

Reproduktiv investering hos  
flekket frøbille, *Callosobruchus maculatus*.

- *Effekten av ulik interaksjonsfrekvens på hunners og hanners vektutvikling og livslengde.*

Sigrid Tveitnes



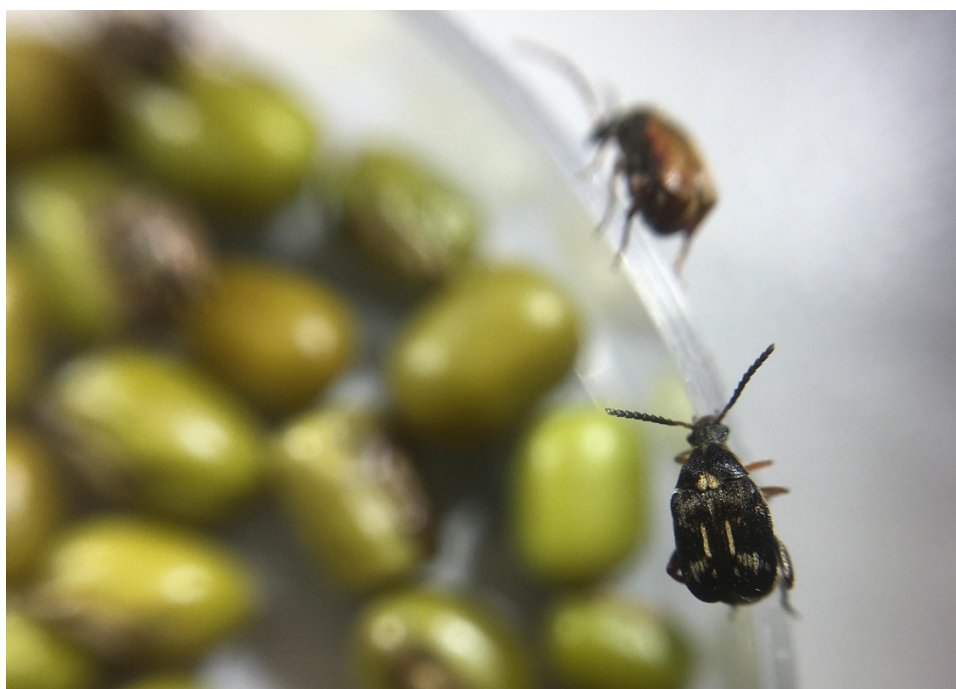
Masteroppgave i  
Biologi; Biodiversitet, Evolusjon og Økologi

Universitetet i Bergen  
Juni 2019



# Reproduktiv investering hos flekket frøbille, *Callosobruchus maculatus*

*-Effekten av ulik interaksjonsfrekvens på hunner og  
hanners vektutvikling og livslengde.*



Skrevet av Sigrid Tveitnes

Veileder: Sigrunn Eliassen,

førsteamanuensis ved institutt for biovitenskap, UiB.

Masteroppgaven i masterprogrammet

Biologi; Biodiversitet, Evolusjon og Økologi

Institutt for biovitenskap

Universitet i Bergen

Juni 2019



Foto v/ Sigrid Tveitnes

Sigrid Tveitnes © Forfatter

2019

# Sammendrag

For insekter er kostnader assosiert med seksuell reproduksjon i stor grad knyttet til gametproduksjon, kurtise og egglegging. Investeringsmønster er ofte forskjellig mellom hunner og hanner, og seksuell konflikt over paringsfrekvens er vanlig, da optimal paringsrate normalt er høyest for hanner. Også for polygame insekt som overfører spermatoforer vil man finne seksuell konflikt over paringsfrekvens. Denne studien har vist at det i noen grad er mulig å kvantifisere reprodutiv investering ved å anvende en modellorganisme med kapitalt forplantningsmønster, flekket frøbille (*Callosobruchus maculatus*). Ved å manipulere hunn- og hannfrøbillers interaksjonsfrekvens gjennom eksponeringstid og kjønnsfordeling har effekten på vektutvikling og livslengde blitt studert. I alt ble fem behandlingsgrupper konstruert på bakgrunn av den antatte energetiske kostnaden forbundet med interaksjon- og paringsfrekvens. Behandlingsgruppene kostnadsgradient bevegde seg fra individ *uten interaksjonskostnad* (isolerte uparede individ) til individ med *høy interaksjonskostnad* (som følge av kontinuerlig interaksjon med partnere under skjev kjønnsfordeling). Ved å studere vektutviklingen til de ulike behandlingsgruppene over en periode på 11 dager, i tillegg til å registrere livslengden til samtlige individ ble det funnet at individ med lav interaksjons- og paringsfrekvens (isolerte uparede individ) hadde lavest vekttap og økt overlevelse, mens høy interaksjon- og paringsfrekvens (kontinuerlig interaksjons med hunn- eller hanndominert kjønnsfordeling) førte til et høyt vekttap og lav overlevelse, for begge kjønn. De innhentede resultatene tydet på at hannfrøbiller med økt paringsfrekvens investerte mer i spermatoforproduksjon, mens hunnfrøbillens investeringsforskjell er blitt tolket til å basere seg på kostnader forbundet med egglegging, økt skadeomfang ved gjentatte paringer og å unngå uønsket seksuell oppmerksomhet.

## Nøkkelord

Reprodutiv investering, *capital breeder*, flekket frøbille, *Callosobruchus maculatus* interaksjonsfrekvens, paringsfrekvens, interaksjonskostnad, vektutvikling, livslengde.



# Takk til:

Flere har bidratt til å gjøre denne oppgaven mulig, de fortjener alle en takk.

Først og fremst må jeg takke min veileder Sigrunn Eliassen, førsteamanuensis ved Institutt for Biovitenskap på UiB. Tusen takk for at alle samtaler, smittende engasjement, gode råd og konstruktiv og vennlig veiledning. Jeg setter utrolig stor pris på alle erfaringer og ansvar du og frøbillene har gitt meg.

Takk til Knut Helge Jensen, senioringeniør ved Institutt for Biovitenskap på UiB, for all din gode hjelp med statistiske problem.

Takk til hele familien min som alle har vært upåklagelig entusiastiske til utallige samtaler og bildepresentasjoner om frøbiller.

Til slutt vil jeg takke min kjære Åsgaut for all støtte og omsorg, bearbeidende diskusjoner, og korrekturlesning. Uten deg ville prosessen med masterprosjektet blitt mørkere enn nødvendig.





# Innholdsfortegnelse

1 Introduksjon .....	1
2 Material og metode .....	7
2.1 Studieorganisme og -populasjon .....	7
2.1.1 Livssyklus .....	7
2.1.2 Studiepopulasjon .....	8
2.2 Studiedesign .....	9
2.2.1 Prøveutvalg .....	9
2.2.2 Behandlingsgrupper Behandling 1: Isolasjon .....	10
2.3 Testprosjekt for utvikling av metode og vektrutiner .....	11
2.4 Statistisk analyse .....	12
2.4.1 Vektutvikling .....	12
2.4.2 Overlevelse (livslengde) .....	13
3 Resultat .....	14
3.1 Vektutvikling .....	15
3.2 Livslengde og overlevelse .....	18
4 Diskusjon .....	20
Konklusjon og videre forskning .....	25
5 Kilder og litteratur .....	27
6 Appendix .....	35
6.1 Vektutvikling .....	35
6.2 Overlevelse (livslengde) .....	37
6.3 R-syntax .....	38
Figur 1: Initialvekt og livslengde for prøveutvalg uavhengig av behandling .....	14
Figur 2 Vektutvikling over veieperiode for samtlige behandlingsgrupper .....	15
Figur 3 Relativ vekt (%) i forhold til initialvekten .....	17
Figur 4 Overlevelsesplot for samtlige behandlingsgrupper .....	18

# 1 Introduksjon

# 1 Introduksjon

Reproduktiv investering varierer mellom arter og individ, og består av funksjoner og atferd som går med til å sikre paring, produsere avkom og øker avkommets overlevelse (Daly, 1978). Reproductiv investering kan defineres som den totale energetiske kostnaden ved reproduksjon over en gitt tidsperiode (Smith & Smith, 2015). For individ med seksuell reproduksjon vil den totale reproduktive investeringen i avkom være avhengig av innsats fra to parter (Daly, 1978). Hvor mye energi en organisme kan investere i reproduksjon avhenger av dens tilgjengelige ressurser, og hvordan disse fordeles. Det totale energibudsjettet til en organisme kan ifølge Kölliker, Royle og Smiseth (2012, s. 9) sees på som en avveining (*trade-off*) mellom kostnader dedikert til tre hovedfaktorer:

1. *Somatisk innsats*: den energetiske kostnaden som en organisme bruker på å opprettholde sin egen somatiske tilstand (Royle, Smiseth, & Kölliker, 2012, s.9).
2. *Paringsinnsats*: den energetiske kostnaden som er gitt for sikre paring, gjennomføre selve paringsakten, eller risiko som er tatt i forbindelse med paring (Low, 1978).
3. *Foreldreinnsats*: den energetiske kostnaden foreldre påføres ved å produsere avkom og utøve foreldreomsorg (Trivers, 1972).

Økt investering i f.eks. foreldreinnsats kan gå på bekostning av investeringen i parings- eller somatisk innsats. Organismens energiallokering kan betraktes fra ulike perspektiver, men i denne sammenhengen er det formålstjenlig å kombinere foreldre- og paringsinnsatsen og se på avveininger mellom reproductiv- og somatisk investering.

Reproductiv investering omfatter energiallokering til seksuelle mekanismer (f.eks. fysiske strukturer, kjemiske signal, gametproduksjon (Daly, 1978; Hayward & Gillooly, 2011)), reproductiv atferd (f.eks. partnersøk, kurtise, egglegging, selve paringsakten og foreldreomsorg (Atkins, 1980, s. 102; Daly, 1978)), uønsket seksuell oppmerksomhet (Daly, 1978; den Hollander & Gwynne, 2009; Gay, Eady, Vasudev, Hosken, & Tregenza, 2009; Sakurai & Kasuya, 2008), predasjonsrisiko, sykdomsoverføring (Daly, 1978) og påføring av skade (Daly, 1978; O'woma, Chigozirim, Emmanuel, & Chukwuebuka, 2016).

## 1 Introduksjon

Hos arter uten foreldreomsorg er det forventet å være spesielt fordelaktig for hanner å øke paringsfrekvensen for å maksimere reprodutiv suksess, mens for hunner vil økt produksjon av levedyktige avkom ofte være viktigere enn paringsfrekvensen (Trivers, 1972). I en litteraturgjennomgang av 122 studier som så på effekten av gjentatte paring hos insekt, fant Arnqvist og Nilssons (2000) at et polygamt reproduksjonsmønster kunne gi hunner en fitness fordel<sup>1</sup>, da det ble funnet positiv korrelasjon mellom økt paringsrate og fekunditet<sup>2</sup>. Resultatene indikerte også at det fantes en optimal/ideell paringsrate som maksimerte reprodutiv suksess (da paring over denne raten reduserte fitness), og at ideell paringsrate var høyere for hanner enn hunner. Denne forskjellen gjør at det oppstår seksuell konflikt i paringsfrekvens mellom hunner og hanner hos insekt med polygam atferd.

For polyandriske insekt som gir eller overfører paringsgaver vil hunnen motta en kompensasjon for interaksjonskostnadene hun utsettes for i forbindelse med gjentagende paring (f.eks. skadepåføring) (Gwynne, 2008). Overføring av en næringsrik spermatofor (spermpakke omgitt av en gelatinaktig hinne (Lawrence, 2016c, s. 550)) kan øke både hannens og hunnens reprodutiv suksess (Arnqvist & Nilsson, 2000): Hanners fordel kommer av at spermatoforen kan sikre flere levedyktige avkom (foreldreinnsats), i tillegg til at næringsbidrag ved paring vil øke den optimale paringsfrekvensen for hunnen (paringsinnsats) (Stiver & Alonzo, 2009). Hunner som mottar spermatoforen kan øke sin reprodutiv suksess ved å utnytte næringsbidraget til økt eggproduksjon eller bedre egen overlevelse eller kondisjon (Gwynne, 2008).

Det er ofte komplisert å kvantifisere den totale reprodutiv investeringen til en organisme, og investering i nåværende avkom vil ofte ha konsekvenser for fremtidig reproduksjon. Fokuserer man på investering lagt ned i inneværende avkom, vil ofte hunnen bli trukket frem som individet med størst reprodutiv kostnad, da gametproduksjon for arter med anisogami<sup>3</sup> er mer energikrevende for hunner enn for hanner (Thornhill, 1979).

På bakgrunn av sin enkle livshistorie er *Callosobruchus maculatus* (*C. maculatus*) (også kjent som flekket frøbille (heretter frøbille)), etter hvert blitt et veletablert modellsystem i studier av

---

<sup>1</sup> Fitness er kombinasjon av en organismes overlevelse og levedyktige avkom produsert i løpet av et livsløp (Bradshaw & McMahon, 2008).

<sup>2</sup> Mengden produserte egg (eller avkom) over et livsløp (Bradshaw & McMahon, 2008; Gwynne, 2008)

<sup>3</sup> «Gameter av ulik størrelse» (Wagner & Bakare, 2017)

## 1 Introduksjon

evolusjonsbiologiske og økologiske aspekt, eksempelvis seksuell seleksjon, spermkonkurranse, paringsinteraksjoner og seksuell konflikt (Arnqvist, Nilsson, & Katvala, 2005; Beck, Blumer, & Habib, 2013; Beck, Blumer, & Ecological Society of America, 2016; Fox, Bush, Roff, & Wallin, 2004; Guedes, Smith, & Guedes, 2003). Kort oppsummert er frøbillen lite ressurskrevende, enkel å holde og håndtere, har høy reproduksjonsfrekvens, i tillegg til å ha en kort generasjonstid (Beck et al., 2013; Devi & Devi, 2014).

I denne studien av reprodutiv investering er frøbillen spesielt anvendbar på bakgrunn av ett vesentlig livshistorietrekk; den har et kapitalt forplantningsmønster<sup>4</sup> (Huang, Yang, Lee, & Horng, 2005; Messina & Fry, 2003). Dette innebærer at frøbillen tar til seg alle ressurser som danner næringsgrunnlaget for senere energikrevende mekanismer, atferd og funksjoner under et larvestadium (Huang et al., 2005; Messina & Fry, 2003). Frøbillen er et holometabolsk insekt og gjennomgår fullstendig metamorfose med fire livsstadier: egg, larve, puppe og fullvoksent individ (Huang et al., 2005; Lawrence, 2016a, s. 264; Messina & Fry, 2003; Ursprung, Hollander, & Gwynne, 2009). Fullvoksne individ på billestadiet vil i utgangspunktet ikke ta til seg næring, men tære på de oppsparte ressursene fra larvestadiet. Over tid vil derfor næringslageret til frøbillene reduseres (Messina & Fry, 2003). Vekttapet frøbillen har i løpet av billestadiet kan derfor ses på et mål for total investering (Wagner & Bakare, 2017).

Wagner og Bakare (2017) har studert den totale reprodutive investeringen hos flekket frøbille, ved å se på den daglige nedgangen i biomasse som proxy av reprodutiv investering. Resultatene viser at når man sammenligner den totale investeringen for begge kjønn ved endt liv, er det ingen signifikant forskjell mellom hann og hunn. Wagner og Bakare (2017) argumenterer videre for at jomfrubiller som kontinuerlig blir holdt isolerte fra andre individ, og ikke får mulighet til å pare seg i løpet av sitt reprodutive livsstadium, kan brukes som en kontrollgruppe. Tanken er at isolerte frøbiller ikke får utøvd «vanlig» reprodutiv atferd og deres vektreduksjon vil hovedsakelig skyldes metabolske energikostnader (somatisk selvoppholdelse). Vektdifferansen mellom individer som parer seg og den isolerte gruppen kan anses som et estimat for energikostnaden allokert til reprodutiv investering.

---

<sup>4</sup> Fra engelsk: *capital breeder*, egen oversettelse

## 1 Introduksjon

Kostnaden hunnfrøbiller påføres ved paring er ansett som spesielt stor da hannfrøbiller er utstyrt med en piggete penis (Dougherty & Simmons, 2017; Eady, Hamilton, & Lyons, 2007). Under paring skades hunnfrøbillens vaginale vegg (Dougherty & Simmons, 2017), og gjentatte paringer (over hunnens ideelle paringsfrekvens) har tidligere blitt vist å ha en negativ effekt på hunnfrøbillers livslengde (Arnqvist et al., 2005; Eady et al., 2007; Edvardsson & Tregenza, 2005; Morrow, Arnqvist, & Pitnick, 2003; Rönn, Katvala, & Arnqvist, 2006).

For hunnfrøbillene er det en tydelig avveining mht paringsfrekvens: Ved å redusere antall paringer vil hunnen kunne redusere indre skade forårsaket av hannen, og ved å øke paringsfrekvensen vil hun få næringsbidrag overført fra spermatoforen (Arnqvist et al., 2005). I tilfeller hvor hunnfrøbiller ikke får ekstern næring tilført har multiple paringer en positiv effekt på hunnens fitness, livslengde og fekunditet (Eady, Wilson, & Jackson, 2000; Fox, 1993a; Fox, 1993b; Savalli & Fox, 1999; Ursprung et al., 2009; Wilson, Tufton, & Eady, 1999). For hunner med lave energilager (ofte eldre individ) vil levetiden øke signifikant ved høyere paringsfrekvens, sammenlignet med hunner med lav paringsfrekvens. Det er viktig å understreke at dette er kun tilfellet dersom hunnen har lite ressurser (Fox, 1993a). Dersom hunnfrøbiller kan tilegne seg vann/næring fra ekstern ressurs i stedet for gjennom paring og spermatoforoverføring, er den eksterne ressursen foretrukket (da fordelene ved paring kan anskaffes og skadepåkostnaden ved paring forsvinner) (Edvardsson, 2007; Fox & Moya-Larano, 2009; Harano, 2012; Savilli & Fox, 1999; Ursprung et al., 2009).

Det er relativt få studier som fokuserer på å hannfrøbillers reproduktive investering. Dette gjelder spesielt kvantifisering av kostnader og kartlegging av hvilken effekt forskjellig investering har på hannfrøbillen (Pauku & Kotiaho, 2005). Pauku og Katiaho (2005) fant at ved økende paringsfrekvens ble livslengden til hannfrøbiller redusert. Årsaken til dette er trolig at spermatoforproduksjon og -overføring er svært energikrevende ettersom fullvoksne frøbiller tærer på opparbeidede næringslagre fra larvestadiet. Spermatoforproduksjon kan føre til et kraftig vekttap hos insekt (Thornhill, 1976, s. 156), og for en frøbille er størrelsen på spermatoforen ved første paring rundt 8% av kroppsvekten til hannen (Fox, Hickman, Raleigh, & Mousseau, 1995). Fox et al. (1995) så på påvirkningen gjentagende paringer hadde på hannens spermatoforstørrelse (gjennom registrering av vekttap før og etter paring). Størrelsen

## 1 Introduksjon

på spermatoforen var størst ved første paring og avtok med suksessive paringer, spesielt med korte intervaller mellom hver paring.

McNamara, Robinson, Rosa, Sloan, van Lieshout & Simmons sin studie fra 2016 var den første som studerte påvirkningen en hanndominert kjønnsratio kan ha på hannfrøbillens spermatorforinvestering (og vektreduksjon). Denne fant ingen tegn på at en hanndominert kjønnsratio ville øke spermkonkurransen og investering i reproduktive strukturer og størrelse på spermatoforen (McNamara et al., 2016).

Hanners reproduktive kostnad kommer også fra reproduktiv atferd som partnersøk, kurtise og mislykkede paringsforsøk. Det er tidligere vist at kurtise og mislykkede paringsforsøk reduserer livslengden til hanner (Wedell, 2010). Det er også kjent at hannfrøbiller påfører hunnfrøbiller uønsket og trakasserende seksuell oppmerksomhet gjennom «repetitive mislykkede forsøk på å pare» (Gay et al., 2009, s. 86; Sakurai & Kasuya, 2008). Repetitive mislykkede forsøk på å pare skjer eksempelvis når hunnfrøbiller unngår paring ved å løpe bort fra pågående hannfrøbiller, eller ved å sparke av seg hanner som prøver å pare seg med hunnen (den Hollander & Gwynne, 2009). Flere studier har funnet at hunner som har tilgang på ekstern næring, men som blir holdt kontinuerlig med hannfrøbiller har signifikant redusert livslengde, til tross for redusert paringsfrekvens. Hannfrøbillenes trakasserende atferd har derfor trolig stor innvirkning på hunnfrøbillers livslengde (den Hollander & Gwynne, 2009; Edvardsson, 2007; Rönn et al., 2006; Tatar, Carey, & Vaupel, 1993). Trakassering vil spesielt være et problem i laboratorieforsøk, da den begrensede plassen gjør det tilnærmet umulig for hunnfrøbiller å unngå hannfrøbiller (den Hollander & Gwynne, 2009).

I dette masterprosjektet er det blitt sett nærmere på hunn- og hannfrøbillers reproduktive investering, og forsøkt å kartlegge effekten av ulik interaksjonsfrekvens gjennom eksponeringstid og kjønnsfordeling. I prosjektet ble det konstruert fem behandlingsgrupper. Disse gruppene varierte fra *ingen interaksjonskostnad* (isolasjon) til *høy interaksjonskostnad* (frøbiller med kontinuerlig interaksjon og hunn- eller hanndominert kjønnsfordeling). Målet har vært å finne hvorvidt denne kostnadsgradienten påvirker frøbillenes vektutvikling og livslengde. Masteroppgavens formål kan oppsummeres i tre forskningsspørsmål:

## 1 Introduksjon

1. Har ulik interaksjonsrate og/eller kjønnsfordeling innvirkning på vektutviklingen til flekket frøbille?
2. Vil investering på bakgrunn av ulik interaksjonsrate og/eller kjønnsfordeling påvirke livslengden til flekket frøbille?
3. Kan eventuelle forskjeller i vektutvikling og livslengde forklares på bakgrunn av ulik reprodutiv investering?



## 2 Material og metode

Denne masteroppgavens datamateriale kommer utelukkende fra egne innhentede data. Datainnsamlingen til masterprosjektet ble gjennomført i to omganger, over en 33-dagers periode. Innsamlet rådata besto av daglig vekt (målt til 0,001mg presisjon) for samtlige individ fra fremtredning<sup>5</sup> (0-24 timer / dag 0) til og med dag 11 (i alt 12 målinger). I tillegg til vekt ble livslengden (her definert som antall levedøgn som fullvoksen/fremtreden frøbille) notert for samtlige individ.

Metoden for masterprosjektet ble utviklet med utgangspunkt i metoden vist i studien til Wagner & Bakare (2017), men med enkelte justeringer og tilpasninger gjennomført på bakgrunn av erfaringene tilegnet i forkant av datainnsamlingsperioden.

I alt ble fem behandlingsgrupper etablert. Forskjellene mellom behandlingsgruppene baserte seg på varierende interaksjonsfrekvens gjennom eksponeringstid og kjønnsfordeling. Dette ble gjort for å se om grupperesultatene kunne belyse forskjeller i investeringskostnadene forbundet med en økende interaksjons- og paringsfrekvens sett i behandlingsgrupper og mellom kjønn.

### 2.1 Studieorganisme og -populasjon

#### 2.1.1 Livssyklus

Flekket frøbille har global utbredelse (Guedes, Guedes, & Smith, 2007) og regnes som et skadedyr da de infiserer tørkede bønner og belgfrø fra slekten *Vigna* (Devi & Devi, 2014). Frøbiller gjennomfører hele sin livssyklus i tilknytning tørkede bønner (Devi & Devi, 2014; Fox, Dublin, & Pollitt, 2003). Et tilnærmet realistisk habitat kan derfor konstrueres i en laboratoriumsituasjon dersom billene har tilgang på tørkede bønner (Beck et al., 2013; Silva, Kunz, Linhares, Samuels, & Macedo, 2015).

Fullvoksne og paret hunnfrøbiller oviposjonerer<sup>6</sup>, dvs legger og fester egg (Lawrence, 2016b, s. 411), på en vertsbønnes overflate (Johnson & Kistler, 1987). Inne i egget utvikles en

---

<sup>5</sup> Fra engelsk: *emergence*, egen oversettelse.

<sup>6</sup> Fra engelsk: *oviposition*, egen oversettelse.

## 2 Material og metode

larve som etter 4-5 dager (ved 28 °C, noe lenger tid ved romtemperatur) klekkes ved å spise seg inn under frøskallet på vertsbønnen (Fox, 1993b). Inne i bønningen konsumerer larven bønningen og går gjennom fire forskjellige larvestadier, før den danner en puppe. Etter fullstendig metamorfose fremtrer den fullvoksne frøbillen ved å grave seg ut fra vertsbønnen (Devi & Devi, 2014). I forkant av fremtredning kan man se små mørke sirkler på vertsbønnen som indikerer at frøbillene har begynt å grave seg ut, disse sirklene vil heretter bli referert til som *fremtredningsvinduer*.

Selv om frøbillene er kjønnsmodne og klare for paring kort tid etter fremtredning, fremtrer ofte hannfrøbillene kun med delvis fulle sædblærer (Savilli & Fox, 1999). Flere studier anbefaler derfor å inkubere individ i 48 timer før man initierer første paring (Rönn et al., 2006; Savilli & Fox, 1999). I løpet av billestadiet vil frøbillen hovedsakelig bruke energi på egg- og spermatoforproduksjon, partnersøk, paring, oviposisjonering og somatisk vedlikehold, som alle legger utgangspunktet for neste generasjon.

### 2.1.2 Studiepopulasjon

Frøbillepopulasjonen som ble anvendt i studien var opprinnelig importert fra Carolina Biological Supply i USA, til Universitetet i Bergen, februar 2016. Den importerte linjen har gitt opphav til flere generasjoner, vekselvis avlet frem ved romtemperatur og i klimaskap med 24-timers lystilgang og temperatur på 28,0°C - 28,5°C.

Før import var populasjonen tilpasset en livssyklus på vertsbønnen *Vigna radiata*, mungbønne, og ble derfor utelukket avlet videre på økologiske mungbønner etter import. Selv om frøbillen er en relativt tilpasningsdyktig art når det kommer til bytte av vertsbønne, ble den opprinnelige vertsbønnen brukt gjennom hele forsøket for å utelukke innvirkningen et eventuelt vertsbønnebytte kunne ha. Messinas (2004) viser at et vertsbønnebytte kunne påvirke aspekt som kroppsstørrelse, overlevelse og utviklingstid hos frøbillen (Messina, 2004).

Det fullstendige prøveutvalget kom fra totalt fem parallelle populasjoner, etablert samtidig, rundt en måned forut for datainnsamlingen. De infiserte mungbønnene som ga opphav til prøveutvalget ble oppbevart i klimaskap (med tilsvarende forhold som tidligere nevnt), frem til fremtredningsvinduer ble synlige. Alle levende frøbiller ble oppbevart i klimaskap med samme

lystilgang og temperatur som under inkuberingstiden. Det eneste unntaket var under den daglige veiingen av individene, som foregikk i romtemperatur.

Da frøbillen er et insekt, samt et skadedyr, finnes det ikke et offentlig etisk reglement som la føringer ved utvikling av prosjektets metode. Avslutning av populasjoner ble gjennomført i henhold til Folkehelseinstituttets anbefalinger (Rukke, 2015).

## 2.2 Studiedesign

Infiserte mungbønner med tydelige fremtredningsvinduer ble plassert i 24-brønns reaksjonsbrett, for å sikre at voksne frøbiller forble uparede og isolerte frem til initialvekt (Alder = 0) ble målt.

### 2.2.1 Prøveutvalg

Prøveutvalget bestod av 140 individ, 70 av hvert kjønn. Frøbillene ble veid daglig til 0,001mg presisjon ved hjelp av *SARTORIUS MICRO M3P*-vekt, fra fremtredning (Alder = 0) og i 11 påfølgende dager. Etter at initialvekten<sup>7</sup> ble registrert (0-24 timer gamle, Alder = 0), overførte og isolertes frøbillene i hver sin petriskål (3cm i diameter). Etter den tredje veiingen (48-72 timer gamle, Alder = 2) ble alle individ tilfeldig tildelt en behandling og eventuelt en partner/partnere. I behandlingsgruppene som bestod av par eller flere individ (behandling 2-5) hadde alle individene fremtrådt innenfor de samme 24 timene. Vektregistrering ble avsluttet etter dag 11 på bakgrunn av at flere individ var døde ved 12. vektregistrering (noen individ enda tidligere). Etter 12. vektregistrering ble alle gjenlevende individ uavhengig av behandlingsgruppe isolert. Hunner ble isolert til mellomstore petriskåler (8cm i diameter) og hanner på små petriskåler (3cm diameter). Livslengden for samtlige individ ble registrert ved død.

---

<sup>7</sup> Initialvekt ble brukt som et mål for å etablere størrelsesforskjellen mellom frøbillene.

## 2.2.2 Behandlingsgrupper

### Behandling 1: Isolasjon.

Frøbiller som ble isolert bestod av  $n=20$  individ, 10 individer av hvert kjønn. Individene i behandling 1 (**B1**) var *uten interaksjonskostnad*. Alle frøbiller i B1 ble oppbevart i isolasjon i små petriskåler fra fremtredning og til de døde, og fikk verken interagere eller pare seg med andre frøbiller gjennom hele billestadiet.

### Behandling 2: Kortvarig interaksjon med 1:1 kjønnsfordeling.

Frøbillene i kortvarig interaksjon ved 1:1 kjønnsfordeling, bestod av  $n=30$  individ, 15 individer av hvert kjønn. Individene i behandling 2 (**B2**) mottok *daglig interaksjonskostnad*, da tilfeldige par, en hann og en hunn, daglig ble satt sammen (dag 2-11) i små petriskåler (3cm diameter) i 2 timer, før de ble separert og plassert tilbake i isolasjon. Hannfrøbiller ble holdt i små petriskåler med noen bønner, mens hunnfrøbiller ble holdt i mellomstore petriskåler (8cm diameter) med ca. 100 mungbønner hver. Individene hadde interaksjon med en og samme partner fra dag 2 til dag 11. Etter 12. vektregistrering ble alle gjenlevende hannfrøbiller isolert i små petriskåler, mens hunnfrøbillene ble værende og isolert i sine opprinnelig mellomstore petriskåler.

### Behandling 3: Kontinuerlig interaksjon med 1:4 hanndominert kjønnsfordeling.

Frøbiller i kontinuerlig interaksjon med 1:4 hanndominert kjønnsfordeling, bestod av  $n=30$  individ, 6 hunner og 24 hanner. Individene i behandling 3 (**B3**) mottok *høy (hunn) eller moderat (hann) interaksjonskostnad*, da en hunn ble satt sammen med fire hanner i mellomstore petriskåler med ca. 100 mungbønner etter tredje vektregistrering (48-72 timer gamle). For å ha muligheten til å følge vektutviklingen til hannene uten å markere individene, ble 24 tilfeldige tilgjengelige hanner rangert basert på initialvekt og plassert i en av fire kategorier; størst, middels stor, middels liten og minst. Hver hunn fikk tildelt en hann fra hver av kategoriene.

### Behandling 4: Kontinuerlig interaksjon med 1:1 kjønnsfordeling.

Frøbiller som var i kontinuerlig interaksjon med 1:1 kjønnsfordeling, bestod av  $n=20$  individ, 10 individer av hvert kjønn. Individene i behandling 4 (**B4**) mottok *kontinuerlig*

*interaksjonskostnad*, da tilfeldige par (et individ av hvert kjønn) ble kontinuerlig holdt sammen i mellomstore petriskåler med ca. 100 mungbønner etter tredje vektregistreringen.

### **Behandling 5: Kontinuerlig interaksjon med 4:1 hunndominert kjønnsfordeling**

Frøbiller som var i kontinuerlig interaksjon med 4:1 hunndominert kjønnsfordeling, bestod av  $n=30$  individ 10 av hvert kjønn. Individene i behandling 5 (**B5**) mottok *moderat (hunn) og høy (hann) interaksjonskostnad*, da en hann ble satt sammen med fire hunner i mellomstore petriskåler med ca. 400 mungbønner etter tredje vektregistrering. For å ha muligheten til å følge vektutviklingen til hunnene uten å markere individene, ble 24 tilfeldige tilgjengelige hunner rangert basert på initialvekt og plassert i en av fire kategorier; størst, middels stor, middels liten og minst. Hver hann fikk tildelt en hunn fra hver av kategoriene.

## **2.3 Testprosjekt for utvikling av metode og vektrutiner**

I forkant av datainnsamlingsperioden, ble det gjennomført et testprosjekt for å finne den mest anvendbare veierutinen, utvalgsstørrelsen, og behandlingsmetoden. I testprosjektet ble et utvalg på 30 individer veid daglig i løpet av en 14-dagers periode for å se om vektreduksjon og/eller økning utløst av alder og/eller paring var observerbar. En *SARTORIUS MICRO M3P*-vekt med 0,001mg presisjon ble anvendt ved veiing av individ. Bruken av vekt med 0,001mg presisjon baserte seg på kjennskap til frøbillens vektsspekter og forventet nedgang, samt anbefalinger gitt i tidligere litteratur (Fox et al., 1995; Wagner & Bakare, 2017). Gjennom de innsamlede resultatene fra testprosjektet ble det konstatert at vektendringen var mulig å registrere med *SARTORIUS MICRO M3P*.

Ved veiing ble frøbilleindivid plassert i et veieskip av aluminium, forseglet med en tilpasset bit parafilm for å forhindre at frøbillene unnslopp under veiing. Ved starten av hver daglige veiøkt ble *SARTORIUS MICRO M3P* nullstilt i forhold til veieskipet og parafilms vekt.

Vektens sensitivitet medførte at små bevegelser fra frøbillene gjorde utslag på den registrerte vekten, i stigende og/eller synkende retning, etter at den først indikerte stabil måling. Basert på observasjon av denne endringen ble det etablert en fast rutine for når veiingen skulle avsluttes og registreres: 1) når vekten var stabil (uten tusendedels desimalendring) i minst 50 sekunder,

eller 2) etter 5 minutters veiing. Denne avlesningsrutinen ble senere brukt på samtlige vektmålinger i masterprosjektet.

I juni 2018, rundt 3 måneder i forkant av testprosjektet ble vekten nøyaktighet kalibrert. Usikkerheten til målingene (mellom 0-500mg spekteret) gjennomført på *SARTORIUS MICRO M3P* ble på bakgrunn av kalibreringen beregnet ved formelen:

$$U_1 = 1,7\mu g + 0,0409\mu g/mg \times R \quad 3.1$$

hvor R erstattes av vekten indikert for den enkelte veiingen.

## 2.4 Statistisk analyse

Alle grafiske fremstillinger og statistiske analyser ble utført i R studio versjon 1.1.463 (R Core Team, 2017). Ved grafisk fremstilling ble R-pakkene *tidyverse* (Wickham, 2017) og *survminer* (Kassambara & Kosinski, 2018) anvendt. R-syntaks for samtlige analyser er vedlagt under *R-script* i appendix.

Rådatasettet ble separert for kjønn i forkant av statistiske analyser, for å unngå at dette ble en gjennomgående tilfeldig påvirkende faktor. B4: *Kontinuerlig interaksjon 1:1* ble satt som fungerende baseline (*intercept*) til sammenligning av grupperesultater. Årsaken til dette var at det var grunn til å tro at resultatene fra B4 kom til å være plassert i midtsjiktet ved sammenligning av alle grupperesultater. Følgelig virket det mer formålstjenlig å sammenligne andre grupper opp mot midtsjiktet, enn mot en behandlingsgruppe som illustrerer et resultat som går i en ekstrem retning.

### 2.4.1 Vektutvikling

En *linear mixed effects model, repeated measures ANOVA*, ble brukt for å teste hvorvidt det fantes signifikante forskjeller mellom vektutviklingen registrert hos de forskjellige behandlingsgruppene i prøveutvalget. Analysen ble gjennomført ved hjelp av R-pakken *nlme* (Pinheiro, Bates, DebRoy, Sarkar, & R Core Team, 2017). I *lme*-funksjonen ble hvilke individ som interagererte med hverandre og hvilken petriskål de ble holdt sammen i, lagt inn som tilfeldig påvirkende faktor (*random=~+1|Boks.id/Individ*). Rådataen forble utransformert (*raw=TRUE*)

## 2 Material og metode

under analyseprosessen. Vektkurvene til behandlingsgruppene ble sammenlignet opp mot *intercept* (B4) gjennom *anova*-funksjonen.

I situasjoner hvor signifikant forskjell i kurvatur og/eller bratthet mellom behandlingsgruppene ble funnet, ble detaljene for analysen studert gjennom *summary*-funksjonen.

Figurene som ble konstruert for å illustrere vektutviklingen til behandlingsgruppene (**figur 2A og 2B**), fikk tilført en polynomisk kurve som indikerer antatt gruppevektutvikling på bakgrunn av kalkulerte predikerte punkter. I tillegg ble gjennomsnittlig utvikling markert som større punkt. I tilfeller hvor behandlingsgruppegjennomsnittet avvek fra den polynomiske kurven, ble det gjort et valg om å forholde seg til utviklingen av den predikerte kurven, ettersom gruppegjennomsnittet i større grad ble upresist ved reduksjon i utvalgsstørrelsen forårsaket av individdød.

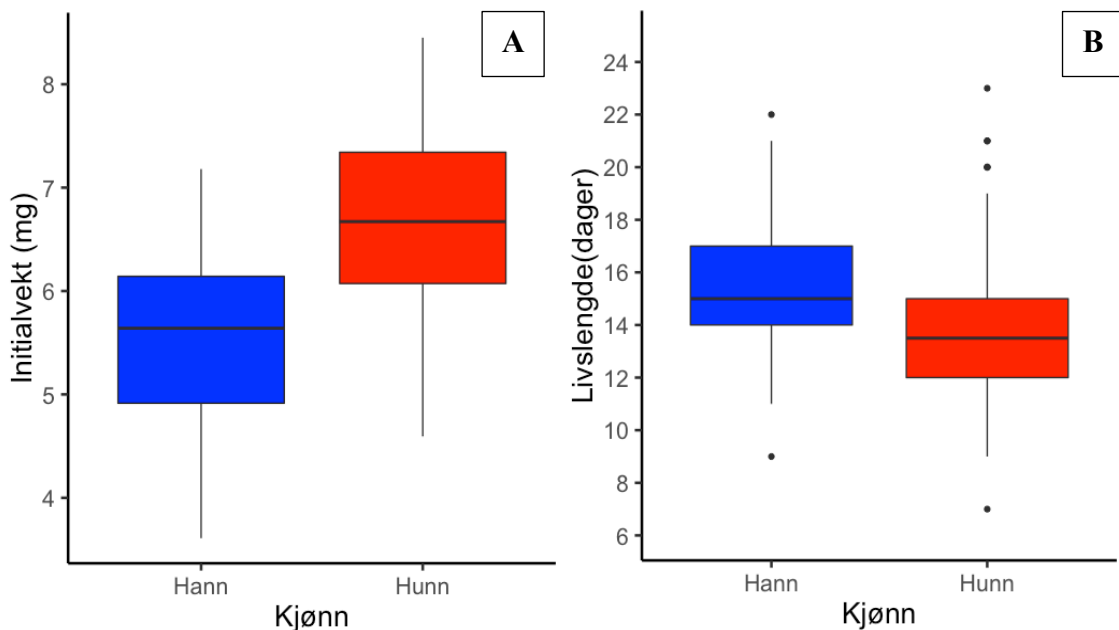
### 2.4.2 Overlevelse (livslengde)

Registrert livslengde ble illustrert og analysert gjennom en overlevelsesmodell, hvor forskjellen mellom overlevelseskurvene ble testet og sammenlignet gjennom *survreg*- og *anova*-funksjonen, ved hjelp av R-pakken *survival* (Therneau, 2015). Den egnede sannsynlighetsfordelingen (fordelingen med lavest uforklart variabilitet ( $-2*LL$ )) ble fastslått separat for hvert kjønn. Predikert gjennomsnittsalder for samtlige behandlingsgrupper ble funnet ut fra egnet sannsynlighetsfordeling.

## 3 Resultat

Flekket frøbille er en insektart med seksuell dimorfisme, hvor hunnen er større enn hannen (Fox, Stillwell, & Moya-Laraño, 2007). Resultatet reflekterer den forventede spredningen da gjennomsnittlig initialvekt for hunnfrøbiller var 7 mg og hannen 5,8 mg. **Figur 1A** illustrerer spredningen av initialvekten (mg) til frøbillene som inngikk i prøveutvalget.

Antall levedøgn som fremtreden frøbille, her betegnet som livslengde (dager), ble registrert (**figur 1B**). Gjennomsnittlig livslengde for samtlige hanner uavhengig av behandling var 15,4 dager, mens hunnfrøbillenes gjennomsnittlige livslengde var 13,9 dager.



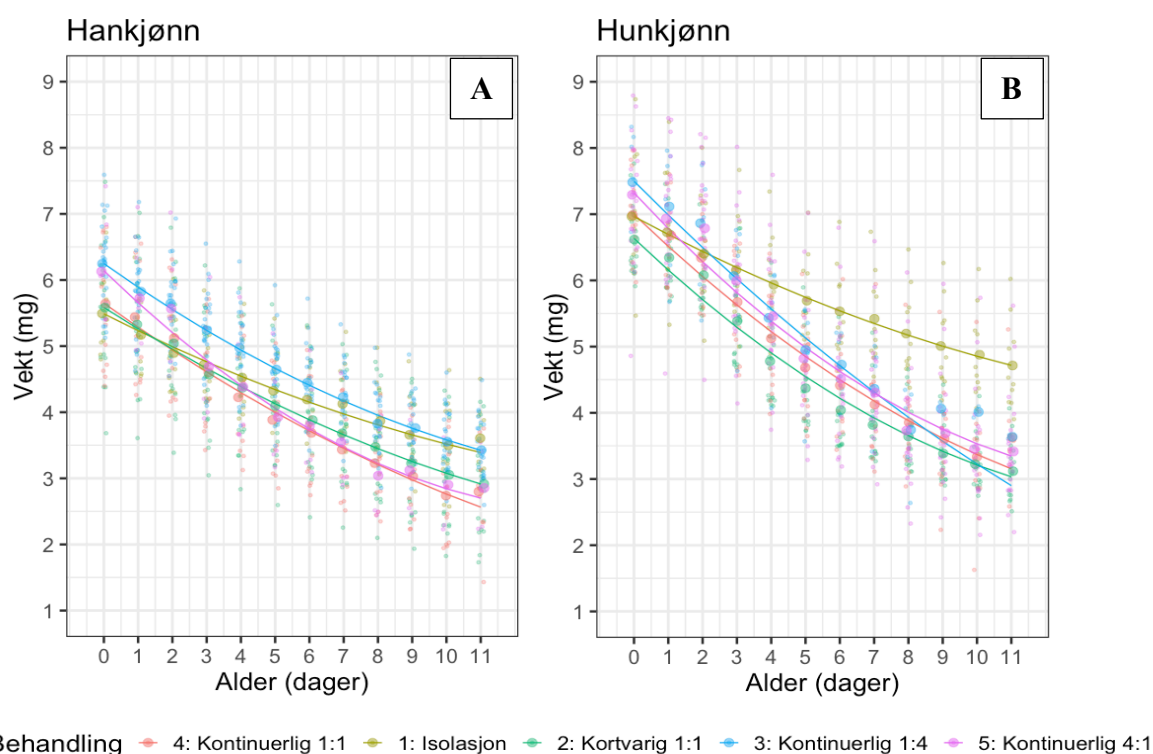
**Figur 1** Initialvekt og livslengde for prøveutvalg uavhengig av behandling.

**A:** Initialvekt registrert hos samtlige individ ( $n=140$ ). **B:** Livslengde (dager, her forstått som antall levedøgn som fremtreden frøbille) registrert hos individ. Hankjønngruppen ble redusert med ett individ fra hovedutvalget, da registrering av livslengde for dette individet mislyktes.



### 3.1 Vektutvikling

Alle individ ble veid daglig fra fremtredning (dag 0, 0-24 timer, initialvekt) til og med dag 11. Gjennomsnittlig vektutvikling for samtlige behandlingsgrupper i løpet av veieperioden er illustrert i **figur 2A og 2B**. Resultatet fra *repeated measures ANOVA*-analysen indikerte at det var en effekt av behandling med signifikant forskjell ( $p < 0,001$ ) i bratthet og/eller kurvatur mellom behandlingsgruppene, både for hann- og hunnfrøbiller.



**Figur 2** Vektutvikling over veieperiode for samtlige behandlingsgrupper.

Små punkt representerer individdata, større punkt er gjennomsnittlig gruppeverdi, linjen er konstruert av predikerte verdier fra modellen. **A: Hankjønn.** Signifikant forskjell i bratthet ble funnet for behandlingsgruppe 1 og 5. Signifikant forskjell i kurvatur ble funnet hos behandlingsgruppe 5. (tabell A6.1.1) **B: Hunkjønn.** Signifikant forskjell i bratthet ble funnet for behandlingsgruppe 1 (tabell A6.1.1).

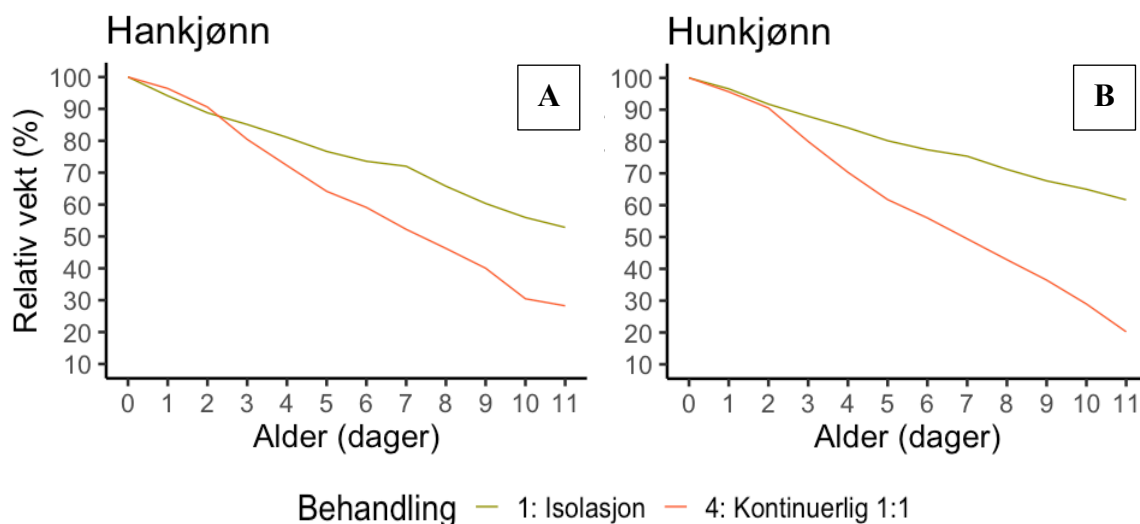
### 3 Resultat

I vektutviklingen til hannfrøbillene (**figur 2A**) skilte gruppene *uten* (B1) og *høy interaksjonskostnad* (B5) seg ut. Behandlingsgruppene med *daglig* (B2), *moderat* (B3) og *kontinuerlig interaksjonskostnad* (B4) hadde lignende vektutvikling, og viste ingen signifikant forskjell i verken bratthet eller kurvatur. De isolerte hannfrøbillene (B1) hadde en mye lavere gjennomsnittlig vektreduksjon, en slakere kurve, over hele veieperioden sammenlignet med resten av behandlingsgruppene. Ved sammenligning opp mot hannfrøbillene med *kontinuerlig interaksjonskostnad* (B4) viste den isolerte gruppen (B1) signifikant forskjell i bratthet ( $df = 750$ ,  $t = 3,613$ ,  $p < 0,001$ ). Hannfrøbiller med *høy interaksjonskostnad* (B5) viste en kraftig vektreduksjon over veieperioden, og vektutviklingen var signifikant forskjellig både i bratthet ( $df = 750$ ,  $t = -3,653$ ,  $p < 0,001$ ) og kurvatur ( $df = 750$ ,  $t = 2,959$ ,  $p = 0,003$ ) sammenlignet med hannfrøbillene med *kontinuerlig interaksjonskostnad* (B4) (tabell A6.1.1).

For hunnfrøbillene (**figur 2B**) skilte også behandlingsgruppen *uten interaksjonskostnad* (B1) seg ut fra de resterende gruppene, igjen med et lavere gjennomsnittlig vekttap sammenlignet med resten av behandlingsgruppene. Sammenlignet med hunnfrøbiller med *kontinuerlig interaksjonskostnad* (B4) viste de isolerte hunnfrøbillene (B1) signifikant forskjell i bratthet ( $df = 733$ ,  $t = 4,245$ ,  $p < 0,001$ ). Alle hunnfrøbiller som ble parett og mottok *daglig* (B2), *moderat* (B5), *kontinuerlig* (B4) eller *høy* (B3) *interaksjonskostnad* i løpet av veieperioden viste lignende vektutvikling uten signifikant forskjell i verken bratthet eller kurvatur (tabell A6.1.1).

Sammenligner man differansen i den relative vektutviklingen (%) mellom behandlingsgruppene *uten interaksjonskostnad* (B1) og *kontinuerlig interaksjonskostnad* (B4) (**figur 3**), kan man få en indikasjon på hvor stor del av vektreduksjonen som skyldes reproduktiv investering. Hannfrøbiller (**figur 3A**) i gruppen *uten interaksjonskostnad* (B1) mistet gjennomsnittlig kun 48% av sin initialvekt etter 11 dager, mens hannfrøbiller med *kontinuerlig interaksjonskostnad* (B4) mistet 72% av initialvekten. Samme mønster finner man igjen hos hunnfrøbillene (**figur 3B**), hvor hunnfrøbiller i gruppen *uten interaksjonskostnad* (B1) mistet gjennomsnittlig 39% av initialvekten, mens hunnfrøbiller med *kontinuerlig interaksjonskostnad* (B4) mistet hele 80% av initialvekten i løpet av veieperioden (tabell A6.1.2)

### 3 Resultat

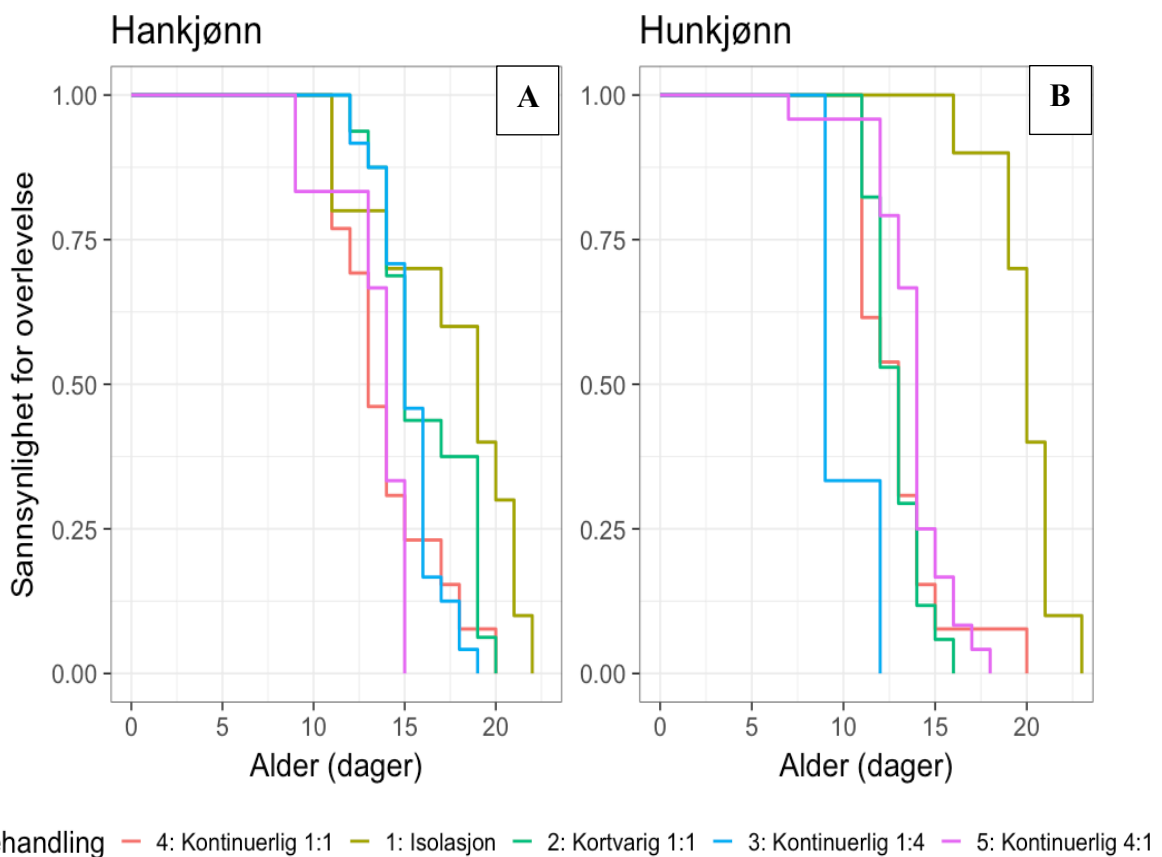


**Figur 3** Relativ vekt (%) i forhold til initialvekt.

Området mellom vektkurvene til B1: Isolasjon og B4: Kontinuerlig interaksjon 1:1. (differansen mellom behandlingsgruppene) kan anses som et mål for investering lagt ned i reproduktiv innsats. Relativ vekt for samtlige behandlingsgrupper kan bli funnet i tabell A6.1.2 s.35. **A: Hankjønn. B: Hunkjønn.**

## 3.2 Livslengde og overlevelse

Gjennomsnittlig livslengde for hannfrøbillene i denne studiens utvalg var generelt litt lengre enn for hunnfrøbillene (figur 1B). Sammenligner man overlevelsessannsynligheten til samtlige behandlingsgrupper (basert på registrert livslengde) finner man større variasjon i overlevelsessannsynlighet for hunnfrøbiller enn for hannfrøbillene (**figur 4A og 4B**). Resultatene fra overlevelsesanalysen viste signifikant effekt av behandling på overlevelse, både for hankjønn (avvik = 265,99, df = 4,  $p < 0,001$ , med *weibull* sannsynlighetsfordeling) og hunnkjønn (avvik = 994,32, df = 4,  $p < 0,001$ , med *logistisk* sannsynlighetsfordeling).



**Figur 4** Overlevelsesplot for samtlige behandlingsgrupper.

**A: Hankjønn**, utviklingen baserer seg på weibull sannsynlighetsfordeling. Momentan dødsrisiko reduseres med alder (scale: 0,14). Predikert livslengde på bakgrunn av modellen lå mellom 14 (B5) og 19,2 dager (B1). **B: Hunkjønn**, utviklingen baserer seg på logistisk sannsynlighetsfordeling. Momentan dødsrisiko endrer seg ikke med alder (scale: 0,937). Predikert livslengde på bakgrunn av modellen lå mellom 9,8 (B3) og 20,1 dager (B1).

### 3 Resultat

*Weibull* sannsynlighetsfordeling ga lavest uforklart variabilitet ( $-2*LL: 3849.611$ ) på datasettet som inneholdt hannfrøbillenes registrerte livslengde (**figur 4A**). *Summary*-funksjonen viste at hannfrøbiller uten (B1) og daglig (B2) interaksjonskostnad hadde signifikant høyere overlevelse (B1:  $z = 12,042$ ,  $p < 0,001$ , B2:  $z = 6,388$ ,  $p < 0,001$ ), mens hanner med høy interaksjonskostnad (B5) hadde lavere signifikant overlevelse ( $z = -5,700$ ,  $p < 0,001$ ) sammenlignet med hanner i B4. Resultatet indikerte også at den momentane dødsrisikoen (*instantaneous risk of death/hazard*) for hannfrøbillene reduseres med alder (*scale: 0,14*). Predikert overlevelse på de ulike behandlingsgruppene basert på *weibull* sannsynlighetsfordeling (tabell A6.2.1) lå mellom 14,0 (B5) og 20,1 dager (B1).

I datasettet som inneholdt hunnfrøbillenes registrerte livslengde (**figur 4B**) var det en *logistic* sannsynlighetsfordeling som ga lavest uforklart variabilitet ( $-2*LL: 3898,75$ ). *Summary*-funksjonen viste at hunnfrøbiller uten (B1) og moderat (B5) interaksjonskostnad hadde signifikant høyere overlevelse (B1:  $z = 36,780$ ,  $p < 0,001$ , B5:  $z = 7,412$ ,  $p < 0,001$ ), mens hunner med høy interaksjonskostnad (B3) hadde lavere signifikant overlevelse ( $z = -11,446$ ,  $p < 0,001$ ) sammenlignet med hunner i B4. Resultatet indikerte at den momentane dødsrisikoen ikke ble endret med alder for hunnene (*scale: 0,973*). Predikert overlevelse på de ulike behandlingsgruppene basert på logistisk sannsynlighetsfordeling (tabell A6.2.1) lå mellom 9,8 (B3) og 20,1 dager (B1).

## 4 Diskusjon

Ved å manipulere interaksjons- og paringsfrekvens til 140 flekkede frøbiller, har det i denne studien blitt undersøkt hvorvidt størrelsen på reprodutiv investering har en effekt på vektutvikling og livslengde (overlevelsessannsynlighet). Som Kölliker, Royle og Smiseth (2012, s. 9) tidligere har foreslått kan en organismes totale energibudsjett sees på som en avveining mellom kostnader dedikert til å opprettholde sin egen somatiske tilstand (somatisk innsats) og reprodutiv investering (paring- og foreldreinnsats). På bakgrunn av dette og funn gjort i tidligere litteratur var det forventet at resultatet skal gjenspeile denne avveiningen, i den forstand at frøbiller med stor vektnedgang på bakgrunn av høyere interaksjon- og paringsfrekvens, ville ha redusert livslengde da det ikke er tilstrekkelig energi til somatisk opprettholdelse.

I prosjektet ble det utviklet en kostnadsgradient som man antok ville påvirke vektutviklingen og/eller livslengden til begge kjønn, hovedsakelig på bakgrunn av kostnaden med høyere interaksjonsrate og økt paringsfrekvens. Metoden inkluderte ikke å observere den faktiske paringsfrekvensen, da det ville blitt for omfattende for et prosjekt av dette omfanget. Det kan derfor antas at vektutvikling og/eller livslengde ikke reflekterer behandlingsgruppens investeringskostnad fullstendig.

Ved å anvende en modellorganisme med kapitalt forplantningsmønster, tillater metoden i noen grad å kvantifisere reprodutiv investering. Vekttapet til frøbiller som ikke har tilgang på ekstern næring og/eller vann vil representere investering lagt ned i reprodutiv og somatisk innsats. I tillegg kan det relative vekttapet til isolerte uparede frøbiller til en viss grad representere et mål for investeringen lagt ned i somatisk opprettholdelse, da de ikke utsettes for/utøver *vanlige* reprodutive kostnader.

For hunnfrøbiller kan kjente kostnader med reproduksjon oppsummeres som skade på vaginal vegg ved paring, eggproduksjon og å unngå uønsket seksuell oppmerksomhet/trakasserende atferd. Den eneste behandlingsgruppen som viste et lavere signifikant vekttap sammenlignet med B4, var de isolerte hunnfrøbillene *uten interaksjonskostnad* (B1). Hunnfrøbillene i B1 viste også signifikant høyest overlevelse og predikert livslengde blant hunnfrøbillene. En åpenbar

## 4 Diskusjon

investeringsforskjell mellom den isolerte gruppen og resten som kan begrunne vektutviklingen til hunnfrøbillene, er at de parede individene produserer og legger egg. Fekunditet har vist seg gjennom flere studier å øke med økende paringsfrekvens (Eady et al., 2000; Fox, 1993a; Guedes & Smith, 2008; Messina & Fry, 2003; Savalli & Fox, 1999; Wilson et al., 1999). Enkelte andre studier har midlertidig vist at økt paringsfrekvens reduserer fekunditet (den Hollander & Gwynne, 2009; Wilson et al., 1999), samtidig som noen studier ikke finner en effekt av fekunditet på bakgrunn av paringsfrekvens (Crudgington & Siva-Jothy, 2000; Eady, Hamilton, & Lyons, 2007).

Studier som har sett på hvordan fekunditet påvirkes av ulik tilgang på vertsbønner (til egglegging), fant at færre bønner ga redusert fekunditet som igjen førte til lavere vekt nedgang (Messina & Fry, 2003; Messina & Slade, 1999; Tatar et al., 1993). Redusert fekunditet ser i tillegg ut til å ha en positiv innvirkning på hunnfrøbillenes livslengde (Guedes & Smith, 2008; Messina & Fry, 2003; Savilli & Fox, 1999; Tatar et al., 1993). På bakgrunn av dette vil man kunne forvente at individ med økt fekunditet vil ha et større vekttap og redusert livslengde. Hunnfrøbillene som viste størst nedgang i relativ vekt over veieperioden var tildelt behandling med hanndominert kjønnsfordeling og *høy interaksjonskostnad* (B3), med gjennomsnittlig 85% vektreduksjon. Hunnfrøbillene i B3 viste i tillegg lavest overlevelsessannsynlighet med predikert gjennomsnittlig livslengde blant samtlige behandlingsgrupper. Det er midlertidig vist at hunner som utsettes for store mengder uønsket seksuell oppmerksomhet får redusert fekunditet (Gay et al., 2009), noe som tyder på at økt fekunditet eller egglegging som en konsekvens av økende interaksjonsfrekvens alene ikke er årsaken til hunnfrøbillers vekttap og reduserte livslengde.

Å kartlegge den faktiske kostnaden av en paringsakt og økt paringsfrekvens for hunnfrøbillier er komplisert, da fordelen med spermatoforoverføring vil kunne kompensere for noe av skaden påført ved paring (opp til den optimale raten til hunnen)(Arnqvist & Nilsson, 2000). Næringsfattige hunnfrøbillier har tidligere blitt vist å øke livslengden på bakgrunn av økt paringsfrekvens (Fox, 1993a; Messina & Slade, 1999; Rönn et al., 2006). Andre studier har derimot gjort funn som tyder på at økt paringsfrekvens reduserer livslengde (Crudgington & Siva-Jothy, 2000; Messina & Fry, 2003). For hunner som kontinuerlig interagerer med flere hanner vil fordelen med gjentagende paring ikke kompensere for kostnaden (den Hollander & Gwynne, 2009), antageligvis på bakgrunn av at økt paringsfrekvens har vist seg å øke

## 4 Diskusjon

skadeomfanget til hunnfrøbiller (Crudginton & Siva-Jothy, 2000). I tillegg er hunnfrøbillenes somatiske tilstand funnet å være negativt korrelert med skadeomfanget (Eady & Brown, 2017). En kan derfor forvente at noe av vektneidgangen hos hunnfrøbillene med økt paringsfrekvens (spesielt hunner med *høy interaksjonskostnad* (B3), men også hunner med *kontinuerlig interaksjonskostnad* (B4)) skyldes økt energiallokering til somatisk opprettholdelse.

Utenom kostnaden av skadeomfanget assosiert med gjentatte paringer, vil hunnfrøbiller som holdes kontinuerlig med en eller flere hanner blir utsatt for en tydelig større andel uønsket seksuell og trakasserende atferd. En studie gjennomført på kinafrøbille, *Callosobruchus chinensis*, fant at hunner som kun mottok trakasserende atferd (ikke paring) fikk 18% lavere fitness sammenlignet med isolerte hunner (Sakurai & Kasuya, 2008). Trakasserende atferd gjennom paringsforsøk kommer av den seksuelle konflikten mellom hunner og hanners optimale paringsfrekvens og resulterer i at hunnfrøbiller må bruke energi på å unngå den uønskede oppmerksomheten ved å løpe fra hannen, samt å sparke han av seg (den Hollander & Gwynne, 2009). Økt seksuell oppmerksomhet har i flere studier vist negativ korrelasjon med hunnfrøbillers livslengde (den Hollander & Gwynne, 2009; Eady et al., 2007; Edvardsson, 2007; Fox & Moya-Larano, 2009; Rönn et al., 2006).

Sammenlignet med B4 hadde hunnfrøbillene med *moderat interaksjonskostnad* (B5) og hunndominert kjønnsfordeling signifikant redusert overlevelse, på tross av at denne behandlingsgruppen antageligvis mottok mindre grad av uønsket seksuell oppmerksomhet. Som tidligere nevnt kan fekunditet påvirkes av tilgangen til vertsbønner (til egglegging), da færre tilgjengelige bønner har gitt redusert fekunditet, som førte til lavere vektneidgang, som økte livslengden (Messina & Fry, 2003; Messina & Slade, 1999; Tatar et al., 1993). I denne masteroppgaven var hunnfrøbillene med *moderat interaksjonskostnad* plassert i en petriskål sammen med 3 andre hunner og rundt 400 bønner på deling. Man kan følgelig undres over om denne ressurstilgangen kan ha stimulert til økt fekunditet hos hunnfrøbiller i B5, men på bakgrunn av at den valgte metoden ikke registrerte fekunditet gir ikke denne studien nok informasjon til å kunne trekke noen form for konklusjon med hensyn til dette.

For hannfrøbiller vil kostnader forbundet med reprodutiv investering omfatte atferd som partnersøk, kurtise og ikke vellykkede paringsforsøk (trakassering), samt produksjon og overføring av spermatorfor. Høy paringsrate hos hanner kan øke deres fitness da dette vil gi høy



## 4 Diskusjon

reproduktiv suksess (Arnqvist & Nilsson, 2000). For hannfrøbiller som overfører seminale paringsgaver, vil hver paring være en betydelig reproduktiv investering på bakgrunn av spermatoforproduksjon og -overføring. Som beskrevet innledningsvis kan spermatoforproduksjon medføre et kraftig vekttap hos insekt (Thornhill, 1976, s. 156), og dette er forventet hos frøbillen da størrelsen på spermatoforen ved første paring har blitt observert til å være rundt 8% av kroppsvekten til hannen (Fox et al., 1995). For hanner med økt paringsfrekvens forventer vi derfor å observere et stort vekttap på bakgrunn av økende antall spermatoforoverføringer, til tross for at spermatoforstørrelsen reduseres med gjentagende paringer (og alder) (Eady, 1995; Fox, 1993a; Fox et al., 1995; Katavala, Rönn, & Arnqvist, 2008; Savalli & Fox, 1999).

Hannfrøbiller *uten interaksjonskostnad* (B1) viste signifikant lavere bratthet, mens hannfrøbiller med *høy interaksjonskostnad* (B5, hunndominert kjønnsfordeling) viste signifikant høyere bratthet samt kurvatur sammenlignet med vektutviklingskurven til hannfrøbiller i B4 (*kontinuerlig interaksjonskostnad*). Disse funnene gjenspeiler forventningen om at økt spermatoforoverføring øker vekttap. Det ble ikke funnet signifikant forskjell mellom hannfrøbiller med *daglig* (B2), *moderat* (B3) og *kontinuerlig* (B4) interaksjonskostnad. Selv om hannfrøbiller i behandling 4 alene hadde kontinuerlig tilgang på en hunn, kan den lignende vekt nedgangen som vi observerer i behandling 2 og 3 med *daglig* og *moderat interaksjonskostnad* muligens forklares på bakgrunn av Fox et al. sine funn i fra 1995. Fox et al. (1995) fant at økt tid mellom paring (som hos hanner i B2 og B3 med *daglig* og *moderat interaksjon*) kan kompensere for effekten gjentatte paringer har på spermatoforstørrelsen. Da observasjon av faktisk paringsfrekvensen ikke var en del av denne oppgavens metode, kan det være mulig at enkelte individ i behandling 2 ikke paret seg i løpet av den to timer lange interaksjonsperioden (eller mellom vekttaking), og perioden mellom paringer ville økes ytterligere.

Svært få har sett på vektreduksjon hos hannfrøbiller som en effekt av reproduktiv investering, vi har derfor ikke store mengder med sammenlignbare data. Wagner og Bakare (2017) sammenlignet hunnfrøbiller og hannfrøbillers reproduktive investering gjennom blant annet skjev kjønnsfordeling. I studien virket vektutviklingen til hannfrøbillene å være upåvirket ved hunndominert kjønnsfordeling (en, to, eller tre hunner med en hann), men i tilfeller med hanndominert kjønnsfordeling så man at den relative vektutviklingen i større grad var

## 4 Diskusjon

varierende. Årsaken til dette ble spekulert i å være på bakgrunn av større seksuell konkurranse mellom hannfrøbiller (Wagner & Bakare, 2017). Studien som er gjennomført i denne masteroppgaven viser at hannfrøbiller med *moderat interaksjonskostnad* med hanndominert kjønnsfordeling (B3) mistet gjennomsnittlig rundt 58% av initialvekten over veieperioden. Dette var den nest laveste relative nedgangen for samtlige behandlingsgrupper. Dette gir grunn til å tro at seksuell konkurranse gjennom konkurrerende atferd med andre hanner ikke er en svært stor kostnadsfaktor for hannfrøbiller rent energetisk, spesielt ikke sammenlignet med spermatoforproduksjon. I lys av reprodutiv suksess vil hannfrøbiller i en hanndominert kjønnsfordeling likevel oppleve en kostnadsfaktor på bakgrunn av økt konkurranse, da redusert paringsfrekvens også reduserer hannens egne avkom. Et mer interessant funn Wagner og Bakare (2017) gjorde var at isolerte hanner mistet mer vekt enn hunner. Dette er tilfellet for oss hvor isolerte hannfrøbiller mistet 47% av initialvekten over veieperioden, mens hunnfrøbiller mistet 38%. Wagner og Bakare (2017) antok også at partnersøk var årsaken til denne investeringsforskjellen. Ett annet funn som kan underbygge denne forskjellen er at den metabolske raten til hanner er funnet til å være 50% høyere enn hos hunnfrøbiller (Arnqvist, Stojković, Rönn, & Immonen, 2017).

I stor grad ser det ut til at ulik mengde spermatoforoverføring på bakgrunn av økt paringsfrekvens, er årsaken til vektutviklingsmønsteret hos hannfrøbillene. Overlevelsessannsynligheten til samtlige behandlingsgrupper bortsett fra hannfrøbiller med *moderat interaksjonskostnad* (B3), viste seg å være signifikant forskjellig fra hannfrøbiller med *kontinuerlig interaksjonskostnad* (B4). Også for hannfrøbillene viste de isolerte billene *uten interaksjonskostnad* (B1) høyeste overlevelse og levde lengst, mens hannfrøbiller med *høy interaksjonskostnad* (B5) viste lavest overlevelse. Mislykkede paringsforsøk og kurtise er en av de kostnadene som er funnet å redusere livslengden til insekthanner (Wedell, 2010). Dette er en mulig forklaring på at hannfrøbillene som hadde *daglig interaksjonskostnad* (B2) viste nest høyeste overlevelse. Hannfrøbiller i B2 ble isolert 22 timer i døgnet, og fikk dermed liten mulighet til å utøve større mengde uønsket seksuell oppmerksomhet mot hunnfrøbiller i løpet av veieperioden.

Den momentane dødsrisikoen for hannfrøbillene indikerte at sjansen for å omkomme ble redusert med alder (*scale*: 0,14). Dette funnet er motstridende med to andre studier som observerte at økende alder førte til økende momentan dødsrisiko for hannfrøbiller (Fox et al.,

2004, 2003). Denne forskjellen kan antageligvis forklares på bakgrunn av at alle individer i Fox et al. sine studier (2004, 2003) var jomfrubiller. Da de aldri parer seg, vil deres reduserte fitness i mye større grad forårsakes av alderdom, sammenlignet med et utvalg som også inkluderer hannfrøbiller som parer seg gjentatte ganger og overfører spermatorer. Det er følgelig grunn til å anta at kostnaden forbundet med økt interaksjon øker den momentane dødsrisikoen tidligere i livsløpet, spesielt da de kun blir utsatt for interaksjonskostnader mellom 2. og 11. levedøgn. Den momentane dødsrisikoen for hannfrøbiller, som man finner i denne studien, understreker bare at interaksjon er kostbart og reduserer livslengde også hos hannfrøbiller sammenlignet med hannfrøbiller som kun lever uparede i isolasjon.

### **Konklusjon og videre forskning**

Reproduktiv investering er kompleks. Å kartlegge alle kostnadsfaktorer som kan ha synlig påvirkning på et eventuelt vekttap og/eller livslengde, er en omfattende og sammensatt oppgave, og er muligens årsaken til at enkelte tidligere funn er motstridende (Paukku & Kotiaho, 2005). På bakgrunn av resultatene ser det ut til at reproduktiv investering hovedsakelig kommer til uttrykk som forskjell i vektutvikling hos hannfrøbiller, antageligvis som et resultat av mengden spermatorer som overføres med ulik paringsfrekvens. For hannfrøbillene kommer effekten av ulik interaksjonsfrekvens med hannfrøbiller i størst grad til uttrykk gjennom ulik overlevelse. Noe av variasjonen skyldes trolig den generelle kostnaden assosiert med egglegging. I tillegg antyder resultatene at energien som brukes på å unnsnippe uønsket seksuell oppmerksomhet og eventuelt skadeomfanget hunner påføres ved gjentatte paringer, har en negativ effekt på hannfrøbillers livslengde.

Denne studien har vist at lav interaksjons- og paringsfrekvens gir et lavt vekttap og økt overlevelse, mens høy interaksjons- og paringsfrekvens gir et høyt vekttap og lav overlevelse for begge kjønn. Metoden som er brukt har gitt resultater som gjør det mulig å kvantifisere reproduktiv investering i noen grad. Modellsystemet som er blitt anvendt er optimalt for å avdekke kostnadsfaktorer forbundet med reproduktiv investering, da organismer med kapittalt forplantningsmønster tillater oss å kontrollere for investering som et følge av vekttap. Metoden involverte i denne omgang en grovskala avdekking av investering på bakgrunn av avveiningen mellom reproduktiv og somatisk innsats. Ved å modifisere metoden til et noe mer kompleks oppsett, kan flere nyanser forbundet med reproduktiv investering gjennom ulike

## 4 Diskusjon

kostnadsfaktorer avdekkes ytterligere. I denne studien var det to grupper med skjev kjønnsfordeling med kontinuerlig interaksjon (B3 og B5). I videre forskning ville det være interessant å utvide studien til å inkludere behandlingsgrupper med skjev kjønnsfordeling og *midlertidig* interaksjon. Ved å sammenligne kontinuerlig og midlertidig interaksjon i grupper med hann- eller hunndominert kjønnsfordeling vil man trolig bedre kunne skille effekten av mislykkede paringsforsøk/uønsket seksuell oppmerksomhet fra kostnadene forbundet med gjentakende paring. Ytterligere metodetilskudd som vil være formålstjenlige er å registrere fekunditet for samtlige hunnfrøbiller, for å kvantifisere hunnenes investering i egglegging med forskjellig interaksjonsfrekvens. Dersom man i tillegg registrerer vekt ved død ville man kunne få et totalt investeringsestimat, noe som er optimalt med hensyn til sammenligning mellom gruppene.

## 5 Kilder og litteratur

- Arnqvist, G., & Nilsson, T. (2000). The evolution of polyandry: multiple mating and female fitness in insects. *Animal Behaviour*, *60*(2), 145–164.  
<https://doi.org/10.1006/ANBE.2000.1446>
- Arnqvist, G., Nilsson, T., & Katvala, M. (2005). Mating rate and fitness in female bean weevils. *Behavioral Ecology*, *16*(1), 123–127. <https://doi.org/10.1093/beheco/arh119>
- Arnqvist, G., Stojković, B., Rönn, J. L., & Immonen, E. (2017). The pace-of-life: A sex-specific link between metabolic rate and life history in bean beetles. *Functional Ecology*, *31*(12), 2299–2309. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12927>
- Atkins, M. D. (1980). *Introduction to insect behavior* (1st ed.). New York: Macmillan Publishing CO., INC.
- Beck, C. W., Blumer, L. S., & Habib, J. (2013). Effects of evolutionary history on adaptation in bean beetles, a model system for inquiry-based laboratories. *Evolution: Education and Outreach*, *6*(1), 5. <https://doi.org/10.1186/1936-6434-6-5>
- Beck, Christopher W, Blumer, L. S., & Ecological Society of America. (2016). Egg size plasticity in bean beetles (*Callosobruchus maculatus*): Does host bean species matter? *Teaching Issues and Experiments in Ecology* -, *11*. Retrieved from <http://tiee.esa.org>
- Bradshaw, C. J. A., & McMahon, C. R. (2008). Fecundity. *Encyclopedia of Ecology*, 1535–1543. <https://doi.org/10.1016/B978-008045405-4.00645-5>
- Crudginton, H. S., & Siva-Jothy, M. T. (2000). Genital damage, kicking and early death. *Nature*, *407*(6806), 855–856. <https://doi.org/10.1038/35038154>
- Daly, M. (1978). The Cost of Mating. *The American Naturalist*, *112*(986), 771–774.  
Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/2460052>
- den Hollander, M., & Gwynne, D. T. (2009). Female fitness consequences of male

## 5 Kilder og litteratur

- harassment and copulation in seed beetles, *Callosobruchus maculatus*. *Animal Behaviour*, 78(5), 1061–1070. <https://doi.org/10.1016/J.ANBEHAV.2009.06.036>
- Devi, M. B., & Devi, N. V. (2014). Biology and morphometric measurement of cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus* fabr. (Coleoptera: Chrysomelidae) in green gram. *Journal of Entomology and Zoology Studies JEZS*, 74(23), 74–76. Retrieved from <http://www.entomoljournal.com/vol2Issue3/pdf/35.1.pdf>
- Dougherty, L. R., & Simmons, L. W. (2017). X-ray micro-CT scanning reveals temporal separation of male harm and female kicking during traumatic mating in seed beetles. *Proceedings. Biological Sciences*, 284(1856), 20170550. <https://doi.org/10.1098/rspb.2017.0550>
- Eady, P. E., & Brown, D. V. (2017). Male–female interactions drive the (un)repeatability of copula duration in an insect. *Royal Society Open Science*, 4(2), 160962. <https://doi.org/10.1098/rsos.160962>
- Eady, P. E., Hamilton, L., & Lyons, R. E. (2007). Copulation, Genital Damage and Early Death in *Callosobruchus maculatus*. *Proceedings: Biological Sciences Proc. R. Soc. B*, 274(274), 247–252. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3710>
- Eady, P. E., Wilson, N., & Jackson, M. (2000). Copulating with multiple mates enhances female fecundity but not egg-to-adult survival in the bruchid beetle *callosobruchus maculatus*. *Evolution*, 54(6), 2161–2165. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2000.tb01259.x>
- Eady, P.E. (1995). Why do male *Callosobruchus maculatus* beetles inseminate so many sperm? *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 36(1), 25–32. <https://doi.org/10.1007/BF00175725>
- Eady, Paul E, Hamilton, L., & Lyons, R. E. (2007). Copulation, genital damage and early death in *Callosobruchus maculatus*. *Proceedings. Biological Sciences*, 274(1607), 247–252. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3710>
- Edvardsson, M. (2007). Female *Callosobruchus maculatus* mate when they are thirsty:

## 5 Kilder og litteratur

- resource-rich ejaculates as mating effort in a beetle. *Animal Behaviour*, 74(2), 183–188.  
<https://doi.org/10.1016/J.ANBEHAV.2006.07.018>
- Edvardsson, M., & Tregenza, T. (2005). Why do male *Callosobruchus maculatus* harm their mates? *Behavioral Ecology*, 16(4), 788–793. <https://doi.org/10.1093/beheco/ari055>
- Fox, C. W. (1993a). Multiple Mating, Lifetime Fecundity and Female Mortality of the Bruchid Beetle, *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Functional Ecology*, 7(2), 203–208. Retrieved from  
<http://www.jstor.org.pva.uib.no/stable/pdf/2389888.pdf?refreqid=excelsior:2dfceb35e9ae3f47bf4f9f7b56f99ae5>
- Fox, C. W. (1993b). The influence of maternal age and mating frequency on egg size and offspring performance in *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Oecologia*, 96(1), 139–146. <https://doi.org/10.1007/BF00318042>
- Fox, C. W., Bush, M. L., Roff, D. A., & Wallin, W. G. (2004). Evolutionary genetics of lifespan and mortality rates in two populations of the seed beetle, *Callosobruchus maculatus*. *Heredity*, 92(3), 170–181. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800383>
- Fox, C. W., Dublin, L., & Pollitt, S. J. (2003). Gender differences in lifespan and mortality rates in two seed beetle species. *Functional Ecology*, 17(5), 619–626.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2435.2003.00781.x>
- Fox, C. W., Hickman, D. L., Raleigh, E. L., & Mousseau, T. A. (1995). Paternal Investment in a Seed Beetle (Coleoptera: Bruchidae): Influence of Male Size, Age, and Mating History. *Annals of the Entomological Society of America*, 88(1), 100–103.  
<https://doi.org/10.1093/aesa/88.1.100>
- Fox, C. W., & Moya-Larano, J. (2009). Diet affects female mating behaviour in a seed-feeding beetle. *Physiological Entomology*, 34(4), 370–378.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.2009.00700.x>
- Fox, C. W., Stillwell, R. C., & Moya-Laraño, J. (2007). Variation in selection, phenotypic plasticity, and the ecology of sexual size dimorphism in two seed-feeding beetles. In *Sex*,

## 5 Kilder og litteratur

- Size and Gender Roles* (pp. 88–96). Oxford University Press.  
<https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780199208784.003.0010>
- Gay, L., Eady, P. E., Vasudev, R., Hosken, D. J., & Tregenza, T. (2009). Costly sexual harassment in a beetle. *Physiological Entomology*, *34*(1), 86–92.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.2008.00656.x>
- Guedes, R. N. C., & Smith, R. H. (2008). Competition strategies and correlated selection on responses to polyandry in the seed beetle *Callosobruchus maculatus*. *Physiological Entomology*, *33*(4), 372–381. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.2008.00643.x>
- Guedes, Raul N. C., Guedes, N. M. P., & Smith, R. H. (2007). Larval competition within seeds: From the behaviour process to the ecological outcome in the seed beetle *Callosobruchus maculatus*. *Austral Ecology*, *32*(6), 697–707.  
<https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.2007.01769.x>
- Guedes, Raul Narciso C., Smith, R. H., & Guedes, N. M. P. (2003). Host suitability, respiration rate and the outcome of larval competition in strains of the cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus*. *Physiological Entomology*, *28*(4), 298–305.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.2003.00347.x>
- Gwynne, D. T. (2008). Sexual Conflict over Nuptial Gifts in Insects. *Annu. Rev. Entomol.*, *53*, 83–101. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.53.103106.093423>
- Harano, T. (2012). Water Availability Affects Female Remating in the Seed Beetle, *Callosobruchus chinensis*. *Ethology*, *118*(10), 925–931. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.2012.02084.x>
- Hayward, A., & Gillooly, J. F. (2011). The cost of sex: quantifying energetic investment in gamete production by males and females. *PloS One*, *6*(1), e16557.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016557>
- Huang, C., Yang, R., Lee, H., & Horng, S. (2005). Beyond fecundity and longevity: trade-offs between reproduction and survival mediated by behavioural responses of the seed beetle, *Callosobruchus maculatus*. *Physiological Entomology*, *0*(0), 050930084535008-???



## 5 Kilder og litteratur

<https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.2005.00474.x>

Johnson, C. L., & Kistler, R. A. (1987). Nutritional ecology of Bruchid beetles. In F. Slansky & J. G. Rodriguez (Eds.), *Nutritional ecology of insects, mites, spiders, and related invertebrates* (pp. 259–282). New York : Wiley. Retrieved from <https://searchworks.stanford.edu/view/1246963>

Kassambara, A., & Kosinski, M. (2018). survminer: Drawing Survival Curves using “ggplot2.” Retrieved from <https://cran.r-project.org/package=survminer>

Katavala, M., Rönn, J. L., & Arnqvist, G. (2008). Correlated evolution between male ejaculate allocation and female remating behaviour in seed beetles (Bruchidae). *Journal of Evolutionary Biology*, 21(2), 471–479. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2007.01494.x>

Lawrence, E. (2016a). *Holometabolous*. *Hendersons’s Dictionary of Biology* (16th ed.). Harlow: Pearson Education Limited.

Lawrence, E. (2016b). *Oviposition*. *Hendersons’s Dictionary of Biology* (16th ed.). Harlow: Pearson Education Limited.

Lawrence, E. (2016c). *Spermatophore*. *Hendersons’s Dictionary of Biology* (16th ed.). Harlow: Pearson Education Limited.

Low, B. S. (1978). Environmental Uncertainty and the Parental Strategies of Marsupials and Placentals. *The American Naturalist*, 112(983), 197–213. <https://doi.org/10.1086/283260>

McNamara, K. B., Robinson, S. P., Rosa, M. E., Sloan, N. S., Van Lieshout, E., & Simmons, L. W. (2016). Male-biased sex ratio does not promote increased sperm competitiveness in the seed beetle, *Callosobruchus maculatus*. *Nature Publishing Group*. <https://doi.org/10.1038/srep28153>

Messina, F. J. (2004). Predictable modification of body size and competitive ability following a host shift by a seed beetle. *Evolution*, 58(12), 2788–2797. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2004.tb01630.x>

## 5 Kilder og litteratur

- Messina, F. J., & Fry, J. D. (2003). Environment-dependent reversal of a life history trade-off in the seed beetle *Callosobruchus maculatus*. *Journal of Evolutionary Biology*, *16*(3), 501–509. <https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.2003.00535.x>
- Messina, F. J., & Slade, A. F. (1999). Expression of a life-history trade-off in a seed beetle depends on environmental context. *Physiological Entomology*, *24*(4), 358–363. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3032.1999.00151.x>
- Morrow, E. H., Arnqvist, G., & Pitnick, S. (2003). Adaptation versus pleiotropy: why do males harm their mates? *Behavioral Ecology*, *14*(6), 802–806. <https://doi.org/10.1093/beheco/arg073>
- O'woma, O. O., Chigozirim, U. P., Emmanuel, O., & Chukwuebuka, E. M. (2016). Reproductive and Survival Strategies Utilized by Insect. A Review. *American Journal of Zoological Research*, *Vol. 4, 2016, Pages 1-6, 4*(1), 1–6. <https://doi.org/10.12691/AJZR-4-1-1>
- Paukku, S., & Kotiaho, J. S. (2005). Cost of reproduction in *Callosobruchus maculatus*: effects of mating on male longevity and the effect of male mating status on female longevity. *Journal of Insect Physiology*, *51*(11), 1220–1226. <https://doi.org/10.1016/J.JINSPHYS.2005.06.012>
- Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy, S., Sarkar, D., & R Core Team. (2017). {nlme}: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. Retrieved from <https://cran.r-project.org/package=nlme>
- R Core Team. (2017). R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Retrieved from <https://www.r-project.org/>
- Rönn, J., Katvala, M., & Arnqvist, G. (2006). The costs of mating and egg production in *Callosobruchus* seed beetles. *Animal Behaviour*, *72*(2), 335–342. <https://doi.org/10.1016/J.ANBEHAV.2005.10.024>
- Royle, N. J., Smiseth, P. T., & Kölliker, M. (2012). What is parental care? In Nick J. Royle,

## 5 Kilder og litteratur

- P. T. Smiseth, & M. Kölliker (Eds.), *The evolution of parental care* (1st ed., p. 356). Oxford: Oxford University Press.
- Rukke, B. A. (2015). Kinafrøbille og flekket frøbille. Retrieved February 12, 2018, from <https://www.fhi.no/nettpub/skadedyrveilederen/biller/kinafrobille-og-flekket-frobille/>
- Sakurai, G., & Kasuya, E. (2008). The costs of harassment in the adzuki bean beetle. *Animal Behaviour*, *75*(4), 1367–1373. <https://doi.org/10.1016/J.ANBEHAV.2007.09.010>
- Savalli, U. M., & Fox, C. W. (1999). The effect of male size, age, and mating behavior on sexual selection in the seed beetle *Callosobruchus maculatus*. *Ethology Ecology & Evolution*, *11*(1), 49–60. <https://doi.org/10.1080/08927014.1999.9522841>
- Savilli, U. M., & Fox, C. W. (1999). The effect of male mating history on paternal investment, fecundity and female remating in the seed beetle *Callosobruchus maculatus*. *Functional Ecology*, *13*(2), 169–177. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2435.1999.00287.x>
- Silva, C. P., Kunz, D., Linhares, R. T., Samuels, R. I., & Macedo, M. L. R. (2015). Diet-derived vicilins detected in eggs laid by a double-mated female *Callosobruchus maculatus* originate from nuptial gifts donated by both male partners. *Journal of Stored Products Research*, *63*, 71–74. <https://doi.org/10.1016/J.JSPR.2015.07.003>
- Smith, T. M., & Smith, R. L. (2015). *Elements of ecology* (9th ed.). Harlow: Pearson education limited.
- Stiver, K. A., & Alonzo, S. H. (2009). Parental and Mating Effort: Is There Necessarily a Trade-Off? *Ethology*, *115*(12), 1101–1126. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.2009.01707.x>
- Tatar, M., Carey, J. R., & Vaupel, J. W. (1993). Long-Term Cost Of Reproduction With And Without Accelerated Senescence In *Callosobruchus Maculatus*: Analysis Of Age-Specific Mortality. *Evolution*, *47*(5), 1302–1312. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1993.tb02156.x>
- Therneau, T. M. (2015). A Package for Survival Analysis in S. Retrieved from <https://cran.r-project.org/package=survival>

## 5 Kilder og litteratur

- Thornhill, R. (1976). Sexual Selection and Paternal Investment in Insects. *The American Naturalist*, 110(971), 153–163. <https://doi.org/10.1086/283055>
- Thornhill, R. (1979). Male and female sexual selection and the evolution of mating strategies in insects. In M. S. Blum & N. A. Blum (Eds.), *Sexual Selection and Reproductive Competition in Insects* (p. 477). Athens, Georgia: Academic Press.
- Trivers, R. L. (1972). *Sexual Selection And The Descent Of Man 1871-1971 - Paternal investment and sexual selection*. Chicago: Aldine Publishing company . Retrieved from <https://web.archive.org/web/20160304025739/http://www1.appstate.edu/~kms/classes/psy2664/Documents/trivers.pdf>
- Ursprung, C., Hollander, M., & Gwynne, D. T. (2009). Female seed beetles, *Callosobruchus maculatus*, remate for male-supplied water rather than ejaculate nutrition. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 63(6), 781–788. <https://doi.org/10.1007/s00265-009-0711-z>
- Wagner, J. D., & Bakare, A. (2017). Lifetime reproductive effort is equal between the sexes in seed beetles ( *Callosobruchus maculatus* ): dispelling the myth of the cheap male. *Ethology Ecology & Evolution*, 29(4), 387–396. <https://doi.org/10.1080/03949370.2016.1211743>
- Wedell, N. (2010). Variation in male courtship costs in butterflies. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 64(9), 1385–1391. <https://doi.org/10.1007/s00265-010-0953-9>
- Wickham, H. (2017). tidyverse: Easily Install and Load the “Tidyverse.” Retrieved from <https://cran.r-project.org/package=tidyverse>
- Wilson, N., Tufton, T. J., & Eady, P. E. (1999). The Effect of Single, Double, and Triple Matings on the Lifetime Fecundity of *Callosobruchus analis* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Insect Behavior*, 12(3), 295–306. <https://doi.org/10.1023/A:1020883220643>

## 6 Appendix

### 6.1 Vektutvikling

Tabell A6.1.1. Resultater fra modell assosiert med figur 2 (vektutvikling). \*Poly 1 er bratthet. \*\*Poly 2 er kurvatur.

Behandling		Kjønn	Verdi	Std.avvik	DF	t-verdi	p-verdi
<b>B4 (intercept)</b>	<i>Poly 1*</i>	♂	-0,371	0,020	750	-18,550	0
	<i>Poly 2 **</i>		0,008	0,002	750	4,934	0
<b>B1</b>	<i>Poly 1</i>	♂	0,110	0,030	750	3,613	<0,001
	<i>Poly 2</i>		-0,002	0,003	750	-0,713	0,476
<b>B2</b>	<i>Poly 1</i>	♂	0,040	0,027	750	1,494	0,136
	<i>Poly 2</i>		0,000	0,002	750	-0,081	0,935
<b>B3</b>	<i>Poly 1</i>	♂	0,004	0,025	750	0,167	0,867
	<i>Poly 2</i>		0,002	0,002	750	0,863	0,389
<b>B5</b>	<i>Poly 1</i>	♂	-0,131	0,036	750	-3,653	<0,001
	<i>Poly 2</i>		0,009	0,003	750	2,959	0,003
<b>B4 (intercept)</b>	<i>Poly 1</i>	♀	-0,496	0,034	733	-14,448	0
	<i>Poly 2</i>		0,013	0,003	733	4,544	0
<b>B1</b>	<i>Poly 1</i>	♀	0,219	0,052	733	4,245	<0,001
	<i>Poly 2</i>		-0,007	0,004	733	-14,448	0,122
<b>B2</b>	<i>Poly 1</i>	♀	0,003	0,045	733	0,075	0,940
	<i>Poly 2</i>		0,002	0,004	733	0,436	0,663
<b>B3</b>	<i>Poly 1</i>	♀	-0,024	0,063	733	-0,373	0,710
	<i>Poly 2</i>		-0,004	0,006	733	-0,693	0,489
<b>B5</b>	<i>Poly 1</i>	♀	-0,059	0,042	733	-1,397	0,163
	<i>Poly 2</i>		0,004	0,004	733	1,192	0,234

**Relativ vekt***Tabell A6.1.2 Gjennomsnittlig relativ vekt (%) i forhold til initialvekten for samtlige behandlingsgrupper*

Alder (dag)	Gjennomsnittlig relativ vekt (%)									
	♂					♀				
	B4	B1	B2	B3	B5	B4	B1	B2	B3	B5
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	96	94	95	93	93	96	97	96	95	95
2	91	89	90	90	91	91	92	92	92	93
3	80	85	81	83	75	80	88	80	80	81
4	72	81	76	78	68	70	84	69	69	72
5	64	77	70	71	58	62	80	60	61	61
6	59	74	65	67	54	56	77	53	56	54
7	52	72	60	62	48	49	75	47	48	50
8	46	66	54	53	34	43	71	43	34	36
9	40	60	47	51	31	36	68	36	26	35
10	30	56	42	45	24	29	65	31	24	29
11	28	53	37	42	22	20	62	28	15	28

## 6.2 Overlevelse (livslengde)

Tabell A6.2.1 Resultater fra modell assosiert med figur 4 (overlevelsesplot)

Behandling	Kjønn	Sannsynlighetsfordeling	Verdi	Std.- avvik	z-verdi	p- verdi	Predikert livslengde (dager)
<b>B4 (intercept)</b>	♂	<i>Weibull</i>	2,752	0,012	235,714	0,000	15,7
<b>B1</b>	♂	<i>Weibull</i>	0,206	0,017	12,042	<0,001	20,1
<b>B2</b>	♂	<i>Weibull</i>	0,097	0,015	6,388	<0,001	17,3
<b>B3</b>	♂	<i>Weibull</i>	0,011	0,014	0,806	0,420	15,8
<b>B5</b>	♂	<i>Weibull</i>	-0,115	0,020	-5,700	<0,001	14,0
<b>Log(scale)</b>	♂	<i>Weibull</i>	-1,964	0,027	-71,612	0,000	-
<b>B4 (intercept)</b>	♀	<i>Logistisk</i>	12,601	0,140	89,869	0,000	12,6
<b>B1</b>	♀	<i>Logistisk</i>	7,513	0,204	36,780	<0,001	20,1
<b>B2</b>	♀	<i>Logistisk</i>	0,146	0,180	0,807	0,420	12,7
<b>B3</b>	♀	<i>Logistisk</i>	-2,770	0,242	-11,446	<0,001	9,8
<b>B5</b>	♀	<i>Logistisk</i>	1,266	0,171	7,412	<0,001	13,9
<b>Log(scale)</b>	♀	<i>Logistisk</i>	-0,028	0,171	-0,952	0,341	-

## 6.3 R-syntax

```
#####
#Forberede datasett til analyser: Alderen er redigert til å starte fra 0 #
#####

biller.df <- read.table("masterdata.csv", header=T, dec=".", sep=";")
biller.df$Alder <- biller.df$Alder-1

#####
# Laster inn R-pakkene som trengs#
#####

library(nlme)
library(survival)

#####
#Vektutvikling. Modell for figur 2A og 2B. Gjennomført separat for begge kjønn#
#####

fit1.lme <- lme(Vekt~poly(Alder,2,raw=TRUE)*Behandling,
random=~+1|Boks.id/Individ, cor=corAR1(), data=datasett.df,
na.action="na.exclude")

anova(fit1.lme)

summary(fit1.lme)

#####
# Livslengde (overlevelse). Gjennomført separat for begge kjønn #
#####

#Forbereder data for overlevelsesplott: #

fit.male/female <- survfit(Surv(Levetid)~Behandling, data=datasett.df)

#Finner passende sannsynlighetsfordeling#

fit1m.surv <- survreg(Surv(Levetid)~Behandling, dist="weibull", data= datasett.df)
fit2m.surv <- survreg(Surv(Levetid)~Behandling, dist="extreme", data= datasett.df)
fit3m.surv <- survreg(Surv(Levetid)~Behandling, dist="exponential", data= datasett.df)
fit4m.surv <- survreg(Surv(Levetid)~Behandling, dist="gaussian", data= datasett.df)
fit5m.surv <- survreg(Surv(Levetid)~Behandling, dist="logistic", data= datasett.df)
fit6m.surv <- survreg(Surv(Levetid)~Behandling, dist="loglogistic", data= datasett.df)
```



## 6 Appendix

```
fit7m.surv <- survreg(Surv(Levetid)~Behandling, dist="lognormal", data= datasett.df)
anova(fit1m.surv, fit2m.surv, fit3m.surv,fit4m.surv,fit5m.surv,fit6m.surv, fit7m.surv)
#Modell for figur 4A og 4B. Eks.: Weibull har lavest uforklart variabilitet#
fit1m.surv <- survreg(Surv(Levetid)~Behandling, dist="weibull", data= datasett.df)
anova(fit1m.surv)
summary(fit1m.surv)
#Finne predikert livslengde på bakgrunn av passende sannsynlighetsfordeling#
predict(fit1m.surv, list(Behandling="1: Isolasjon"), type="response")
predict(fit1m.surv, list(Behandling="2: Kortvarig 1:1"), type="response")
predict(fit1m.surv, list(Behandling="3: Kontinuerlig 1:4"), type="response")
predict(fit1m.surv, list(Behandling="5: Kontinuerlig 4:1"), type="response")
predict(fit1m.surv, list(Behandling="4: Kontinuerlig 1:1"), type="response")
```