene skal dere endre verdien på y-aksen i den siste figuren slik at den får samme skala som aksene for hanner. Dette gjøres ved å dobbeltklikke med venstre musetast på y-aksen.



Klikk på *skala* og sett inn verdiene tilsvarende y-aksen for hanner som vist under. Klikk *OK*.

Nå er det lettere å sammenligne de to stolpediagrammene.



Om det er forskjeller mellom de to gruppene innen hvert kjønn kan testes statistisk ved å bruke en *t-test*. Dere skal først gjøre en t-test for tidlig og sent fødte hanner. Testen gir svar på om det er en statistisk *signifikant* forskjell i overlevelse for hanner om de er født tidlig eller sent på året. Vi kan sette opp to hypoteser for dette som testen gir svar på.

- H_0 at det ikke eksisterer forskjeller i overlevelse mellom tidlig og sent fødte hanner.
- H_1 at det eksisterer forskjeller i overlevelse mellom tidlig og sent fødte hanner.

=TTEST(H3:H19		G	H	I	J	K	L	M
iv inn	TTEST(matrise1; matrise2; sider; type)							
nytt fødte	Tidlig fødte	Tidlig fødte	Tidlig fødte	Tidlig fødte				
jønnsrate	AnthannRekrutter	AnthunnRekrutter	AndelhannerOverlevd	AndelhunnerOverlevd				
0,25	0	1	0,00	0,33				
0,50	0	0	0,00	0,00			Hanner	
0,25	0	0	0,00	0,00				
0,60	1	0	0,33	0,00			Gjennomsnitt overlevelse tidlig fødte hanner	
0,25	0	0	0,00	0,00			0,03	
0,75	0	0	0,00	0,00			Gjennomsnitt overlevelse sent fødte hanner	
0,40	0	1	0,00	0,33			0,36	
0,40	0	1	0,00	0,33			TTEST, hanner, overlevelse, tidlig og sent fødte	
0,20	0	1	0,00	0,25			T(H3:H19	
0,60	0	1	0,00	0,50				
0,00	0	3	0,00	0,75				
0,50	0	0	0,00	0,00				
0,60	0	0	0,00	0,00				
0,50	0	0	0,00	0,00				
0,67	1	0	0,25	0,00				
0,50	0	0	0,00	0,00				
0,50	0	0	0,00	0,00				

Skriv inn *TTEST*, *hanner*, *overlevelse*, *tidlig* og *sent fødte*, i en rute. I ruten under skriver dere =*TTEST*(. Angi hvilke to *datamatiser* (grupper av data) som skal være med i testen ved å markere de ønskede dataene (som er tidlig fødte hanner) som skal med i *matrise 1*. Skriv inn tegnet *semikolon* ; og marker *matrise 2* som er sent fødte hanner. Sett *tallet 2* for *sider* (tosidig t-test) og *tallet 2* for *type* (tohalet t-test). Avslutt med) og klikk *Enter*. Gjør akkurat samme test for hunner.

Resultatet dere får vil være 0,00 for hanner og 0,88 for hunner. For hanner betyr dette at det er liten sannsynlighet for at hypotesen H_1 om at det eksisterer *forskjeller i overlevelse mellom tidlig og sent fødte hanner* er feil. Vi opererer med en verdi på 0,05 som utgjør den ”magiske” forskjellen for når vi sier at det eksisterer forskjeller mellom de to gruppene eller ikke. Denne verdien kalles *signifikanssannsynlighet*. Dette betyr at med et signifikansnivå større enn 0,05 vil det med liten sannsynlighet

eksistere signifikante forskjeller i de to gjennomsnittene, mens en verdi under 0,05 tilsvarer at det eksisterer signifikante forskjeller i gjennomsnittene. Når det gjelder hunner, ser vi at testen gir en signifikansverdi 0,80 som er større enn 0,05. Dette betyr at det er for stor sannsynlighet for at hypotesen om at det eksisterer forskjeller i overlevelse mellom tidlig og sent fødte hunner er feil, og vi har derfor ikke statistisk belegg for å si at det er forskjeller i overlevelse mellom tidlig og sent fødte hunner. Resultatene av testen viser

- Det er signifikante forskjeller i overlevelse for hanner født tidlig og sent på sommeren.

Av stolpediagrammet ser vi at sent fødte hanner har større overlevelse.

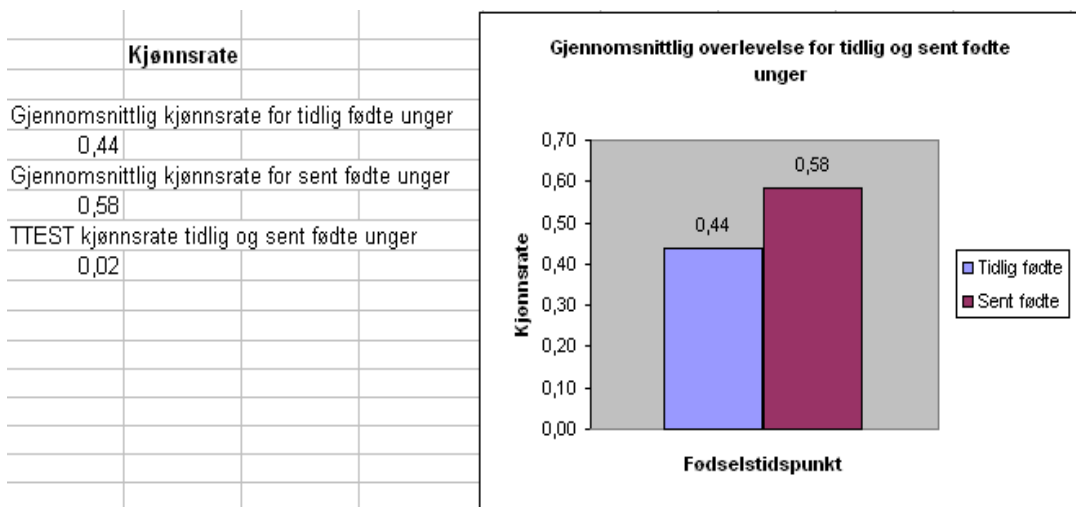
- Det er ingen signifikante forskjeller i overlevelse for tidlig og sent fødte hunner.

Dette virker rimelig fordi vi ser at søylene i stolpediagrammet er relativt like høye. Det ser altså ut for at det lønner seg for en hunn å legge hannegg sent på sommeren, samt å legge hunnegg tidlig på sommeren, fordi det da vil være flest unger som overlever til neste sommer.

Dette leder til den neste hypotesen dere skal teste om hvorvidt hunnen er i stand til å påvirke kjønnsraten på avkommene for å øke overlevelsen til ungene.

- H_0 , hunnene legger ikke overvekt av hunnegg tidlig på sommeren og overvekt av hannegg sent på sommeren.
- H_1 , hunnene legger overvekt av hunnegg tidlig på sommeren og overvekt av hannegg sent på sommeren.

Regn først ut gjennomsnittsverdier for kjønnsraten i reirene til de gråspurvullene som er født tidlig og de som er født sent på sommeren. Kjønnsraten i reiret er antall hanner delt på totalt antall unger i reiret. For utregning av gjennomsnittlig kjønnsrate, bruk beskrivelsen over (som for utregning av overlevelse). I tillegg skal dere lage et søylediagram for gjennomsnittlig kjønnsrate der dere sammenligner kjønnsraten for tidlig og sent fødte individer. Gjør deretter en t-test hvor dere sammenligner den gjennomsnittlige kjønnsraten i gruppe 1 og 2 (dvs. tidlig og sent fødte unger). Utfør en t-test på samme måte som over, men nå på kolonnen *kjønnsrate*. Dere skal sammenligne tidlig og sent fødte individer.



T-testen får en signifikanssannsynlighet på 0,02 og bekrefter at kjønnsraten er signifikant høyere sent på sommeren. Det vil si at vi har statistisk belegg for å hevde at det er funnet flere hanner i reiret sent, enn tidlig på sommeren. Altså ser det ut for at hunnene tilpasser andelen hunner og hanner i reiret, ut i fra hva som fører til størst overlevelse for flest mulig unger.

Vi har vist at hunnene får større overlevelse for avkommene sine, ved å produsere flere hanner sent på sommeren fordi hannene da har størst overlevelse. I tillegg har vi vist at hunnene er i stand til å justere kjønnnet på avkommet etter om det er født tidlig eller sent på sommeren.

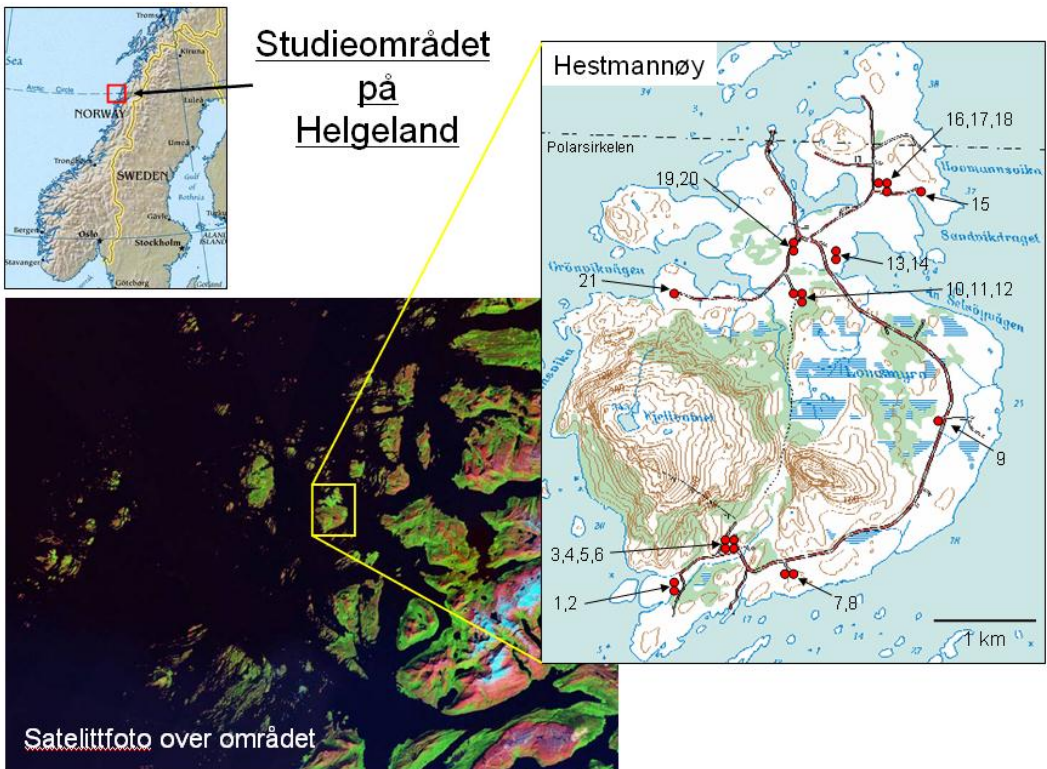
Elevaktivitet 4: Tolking av elektroferogram

I denne oppgaven skal dere gjøre en farskapsanalyse av gråspurv. Gråspurvener lever sammen i *monogame* par hele livet. Med monogam menes at de lever sammen med samme partner hele livet. Men ikke sjelden viser det seg at gråspurv-hunnene får avkom med andre hanner enn sin make. Ofte kan en hann være far til mange unger i forskjellige reir, mens andre hanner nesten ikke får avkom i det hele tatt. Hvor mange avkom en hann får, tror forskerne har med størrelsen på hannens brystfleck å gjøre.

Brystflekken hos gråspurv er et eksempel på et seksuelt trekk. Stort gevir hos hjort er et annet eksempel, påfuglens store fjærdrakt et tredje eksempel. Seksuelle trekk

hos dyr er et uttrykk for kvalitet og overskudd av energi, og kalles *ornamenter*. Hanner med store ornamenter har ofte bedre parringssuksess enn hanner med mindre ornamenter. Disse hannene får på grunn av høyere parringssuksess også flere avkom. Vi sier at slike hanner har en større *fitness*.

Vi skal her bestemme fedrene til gråspurvungene i et studieområde i Nordland, Hestmanøy (se kart). Kartlegging av farskap hos gråspurven gir oss mulighet til å beregne evolusjon av hannens brystflekk, og derved få mer kunnskap om blant annet hvor mye størrelsen har å si for evnen til å produsere avkom. Metoden dere skal bruke i denne oppgaven kan brukes på mange forskjellige målbare trekk hos ulike dyrearter.



Studieområdet Hestmanøy på Helgeland.

Metoder i felt og på labb

For unger i reir blir blodprøver tatt før de er flygedyktige. I tillegg blir alle voksne hanner og hunner i bestanden fanget i nett, og det blir tatt blodprøve av dem (beskrevet ovenfor i del 1). Blodprøvene blir hatt opp i eppendorfrør med sprit for best mulig oppbevaring inntil de skal analyseres. Fuglene blir også ringmerket med fargeringer, slik at det er mulig å observere hvilke fugler som mater ungene i ulike reir. Hos alle hannene og hos ungene som overlever til de er ett år, måles størrelsen på brystflekken. Det er verdiene for brystflekkstørrelse vi skal beregne evolusjonær respons ut i fra. Vi bruker kvadratroten av arealet på brystflekken som måltall i våre analyser.



Foto: Henrik Jensen

Bildet viser høyden og bredden på hannenes brystflekk måles.

Inne på labben blir DNA fra blodprøvene ekstrahert med Chelex-ekstraksjon. Deretter blir de DNA-fragmentene man ønsker å undersøke oppformert ved bruk av PCR-teknikk (som beskrevet på s 27-29).

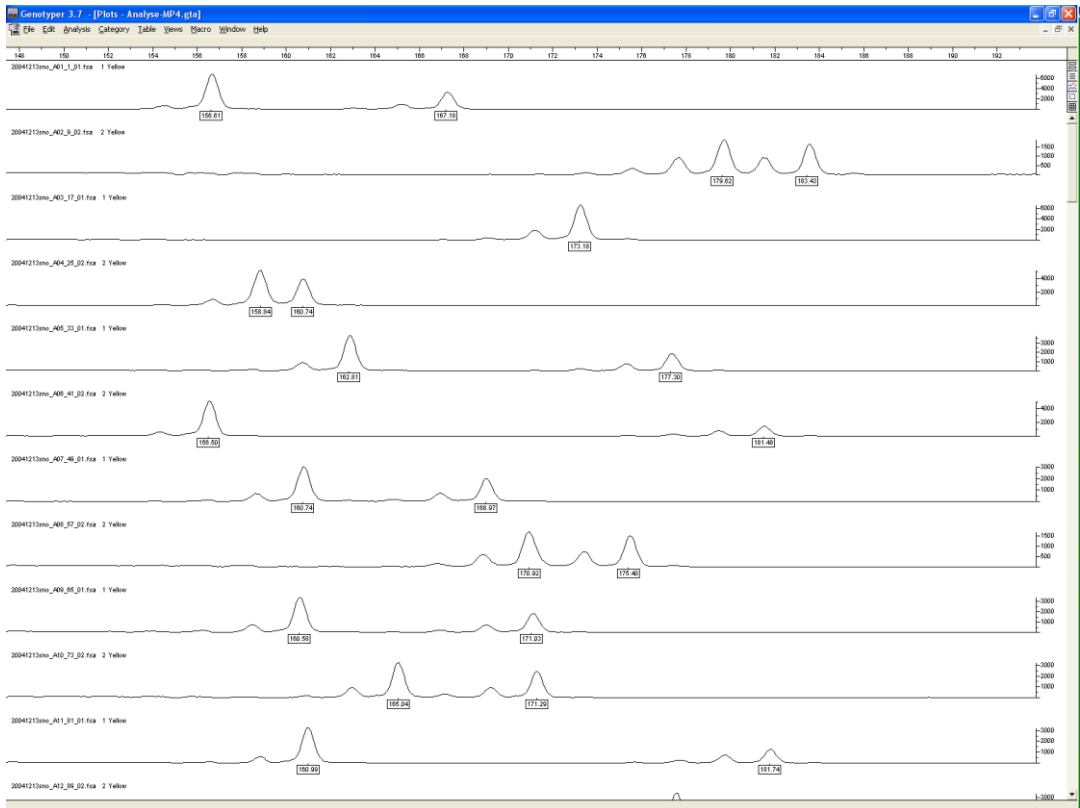
Vanligvis i slektskapsanalyser blir det undersøkt 11 forskjellige gener på ulike *loci*. For at to personer skal være i slekt, må alle de undersøkte genene være sammenfallende med enten mor eller far. I slektskapsanalyser blir områder på DNAet som ikke koder for noen egenskap brukt. Kun 1-3 % av DNAet i mennesker og dyr koder for egenskaper, resten består av ikke-kodende områder. I disse

områdene er det ofte lange rekker med basesekvenser hvor to og to baser er repetert mange ganger. I slektskapsanalyser kartlegger vi lengden på disse områdene. Disse lengdene varierer mye mellom individer, men vil være mer lik mellom slektinger enn individer som ikke er i slekt. Hos foreldre og avkom vil vi finne samme lengdene på DNA-fragmentene, og ut fra dette kan vi anta slektskap mellom individer. DNA-fragmentene skilles etter samme prinsipper som for elektroforesen som ble forklart i elevaktivitet 1, men med en teknikk for separering av DNA-fragmentene som kalles kapillærelektroforese.

Kapillær elektroforese

Metoden skiller seg fra vanlig gel-elektroforese ved at hele prosedyren skjer i et avansert elektroforeseapparat koblet til en datamaskin. Dette apparatet kalles en sekvenseringsmaskin. En slik maskin kan automatisk analysere PCR-produktets vandring i forhold til et markør-DNA av kjent størrelse. I sekvenseringsmaskinen blir PCR-prøvene tatt opp i kapillærrør. Det settes på en sterk elektrisk spenning og de ulike DNA-fragmentene vandrer igjennom kapillærene. Korte fragmenter av DNA vandrer fortere enn lengre fragmenter. Man kan skille mellom DNA-fragmenter som har ulik lengde og ulik fluorescerende farge. DNA-fragmentene farges ved å sette til fluorescerende molekyler på enden av primerne. Fargen på disse fluorescerende molekylerne kan være blå, grønn, gul eller rød, og kan være forskjellig for ulike primere. Dette gjør at det går å analysere flere DNA-biter samtidig selv om de har lik størrelse fordi fargen vil være ulik. Primerne sitter igjen på PCR-produktene, derfor vil alle PCR-produkter lagd med et spesielt sett primere ha samme farge (eks. blå). Produkter fra et annet sett primere kan ha en annen farge (eks. gul). Om størrelsen er lik, vil du da se en blå topp og en gul topp på samme sted (dvs. samme størrelse/lengde på PCR-produktet).

Når DNA-fragmentene har vandret til slutten av kapillærrøret, blir de truffet av en laser som sender ut lys. En detektor måler *fluorescensen*, det om lyset som treffer detektoren, og viser dette som topper i et *elektroferogram* (se figur under). Toppenes plassering angir DNA-fragmentenes lengde (målt i antall basepar), toppenes høyde angir kvaliteten (antall kopier av DNA-fragmentet) på prøven. Ved hver ny analyse gjøres en kalibrering med DNA-fragmenter med kjente lengder.



Figuren viser eksempel på et elektroferogram for et gen. Hver linje representerer et individ, hvert individ kan ha et (homozygot) eller to (heterozygote) varianter av DNA-området.

Denne metoden er mer effektiv og mer automatisert enn tradisjonell elektroforese, som i hovedsak er begrenset av:

- Upreis identifikasjon av DNA-fragmentene.
- Lav spenning for å unngå varmeødeleggelse av DNA-molekylene.

Begge disse problemene er løst i kapillærelektroforese. Kapillærrørene har stor overflate og dermed stor varmeutveksling med omgivelsene. Slik unngår man at prøvene blir overopphetet. Siden metoden tillater bruk av høyere spenning (10-30 kV), kan analysen tiden kortes ned betydelig. Andre fordeler med kapillærelektroforese er at man slipper å lage gel, applisere prøver og rengjøre utstyr. I tillegg kommer prøveresultatene direkte opp på en dataskjerm.

I denne oppgaven skal dere tolke elektroferogram av kun et bestemt område på DNAet hos gråspurv og finne ut hvilke individer som er i slekt med hverandre. Utskriftene fra sekvenseringen finnes i vedlegg 1.

Tolkning av elektroferogram – fremgangsmåte

Dere skal finne ut hvem som er far til de forskjellige gråspurvungene i hvert reir. De ulike toppene tilsvarer bånd på en gel. Hver topp tilsvarer en variant av et spesielt område på kromosomet. Hos alle individene vil det undersøkte området på DNAet ha en spesiell lengde (en topp) som er arvet fra mor og en annen lengde på DNAet (en topp) som arvet fra far.

Vi skal identifisere slektskapet ved hjelp av lengden på dette området. Vi kaller et spesielt område på et kromosom for et *locus*. I vår undersøkelse skal vi bare se på lengden av et locus. Det vil si at dersom vi finner en unge som har samme lengde på DNA-fragmentet som hannen i reiret, vil dette fragmentet være nedarvet fra denne hannen, og vi antar han er den genetiske faren til avkommet vi undersøker. Det er også viktig å merke seg at det allelet som ikke deles med faren, kommer fra moren. Siden den genetiske moren alltid er den som mater ungene i reiret er det lurt å finne hvilket allel ungen har fått fra henne først. I vårt forsøk har vi ikke genetiske analyser fra moren, derfor må vi isteden undersøke om avkommet deler en topp med hannen i reiret. Hvis ungen ikke deler samme lengde på DNA-fragmentet med den mulige faren, betyr det at det er en annen hann som er far til ungen.

Klassen fordeler de ulike reirene mellom seg og kartlegger farskap i de ulike reirene gruppevis. Øverst på hvert ark finner dere genotypen til hanner i ulike reir. Nedenfor finner dere genotypen til ungene. Vi kaller dem *rekrutter*, fordi vi kun ser på de ungene som overlever til de er 1 år gamle. Dere skal lete etter sammenfallende lengder av området på DNAet (sammenfallende topper) mellom hanner og rekrutter på hvert ark. Skriv en liste for hvert reir over hvilke av rekruttene som hannen i reiret hannen er far til og hvilke rekrutter han ikke er far til. Dere vil finne ut at en god del utroskap eksisterer blant disse gråspurvvene!

Elevaktivitet 5: Beregning av seleksjon og evolusjonær respons

Beregning av evolusjonær respons og seleksjon på brystflekken til gråspurvhanner

I hvilken grad en populasjon vil forandre seg i takt med endringer i miljøet, kan man bare forstå hvis man kjenner de genetiske prinsippene for naturlig utvalg. I

følge Darwins teori må to forutsetninger være oppfylt for at det skal foregå evolusjon:

- Det må være *arvelig variasjon* i bestemte trekk blant individene.
- Individene må ha en forskjell i enten overlevelse, eller reprodutiv suksess som er bestemt av forskjellene i trekket. Det må foregå *seleksjon*.

Kvantitativ genetik inkluderer verktøy for å regne seg fram til både arvelig variasjon og seleksjon. I denne oppgaven skal vi beregne disse to verdiene, og bruke dette til å finne:

- *Evolusjonær respons* som følge av seleksjon på et bestemt trekk.

Vi skal beregne evolusjonær respons for størrelsen av brystflekken hos gråspurv og bruke resultatene fra farskapsanalysene i oppgaven over.

Beregning av forskjeller i overlevelse og reprodutiv suksess (S)

Vi ønsker å måle styrken på seleksjonen, det vil si vi vil finne et presist mål for sammenhengen mellom størrelsen på brystflekken hos hannene og antall rekrutter. Denne størrelsen kalles *Seleksjons differensialet*, S .

$$1) \quad S = \text{Cov}(x,y) / \text{Var}(x)$$

Seleksjons differensialet S kan være positivt, negativt eller 0.

$S = 0$ ingen sammenheng mellom antall rekrutter og størrelse på fars brystflekk – dvs. ingen seleksjon, og brystflekken forandres ikke i størrelse mellom generasjoner.

$S > 0$ positiv sammenheng mellom antall rekrutter og størrelse på fars brystflekk – dvs. positiv seleksjon, og brystflekken blir større for hver generasjon.

$S < 0$ negativ sammenheng mellom antall rekrutter og størrelse på fars brystflekk – dvs. negativ seleksjon, og brystflekken blir mindre for hver generasjon.

$\text{Cov}(x,y)$ er gitt ved ligning (2)

$$2) \quad \text{Cov}(x,y) = \sum (x_i - X)(y_i - Y)$$

der Cov er kovariansen, x er størrelsen på brystflekken, og y er antall rekrutter hannen har produsert. x_i er størrelsen på brystflekken og y_i reprodusjon til hver enkelt av hannene (i) i bestanden. X er gjennomsnitt av brystflekk til alle hannene

og Y er og gjennomsnittlig antall rekrutter til alle hannene. Σ betyr at en summerer dette for alle hannene i bestanden.

Covariansen gir et mål på sammenhengen mellom antall rekrutter en hann produserer, og størrelsen på hannens brystflekk. For å finne styrken på seleksjonen må vi dele på variansen i brystflekkstørrelser hos hannene i bestanden.

$\text{Var}(x)$ er gitt ved ligning (3)

$$3) \quad \text{Var}(x) = \Sigma (x_i - X)^2$$

$\text{Var}(x)$ er variansen i brystflekkstørrelsen til hannene.

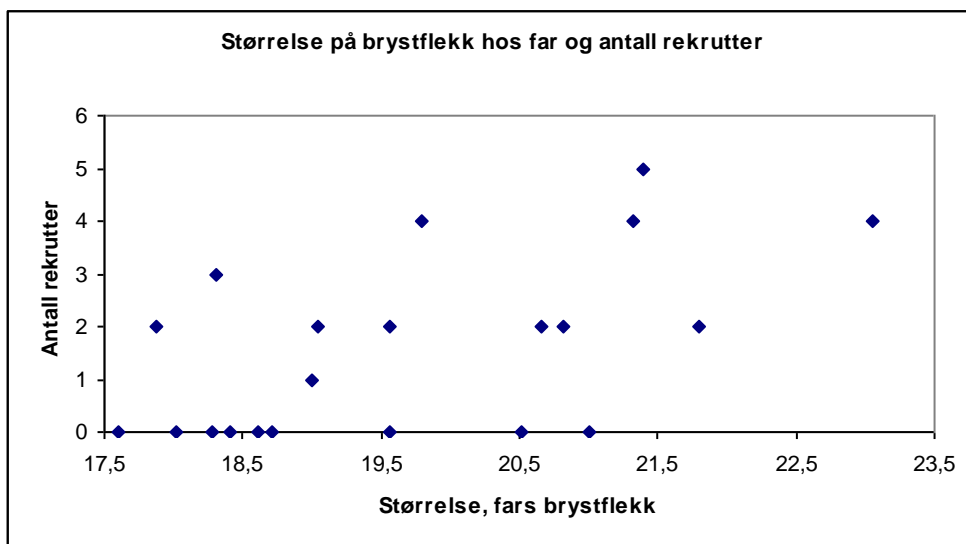
I Excel beregnes dette slik:

Åpne filen *Regresjon-seleksjon*.

Exel-filer finnes på følgende nettsadresse:

<http://www.plu.ntnu.no/skolelab/publikasjoner.htm#hefte13>

Lag et punktdiagram som viser forholdet mellom størrelsen på fars brystflekk og antall rekrutter de produserer. La *Fars brystflekk* (x) være den uavhengige variabelen (x -aksen) og *Antall rekrutter* (y) være den avhengige variabelen (y -aksen).



Ut fra figuren kan det se ut som det er en sammenheng mellom størrelsen på fars brystflekk og antall rekrutter. Hvorvidt dette stemmer og om denne sammenhengen leder til evolusjon mot en større brystflekk hos hannene, skal vi nå regne oss fram til. Vi finner først $Cov(x,y)$ som beregnes ved $(x_i - X)(y_i - Y)$ for fedrene i bestanden.

Microsoft Excel - Regresjon-Seleksjon

F2 $\text{fx} = ((C2-GJENNOMSNIITT(C:C))*(E2-GJENNOMSNIITT(E:E)))$

	A	B	C	D	E	F
1	Fugl nr.	Reir	Fars brystflekk (x)	Antall unger i reiret	Antall rekrutter (y)	$(x_i - X)(y_i - Y)$
2	8537652	3	18,28	1	0	2,203189876
3	8573246	5	21,32	2	4	
4	8573591	6	19,56	3	2	
5	8573644	4	18,41	0	0	
6	8573722	10	18,02	2	0	
7	8598504	18	23,05	2	4	
8	8598567	12	21,40	3	5	
9	8598665	16	20,52	1	0	
10	8598757	17	17,60	1	0	
11	8651701	11	20,82	2	2	
12	8651879	21	18,72	0	0	
13	8681024	9	19,00	1	1	
14	8732255	19	21,80	2	2	
15	8732552	20	19,04	2	2	
16	8732680	13	21,01	2	0	
17	8747234	1	19,80	2	4	
18	8747698	14	18,31	1	3	
19	8747720	8	20,66	2	2	
20	8747749	2	18,61	2	0	
21	8800314	7	19,56	0	0	
22	8800395	15	17,88	2	2	

Skriv inn $(x_i - X)(y_i - Y)$ øverst i kolonne F. Sett markøren i feltet under og skriv inn kommandoen $=((C2-GJENNOMSNIITT(C:C))*(E2-GJENNOMSNIITT(E:E)))$ i funksjonsfeltet. Klikk *Enter*. For å beregne denne verdien for alle hannene, klikk nederst i høyre hjørne i feltet som formelen er skrevet inn i og dra muspekeren nedover til kolonnen slutter. Hele kolonnen vil merkes og programmet vil automatisk beregne $(x_i - X)(y_i - Y)$ for alle hannene i datafilen.

Microsoft Excel - Regresjon-Seleksjon

File Rediger Vis Sett inn Format Verktøy Data Vindu Hjelp Adobe PDF

G2 fx =SUMMER(F:F)

	A	B	C	D	E	F	G
1	Fugl nr.	Reir	Fars brystflekk (x)	Antall unger i reiret	Antall rekrutter (y)	(xi-X)'(yi-Y)	Cov(x,y)
2	8537652	3	18,28	1	0	2,2	27,5
3	8573246	5	21,32	2	4	4,0	
4	8573591	6	19,56	3	2	-0,1	
5	8573644	4	18,41	0	0	2,0	
6	8573722	10	18,02	2	0	2,6	
7	8598504	18	23,05	2	4	8,2	
8	8598567	12	21,40	3	5	5,9	
9	8598665	16	20,52	1	0	-1,3	
10	8598757	17	17,60	1	0	3,3	
11	8651701	11	20,82	2	2	0,5	
12	8651879	21	18,72	0	0	1,5	
13	8681024	9	19,00	1	1	0,4	
14	8732255	19	21,80	2	2	0,9	
15	8732552	20	19,04	2	2	-0,3	
16	8732680	13	21,01	2	0	-2,1	
17	8747234	1	19,80	2	4	0,3	
18	8747698	14	18,31	1	3	-2,0	
19	8747720	8	20,66	2	2	0,4	
20	8747749	2	18,61	2	0	1,7	
21	8800314	7	19,56	0	0	0,2	
22	8800395	15	17,88	2	2	-0,8	

$Cov(x,y)$ beregnes i kolonne G. Sett markøren øverst i kolonne G og skriv inn $Cov(x,y)$. Sett deretter markøren i ruten nedenfor og skriv inn =SUMMER(F:F) i funksjonsfeltet. Klikk *Enter*.

Dere har nå funnet et tall for graden av sammenheng mellom antall rekrutter en hann produserer og størrelsen på brystflekken hos hannen.

$Cov = 27,5$ viser at det er en positiv sammenheng mellom antall rekrutter en hann produserer og brystflekkstørrelsen hos hannen.

For å finne styrken på seleksjonene må vi nå finne $Var(x)$, som er variasjonen i fedrenes brystflekkstørrelse i bestanden.

regresjon-Seleksjon

tt inn Format Verktøy Data Vindu Hjelp Adobe PDF

100% Arial

$\text{fx} = ((C2-GJENNOMSNIITT(C:C)))^2$

C	D	E	F	G	H
Fars brystflekk (x)	Antall unger i reiret	Antall rekrutter (y)	(xi-X)'(yi-Y)	Cov(x,y)	$\Sigma (xi-X)^2$
18,28	1	0	2,2	27,5	2,0
21,32	2	4	4,0		
19,56	3	2	-0,1		
18,41	0	0	2,0		
18,02	2	0	2,6		
23,05	2	4	8,2		
21,40	3	5	5,9		
20,52	1	0	-1,3		
17,60	1	0	3,3		
20,82	2	2	0,5		
18,72	0	0	1,5		
19,00	1	1	0,4		
21,80	2	2	0,9		
19,04	2	2	-0,3		
21,01	2	0	-2,1		
19,80	2	4	0,3		
18,31	1	3	-2,0		
20,66	2	2	0,4		
18,61	2	0	1,7		
19,56	0	0	0,2		
17,88	2	2	-0,8		

Skriv inn $\Sigma (xi-X)^2$ øverst i kolonne H. Flytt markøren til feltet under. Skriv inn $=((C2-GJENNOMSNIITT(C:C)))^2$ i funksjonsfeltet. For å beregne denne verdien for alle reirene merkes hele kolonnen ved å høyreklikke nederst i høyre hjørne i feltet som formelen er skrevet inn i og dra muspekeren nedover til kolonnen slutter.

Var(x) kan nå beregnes ved å summere kolonne H. Forsøk først å summere kolonne H slik du gjorde med kolonne F uten å se på fremgangsmåten.

Hvis du ikke husker, gjør slik:

Sett markøren øverst i kolonne H. Skriv inn Var (x). Flytt markøren til kolonnen under og skriv inn =SUMMER(H:H). Klikk *Enter*.

gresjon-Seleksjon

ett inn Formåt Verktøy Data Vindu Hjelp Adobe PDF

fx =G2/I2

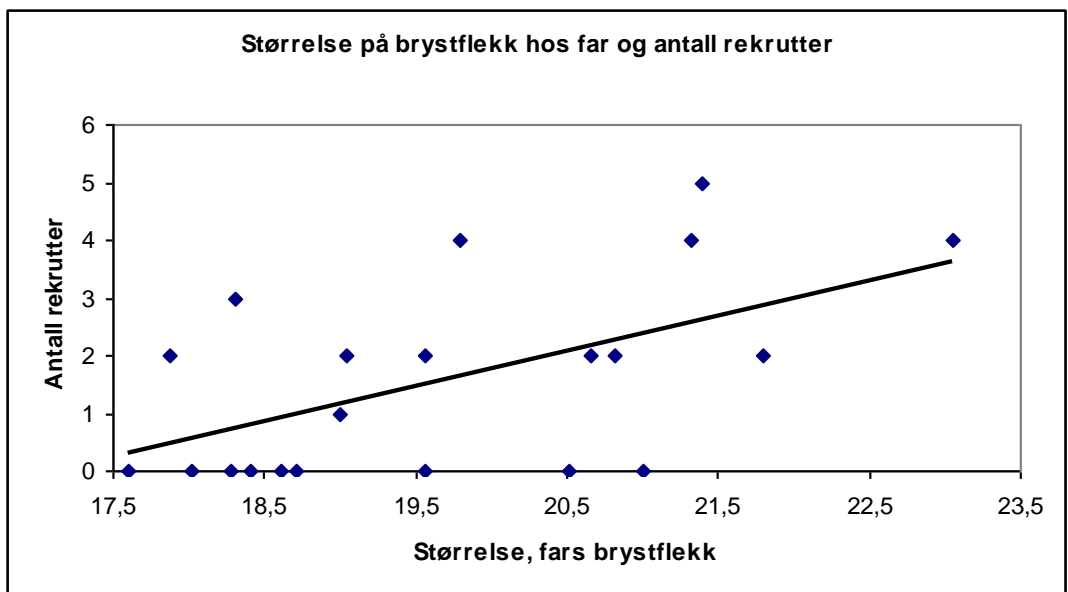
C	D	E	F	G	H	I	J
Fars brystflekk (x)	Antall unger i reiret	Antall rekrutter (y)	(xi-X)^(yi-Y)	Cov(x,y)	$\Sigma (xi-X)^2$	Var (x)	S
18,28	1	0	2,2	27,5	2,0	45,0	0,6
21,32	2	4	4,0		2,7		
19,56	3	2	-0,1		0,0		
18,41	0	0	2,0		1,6		

Nå kan vi enkelt beregne *Seleksjons differensialet*, S ligning (1). Skriv inn S øverst i kolonne J. Flytt markøren til feltet under. Skriv inn $=G2/I2$ i funksjonsfeltet. Klikk *Enter*.

Dere har nå funnet at verdien for *Seleksjons differensialet*, $S = 0,6$.

Hva betyr dette?

Dette betyr at dersom størrelsen på brystflekken til hannen øker med 1 mm^2 forventes hannen å produsere 0,6 flere rekrutter. Dere har altså lagd en modell som sier noe om sammenhengen mellom brystflekkstørrelse og antall rekrutter en hann produserer. Denne sammenhengen kan illustreres ved å legge inn en trendlinje i figuren ovenfor.



Her vil stigningstallet til trendlinjen være lik *Seleksjons differensialet* dere har beregnet. Hvis vi går en enhet til høyre på grafen vil linjen altså stige med 0,6 enheter på y-aksen. Se etter om dette stemmer!

Beregning av arvelig variasjon (h^2)

Arvbarhet h^2 er et mål på hvor stor andel av den fenotypiske variasjonen i et trekk hos individene i en bestand som skyldes gener i forhold til miljø. Med fenotypisk variasjon menes variasjon i hvordan et trekk ser ut, som kan skyldes både arv og miljø. Arvbarhet vil alltid være et tall mellom 0 og 1.

De fleste egenskaper hos organismer skyldes en sammensetning av arv og miljø. Hvor mye av et trekk som skyldes arv, er mulig å beregne ved at man ser hvor like foreldre og avkom er.

Hvis vi skal finne ut om et trekk skyldes genetisk variasjon, kan man lage et *punktdiagram* med avkommets trekk på y-aksen og foreldrenes trekk på x-aksen. Siden hvert avkom har to foreldre, brukes gjennomsnittet av foreldrene når et foreldrepar har flere avkom brukes gjennomsnittet for avkommene. Hvis avkommene ikke ligner foreldrene, vil trendlinjen mellom plottene bli vannrett, og det er sannsynlig at variasjon mellom individene heller skyldes miljø, enn arv. Hvis avkommene er meget lik med foreldrene, vil helningen på trendlinjen være nær 1. For de fleste trekk har avkommene en moderat likhet med foreldrene og helningen på trendlinjen vil være mellom 0 og 1.

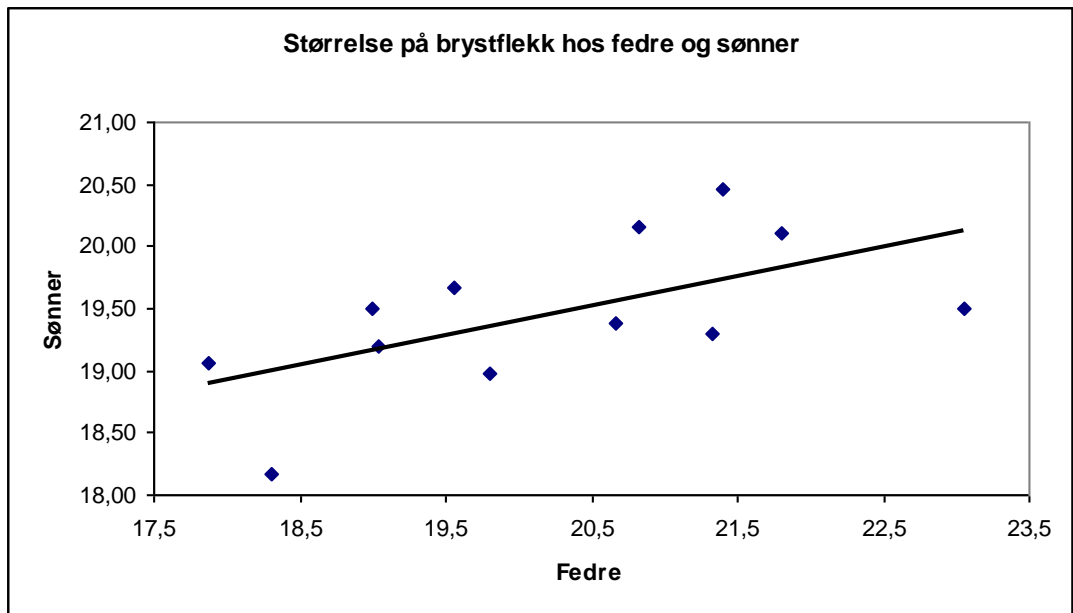
For arvbarhet til brystfleck som kun uttrykkes hos hanner sammenlignes sønner med sine fedre.

I Excel beregnes h^2 slik:

Åpne filen *Regresjon-arvbarhet*.

Excel-filer finnes på følgende nettadresse:
<http://www.plu.ntnu.no/skolelab/publikasjoner.htm#hefte13>

Lag et punktdiagram som viser forholdet mellom størrelsen på fars brystfleck og gjennomsnittlig størrelse på rekrutteres brystfleck. La størrelsen på fars brystfleck være den uavhengige variabelen (x-aksen) og gjennomsnittlig størrelse på brystflekken hos sønnene være den uavhengige variabelen (y-aksen).



Gjennomsnittlig størrelse på brystflekk hos sønner som funksjon av størrelse på brystflekken til fedrene.

For å beregne arvbarhet må vi finne et presist mål for sammenhengen mellom størrelsen på brystflekken hos fedrene og deres sønner. Arvbarheten forteller i hvilken grad variasjonen i et trekk bestemmes ut fra genetisk variasjon.

Arvbarheten kan vi finne ved å følge nesten samme fremgangsmåte som når vi fant *seleksjons differensialet* (1). Arvbarheten beregnes ut i fra covariansen mellom brystflekkstørrelsen til fedre og sønner, og en tar hensyn til variansen i brystflekkstørrelse blant fedrene som produserte hannlige rekrutter (4).

$$4) \quad h^2 = \text{Cov}(x,z) / \text{Var}(x)$$

Hvor $\text{Cov}(x,z)$ er gitt ved ligning (5)

$$5) \quad \text{Cov}(x,z) = \sum (x_i - X)(z_i - Z)$$

Cov er covariansen, x er størrelsen på brystflekk hos far og z er størrelsen på gjennomsnittlig brystflekk hos rekrutter, mens X er størrelsen på gjennomsnitt av

brystflekk hos alle fedre i bestanden og Z er gjennomsnittlig størrelse på brystflekk hos alle rekruttene som fedrene har produsert.

Covariansen gir her et mål på sammenhengen mellom størrelsen på farens brystflekk og gjennomsnittlig størrelsen på rekrutters brystflekk.

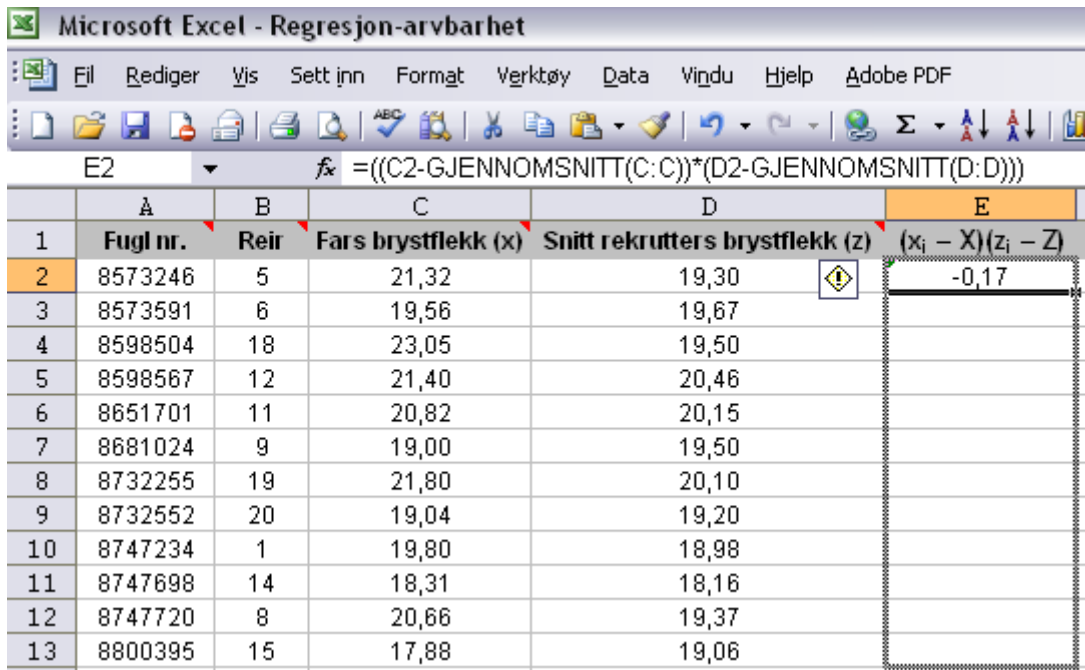
Covariansen (Cov) kan være positiv, negativ eller 0.

Var(x) er gitt ved ligning (6)

$$6) \quad \text{Var}(x) = \sum (x_i - X)^2$$

Var(x) er variasjonen i brystflekkstørrelse hos fedrene som har produsert hannlige rekrutter.

For å finne Cov(x,z) beregnes først $(x_i - X)(z_i - Z)$ for fedre og avkom i hvert reir.



	A	B	C	D	E
1	Fugl nr.	Reir	Fars brystflekk (x)	Snitt rekrutters brystflekk (z)	$(x_i - X)(z_i - Z)$
2	8573246	5	21,32	19,30	-0,17
3	8573591	6	19,56	19,67	
4	8598504	18	23,05	19,50	
5	8598567	12	21,40	20,46	
6	8651701	11	20,82	20,15	
7	8681024	9	19,00	19,50	
8	8732255	19	21,80	20,10	
9	8732552	20	19,04	19,20	
10	8747234	1	19,80	18,98	
11	8747698	14	18,31	18,16	
12	8747720	8	20,66	19,37	
13	8800395	15	17,88	19,06	

Skriv inn $(x_i - X)(z_i - Z)$ øverst i kolonne E. Sett markøren i feltet under og skriv inn kommandoen $=((C2-GJENNOMSNIITT(C:C))*(D2-GJENNOMSNIITT(D:D)))$ i funksjonsfeltet. Klikk *Enter*. For å beregne denne verdien for alle reirene, klikk nederst i høyre hjørne i feltet som formelen er skrevet inn i og dra muspekeren

nedover til kolonnen slutter. Hele kolonnen vil merkes og programmet vil automatisk beregne $(x_i - X)(z_i - Z)$ for alle reirene.

Microsoft Excel - Regresjon-arvbarhet

Fil Rediger Vis Sett inn Format Verktøy Data Vindu Hjelp Adobe PDF

F2 fx =SUMMER(E:E)

	A	B	C	D	E	F
1	Fugl nr.	Reir	Fars brystflekk (x)	Snitt rekrutter's brystflekk (z)	$(x_i - X)(z_i - Z)$	$Cov(x,z)$
2	8573246	5	21,32	19,30	-0,17	6,24
3	8573591	6	19,56	19,67	-0,14	
4	8598504	18	23,05	19,50	0,12	
5	8598567	12	21,40	20,46	1,18	
6	8651701	11	20,82	20,15	0,42	
7	8681024	9	19,00	19,50	-0,06	
8	8732255	19	21,80	20,10	1,02	
9	8732552	20	19,04	19,20	0,30	
10	8747234	1	19,80	18,98	0,20	
11	8747698	14	18,31	18,16	2,47	
12	8747720	8	20,66	19,37	-0,04	
13	8800395	15	17,88	19,06	0,93	

$Cov(x,z)$ beregnes i kolonne F. Sett markøren øverst i kolonne F og skriv inn $Cov(x,z)$. Sett deretter markøren i ruten nedenfor og skriv inn $=SUMMER(E:E)$ i funksjonsfeltet. Klikk *Enter*.

Vi skal nå finne variasjonen i brystflekkstørrelse hos fedrene som har fått levedyktige avkom $Var(x)$.

cel - Regresjon-arvbarhet

Vis Sett inn Format Verktøy Data Vinu Hjelp Adobe PDF

Σ 100%

$=((C2-GJENNOMSNIITT(C:C)))^2$

B	C	D	E	F	G
Reir	Fars brystflekk (x)	Snitt rekrutters brystflekk (z)	$(x_i - \bar{X})(z_i - \bar{Z})$	Cov(x,z)	$(x_i - \bar{X})^2$
5	21,32	19,30	-0,17	6,24	1,21
6	19,56	19,67	-0,14		
18	23,05	19,50	0,12		
12	21,40	20,46	1,18		
11	20,82	20,15	0,42		
9	19,00	19,50	-0,06		
19	21,80	20,10	1,02		
20	19,04	19,20	0,30		
1	19,80	18,98	0,20		
14	18,31	18,16	2,47		
8	20,66	19,37	-0,04		
15	17,88	19,06	0,93		

Skriv inn $(x_i - \bar{X})^2$ øverst i kolonne G. Flytt markøren til feltet under. Skriv inn $=((C2-GJENNOMSNIITT(C:C)))^2$ i funksjonsfeltet. For å beregne denne verdien for alle reirene merkes hele kolonnen ved å klikke nederst i høyre hjørne i feltet som formelen er skrevet inn i og dra muspekeren nedover til kolonnen slutter.

$Var(x)$ kan nå beregnes ved å summere kolonne G. Forsøk først å summere kolonne G slik du gjorde med kolonne E uten å se på fremgangsmåten.

Hvis du ikke husker gjør slik:

gresjon-arvbarhet

ett inn Format Verktøy Data Vinu Hjelp Adobe PDF

Σ 100% Arial

$f_x = \text{SUMMER}(G:G)$

C	D	E	F	G	H
Fars brystflekk (x)	Snitt rekrutters brystflekk (z)	$(x_i - X)(z_i - Z)$	$\text{Cov}(x,z)$	$(x_i - X)^2$	$\text{Var}(x)$
21,32	19,30	-0,17	6,24	1,21	26,26
19,56	19,67	-0,14		0,43	
23,05	19,50	0,12		7,99	
21,40	20,46	1,18		1,38	
20,82	20,15	0,42		0,36	
19,00	19,50	-0,06		1,48	
21,80	20,10	1,02		2,50	
19,04	19,20	0,30		1,38	
19,80	18,98	0,20		0,18	
18,31	18,16	2,47		3,64	
20,66	19,37	-0,04		0,19	
17,88	19,06	0,93		5,49	

Sett markøren øverst i kolonne H. Skriv inn $\text{Var}(x)$. Flytt markøren til kolonnen under og skriv inn $=\text{SUMMER}(G:G)$. Klikk *Enter*.

gresjon-arvbarhet

ett inn Format Verktøy Data Vinu Hjelp Adobe PDF

Σ 100% Arial 9

$f_x = F2/H2$

C	D	E	F	G	H	I
Fars brystflekk (x)	Snitt rekrutters brystflekk (z)	$(x_i - X)(z_i - Z)$	$\text{Cov}(x,z)$	$(x_i - X)^2$	$\text{Var}(x)$	b
21,32	19,30	-0,17	6,24	1,21	26,26	0,24
19,56	19,67	-0,14		0,43		
23,05	19,50	0,12		7,99		
21,40	20,46	1,18		1,38		
20,82	20,15	0,42		0,36		
19,00	19,50	-0,06		1,48		
21,80	20,10	1,02		2,50		
19,04	19,20	0,30		1,38		
19,80	18,98	0,20		0,18		
18,31	18,16	2,47		3,64		
20,66	19,37	-0,04		0,19		
17,88	19,06	0,93		5,49		

Vi kan nå beregne *arvbarheten*, h^2 ligning (4). Skriv inn h^2 øverst i kolonne I. Flytt markøren til feltet under. Skriv inn $=F2/H2$ i funksjonsfeltet. Klikk *Enter*.

Dere har nå funnet at verdien for *arvbarheten*, h^2 , $h^2 = 0,24$.

Hva betyr dette?

Dette betyr altså at 24 % av variasjonen en ser i brystflekkstørrelse i bestanden skyldes genetiske effekter. Resten skyldes miljøeffekter.

Beregning av forventet evolusjonær respons R

Endringen i gjennomsnittlig fenotype (her størrelse på brystflekk) fra generasjon til generasjon kaller vi *evolusjonærrespons* R på seleksjonen. Den er gitt ved ligning (7).

$$7) \quad R = h^2 S$$

Dette kan beregnes i filen *Arvbarhet*. Skriv inn verdien for *Seleksjonsdifferensialet*, $S = 0,61237$ i kolonne J. Denne verdien beregnet dere i forrige oppgave, slik at dere må hente den fra filen *Seleksjon*.



D	E	F	G	H	I	J	K
Snitt rekrutteres brystflekk (z)	$(x_i - X)(z_i - Z)$	Cov(x,z)	$(x_i - X)^2$	Var (X)	$b = h^2$	S	R
19,30	-0,17	6,24	1,21	26,26	0,24	0,61	0,15
19,67	-0,14		0,43				
19,50	0,12		7,99				
20,46	1,18		1,38				
20,15	0,42		0,36				
19,50	-0,06		1,48				
20,10	1,02		2,50				
19,20	0,30		1,38				
18,98	0,20		0,18				
18,16	2,47		3,64				
19,37	-0,04		0,19				
19,06	0,93		5,49				

R beregnes i kolonne K ved å skrive $=I2*J2$ inn i funksjonsfeltet. Markøren må alltid stå i ruten dere vil ha tallet inn i.

Dere har nå fått en verdi for R som er 0,15.

I dette tilfellet er den beregnede evolusjonære responsen hvor mye brystflekken til hannene vil forandre seg per generasjon. Dette er uttrykt i forhold til variasjonen i brystflekken i bestanden, i mm^2 . Vi har da konstatert at det foregår det en evolusjon av størrelsen på brystflekken, og kommet fram til et funn som støtter evolusjonsteorien når det gjelder dette trekket.

Men kan brystflekken bli uendelig stor?

Seleksjon (både naturlig og kunstig) for et trekk kan ikke pågå evig. Enhver populasjon vil til slutt nå en seleksjonsgrense, der den ikke lenger kan respondere på seleksjonen. En av grunnene til dette er at den genetiske variansen har blitt veldig liten på grunn av at alle allelene som styrer den valgte egenskapen har blitt fiksert (det vil si at alle individer i populasjonen har samme allel for det genet), tapt eller på andre måter har blitt utilgjengelige for seleksjon. Uten genetisk varians kan det ikke foregå seleksjon.

Elevaktivitet 6: Gjør rede for dette forskningsprosjektet

Gjør rede for et forskningsprosjekt, beskrive problemstillinger, organisering, målestyr, resultater og finansiering.

Dere skal ut i fra det dere har lært av dette undervisningsopplegget beskrive problemstillinger, utstyr og hovedresultater i forskningsprosjektet. Dere skal også gjøre rede for hvordan prosjektet er organisert og finansiert.

Referanser:

Griffiths R., Double M. C., Orr K. & Dawson J. G. 1998. A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology* 7, 1071-1075.

Husby, A., Sæther, B.-E., Jensen, H. & Ringsby, T. H. 2006. Causes and consequences of adaptive seasonal sex ratio variation in house sparrows. *Journal of Animal Ecology* 75, 1128-1139.

Jensen, H., Sæther, B.-E., Ringsby, T. H., Tufto, J., Griffith, S. C. & Ellegren, H. 2004. Lifetime reproductive success in relation to morphology in the house sparrow *Passer domesticus*. *Journal of Animal Ecology* 73, 599-611.

Ringsby T.H., Sæther B.-E., Tufto, J., Jensen H., & Solberg E.J. 2002. Asynchronous spatiotemporal demography of a house sparrow metapopulation in a correlated environment. *Ecology* 83, 561-569.

Sjøberg, S. *Naturfag som almenndannelse – en kritisk fagdidaktikk*. Gyldendal akademisk forlag. 2. utgave 2004

Strand L. & Marvik O. J. 2000 *Genteknologi for Videregående Skole*, Skolelab DA

Nettressurser:

Strategic Programme in Conservation Biology

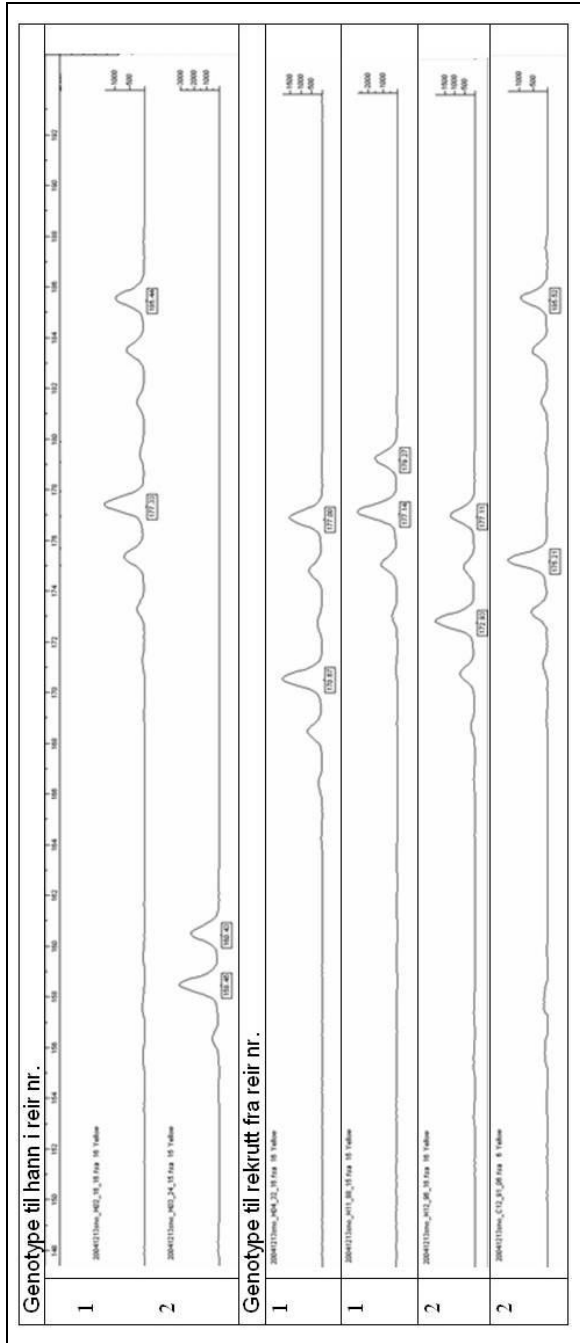
<http://www.bio.ntnu.no/sup/>

Bachelorprogram i biomatematikk

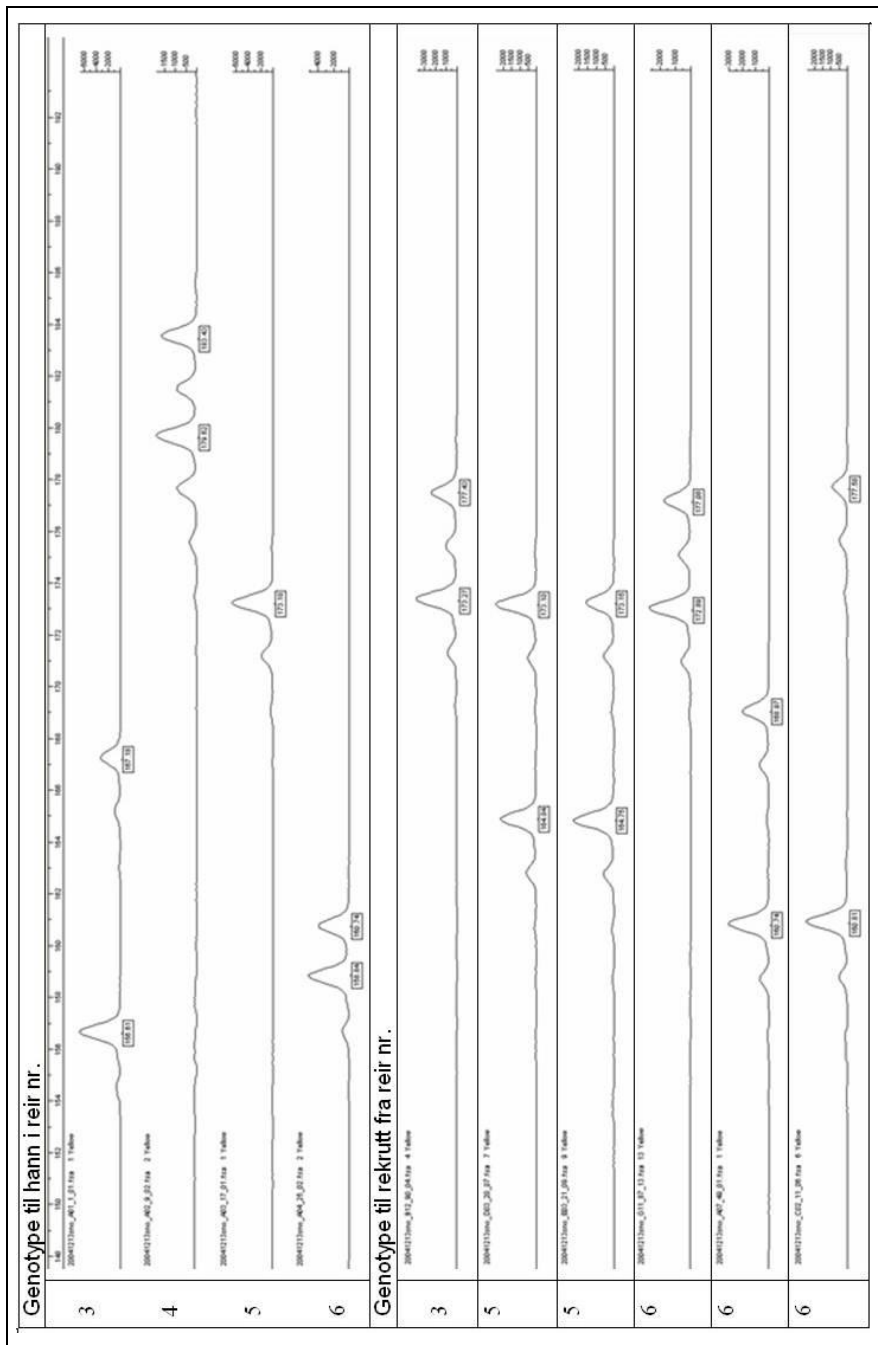
<http://www.math.ntnu.no/biomat/>

Vedlegg 1: Genotyping av 21 hanner og ungene i deres reir

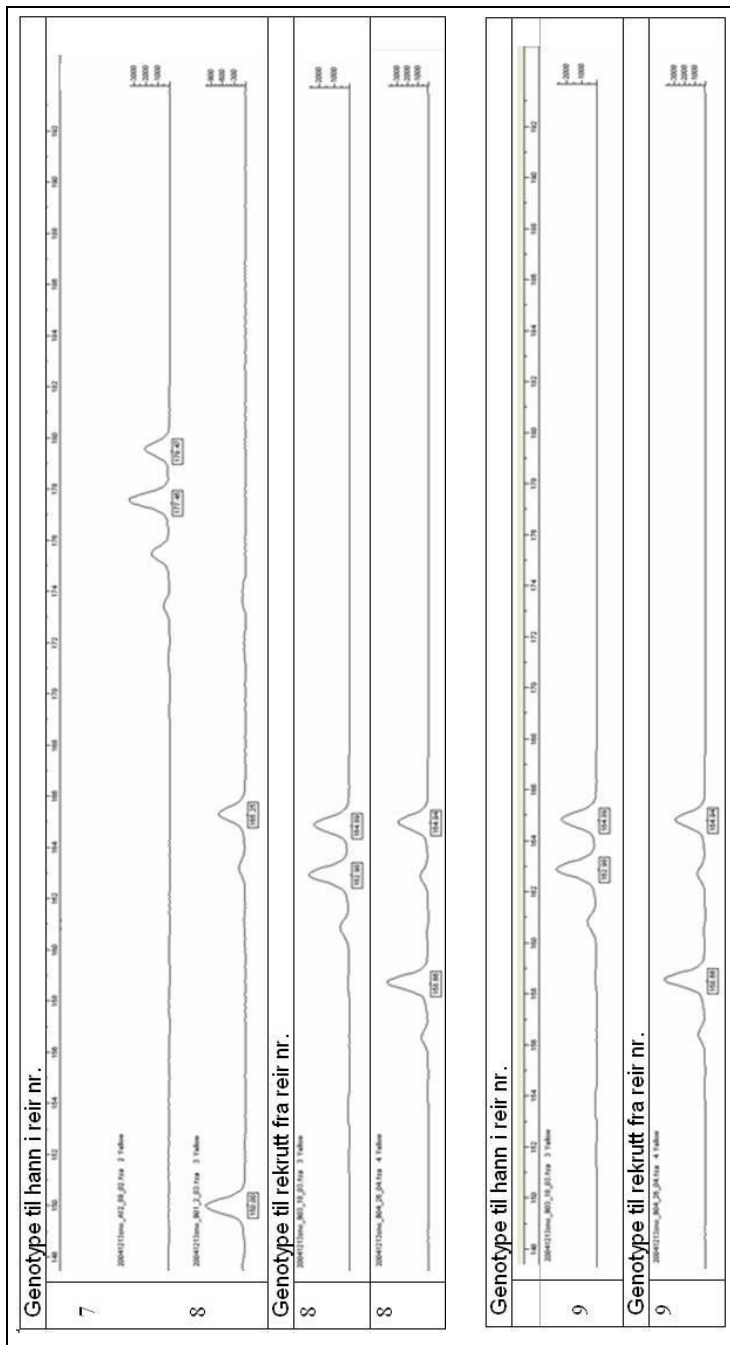
Genotype til hann i - og rekrutt fra reir 1 og 2



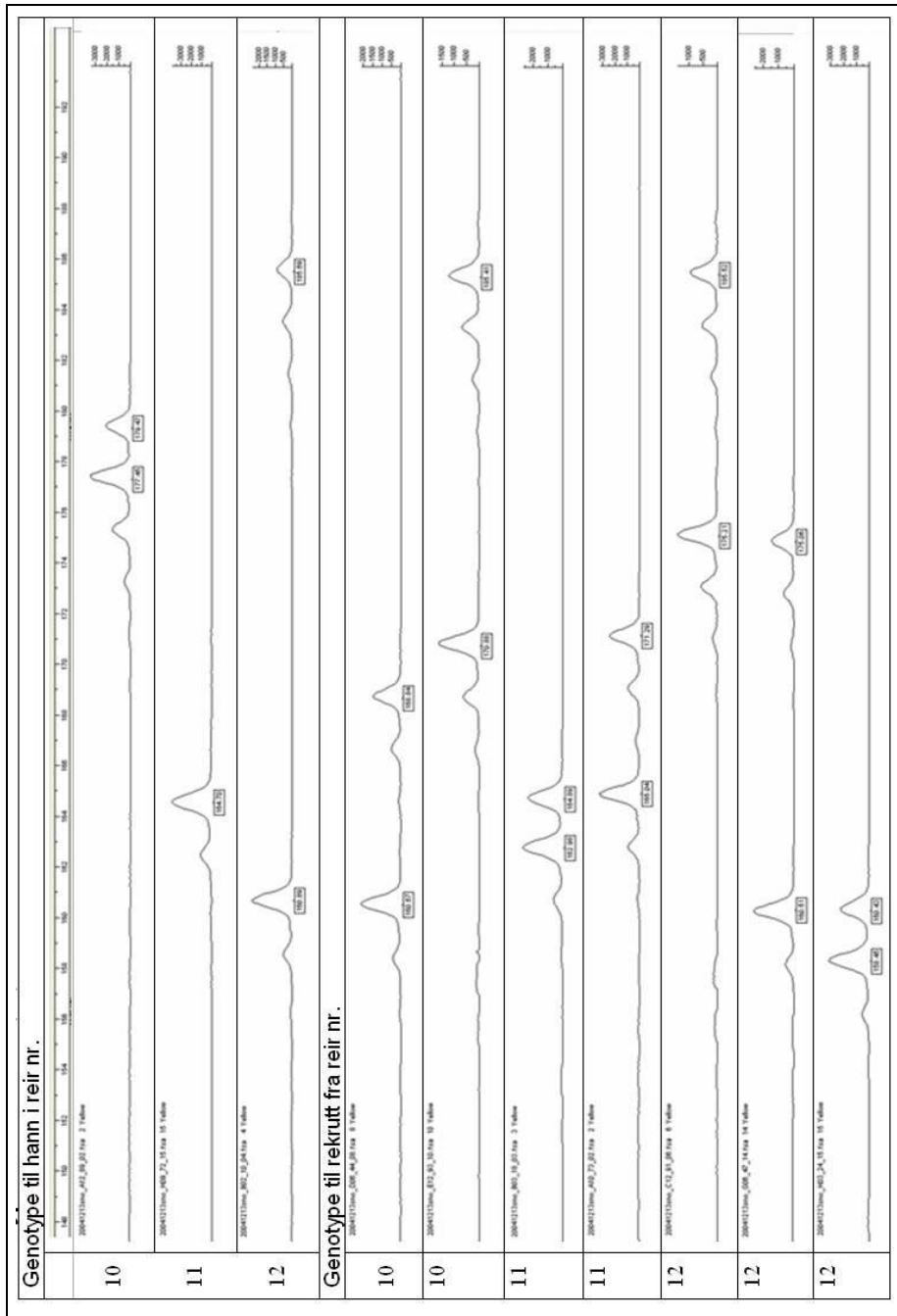
Genotype til hann i - og rekrutt fra reir 3, 4, 5 og 6



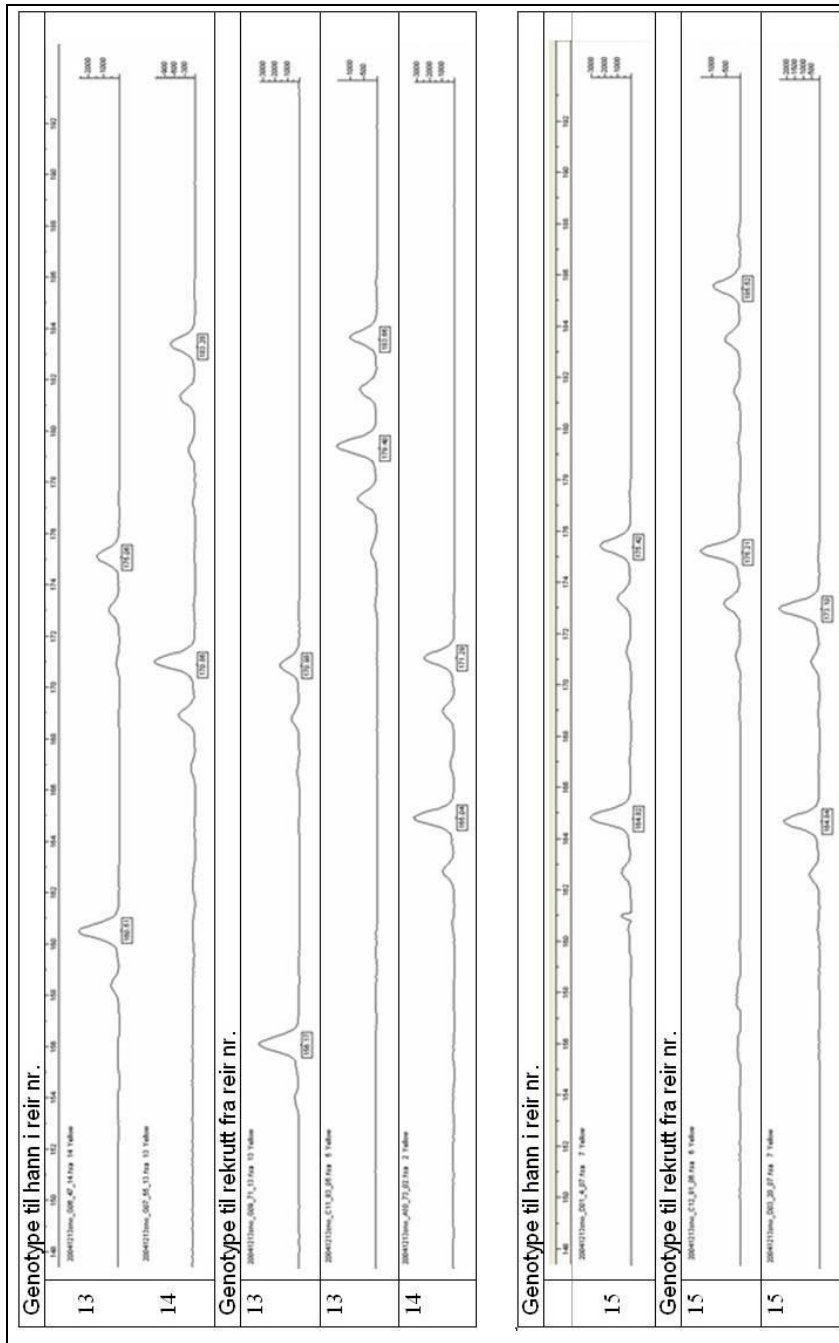
Genotype til hann i - og rekrutt fra reir 7, 8 og 9



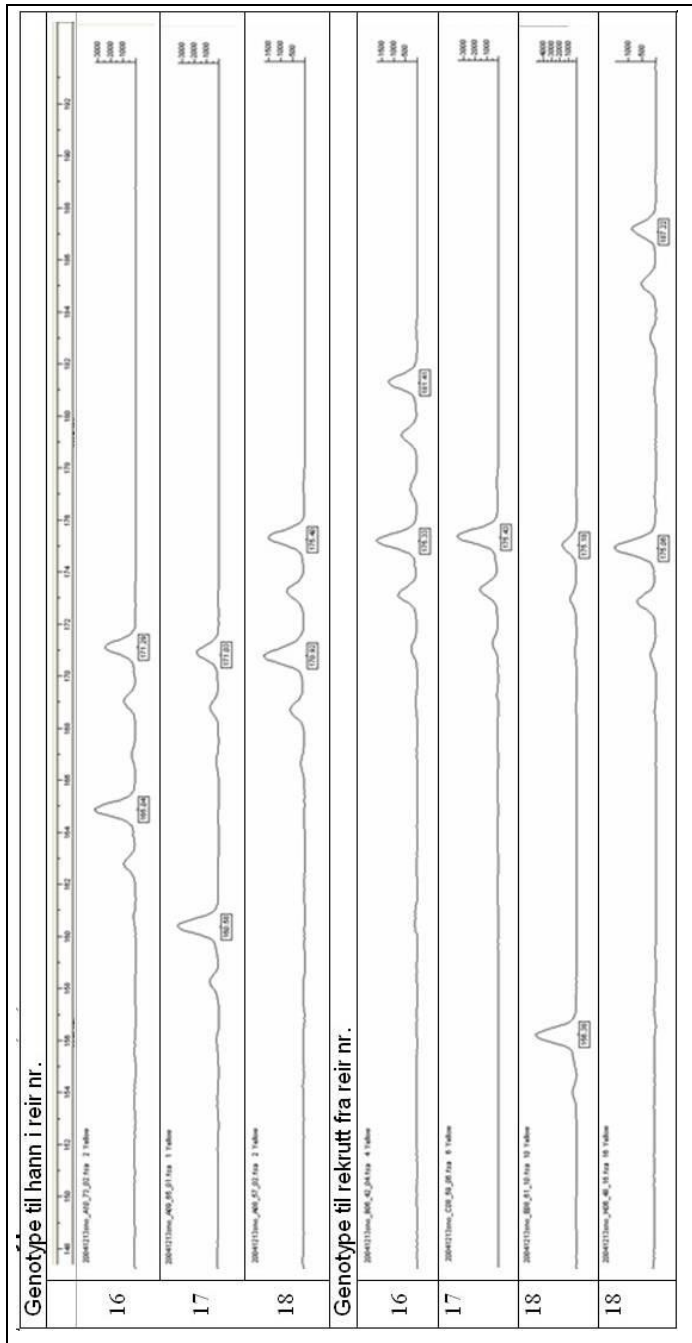
Genotype til hann i - og rekrutt fra reir 10, 11 og 12



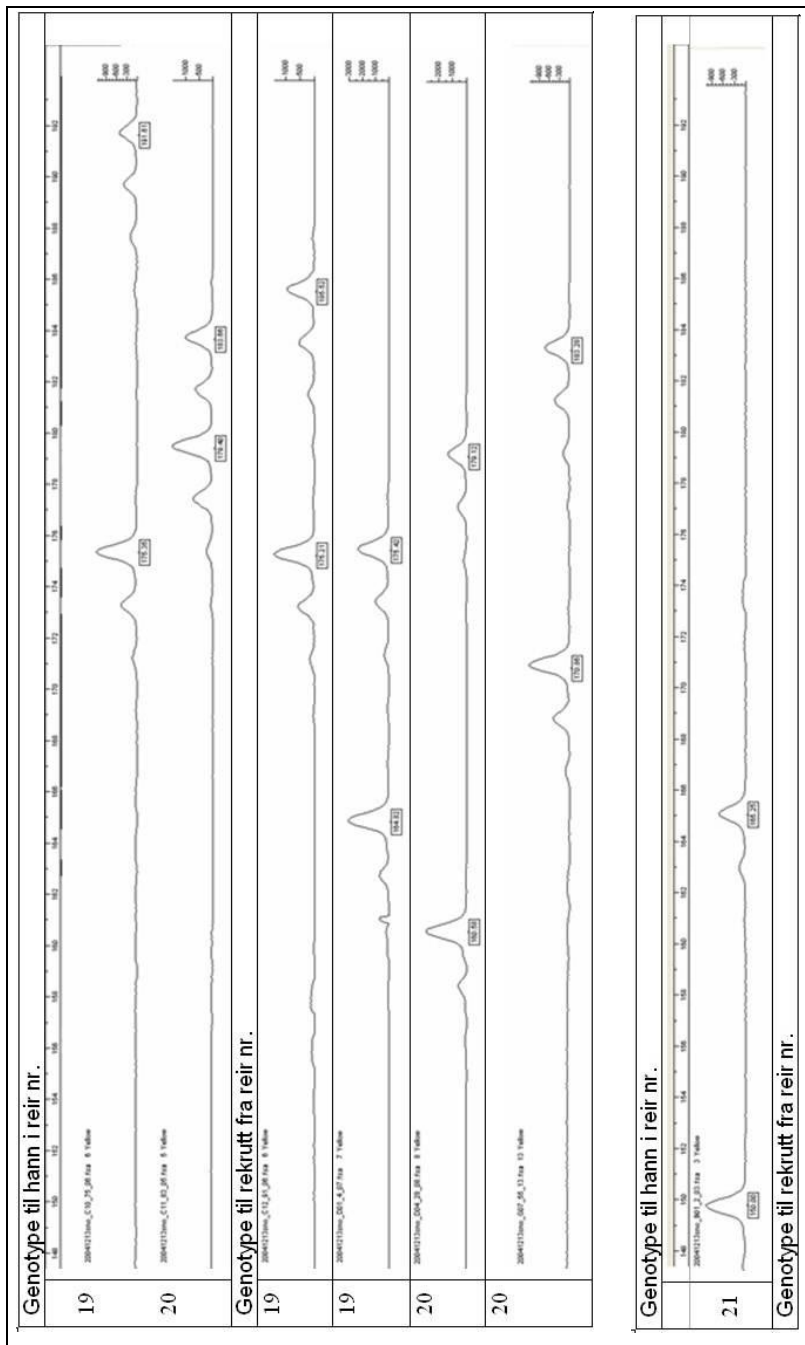
Genotype til hann i - og rekrutt fra reir 13, 14 og 15



Genotype til hann i - og rekrutt fra reir 16, 17 og 18



Genotype til hann i - og rekrutt fra reir 19, 20 og 21



Vedlegg 2 Formler

Under følger en oversikt over de forskjellige parameterne som dere har beregnet.

Betegnelsen	Formel	Forklaring
<i>Covarians, s</i>	$s = \sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})$	Graden av samvariasjon mellom fitness og størrelsen på brystflekken
<i>Seleksjons differensialet, S</i>	$S = s / \text{Var}(x)$	Sammenhengen mellom relativ fitness og størrelsen på brystflekken
<i>arvbarhet h^2</i>	$h^2 = \text{Cov}(x,y) / \text{Var}(x)$	Hvor stor andel av den fenotypiske variasjonen som skyldes gener
<i>Variasjon i x</i>	$\text{Var}(x) = \sum (x_i - \bar{x})^2$	Variasjon i størrelsen på fars brystflekk
<i>Responsen R</i>	$R = h^2 S$	Hvor mye gjennomsnittlig fenotype forventes å forandre seg fra generasjon til generasjon

Vi gjør oppmerksom på at noen av verdiene som beregnes i disse oppgavene avviker noe i forhold til det som er helt korrekt. Dette er gjort for å forenkle utregningene. Men sammenhengene som beregnes i undervisningsopplegget er korrekte. For eksakte beregninger se referanser.

Vedlegg 3 Utstyr og reagenser er bestilt hos:

BIORAD

<http://bio-rad.com/>

Bio-Rad Laboratories
Johan Scharffenbergs vei 91
N-0694 OSLO
Norway
Phone: 47 23 38 41 30

Truls Wabakken 91808118

troels_wabakken@bio-rad.com

VWR

www.vwr.no

VWR International AS
Tlf: 73 82 52 84
Mobil: 92 83 27 94
Fax: 73 82 52 90
Leirfossveien 27
N-7038 Trondheim
NORWAY

INSTRUMENTTEKNIKK

<http://www.instrument-teknikk.no>

Erik Sigvarthsen
Produktsjef
Tlf. 55990410
Mob. 90544261
e-mail: erik.sigvathsen@instrument-teknikk.no



Hftet er utviklet i samarbeid med et forskningsprosjekt ved "Population Biology Centre" på NTNU, ledet av professor Bernt-Erik Sæther. Undervisningsopplegget er i hovedsak utviklet for å inngå i programfaget teknologi og forskningslære, men dekker også læreplanmål fra programfaget Biologi. Det legger stor vekt på metodisk tilnærming og bruk av teknolog og matematikk for å forstå økologiske prosesser i naturen. I tillegg får elevene en innføring og forståelse for evolusjon og seleksjon i små populasjoner.

Maria Sviland, Skolelaboratoriet, NTNU

Henrik Jensen, Population Biology Centre,
Institutt for biologi, NTNU

Børge Moe, Institutt for biologi, NTNU

Åsa Borg, Skolelaboratoriet og Institutt for
Biologi, NTNU

Skolelaboratoriet har som oppgave å drive forsknings- og utviklingsarbeid rettet mot undervisning i realfag og teknologi i skolen. Gjennom SLserien vil PLU og Skolelaboratoriet publisere resultatene av dette arbeidet.

NTNU



Trondheim

Program for lærerutdanning

Skolelaboratoriet
for matematikk, naturfag og
teknologi

Tlf: 73 55 11 43

Fax: 73 55 11 40

<http://www.skolelab.ntnu.no>

ISBN 82-7923-052-6

ISSN 1503-9242