

För elever

**Anna Lorenc**

Max Planck Institute for Evolutionary Biology, Plön, Deutschland

**Dean Madden [Ed.]**

NCBE, University of Reading, UK

## Evolutionen hos mammutar och deras nu levande släktingar

### Introduktion

Hur är asiatiska och afrikanska elefanter besläktade med ullhåriga mammutar?

Ullhåriga mammutar (*Mammuthus primigenius*) var mycket framgångsrika arter, som man tror har existerat i stort antal. De fanns från Spanien till Nordamerika. De äldsta fossilen av ullhåriga mammutar är 150 000 år gamla. De flesta ullhåriga mammutar dog ut i slutet av Pleistocene (10–12 000 år sedan), medan det finns lämningar så sent som för 3 700 år sedan.



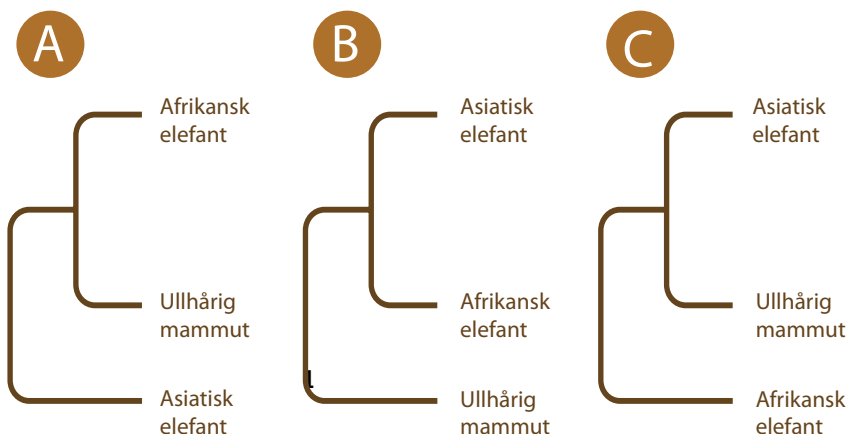
BILD FRÅN: Sedwick, C. PLoS Biology 6 (4): e99

Mammutar är nära besläktade med de elefanter som lever idag, men tills nyligen har det exakta släktskapet mellan dessa arter varit oklart. Delade mammutarna en gemensam förfader med dagens elefanter (B)? Eller var de närmare besläktade med en av de moderna elefantarterna (A or C)?

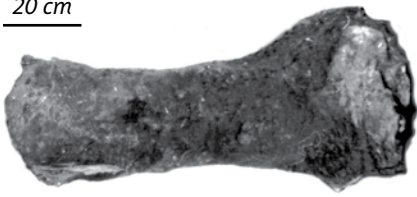
Tre möjliga evolutionsära släktskap mellan ullhåriga mammutar och moderna elefanter.

Kontakt:  
d.r.madden@reading.ac.uk

www.bioscience-explained.org



20 cm

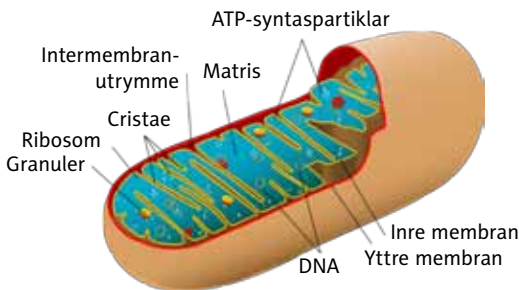


Del av höger bakben hos en ullhårig mammut, som använts för mtDNA sekvensdata i denna övning. DNA extraherades ur mycket väl bevarad muskelfävnad.

BILD FRÅN: Rogaev, et al. PLoS Biology, 4(3): e73

Forskare har diskuterat detta släktskap under lång tid. Jämförelse av tänder, snabelpetsens struktur, hårstruktur och immunologiska reaktioner har alla misslyckats med att lösa dispyten. Lyckligtvis kan DNA användas för att bedöma dessa släktskap — DNA från levande elefanter och DNA extraherat från ett ~33 000-år gammalt mammutben, som man hittat fruset i Sibirien 1986, användes för att fastställa dessa släktskap. (Den frusna mammuten kallades *Enmyrn* efter floddalen *Enmyrnveem*, där man hittade den.)

DNA är det avgörande 'rättsliga' beviset för evolutionen. DNA sekvenserna från de två nu levande elefanterna kan jämföras med sekvensen från mammuten och ett evolutionsträd baserat på sekvensskillnader kan ritas upp.



Strukturen av en mitokondrie - figuren visar var DNA finns.

De sekvensdata som tillhandahålls kommer från mitokondrie DNA (mtDNA). Mitokondrier är organeller som finns inne i cellerna och som gör det möjligt att utnyttja energi. Mitokondrier har sitt eget genom och varje mitokondrie innehåller flera kopior av detta. Celler kan innehålla tiotusentals mitokondrier, vilket gör mtDNA rikligt och det är därför lättare att extrahera mtDNA från celler än kärn DNA. Detta förklarar också varför mtDNA under många år var huvudkällan vid analys av gammalt DNA.

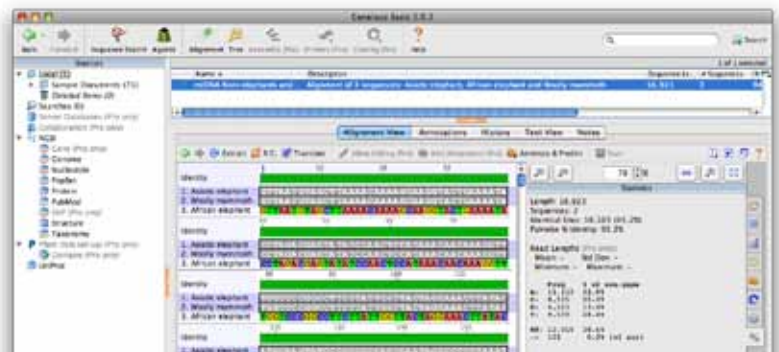
### Mammutar och moderna elefanter – DNA-analys

Eftersom det mtDNA som används i denna övning är en relativt lång sträcka DNA (16 842 baser), så skulle det ta mycket lång tid för "aligning" av tre sekvenser, även med hjälp av en dator. Av denna anledning har "alignments" preparerats i förväg i dokumentet: **elephants\_and\_mammoth.geneious**. För att ladda ner detta dokument måste du först ladda ner Geneious mjukvara. Ladda ner detta från: [www.dnadarwin.org/casestudies/10](http://www.dnadarwin.org/casestudies/10). Tryck därefter på Data och därefter på Open. Dubbelklicka på Mammoth data

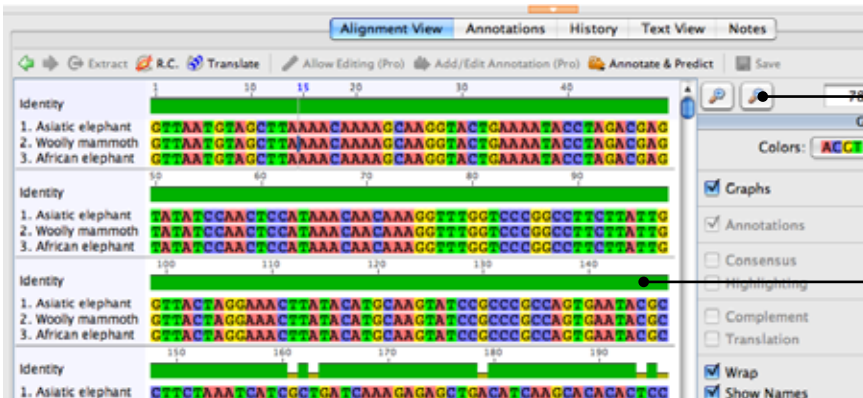


OBS!  
Om en box kommer upp över Geneious start-up screen, som meddelar att din "Pro-version" inte gäller längre, klicka på "use Geneious Basic"!

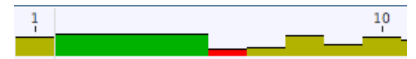
1. Dubbelklicka på elephants\_and\_mammoth.geneious document. Då startas Geneious mjukvara. Ladda ner filen med DNA sekvens data in i programmet.
2. Geneious fönstret visar nu mtDNA-sekvenserna från den ullhåriga mammuten, samt från de asiatiska och afrikanska elefanterna:



3. Använd zoom-tangenterna för att zooma in på DNA data.



Zoom-knapparna

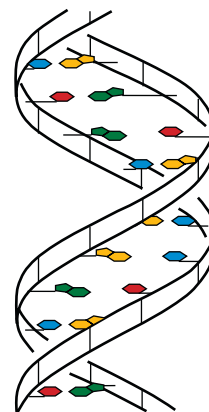
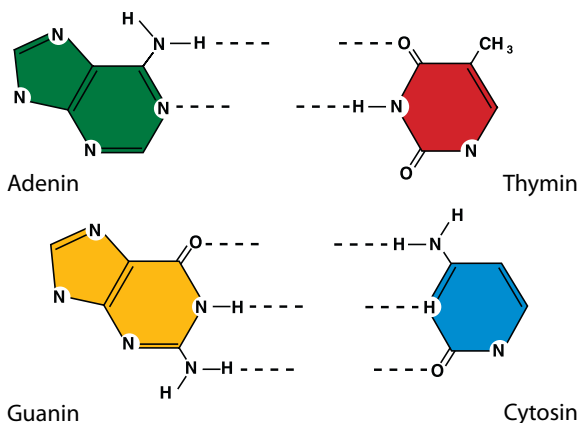


'Identitets' grafen över sekvenserna visar hur lika de är : grön= identisk; senapsfärgad= några olikheter; röd=många olikheter.

4. Scrolla genom data, leta efter skillnader mellan de tre mtDNA sekvenserna. (Tips: titta bara efter olika färger eller efter förändringar i den gröna remsan överst vid sekvenserna). Håll på ett ungefär reda på förändringarna, som du eventuellt upptäcker, t ex A ändras till C, G ändras till C osv. **Använd inte alltför mycket tid till detta: du skall bara få ett första intryck av likheter och olikheter mellan de tre arternas sekvenser.**
5. Du kommer att finna att de flesta sekvenser är identiska hos de tre arterna. Att jämföra sekvenser med hjälp av ögonen är mycket mödosamt och det blir lätt felaktigheter (speciellt om du är färgblind). Lyckligtvis har *Geneious* en annan metod att jämföra sekvenser: *Statistik boxen*.

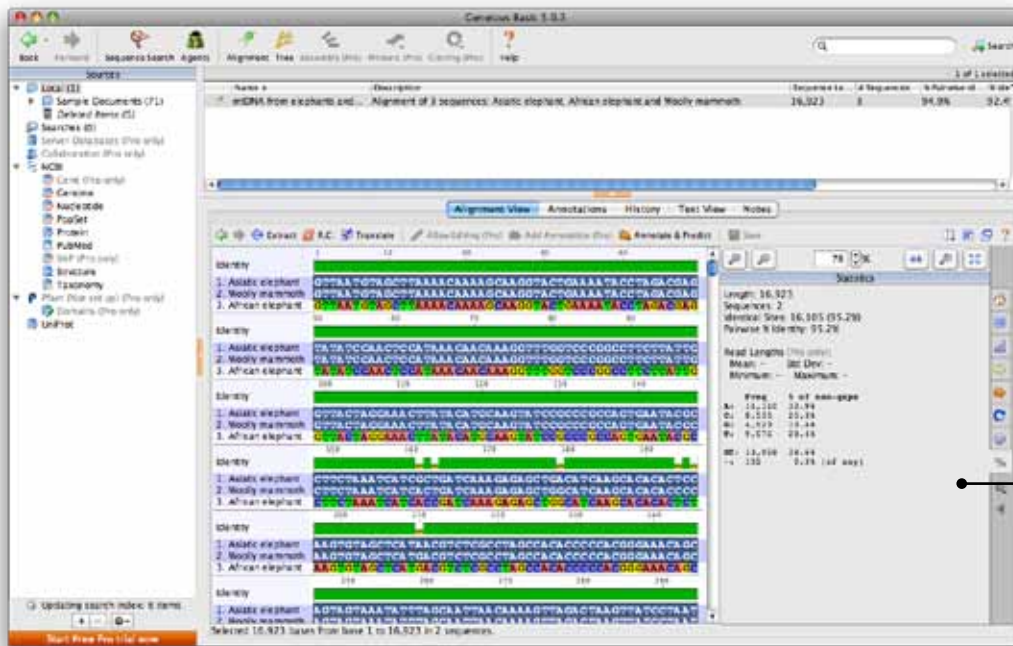
**Frågor**

1. Vilka typer av nukleotidsubstitutioner är de vanligaste?
2. Kan du redogöra för varför vissa nukleotid mutationer är vanligare än andra? **Tips:** tänk på den kemiska strukturen hos de olika baserna i DNA; visas nedan.



En förenklad bild av DNA-struktur.

- Välj två sekvenser genom att klicka på namnen till vänster och håll ner tangenten **enter** (på Mac) eller **Ctrl**-tangenten (på PC) när du väljer dem. Undersök därefter data i Statistik boxen. Titta på 'Pairwise % Identity' värdena. Genom att jämföra arternas sekvenser parvis, kan du förutsäga vilket av de tre evolutionära träden som visas i introduktionen, som kan vara korrekt?



- Bygg ett evolutionärt (fylogenetiskt) träd på följande sätt, för att kontrollera din förutsägelse. Välj mtDNA sekvenser i det övre fönstret.

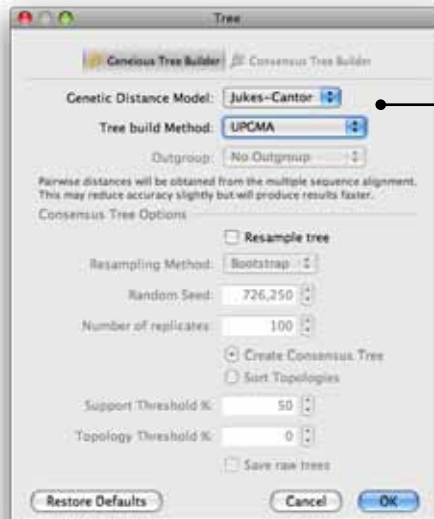




- Klicka på "Tree"-knappen överst i Geneious huvudfönster. En dialogbox blir synlig. Välj *Jukes-Cantor* som Genetic Distance Model och *UPGMA* som Träd bygg metod. Klicka sedan på *OK*.

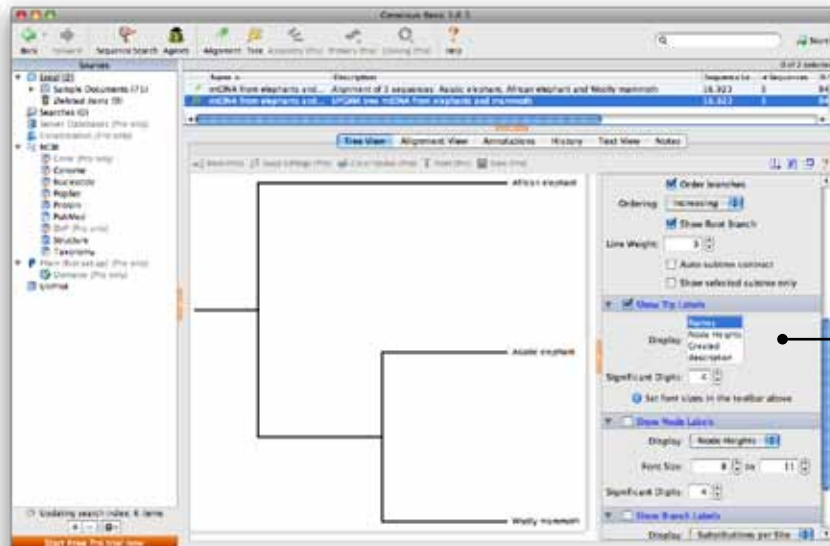


Träd-knappen



Välj 'Jukes-Cantor' och 'UPGMA' här.

- Ett fylogenetisk träd skapas. Välj "Show Tip" Labels (*Display namn*) i panelen på höger sida.



Välj 'Display names'.

- Om du väljer *Show Branch Labels*, visar sig nummer på grenarna. Dessa visar antalet bassubstitutioner per läge i DNA sekvens data.

## Frågor

1. Diskutera varför släktskapen mellan moderna elefanter och den ullhåriga mammuten diskuterades under så lång tid.
2. Vilket av de tre träden som visas på sidan 1 (A, B eller C) är korrekt?

## Ytterligare aktiviteter

### Nu levande släktingar till elefanter

Dugongen (*Dugong dugon*) och klippdassen (*Procavia capensis*) anses vara nära släktingar till moderna elefanter. Deras mitokondrie DNA (mtDNA) har också isolerats och sekvenserats och kan användas för att framställa ett evolutionärt träd.



BILD FRÅN: Hans Hillewaert, Wikipedia.org

Klippdasse (*Procavia capensis*)



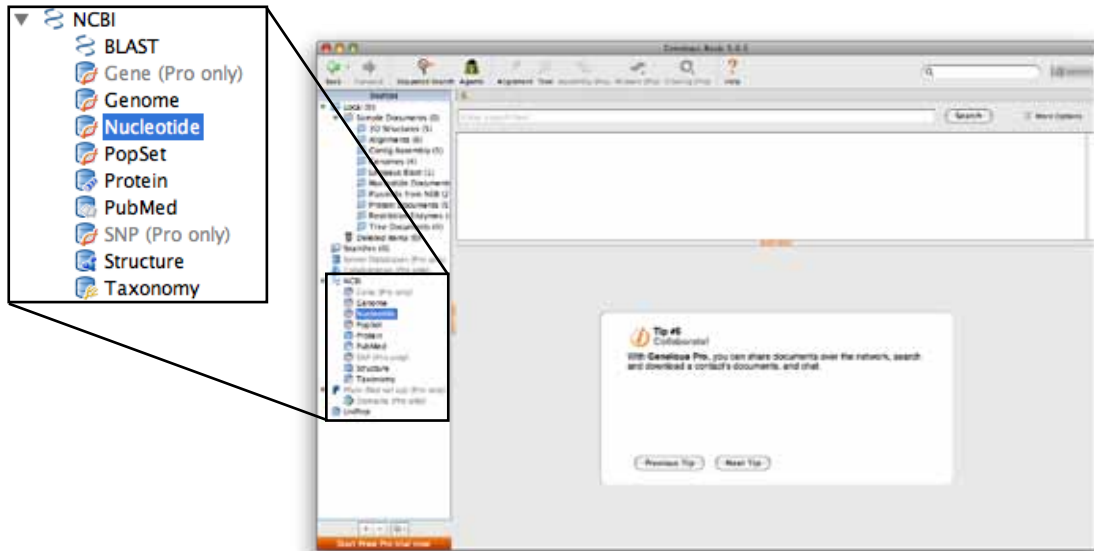
BILD FRÅN: Julien Willem, Wikimedia Commons.

Dugong (*Dugong dugon*)

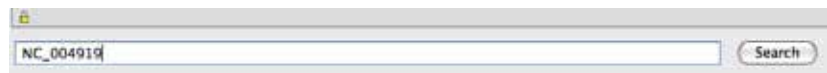
Om din dator är ansluten till Internet, så kan du ladda ner mtDNA sekvenserna för dessa två djur. Alternativt, eftersom det kan ta lång tid att "aligna" sekvenserna, så kan du få dessa data färdiga för analys.

**Att ladda ner data från internet (kan ta lite tid)**

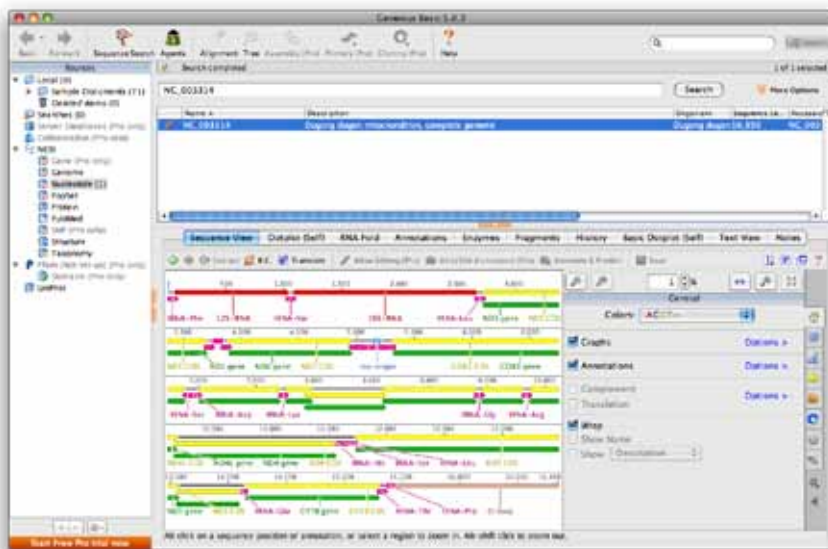
1. Starta Geneious och klicka på *Nucleotide* under *NCBI* i kolumnen på vänster sida:



2. Lägg in en Accession code i sökfältet och klicka på *Search*-knappen:



3. Sekvensen laddas ner från internet och visas i *Geneious* huvudfönster:



**GenBank-koder**

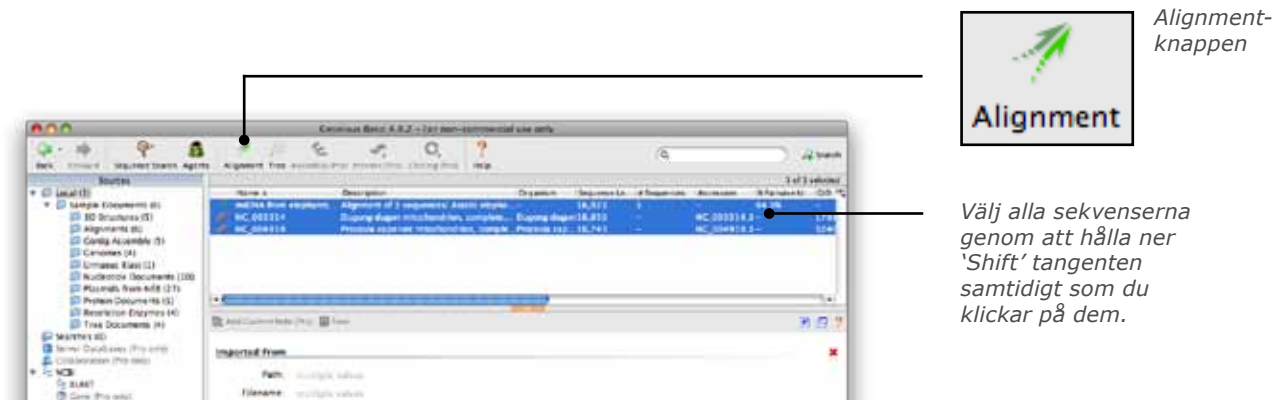
Accession-koder för de fullständiga mtDNA sekvenserna från följande arter:

<i>Afrikansk elefant</i>	DQ316069
<i>Asiatisk elefant</i>	DQ316068
<i>Ullhårig mammut</i>	DQ316067
<i>N.amerikansk mastodont</i>	EF632344
<i>Klippdasse</i>	NC_004919
<i>Dugong</i>	NC_003314

4. Dra den nedladdade sekvensen in i samma mapp som de två elefanterna och mammutsekvenserna, sök därefter efter och ladda ner den andra mtDNA sekvensen från NCBI databasen. Drag in den andra nedladdade sekvensen i samma mapp som de övriga sekvenserna som du skall analysera.



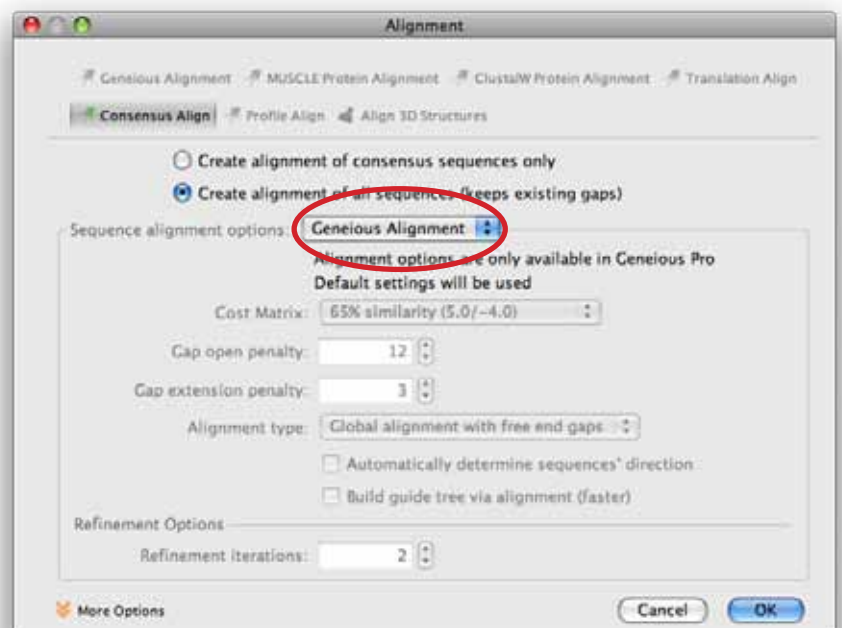
5. Välj alla tre sekvenserna på samma gång (genom att hålla ner *Shift*-tangentsen samtidigt som du klickar på namnen), klicka sedan på *Alignment*-knappen överst i Geneious-fönstret.



6. När dialogruta visas, försäkra dig om att Geneious Alignment har valts, klicka sedan på *OK*-knappen.

**VIKTIGT!**

*"Alignment"; även ett litet antal DNA sekvenser, kan ta flera timmar på en långsam dator. Du kanske därför vill använda de "ready-aligned" sekvenser som finns (se nästa sida).*





7. De "alignade" sekvenserna kan användas för att konstruera ett evolutionsträd som beskrivs nedan.

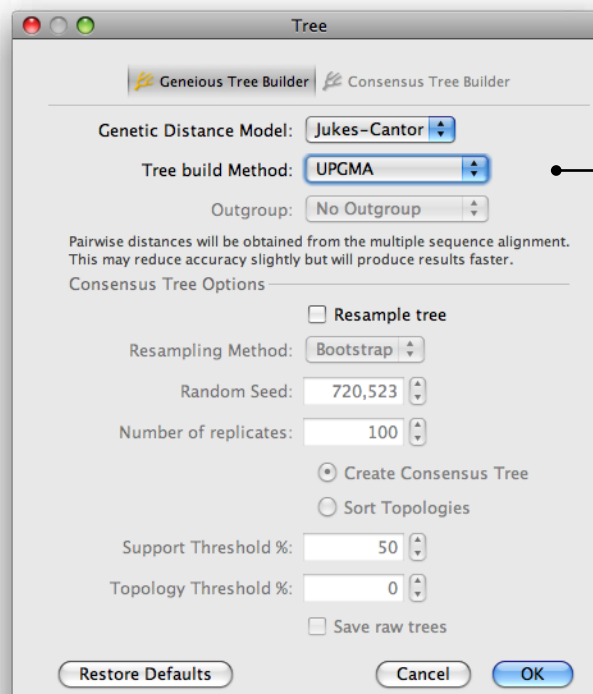
### Använda "ready-aligned" sekvenser för att bygga ett evolutionsträd



1. Dubbelklicka på dokumentet som kallas: Dugong\_Hyrax\_Mammoth\_Elephants.geneious. Detta startar Geneious om programmet inte redan körs.
2. Framställ en fylogeni (evolutionsträd) genom att välja data i det översta Geneious fönstret och klicka på *Tree*-knappen överst i Geneious huvudfönster. En dialog box blir synlig. Välj *Jukes-Cantor* som Genetic Distance Model och *UPGMA* som Tree build Method, klicka sedan på *OK*.



Knappen för att bygga ett träd



Välj 'Jukes-Cantor' och 'UPGMA'.

### Frågor

1. Beskriv var klippdassen och dugongen finns på det evolutionära trädet.
2. Vad säger trädet om hur nära släkt dessa två djur är med moderna elefanter och mammutar?
3. Om du placerar människor på samma träd, var skulle du sätta dem?

## Mammutar och mastodonter

Den utdöda nordamerikanska mastodonten (*Mammuth americanum*) hade tjockt kroppshår, som den ullhåriga mammuten, men olikt moderna elefanter. De hade rakare betar än den ullhåriga elefanten och olikt mammuten, ryggen sluttade inte och den hade ett större och plattare huvud. Mastodonten hade ungefär samma storlek som en modern asiatisk elefant (~3 m stor). Det verkar på mastodontens tänder att den var en browser (detta innebär att den betade av högt växande vegetation), inte en grazer (detta skiljer den från moderna elefanter och den ullhåriga mammuten).

### Fråga

1. Baserat på dess utseende och levnadssätt, var skulle du placera den nordamerikanska mastodonten på evolutionstrådet med mammuten och nu levande elefanter?

BILD FRÅN: Dantheman9758. Wikipedia.org

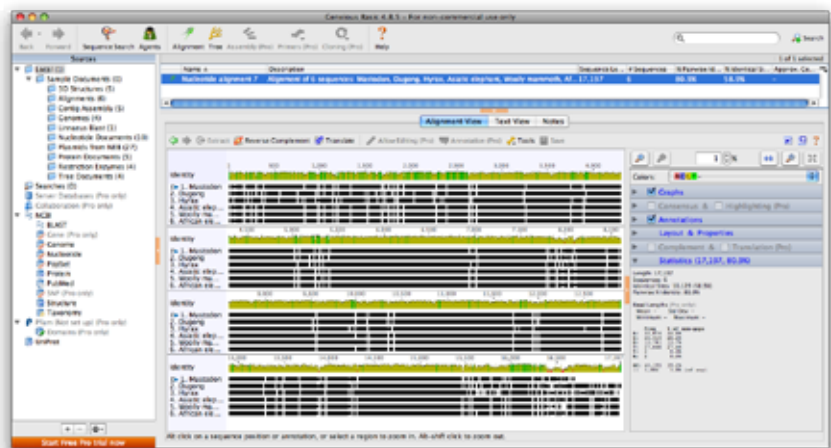


Nordamerikansk mammut eller mastodont (*Mammuth americanum*).

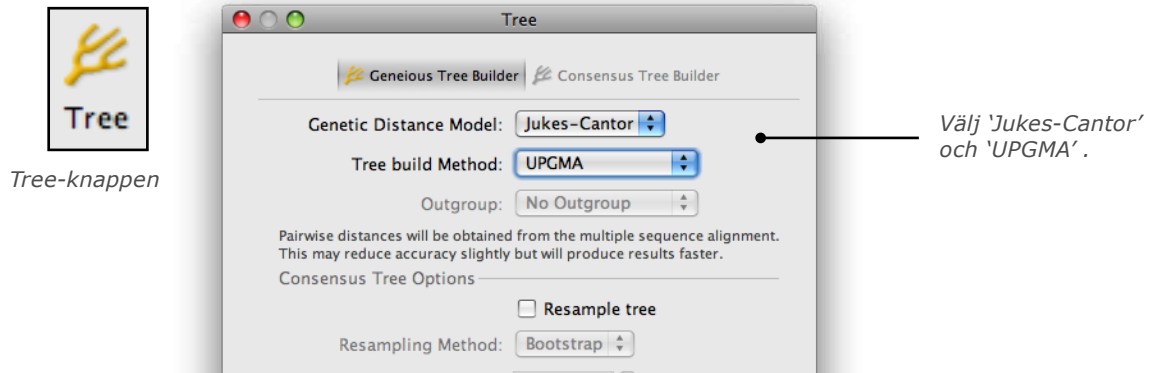
Mitokondrie-DNA har renframställts and sekvenserats från en mastodont tand, som man hittat i Alaska. Detta har "alignats" med mtDNA från moderna elefanter och från den ullhåriga mammuten.



1. Dubbelklicka på dokumentet: Plus\_Mastodon.geneious. Detta startar Geneious, om man inte redan kör programmet och ladda ner mtDNA sekvensdata i mjukvaran.



2. Bygg upp ett evolutionsträd genom att välja data i det övre Geneious fönstret och klicka på *Tree*-knappen överst i Geneious huvudfönster. En dialogbox kommer upp. Välj *Jukes-Cantor* som Genetic Distance Model och *UPGMA* som Trädbyggarmetod, klicka därefter *OK*.



### Frågor

1. Överensstämmer trädet som byggts upp med mtDNA data från mastodonten med dina förutsägelser?
2. Hur förklarar du de evolutionära sambanden som visas i trädet? (Du kanske vill undersöka teorin som finns om landbryggan över Berings sund och läsa mer om mammutar och masodonter samt om efantfamiljens utvecklingshistoria.)

### Ytterligare läsning

- Cooper, A. (2006) The year of the mammoth. *PLoS Biology*, 4(3): e78. doi: 10.1371/journal.pbio.0040078. Detta är en artikel som är lätt att följa och som sätter sekvenseringen av mammutens mitokondriegenom i sitt sammanhang och beskriver de metoder som använts och används idag.
- Gross, L. (2006) Reading the evolutionary history of the woolly mammoth in its genome. *PLoS Biology*, 4(3): e74. doi: 10.1371/journal.pbio.0040074. En enkel rapport som förklarar upptäckterna i Rogaev et al. uppsats.
- Rogaev, E.I. et al (2006) Complete mitochondrial genome and phylogeny of pleistocene mammoth *Mammuthus primigenius*. *PLoS Biology*, 4(3): e73. doi: 10.1371/journal.pbio.0040073. Detta är en av de vetenskapliga artiklar som denna övning baseras på.
- Rohland, N. et al (2007) Proboscidean mitogenomics: Chronology and mode of elephant evolution using mastodon as outgroup. *PLoS Biology*, 5(8): e207. doi: 10.1371/journal.pbio.0050207. *Mastodontens sekvensdata erhöles från denna undersökning.*

### Observera

Alla dessa artiklar finns gratis tillgängliga på: [www.plosbiology.org](http://www.plosbiology.org). Ytterligare referenser finns listade i handledningen för lärare.