

Prosjektrapport for pilotprosjektet:

Hva spiser egentlig svalbardrypa?

Pernille Bronken Eidesen, Eike Müller og Åshild Ønvik Pedersen

Uttesting av DNA metodikk for analyse av rypeavføring for kartlegging av diett.



Foto: Nicolas Lecomte



Innholdsfortegnelse

Sammendrag	2
Bakgrunn	3
Målsetning med prosjektet	4
Materialinnsamling, metode og resultater	5
Innsamling av rypekroer og rypeavføring	5
Analyse av kroinnhold	5
Utvikling og uttesting av DNA analyser	5
Analyse av rypekroer med studenter	5
Visuell analyse av rypekroer	5
Ekstraksjon av DNA for diettanalyse av rypeavføring	7
Utvikling og uttesting av spesifikke DNA markører for diettanalyse av rypeavføring	7
Uttesting av generelle DNA markører og storskalasekvensering (high-throughput sequencing) for diettanalyse av rypeavføring	7
Vurdering av resultater og veien videre	10
Takk til	11
Appendikser	12
Referanser	12

Sammendrag

Bærekraftig beskatning og forvaltning av svalbardrypa krever kunnskap, men det er fortsatt mye vi ikke vet om svalbardrypa. For eksempel kunnskap om hva rypa spiser gjennom året er basert på et fåtall ryper fra en studie gjort for mer enn 30 år siden. Tradisjonelt baserer man diettstudier på analyse av kro- eller mageinnhold. Dette fordrer vanligvis avlivning. Med dette pilotprosjektet ønsket vi å teste muligheten for å bruke DNA analyse av rypeavføring til å studere rypediett. Slik analyse av avføring er hva vi kaller *non-invasiv* metodikk (krever ikke avliving eller andre fysiske inngrep). For å verifisere metodikken, ble den testet på kroinnhold som på forhånd var analysert på tradisjonell måte. Vi hadde også som mål å inkorporere prosjektet i undervisning ved Universitetssenteret på Svalbard.

Gjennom prosjektet har vi bygget opp en bra og stadig økende samling av avføringsprøver for videre analyse, men antallet prøver fra mørketida er fremdeles lav. Dette skyldes at færre er ute i terrenget på denne tida, og rypene er vanskeligere å få øye på.

DNA metodene vi har testet så langt tilhører to kategorier, hvor den ene baserer seg på å designe spesifikke DNA markører som gjenkjenner en gitt plante, mens i den andre benyttes generelle primere og storskalasekvensering (*high-throughput sequencing*) for å identifisere alle plantetyper rypa har spist. Det er fordeler og ulemper med begge metodene, og egnethet avhenger av hvilke spørsmål en ønsker svar på. Videreutvikling av begge metodene er ønskelig, da de kan komplimentere hverandre.

Totalt ble det designet 12 spesifikke «primere» (dvs. markører som muliggjør oppkopiering av en bestemt del av DNAet), hvorav tre ble testet med hell. Når det gjelder videre metodetesting for spesifikke markører, vil vi fokusere på ytterligere testing av markører vi allerede har designet, samt designe flere spesifikke markører som favner bredden av rypedietten, inkludert foretrukken sopp som seljetjæreflekk. Videre vil vi teste om markørene også kan brukes til kvantitative analyser. Måten vi har testet spesifikke markører til nå gir kun sikkert svar på om rypa har spist en gitt plante eller ikke, og ikke hvor mye den har spist av denne planta relativt til andre. Neste steg er derfor å teste spesifikke markører til kvantitativ analyse via *quantitative real-time PCR* (qPCR).

Våre foreløpige analyser basert på et tilfeldig utvalg av storskalasekvenseringen (200000 sekvenser utav totalt 20 millioner) tyder på at slik DNA analyse av rypeavføring fungerer bra, og at DNA identifisering av planter i avføring gjenspeiler det vi finner basert på kroinnhold; som for eksempel at polarvier (*Salix polaris*) er en svært viktig komponent i rypedietten utenom vekstsesongen, mens dietten på sommeren virker mer variert, når tilgangen til friske planter er god.. Det har tidligere vært hevdet at svalbardrypa i liten grad spiser insekter, og våre DNA tester så langt støttet dette. Når de endelige dataene foreligger, satser vi på å publisere disse i et vitenskapelig tidsskrift.

Å bruke studenter til innsamling og analyse av materialet er et flott supplement, og studentene setter pris på å delta i prosjekter de opplever som ekte. Vi ser likevel et behov for mer planlagte, regelmessige innsamlingsrunder i bynære områder hvor det ofte observeres rype for å få bedre innsamlingstetthet i mørketida. Desember og januar er dessuten en periode hvor mange av studentene er på fastlandet. Inkludering av studenter i laboratoriearbeid fungerte godt for tradisjonell gjennomgang av kroinnhold. Ekstraksjon av DNA fra avføring egnet seg derimot ikke som læringsaktivitet for studenter på dette nivået, da dette krevde svært strengt renslighetsregime og presisjon på laboratoriet. Basert på erfaringene fra dette prosjektet jobber vi nå med å videreutvikle en læringsaktivitet hvor studentene er aktivt med i innsamling av avføring, og tolking av resultater fra DNA analysen av avføringsprøver, men ikke direkte involvert i laboratedelen; denne overlates til teknisk personell. Studentene vil i tillegg få analyser av kroinnhold fra ryper skutt under jakt. Disse læringsaktivitetene vil over tid kunne generere nok data til å bidra med relevant og nyttig informasjon for både vitenskapen og forvaltningsmyndighetene.

Bakgrunn

Bærekraftig beskatning og forvaltning av svalbardrypa krever kunnskap. Kunnskapen om svalbardrypas økologi øker jevnt og trutt, men fremdeles er det mye vi ikke vet (Pedersen *et al.*, 2005), eller vi baserer oss på antatte sannheter som ble publisert for mer enn 30 år siden. Et godt eksempel på det er hva rypa spiser gjennom året. Det eneste studiet som inkluderer svalbardrypas vinterdiett er Unander *et al.* (1985). Det baserer seg på kroinnhold av totalt 14 ryper skutt fra begynnelsen av november og ut februar. Fra disse 14 kroene, samlet en enkelt vinter for over 30 år siden, i nærheten av Ny Ålesund og Longyearbyen, har vi ekstrapolert vinterdietten til en art som finnes over store deler av Svalbard og Frans Josef Land. Med så få prøver, har vi ingen anelse om dette resultatet er representativt for arten som helhet. Det kan strengt tatt være tilfeldigheter at resultatet ble som det ble. Som Unander skriver selv i sin publikasjon: *"In order to achieve the amounts of material needed for the botanical and chemical analyses, it was necessary to pool the contents of several crops. Unfortunately, the possibility to perform a meaningful statistical treatment of the results was thereby strongly restricted."*

Det er viktig å vite hva svalbardrypa spiser gjennom året, både for å bygge generell kunnskap, og for å kunne si noe om effekten av de pågående klimaendringene. Klimaendringer medfører flere regnskyl om vinteren, som skaper islag som gjør mange krypende planter utilgjengelige for rypa. Hvordan vil dette påvirke næringstilgangen til rypa? Vil en vinter med mye is gi rypebestanden en knekk? (se Hansen *et al.* (2013) for et eksempel på hvordan vekstraten til rypebestanden påvirkes negativt av en slik vinter) eller vil rypekyllingene klekkes for tidlig for å nytte seg av de næringsrike yngleknoppene til harerug? Slike spørsmål er vanskelig å svare på det når man egentlig ikke vet med sikkerhet hva rypa spiser, spesielt om vinteren. Denne informasjonen kan derfor bidra direkte til den planlagte utvidelsen av rypeovervåkingen av svalbardrype innenfor langtidsprosjektet «COAT - Klimaøkologisk observasjonssystem for Arktisk Tundra». I COAT er det bl. a satt fokus på rypas diett gjennom ønske om å teste ut om klimaendringene kan føre til en *mismatch* mellom rypekyllingenes dokumenterte avhengighet av harerug rett etter klekking og endringer i harerugens fenologi som følge av tidligere start på vekstsesongen

Kroposen er en del av rypas fordøyelsessystem, og er egentlig en utposing på spiserøret som fungerer som midlertidig lagringsplass før maten går videre til kjertelmagen og kråsen. Undersøkelse av kroposer gir et godt bilde av hva rypa spiser ettersom plantedelene en finner der er mer eller mindre intakte, og kan artsbestemmes. Ulempen med undersøkelse av kroposer er at rypa må bøte med livet, noe som legger visse begrensninger på både antall prøver og når på året prøvene kan hentes inn. Få jakter rype etter at mørket senker seg, og jakt sesongen er uansett over i desember.

Vi ønsket derfor å supplere undersøkelser av kroposer med DNA-analyser av rypeavføring. DNA-analyse av avføring har de senere årene blitt mer og mer vanlig som en alternativ metode for kartlegging av diett. Artsbestemmelse

Boks1. DNA-barcoding

Barcoding betyr strekkoding. I DNA-barcoding brukes et spesielt gen som en unik merkelapp på hver art. Dette genet kan sammenlignes med strekkoden som dagligvareforretningene bruker til avlesing av pris på en bestemt varetype ved kassaapparatet: Alle strekkoder har en unik kombinasjon av tykke og tynne streker som apparatet søker opp i en database for å finne prisen som matcher varen. I DNA-barcoding er de tykke og tynne strekene byttet ut med de fire byggesteinene i DNA-molekylet, og databasen matcher denne DNA-koden med en art. En typisk strekkode består av ca 500-1000 par byggesteiner avhengig av hvilken «barcode» man bruker. For avføring, hvor DNAet antas å ha dårligere kvalitet, brukes kortere strekkoder.

via DNA kalles «DNA-barcoding» (Boks 1.). Via DNA ekstraksjon fra avføringen, og ved bruk av DNA markører som kun plukker opp DNA fra planter, kan vi kopiere opp DNA tråder av alle plantene det er rester av i avføringa. Hver plantart har en egen DNA-kode. Derfor kan vi identifisere plantene ved å sammenligne denne koden mot databaser som kobler denne koden opp mot riktig plantenavn. Ettersom alle svalbardplantene allerede er sekvensert for denne DNA regionen og lagt inn i en database, er det mulig å identifisere planter i avføringa på denne måten. Det er også mulig å søke etter insekter i dietten på samme måte. Insekter er nemlig en vanlig del av rypedietten på fastlandet, men det er ikke kjent at svalbardrypa spiser insekter. DNA-analyse av avføring har en rekke fordeler sammenlignet med analyse av kroinnhold: avføringsprøver kan lett samles inn året rundt, prøvetakning medfører ikke avlivning, og det er lettere å analysere et stort antall prøver. Ulempene med DNA-analyse er for eksempel at DNA-barcodene ofte ikke er spesifikke nok til å skille nærstående arter fra hverandre, det er vanskelig å få gode mål på kvantitet, og prøver kan lett bli forurenset (Pompanon *et al.*, 2012).

Det finnes to vanlige metoder for DNA identifisering av diett (Valentini *et al.*, 2009), hvor den ene baserte seg på å designe spesifikke DNA primere (markører) som kun gjenkjenner en gitt plante, mens den andre baserte seg på generelle primere tilgjengelige på markedet og *high-throughput amplicon sequencing* (som er en måte å kopiere opp veldig mange DNA sekvenser samtidig) for å identifisere alle plantetyper rypa har spist. Fordelen med den første metoden (spesifikke primere) er at når metoden er utviklet er kostnadene lave, dataanalysene i etterkant er relativt enkle, og en slik metodikk egner seg derfor godt til bruk i undervisning. For de fleste studier vil nok likevel den siste metoden (generelle primere) være å foretrekke, da den 1) ikke krever noen forkunnskaper om dietten til dyret en ønsker å studere, 2) man trenger ikke utvikle nye markører, og 3) sammenligning av metodene har vist at de virker like bra (Valentini *et al.*, 2009). Ettersom vi ønsket å knytte dette prosjektet opp mot undervisning, og hadde forkunnskap om dietten til rypa, testet vi begge metodene.

Universitetssenteret på Svalbard tilbyr forskningsbasert og feltbasert undervisning. For oss var dermed dette prosjektet også en gylden mulighet til å kombinere undervisningsaktivitet med forskningsaktivitet. På denne måten ville studentene førstehånds erfaring om rypas næringspreferanser, og bidro til innsamling av grunnleggende informasjon om svalbardrypas biologi. En slik læringsmetodikk fremmer læring på flere nivåer; forskning har vist at integrering av forskningsprosjekter i undervisning gir økt eierskap, økt motivasjon og bedre læringsutbytte (Jenkins *et al.*, 2007; Fuller *et al.*, 2014).

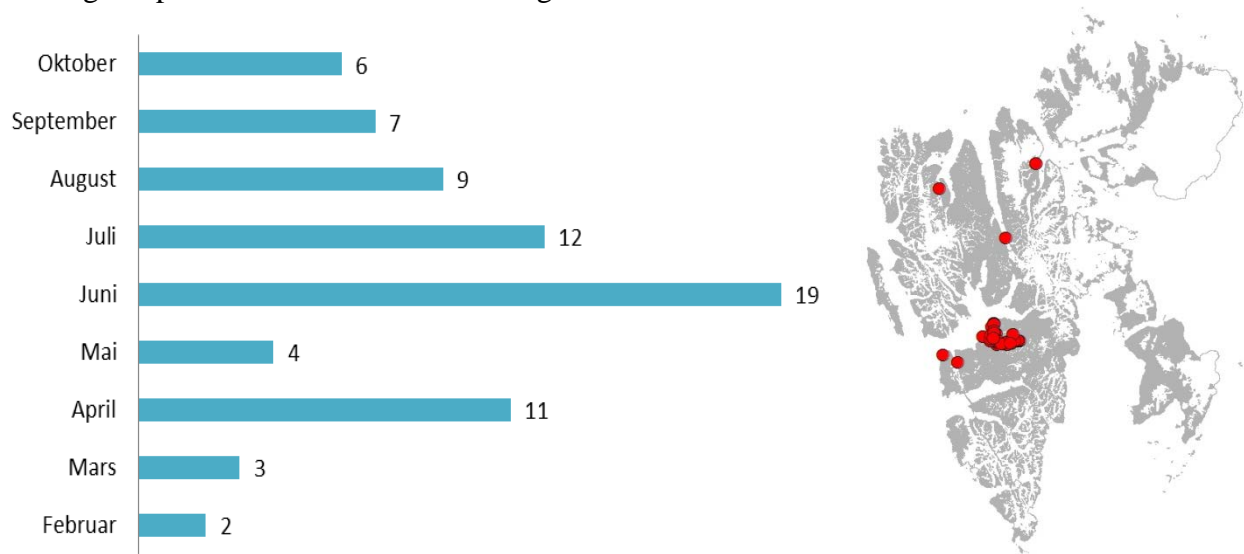
Målsetning med prosjektet

Hovedmålsettingen med dette pilotprosjektet var å teste muligheten for å bruke DNA analyse av rypeavføring til å studere rypediett. Slik analyse av avføring er hva vi kaller *non-invasiv* metodikk (i.e. krever ikke avlivning eller andre fysiske inngrep). Vår opprinnelige søknad til miljøfondet inkluderte utvikling av DNA analyser, prøveinnsamling og analyse av prøver over flere år som en integrert del av undervisning av biologistudenter ved UNIS. Vi fikk kun innvilget første del av prosjektet, som gjorde det mulig å kjøre et pilotprosjekt for å teste ut DNA-analyse av rypediett, og knytte dette opp mot undervisning og involvering av studenter. Resultatene presentert i denne rapporten er derfor fokusert på metodeutvikling og utvikling av læringsaktiviteter med studenter, og fokuserer i mindre grad på de biologiske spørsmålene, da dette krever innsamlinger over flere år og analyser av langt flere prøver for å fremskaffe pålitelige data.

Materialinnsamling, metode og resultater

Innsamling av rypekroer og rypeavføring

Vi samarbeidet med lokale jegere for å samle kroposer til undervisningen. Dette er en praksis vi satser på å videreføre og utvide i årene fremover. Data fra kroposer presentert her ble alle skutt i september eller oktober. Rypeavføring ble innsamlet ved å oppfordre studentene til å samle avføring hvis de møtte på rype i terrenget, eller fant avføring som kunne antas å være fersk (e.g. ved ferske rypespor). Studentene ble utstyrt med små papirposer for innsamling, samt instruksjoner om prosjektet og ønsket metadata (Appendiks 1). Både tørre og ferske prøver oppbevares ved -20 °C. I tillegg skrev vi en artikkel om prosjektet vårt som ble trykket i Svalbardposten, hvor vi oppfordret lokale innbyggere til å hjelpe oss med innsamlingen (Eidesen et al. 2014), samt at vi selv prøvde å samle prøver ved anledning og ba Sysselmannens feltinspektører samle prøver under sine sommeroppdrag. Vi har nå 73 prøver innsamlet (Appendiks 2), hvorav 30 ble analysert under testing av metodikk. En oversikt over hvor og når prøvene ble samlet er vist i Figur 1.



Figur 1. Barplot (t.v.) viser antall prøver av rypeavføring samlet inn i prosjektperioden sortert etter hvilken måned av året de ble samlet. De fleste prøvene er samlet inn rundt Longyearbyen, men andre lokaliteter på Svalbard er inkludert. Oversikt over lokaliteter hvor prøver av rypeavføring er samlet inn er vist på kartet t.h.

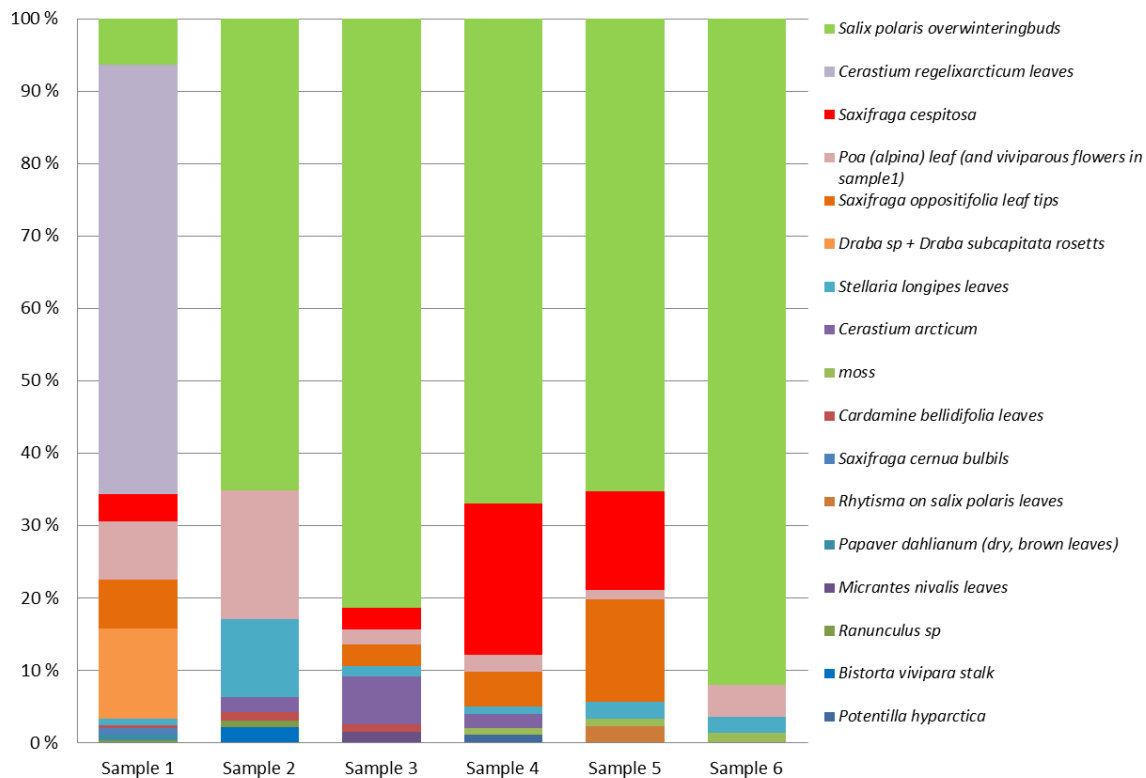
Visuell analyse av rypekroer

Tre år på rad (2013-2015) har vi analysert rypekroer med studentene. I 2013 ble seks kroposer analysert mer i detalj for å fungere som referanse under testing av DNA analyse (Figur 2). Disse kroposene ble først analysert av studentene, så i detalj av fagpersonell. For disse prøvene ble både våtvekt og tørrvekt vurdert, men forskjellen i relative fordeling var liten mellom disse. For prøver gjennomgått fra 2014 og 2015 ble derfor kun våtvekt notert.

Totalt har vi data fra 31 kroer, alle fra ryper skutt i september-oktober. Studentene ble bedt om å homogenisere innholdet i kroposen, og deretter ta ut to teskjeer med materialet. Identifisering av plantefragmenter fra kroene ble gjort under stereolupe, ved hjelp av floraer samt et hjelpehefte vi har laget med bilder og navn av tørkede planterester. Studentene sorterte så innholdet av sine to teskjeer etter art og veide hver fraksjon, for deretter regne ut prosentvis fordeling av disse. Alle tallene ble samlet i et felles excel ark som vi gjennomgikk til slutt.

Vi så det samme mønsteret hvert år; kroposene inneholdt ganske stor artsdiversitet, med fragmenter fra ca. 30 ulike karplantearter, i tillegg til mosefragmenter og lav. Det var

også ganske stor variasjon mellom kropsene, men nesten hver eneste krose inneholdt polarvier (*Salix polaris*), og ofte i store mengder. Utenom vekstsesongen er det overvintringsknoppene til polarvieren rypa spiser (Figur 2). På høsten er bladene visne og gir lite næring, men disse overvintringsknoppene er nye blad- og blomsteranlegg; rypa spiser rett og slett det som skal bli neste års blad. Harerug (*Bistorta vivipara*) var også en gjenganger, og har også tidligere blitt fremhevet som viktig rypeføde, spesielt for rypekyllingene (Unander *et al.*, 1985; Pedersen *et al.*, 2005). Andre vanlige arter i kropsene var sildrearter som rødsildre (*Saxifraga oppositifolia*), tuesildre (*S. cespitosa*) og knoppsildre (*S. cernua*). Tundraarve (*Cerastium arcticum*), rublom (*Draba* sp.), valmue (*Papaver* sp.) var også gjengangere.



Figur 2 Fordeling av kroinnhold basert på prosentvis fordeling av våtvekt. Prøve 1 (Sample 1) er fra september 2013, mens prøve 2-6 er fra oktober 2013.

Selv om vi fokuserte på planter, er noen andre observasjoner verdt å nevne. Unander *et al* (1985) fant en parasittisk sopp i sine diettanalyser av kroinnhold hos svalbardrype, men anså dette av mindre betydning. Våre tradisjonelle analyser av kroinnhold fra sen høst kan tyde på at parasittisk sopp er en delikatess for svalbardrypa. Foruten overvintringsknopper av polarvier, fant vi noen polarvierblader, men alle bladene var infiserte med seljetjæreflekk (*Rhytisma salicinum*; Figur 3). Når det finnes lite friske plantedeler, ser det altså ut til at rypene aktivt velger polarvierblader med denne parasittiske soppen.



Figur 3 Overvintringsknopper av polarvier (*Salix polaris*) var det mye av i sene høstprøver, men vi fant også noen polarvierblader, men alle bladene var infisert med den parasittiske soppen seljetjæreflekk (*Rhytisma salicinum*)

Ekstraksjon av DNA for diettanalyse av rypeavføring

Før DNA ekstraksjon, ble avføringsprøver tatt ut av fryseren og lufttørket i to dager, mens kroprøvene ble tørket i tørkeskap ved 37 °C. Hver tørket prøve ble så homogenisert ved bruk av en morter (Appendiks 3). Tre ulike kommersielle DNA-ekstraksjonssett ble testet. DNeasy plant kit (Qiagen), QIAamp DNA stool mini kit (Qiagen), og PowerSoil DNA isolation kit (MoBio). Alle ga gode resultater, men vi hadde noen problemer med forurensing av prøver, og ekstraksjonene måtte gjentas til alle negative kontroller var godkjent .

Utvikling og uttesting av spesifikke DNA markører for diettanalyse av rypeavføring

Spesifikke primere for ble designet for 12 plantearter som alle er vanlige ingredienser i rypas diet (Unander et al. 1985). Primerne ble basert på sekvenser av kloroplastregionen trnL, og designet ved bruk av Primer-BLAST (Appendiks 4). Tre primerpar (spesifikke for reinrose (*Dryas octopetala*), valmue og rødsildre) ble syntetisert og testet på 1) rent DNA fra hver av disse plantene, 2) DNA ekstrahert fra avføringsprøver og 3) DNA ekstrahert fra kroposer. Resultatene av disse testene viste at primerne var spesifikke for de gitte artene, og spesifikke nok til å indikere tilstedeværelse/fravær av den gitte arten i kroprøver (verifisert ved sammenligning mot innholdet analysert visuelt). Rødsildre og reinrose ble også fanget opp i noen av avføringsprøvene, som tydet på at disse primerne også virket bra på slike prøver.

Uttesting av generelle DNA markører og storskalasekvensering (high-throughput sequencing) for diettanalyse av rypeavføring

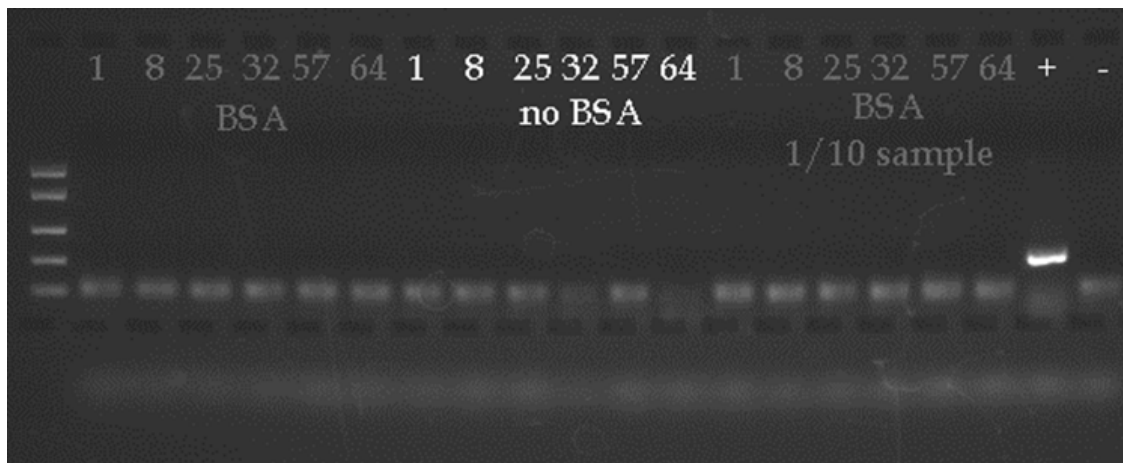
For denne testen ble DNA fra 30 prøver ekstrahert, fordelt på ulike tider av året (Appendiks 3). Seks av prøvene var DNA fra kroposer som også var visuelt analysert (Figur 2), og fungerte som referanse. Hver av de 30 prøvene ble ekstrahert tre ganger, for å sjekke at DNA ekstraksjonen var robust og at samme resultat ble oppnådd ved repeterte forsøk. Totalt ble dermed 90 prøver (pluss seks replikater og blindprøver) ekstrahert og sekvensert. Hver prøve ble sekvensert for tre DNA primersett; to for planteidentifisering og et for insekter (Tabel 3).

Tabell 1 Oversikt over generelle DNA barcoding primere testet for detektering av planter og insekter i rypeavføring.

Primer ID	Target region	Sequence	Product length	Reference
CN0103	Plants-Chloroplast trnL-G	/5Phos/GGGCAATCCTGAGCCAA	10-143	Taberlet <i>et al.</i> (2007)
CN0104	Plants-Chloroplast trnL-H	/5Phos/CCATTGAGTCTCTGCACCTATC		
CN0105	Plants-Chloroplast trnL-C	/5Phos/CGAAATCGGTAGACGCTACG	254-767	Taberlet <i>et al.</i> (1991)
CN0106	Plants-Chloroplast trnL-D	/5Phos/GGGGATAGAGGGACTTGAAC		
ZBJ-ArtF1c	Insects-mitochondria-CO1	/5Phos/AGATATTGGAACWTTATATTTTATTTTGG	157	Zeale <i>et al.</i> (2011)
ZBJ-ArtR2c	Insects-mitochondria-CO2	/5Phos/WACTAATCAATTWCCAAATCCTCC		

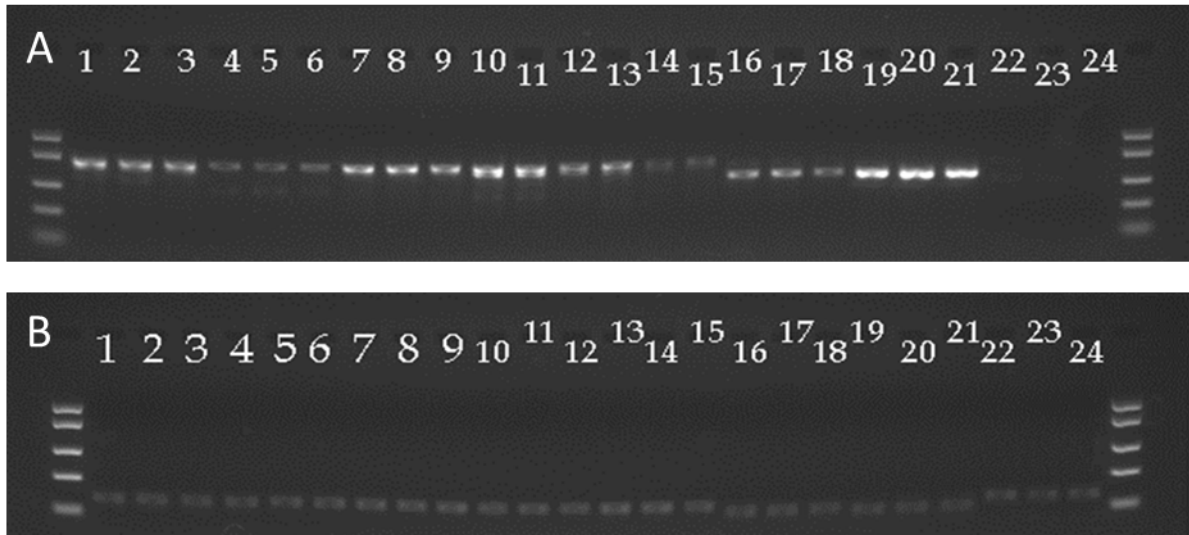
Når en skal analysere avføringsprøver er det vanligvis en fordel at primerne genererer korte produkter, da DNA i avføring ofte er fragmentert og ødelagt. To av primersettene vi brukte genererer slike korte sekvenser (CN0103/ CN0104 og ZBJ-ArtF1c/ZBJ-ArtR2c; Tabell 1). Det er likevel en fordel med lengre sekvenser for bedre artsadskillelse. Ettersom spesielt kromaterialet var av god kvalitet, ønsket vi også å teste om det var mulig å generere lengre plantesekvenser, så det andre planteprimersettet vi testet genererer lengre produkter.

Før prøvene ble sendt til sekvensering, testet vi om primerne virket; dvs. klarte de å kopiere opp noen DNA biter i det hele tatt fra prøvene våre? Insektsprimerne virket utmerket på DNA fra insekter (som var inkludert som positiv kontroll), men ga ingen utslag i hverken kro- eller avføringsprøver fra rype (Figur 3). Disse prøvene ble derfor ikke sendt videre til sekvensering.



Figur 4 Oppkopierte DNA fragmenter visualisert som bånd på en agarose-gel. Primerne for insekter virket utmerket på DNA ekstrahert fra insekter (indikert med +), mens tilsvarende bånd kom ikke opp i DNA fra avføringsprøver. Båndene til venstre er størrelsesmarkør.

Begge planteprimerne genererte produkter fra både kro- og avføringsprøver (Figur 4). Begge disse regionene ble dermed sendt til sekvensering. Strengt tatt er det ikke optimalt å kjøre produkter av så ulik lengde på samme system, men det var mest kostnadseffektivt å kjøre de sammen. Prøvene ble kjørt på en sekvenseringsplattform som kan håndtere ganske lange produkter (Paired-end sekvensering (2x300) på Illumina Miseq via ACGT Inc www.acgtinc.com). Sekvenseringsprosedyrene vi fulgte er beskrevet i Mundra *et al.* (2015).

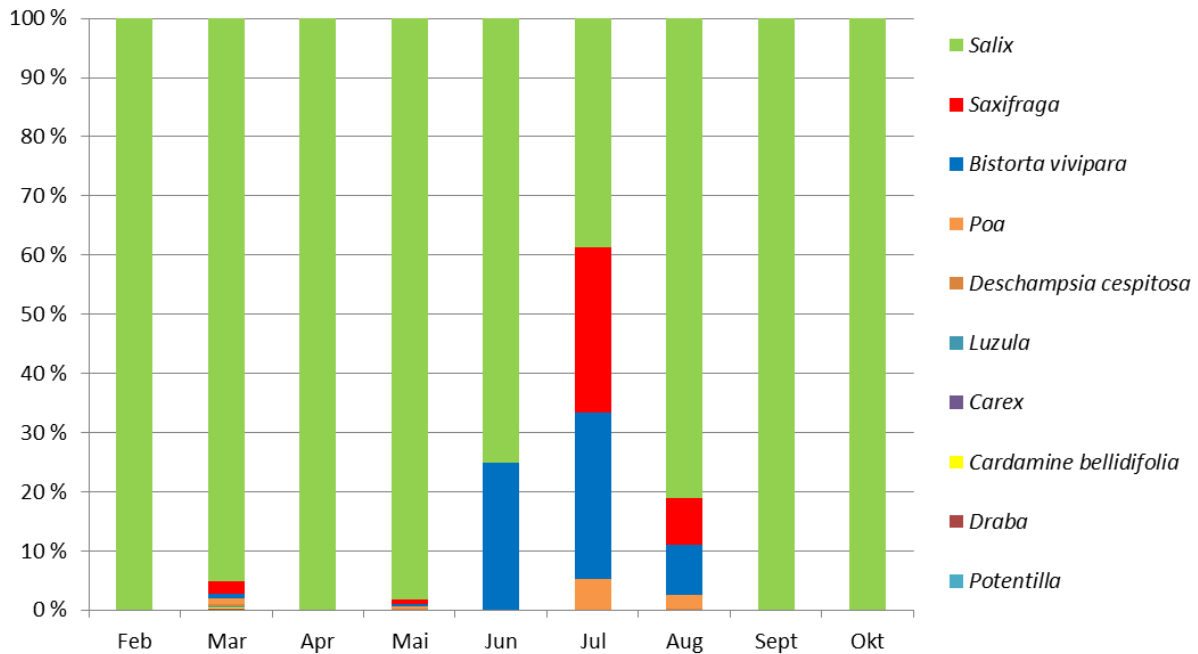


Figur 5 Oppkopierte DNA fragmenter av plantematerialet i rypeavføring visualisert som bånd på en agarose-gel. Øverst (A): Visualisering av DNA fragmentene generert med primerne CN0105/CN0106 (lengre sekvenser; Tabell 1).. Nederst (B): Visualisering av DNA fragmentene generert med primerne CN0103/CN0104 (kortere sekvenser; Tabell 1). Primere som generer en lengre sekvens beveger seg saktere gjennom gelen, og båndet vil ligge høyere opp.

Vi fikk nesten 20 millioner sekvenser av varierende kvalitet. Slike store datamengder krever grundig bioinformatisk arbeid og tar lang tid å analysere. På nåværende tidspunkt har vi ikke endelige resultater klare, men for å vurdere om metoden virket, tok vi et tilfeldig utvalg på 200000 sekvenser ut av de 20 millioner sekvensene. Dette nedskalerte datasettet var mulig å analysere relativt raskt, og kunne brukes til å optimalisere de videre bioinformatiske analysene.

Vi filtrerte sekvensene etter strenge kvalitetskriterier (Appendiks 5). Av de to planteprimerne vi testet, var det kun primerparet som generer korte sekvenser (CN0103/CN0104) som genererte nok sekvenser av god nok kvalitet for videre analyse. Etter kvalitetsfiltrering og databehandling satt vi igjen med 8284 sekvenser for denne regionen. Disse ble gruppert med krav om 99 % likhet, noe som ga 128 grupper. Søk mot databasen GenBank viste at veldig mange av disse gruppene hadde samme treff og representerte samme art eller taksa, og ble derfor slått sammen. Etter sammenslåing satt vi igjen med 15 ulike plantetaksa som alle var vanlige og kjente ingredienser i rypediett. Fordelingen av identifiserte arter og slekter er vist i Figur 6 (i figuren er ulike taksa fra samme slekt sammenslått når de ikke hadde entydige treff til art i databasen).

De replikerte DNA ekstraksjonene ga samsvarende resultater, også når det gjaldt fordeling av antall sekvenser mellom artene. Det samme gjorde sammenligningen mellom DNA analyse og visuelle analyser av kroposer; de dominerende artene identifisert i kroposene, var også dominerende basert på DNA analyse. De preliminære resultatene indikerte også at dietten inneholdt flere hovedkomponenter på sommeren (harerug, sildrer og gress), mens polarvier dominerte fullstendig utenom vekstsesongen.



Figur 6 Foreløpige esultater av DNA analyse av avføring og kroposer fra 30 svalbardryper samlet gjennom året, vist som relativ fordeling av 8284 DNA sekvenser tilhørende ulike plantearter/slekter.

Vurdering av resultater og veien videre

Dette prosjektet har vært en vinn-vinn prosess for både forskning og undervisning; vi har tilegnet oss ny kunnskap og analysemetodikk som kan benyttes inn mot rypeforskning og forvaltning, og videreutviklet læringsmetodikk som høyner kvaliteten på undervisningen.

Gjennom prosjektet har vi bygget opp en bra samling av avføringsprøver for videre analyse, men antallet av prøver fra mørketida er fremdeles lav. Dette skyldes flere faktorer. For det første er færre ute i terrenget på denne tida, og rypene er vanskeligere å få øye på. Desember og januar er dessuten en periode hvor mange av studentene er på fastlandet. Videre var innsamlingsstrategien var basert på frivillighet. Sjøl om studentene liker å delta i prosjekter de opplever som ekte og dette motiverer til læring, vil læringsaktiviteter som ikke bidrar direkte inn mot vurderingskriterier ofte bli nedprioritert (Biggs & Tang, 2011). For fremtidige studier, vil vi satse på mer planlagte, regelmessige innsamlingsrunder i bynære områder hvor det ofte observeres rype. En mulig måte å gjøre dette på, er å gi studentene ansvar etter tur om å sjekke gitte lokaliteter hvor vi vet det ofte observeres rype. Våre kurs tar 18 studenter. Hvis vi velger tre områder som skal sjekkes ukentlig, vil hver enkelt student ha dette ansvaret hver sjetten uke. Dette er en overkommelig belastning, og noe vi vil teste fra høsten av.

Inkludering av studenter i laboratoriearbeid fungerte godt for tradisjonell gjennomgang av kroinnhold, men også denne aktiviteten vil vi utvikle videre for å gi bedre data og ny informasjon. I sin nåværende form er denne aktiviteten svært deskriptiv. Ved en mer bevisst innhenting av kroer (tidlig og sent i jakt sesongen og fordelt på kjønn) og fokus på enkelte komponenter av dietten, kan vi for eksempel se på økningen av inntak av visse komponenter utover høsten, slik som overvintringsknopper av polarvier, og polarvierblad med og uten seljetjæreflekk. Vi kan eventuelt også måle næringsinnhold i noen av disse komponentene via et bombekalorimeter (kaloriinnhold) og CHN-analyse (nitrogen i forhold til karbon). Dette vil gi kunnskap om kvaliteten av maten rypa velger. Slike oppgaver kan også inngå i andre studentprosjekter tidligere på høsten. Denne typen prosjekter vil være mer

nybrottsarbeid, og studenter finner det svært motiverende å jobbe med spørsmål hvor svaret faktisk er ukjent. Samtidig vil slike øvelser kunne inngå som viktige pilotprosjekter for framtidig forskning.

Vi testet to metoder for DNA identifisering, med 1) spesifikke og 2) generelle primere og storskalasekvensering. Bruk av spesifikke primere og identifisering av tilstedeværelse/fravær av visse diettkomponenter visualisert som bånd på en agarosegel egner seg godt til undervisningsformål; data kan fremskaffes på relativt kort tid, med begrensede midler og alle prosedyrer kan gjøres på UNIS. Lignende studentprosjekt med diettanalyse via spesifikke DNA markører er allerede utprøvd med hell på mageinnhold av en rekke ulike dyr på marine biologikurs ved UNIS. I utgangspunktet hadde vi derfor tenkt å la studentene våre utføre hele prosedyren fra innsamling, ekstraksjon og oppkopiering av DNA, og vurdering av resultater. Vi opplevde derimot at ekstraksjon av avføring krevde gode labkunnskaper og strenge krav til presisjon og renslighet på laboratoriet. Dette gjorde det vanskelig å gjennomføre denne delen av prosedyren som læringsaktivitet med laveregradsstudenter. Avføring er ytterligere nedgradert i forhold til mageinnhold, og faren for forurensing mellom prøver er antakeligvis større. Basert på erfaringene fra dette prosjektet jobber vi nå med å videreutvikle en læringsaktivitet hvor studentene er aktivt med i innsamling av avføring, og tolking av resultater fra DNA analysen av avføringsprøver, men ikke direkte involvert i laboratoriedelen; denne overlates til teknisk personell.

For videre metodetesting for spesifikke markører, vil vi fullføre testene av de markørene vi allerede har designet, samt designe flere spesifikke markører som favner bredden av rypedietten, inkludert foretrukken sopp som seljetjæreflekk. Videre vil vi teste om markørene også kan brukes til kvantitative analyser. Måten vi har testet spesifikke markører til nå gir kun sikkert svar på om rypa har spist en gitt plante eller ikke, og ikke hvor mye den har spist av denne planta relativt til andre. Neste steg er derfor å teste spesifikke markører til kvantitativ analyse via *quantitative real-time PCR* (qPCR).

Våre foreløpige analyser er basert på et tilfeldig utvalg av storskalasekvenseringen gjort med generelle barcoding primere (200000 sekvenser utav totalt 20 millioner). Resultatene så langt tyder på at slik DNA analyse av rypeavføring fungerer bra, er robust og at DNA identifisering av planter i avføring gjenspeiler det vi finner basert på kroinnhold.

Metoden ble kun testet på 30 prøver, og kun en brøkdel av sekvensene er analysert, så videre analyse av datasettet, samt analyse av flere prøver vil gi mer detaljert informasjon om rypedietten gjennom året. Likevel er det ingen tvil om at noen plantearter er viktigere enn andre; svalbardrypa spiser mye polarvier utenom vekstsesongen, og på sommeren er dietten mer variert, når tilgangen til friske planter er god. Det har tidligere vært hevdet at svalbardrypa i liten grad spiser insekter, og våre DNA tester så langt støttet dette. Når de endelige dataene foreligger, satser vi på å publisere disse i et vitenskapelig tidsskrift.

Takk til

Tusen takk til alle studenter og andre ivrige samlere av prøver. Videre vil vi rette en stor takk til Courtney Nadeau, Iva Pitelková, and Stuart Thomson for teknisk assistanse og gjennomføring av labarbeidet. Tusen takk til Sunil Mundra for hjelp med bioinformatiske analyser, og til Universitetscenteret på Svalbard og Svalbard Miljøvernfond for økonomisk støtte.

Appendikser

Alle appendikser er tilgjengelig ved henvendelse til Universitetscenteret på Svalbard ved Pernille Bronken Eidesen (pernillee@unis.no).

- Appendiks 1 Instruksjon til studentene “How to collect faeces” (engelsk)
- Appendiks 2 Metadata over innsamlede prøver
- Appendiks 3 Prosedyreoppsummering for DNA ekstraksjon (engelsk)
- Appendiks 4 Prosedyre for spesifikk primerdesign (engelsk)
- Appendiks 5 Logg over bioinformatisk analyse (engelsk)

Referanser

- Eidesen, P.B., Fuglei, E., Pedersen, Å.Ø. 2014. Hva spiser svalbardrypa om vinteren? Svalbardposten Nr 38:38.
- Biggs, J. & Tang, C. (2011) *Teaching for Quality Learning at University: What the Student Does*, 4 edn. Open University Press, England.
- Fuller, I.C., Mellor, A. & Entwistle, J.A. (2014) Combining research-based student fieldwork with staff research to reinforce teaching and learning. *Journal of Geography in Higher Education*, **38**, 383-400.
- Hansen, B.B., Grøtan, V., Aanes, R., Sæther, B.-E., Stien, A., Fuglei, E., Ims, R.A., Yoccoz, N.G. & Pedersen, Å.Ø. (2013) Climate Events Synchronize the Dynamics of a Resident Vertebrate Community in the High Arctic. *Science*, **339**, 313-315.
- Jenkins, A., Healey, M. & Zetter, R. (2007) Linking teaching and research in disciplines and departments. In: (ed. T.H.E. Academy), United Kingdom.
- Mundra, S., Bahram, M., Tedersoo, L., Kauserud, H., Halvorsen, R. & Eidesen, P.B. (2015) Temporal variation of *Bistorta vivipara*-associated ectomycorrhizal fungal communities in the High Arctic. *Molecular Ecology*, **24**, 6289–6302.
- Pedersen, Å., Overrein, Ø., Unander, S. & Fuglei, E. (2005) Svalbard Rock Ptarmigan (*Lagopus mutus hyperboreus*) - a status report. *Norsk Polarinstitutt, Rapportserie 125*,
- Pompanon, F., Deagle, B.E., Symondson, W.O., Brown, D.S., Jarman, S.N. & Taberlet, P. (2012) Who is eating what: diet assessment using next generation sequencing. *Mol Ecol*, **21**, 1931-50.
- Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G. & Bouvet, J. (1991) Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*, **17**, 1105-1109.
- Taberlet, P., Coissac, E., Pompanon, F., Gielly, L., Miquel, C., Valentini, A., Vermat, T., Corthier, G., Brochmann, C. & Willerslev, E. (2007) Power and limitations of the chloroplast trnL (UAA) intron for plant DNA barcoding. *Nucleic Acids Res*, **35**, e14.
- Unander, S., Mortensen, A. & Elvebakk, A. (1985) Seasonal changes in crop content of the Svalbard Ptarmigan *Lagopus mutus hyperboreus*. *Polar Research*, **3**, 239-245.
- Valentini, A., Pompanon, F. & Taberlet, P. (2009) DNA barcoding for ecologists. *Trends Ecol Evol*, **24**, 110-7.
- Zeale, M.R., Butlin, R.K., Barker, G.L., Lees, D.C. & Jones, G. (2011) Taxon-specific PCR for DNA barcoding arthropod prey in bat faeces. *Mol Ecol Resour*, **11**, 236-44.