



# Bachelorgradsoppgave

## DNA-Strekkoding

Hvilket potensial har DNA-strekkoding i kartlegging av arter?

## DNA Barcoding

What is the Potential of DNA Barcoding in Species Assessment?

Mona Renate Saursaunet

BAC350

Bachelorgradsoppgave i Naturforvaltning

Avdeling for landbruk og informasjonsteknologi  
Høgskolen i Nord-Trøndelag - 2014



**HINT**

# DNA-Strekkoding

Hvilket potensial har DNA-strekkoding i kartlegging av arter?

# DNA Barcoding

What is the Potential of DNA Barcoding in Species Assessment?

av

Mona Saursaunet

BAC350

Bachelorgradsoppgave i Naturforvaltning

Avdeling for landbruk og informasjonsteknologi

Høgskolen i Nord-Trøndelag - 2014



**HINT**

## **SAMTYKKE TIL HØGSKOLENS BRUK AV KANDIDAT-, BACHELOR- OG MASTEROPPGAVER**

**Forfatter(e):** Mona Saursaunet

**Norsk tittel:** DNA-Strekkoding

Hvilket potensial har DNA-strekkoding i kartlegging av arter?

**Engelsk tittel:** DNA Barcoding

What is the Potential of DNA Barcoding in Species Assessment?

**Studieprogram:** Naturforvaltning

**Emnekode og navn:** BAC350 - Bacheloroppgave

☒ Vi/jeg samtykker i at oppgaven kan publiseres på internett i fulltekst i Brage, HiNTs åpne arkiv

☐ Vår/min oppgave inneholder taushetsbelagte opplysninger og må derfor ikke gjøres tilgjengelig for andre

**Kan frigis fra:** 20.5.2014

**Dato:**

\_\_\_\_\_  
underskrift

\_\_\_\_\_  
underskrift

\_\_\_\_\_  
underskrift

\_\_\_\_\_  
underskrift

## Forord

Denne oppgaven skrives som avslutning på en treårig bachelorgrad ved Høgskolen i Nord-Trøndelag. Tema for oppgaven er DNA-strekkoding i artskartleggingsøyemed.

DNA-strekkoding er et tema jeg kom over i forbindelse med undersøkelser med tanke på videre studier og framtidige arbeidsplasser. Temaet fanget min interesse siden jeg nok er over gjennomsnittet interessert i teknologi, spesielt når det kan knyttes til naturforskning. Dette førte videre til ønsket om å se hvordan DNA-strekkoding kan benyttes innenfor mitt fagfelt.

Etter kontakt med nasjonal koordinator for Det norske nettverket for DNA-strekkoding, Torbjørn Ekrem, begynte et samarbeid med han og hans kollega ved NTNU Vitenskapsmuseet, Elisabeth Stur. Disse to har fungert som eksterne veiledere for min bacheloroppgave, og har bistått i den metodiske og teoretiske delen av prosjektet.

Jeg vil rette en stor takk til mine veiledere, Torbjørn Ekrem og Elisabeth Stur ved NTNU Vitenskapsmuseet, og Rolf Terje Kroglund ved Høgskolen i Nord-Trøndelag, for all støtten jeg har mottatt i forbindelse med mitt bachelorprosjekt.

## Sammendrag

DNA-strekkoding er et bioteknologisk verktøy med mange ulike bruksområder. Omtrent alt organisk materiale, måtte det være egg, larver eller ekskrementer, kan bestemmes til art via denne teknologien. DNA-strekkoding utnytter de strukturelle egenskapene til det mitokondrielle genet CO1 til å skille mellom individer på artsnivå, og kan derfor brukes til å bestemme arter. Dette forutsetter at det finnes et database-registrert referanseindivid til nettopp denne arten. Dataene til referanseindividene er registrert i den internasjonale databasen BOLD.

For å teste ut hvor dekkende referansebiblioteket BOLD er når det gjelder den taksonomiske gruppen Chironomidae (fjærmygg), ble det foretatt et utvalg fra en insektinnsamling ved Ringve botaniske hage i Trondheim i slutten av august 2013. Dette utvalget, bestående av både larver og imago hovedsakelig fra familien Chironomidae, ble forhåndsregistrert, og vevsprøver ble sendt inn til sekvensering ved Canadian Centre for DNA Barcoding. Resultatene viste at antall treff i databasen var 79 av totalt 91 fungerende prøver. Dette tilsvarte 24 av 32 arter, altså 75 %.

Oppgaven diskuterer DNA-strekkoding og potensialet for bruk av denne teknologien som verktøy i naturforvaltning og kartlegging i Norge. Litteratursøk rundt temaet har vist at det kreves mer forskning og testing før DNA-strekkoding kan bli en standardisert metode i kartlegging. Foreløpig finnes det ingen protokoller som er hensiktsmessige å bruke i slik sammenheng, likevel ser det ut til at DNA-strekkoding er en teknologi i rask framvekst og som innehar et stort potensial for framtiden.

## Summary

DNA barcoding is a biotechnological tool with many different applications. Any organic material, be it eggs, larva or excrements, may be identified to species via this technology. DNA barcoding utilizes the structural features of the mitochondrial gene CO1 to separate between individuals on a species level, and may therefore be used for species identification. This relies on a database registered reference individual that matches the species in notion. The data of the reference individuals are registered in the international database BOLD.

To test the coverage of the reference library BOLD regarding the taxonomical group of Chironomidae, a selection was taken from insects collected near the Ringve botanical garden in Trondheim in the end of august 2013. This selection, containing both larva and imago mainly from the family Chironomidae, was preregistered, and tissue samples were sent to the Canadian Centre for DNA Barcoding for DNA sequencing. The results showed that the number of matches in the database was 79 out of a total of 91 functioning samples. This makes 24 out of 32 species, which is 75 %.

This thesis discusses DNA Barcoding and the potential of this technology as a tool in nature management and species assessment in Norway. Literature search has shown that more research and testing is necessary before DNA barcoding can become a standardized method for species assessment. For the time being, there are no protocols suitable for usage in this context. However, DNA barcoding is a technology in rapid development, and which holds a great potential for the future.

# Innhold

|                      |    |
|----------------------|----|
| Forord .....         | 3  |
| Sammendrag .....     | 4  |
| Summary .....        | 5  |
| Innledning.....      | 7  |
| Metode .....         | 9  |
| Resultater .....     | 13 |
| Diskusjon .....      | 16 |
| Konklusjon .....     | 22 |
| Litteraturliste..... | 23 |
| Vedleggsliste.....   | 27 |

## Innledning

I 2003 presenterte Paul Hebert og teamet hans ved University of Guelph i Canada en ny metode for artsgjenkjenning. I rapporten «Biological identifications through DNA barcodes» beskrev de hvordan arter kunne identifiseres ved hjelp av små artsspesifikke genetiske sekvenser kalt DNA-strekkoder. DNA-strekkoding utmerket seg tidlig som et viktig verktøy for systematikere og taksonomer, men har også vist seg å ha flere andre bruksområder, for eksempel innenfor miljøovervåkning og bevaring av arter (International Barcode of Life, a).

DNA-strekkoding skiller seg fra annen DNA-analyse ved at informasjon om artsspesifikt DNA blir tilgjengeliggjort i internasjonale databaser i form av referansesekvenser med kobling til arkiverte referanseindivider. Referansesekvensene fungerer omtrent på samme måte som strekkodene på varene i butikken; de er unike for hver art, på samme måte som hver vare i butikken har sin egen distinkte ID-kode. Koblingen til referanseindividene sikrer mer nøyaktighet, samt at det skaper mulighet til å rette opp i feil gjennom at man kan spore opp kilden til publikasjonene.

For de fleste dyr, blir en del av det mitokondrielle genet CO1 benyttet til å skille mellom arter. CO1-genet har den egenskapen at det ser forskjellig ut for individer av ulik art, men ser likt ut for individer av samme art (Hebert, Cywinska, Ball & deWaard 2003). For Chironomidae (fjærmygg), som er fokusgruppe for denne undersøkelsen, har CO1 vist seg å ha tilstrekkelig variasjon mellom arter (Ekrem, Williassen & Stur 2007). DNA-sekvensene som er blitt publisert i en database kan derfor sammenlignes med nye vevsprøver og brukes til å identifisere arter (Ekrem & Jordal 2005; Ekrem et al. 2007).

Arbeidet med innsamling og distribuering av strekkodingsmaterialet i Norge er koordinert gjennom Det norske nettverket for DNA-strekkoding, forkortet NorBOL. NorBOL er et samarbeid mellom ulike institusjoner og forskere som jobber med å lage et referansebibliotek av strekkoder i Norge. Frem til våren 2013, er 4173 av 20 000 arter sekvensert og registrert i Norge. 20 000 er omtrent 1/3 av eukaryotene som antas å finnes i Norge, og dette er NorBOLs offisielle mål innen 2018 (Det norske nettverket for DNA-strekkoding 2014a).

I 2014 ble NorBOL offisielt åpnet som nasjonal infrastruktur for DNA-strekkoding. Med dette ble det bevilget en stor sum i pengestøtte fra Norges forskningsråd. Det at NorBOL har fått denne rollen, fremhever prosjekts verdi som satsningsområde innenfor kartlegging og forskning (Det norske nettverket for DNA-strekkoding 2014b).



I verdenssammenheng er NorBOL bare en liten del av et større nettverk som driver med DNA-strekkoding. Barcoding of Life Initiative (IBOL) er et internasjonalt samarbeid som har som mål å DNA-sekvensere alle arter i verden. DNA-strekkodene publiseres i en egen elektronisk database: Barcoding of Life Database, eller BOLD. En slik database med et internasjonalt språk vil sikre at mye kunnskapsgrunnlag befinner seg på ett sted og er lett tilgjengelig. Dette samarbeidet vil også fremme en mer helhetlig oppfatning av den globale biodiversiteten og kan sikre en bedre internasjonal artsforvaltning (International Barcode of Life, b).

BOLD ble designet for å romme sekvenser fra alt eukaryotisk liv, et mål satt av The Consortium for the Barcode of Life (Ratnasingham & Hebert 2007). BOLD er den sentrale DNA-strekkodingsdatabasen, men det finnes også andre databaser for genetisk analyse som inneholder DNA-strekkoder. Et eksempel er «Genbank» som inngår som en del av et større nettverk av gensekvens-databaser kalt NCBI (Barcode of Life).

En av de største fordelene med et verdensdekkende referansebibliotek som blant annet IBOL og NorBOL bygger opp, er at det i høy grad forenkler kartleggingsarbeid av biologisk mangfold. Bestemmelse av vanskelige arter kan gjøres raskt og effektivt ved å sende inn sekvenser til et laboratorium, og etterpå sammenligne resultatene med registrerte referanser i databasen. I dag mangler rutiner og et tilrettelagt system så dette kan bli en standardmetode for kartlegging av arter. Hensiktsmessig bruk av denne teknologien forutsetter at metoden blir vurdert opp mot tradisjonelle verktøy, for å avdekke hvordan en best kan benytte DNA-strekkoding i praksis, samt å opprette protokoller for slik bruk (Pilgrim et al. 2011).

Tap av biologisk mangfold har aldri foregått i raskere tempo, og dette er en av de største utfordringene verden står overfor i dag (Convention on Biological Diversity). Internasjonale avtaler som Rio-konvensjonen og Ramsar-konvensjonen, har som mål å hindre nedgangen i artsmangfold, men for å kunne bevare arter må vi først vite hvilke arter vi har. Det er viktigere enn noensinne at hensiktsmessige metoder blir tatt i bruk og satt i system slik at man får en oversikt over verdens biologiske mangfold, og det er her DNA-strekkoding kommer inn.

### Målsetting:

I denne oppgaven diskuteres potensialet for DNA-strekkoding som verktøy i forvaltningen i Norge, spesielt med tanke på artskartlegging.

Som en del av dette har jeg testet ut metoden i praksis, for å undersøke hvor dekkende referansebiblioteket BOLD er i forhold til ulike arter av familien Chironomidae, innsamlet fra Ringve botaniske hage.

### **Metode**

Innsamling av Chironomidae ble gjennomført 20.8.2013 i og ved den kunstig anlagte dammen ved Ringve botaniske hage i Trondheim. Innsamlingen ble gjennomført ved hjelp av vannhåv og sommerfuglhåv.



**Fig. 1.** Dammen ved Ringve botaniske hage i Trondheim. Dammen er kunstig, og ble anlagt på 1970-tallet. Den er ca 2500 m<sup>2</sup>, og mellom 1-2 meter dyp. Det er plantet sverdlilje, smal dunkjevle, bred dunkjevle, sjøsvaks og kjempepiggnopp i vannet og salix samt noe naturlig vegetasjon langs vannkanten. I tillegg er det kommet inn en art av tjønnaks, som har spredt seg naturlig i store deler av dammen. Foto: Mona Saurset.

I tillegg til egne innsamlinger ble det foretatt et utvalg fra samme lokalitet av Chironomidae fra bunnprøver gjort med vannhåv, samt Chironomidae fanget med malaise-telt, 1.7. og 19.7.2013 av Torbjørn Ekrem og Elisabeth Stur ved NTNU Vitenskapsmuseet. Utvalget ble foretatt på bakgrunn av morfologiske trekk, for å sikre et større arts mangfold. Dette utvalget inneholdt både larver og imago.



**Fig. 2.** Malaise-telt er en insektfelle for innsamling av flyvende insekter. Insekter som setter seg på den mørke nettingen vil kravle oppover, tiltrukket av den lyse duken. Denne duken vil lede dem stadig oppover og ned i en beholder med sprit. Foto: Mona Saurset.



**Fig. 3.** Merking av Malaise-telt. Det er viktig å forklare for publikum hva denne anretningen er og hvem den tilhører. Da får den forhåpentligvis stå i fred. Foto: Mona Saurset.



**Fig. 4.** Innsamling med vannhåv ble gjort fra vannkanten. Håven slås mot vegetasjonen og man gjør raske, sirkulære bevegelser med håven under vann. Foto: Torbjørn Ekrem.



**Fig. 5.** Innsamling med sommerfugl-håv ble gjort ved å slå med håven med brå, bestemte bevegelser inni vegetasjonen. Foto: Torbjørn Ekrem.

Fra det innsamlede materialet av Chironomidae ble et utvalg på 95 individer sendt til DNA-sekvensering. Analysen ble gjennomført av Canadian Centre for DNA Barcoding. Utvalget var basert på morfologiske ulikheter blant individene, fordi flere morfotyper øker

sannsynligheten for å få et utvalg bestående av et større arts mangfold. Både imago (av hann-individer) og larver ble valgt ut. De voksne hunnene ble ikke sendt til sekvensering siden det finnes lite bestemmelseslitteratur på disse, og da vil det være veldig krevende å bestemme disse til art, dersom de skulle mangle referanse i BOLD. Insektene i utvalget, blir videre i teksten omtalt som prøver.

Prøvene ble sortert på ulike rør med en tilhørende ID-kode. ID-koden skulle stemme overens med en tilsvarende kode i et standardisert registreringsskjema kalt «SpecimenData» opplastet fra BOLD, se vedlegg a-d. I dette skjemaet ble det fylt inn metadata som innsamlingsinfo og taksonomi. Taksonomien til prøvene ble bestemt til underfamilie, basert på bestemmelseslitteratur for fjærmygg i den holarktiske regionen. Denne taksonomien ble oppdatert etter at resultatene kom tilbake fra laboratoriet i Canada. Alle prøvene ble fotografert ved hjelp av mikroskop med integrert kamera. De ble merket med ID-kode og lagt i en komprimert fil-mappe, sammen med et nytt registreringsskjema kalt «ImageData» (vedlegg e) og lastet opp i BOLD sammen med «SpecimenData»-fila.

Det ble tatt vevsprøver av dyrene for innsending til DNA-sekvensering. For å unngå krysskontaminering mellom prøvene ble pinsetten dyppet i sprit og tuppen tent på med en lighter mellom hver gang en ny prøve ble håndtert. For imago ble det plukket av 1-3 ben avhengig av størrelsen, mens for larvene ble det plukket av 2-3 ledd fra midten av larvekroppen. Vevsprøvene ble lagt i forskjellige brønner på ei plate fylt med sprit. Brønnene var kodet med en kombinasjon av én bokstav og ett tall som skulle identifisere prøven. Tall- og bokstavkombinasjonene ble også ført opp i et registreringsskjema kalt «CCDB-Record» (vedlegg f) som skulle følge med vevsprøvene inn til sekvensering.

På bakgrunn av resultatene fra laboratoriet, ble det laget en oversikt over treffene med prosentvis likhet i CO1. Oversikten ble hentet fram i BOLD ved å logge inn på prosjektet for så å hente fram en sekvens-analyse av laboratorie-resultatene i form av et «Neighbour Joining Tree», presentert som et «TaxonID Tree» (figur nr. 6). For å bygge dette treet ble det valgt «Distance Model: Kimura 2 parameter» og «Align sequences: BOLD Aligner». TaxonID treet arrangerte prøvene i enkeltgrener eller grupperinger kalt cluster. Lengden på grenene anga den prosentvise ulikheten i genetisk distanse i CO1-genet mellom prøvene. Målestokken i øverste høyre hjørne i figur nr. 6, er et mål på den prosentvise genetiske distansen mellom clusterne basert på lengden av grenene på treet. I dette systemet representerer hver cluster én art.

På bakgrunn av TaxonID Treet ble det laget en tabell som skulle vise prosentvis likhet i CO1-genet med DNA-sekvenser fra andre data i BOLD. For å finne ut om det var treff med andre prøver i databasen ble det valgt «View All Records» og deretter ble profilen for hver av prøvene undersøkt gjennom egne lenker i kolonnen kalt «Sequence Page». Ved å velge «Full DB» dukket de nærmeste treffene fra databasen opp i en liste.

Vanligvis vil en likhet i DNA et på 95 % -100 % indikere at de overlappende DNA-sekvensene tilhører individer av samme art (Ekrem & Jordal 2005). Med en grense på 98 % istedenfor 95 % vil denne antakelsen være enda sikrere. Derfor ble alle clusterne som hadde 98 % likhet med andre identifiserte prøver i BOLD bestemt til art på bakgrunn av denne overlappingen. Clustere med 95 % likhet ble også ført opp i tabellen, under en annen kolonne. Likhet på 98 % eller mer i databasen Genbank ble også ført opp, som en ekstra sikkerhet. Tabellen ble etterpå brukt til å oppdatere filen kalt SpecimenData med artsnavn i henhold til treff i BOLD med 98 % likhet eller mer. Disse nye oppdateringene ble registrert gjennom valgmuligheten «Initiate Batch Submission» under «Uploads» i menyen til venstre i BOLD.

De resterende artsgruppene som ikke hadde treff med andre individer i databasen, ble det laget preparater av, slik at de kunne bestemmes ved hjelp av dikotome bestemmelsesnøkler. I de tilfellene hvor det var mulig, ble BOLD oppdatert med hensyn på taksonomien på bakgrunn av nøklene. Bestemmelseslitteraturen som ble brukt var: «Chironomidae of the Holarctic Region: Keys and diagnoses – Larvae», «British Dixidae (Meniscus Midges) and Thaumaleidae (Trickle Midges): Keys with Ecological Notes», og «Revision der Gattung Cricotopus van der Wulp und ihrer Verwandten (Diptera Chironomidae)».

For å undersøke potensialet for DNA-strekkoding som verktøy i forvaltningen i Norge, ble det foretatt et litteratursøk blant elektroniske tidsskrift, samt publiserte tekster fra de aktuelle nettsidene tilknyttet DNA-strekkoding. I tillegg har jeg vært i kontakt med Norwegian Sequencing Centre for å hente fram diverse opplysninger vedrørende Next Generation Sequencing.



# Resultater

## BOLD TaxonID Tree



**Fig. 6.** Treer grupperer prøvene i clusterer etter prosentvis genetisk likhet. Lengden på grenene (de horisontale linjene) er basert på målestokken i øverste høyre hjørne som angir prosentvis genetisk distanse. Dette treer viser 32 adskilte clusterer. For å foreta denne analysen ble det valgt Distance Model: Kimura 2 parameter og Align sequences: BOLD Aligner. Figuren finnes i større format i vedlegg g.

Av de 95 forskjellige vevsprøvene som ble sendt inn til sekvensering i Canada, var 92 vellykkede og fungerende prøver. Én av disse ble flagget ut av BOLD da den viste stor genetisk likhet med flere forskjellige andre insektordener. Etter denne utflaggingen, står det igjen 91 velfungerende prøver totalt som kan være med i tolkningen av resultatene.

Antall treff i BOLD var 79 av 91 prøver totalt. Resten av artene var ikke registrert i BOLD eller i databasen Genbank fra før. Nøyere skjematisk oppsett av treffene finnes i tabell 1.

Flere av prøvene som ble sendt inn viste seg å tilhøre individer av samme art. Disse har 98 % -100 % overlapp i DNA-sekvensen (se tabell 1). På TaxonID treet (figur 6) er disse artene å finne i samme cluster. Utfra dette treet ser man at utvalget stammer fra 32 forskjellige arter totalt, da det er 32 forskjellige, godt adskilte cluster som er representert i treet.

Ved å sammenligne med andre prøver i BOLD ser man at 24 av de 32 artene allerede var registrert i BOLD. Dette er 75 % av alle artene fra de vellykkede prøvene i utvalget. Åtte arter fantes ikke i databasen fra før, men flere av dem ble i etterkant bestemt ved hjelp av bestemmelseslitteratur. Artene som ble bestemt på bakgrunn av morfologiske trekk ved hjelp av bestemmelseslitteratur er merket med en stjerne i tabell 1.

Bilder publisert i BOLD, fra det innsamlede materialet:



**Fig. 7.** Fjærmygglarve, *Ablabesmyia monilis*, fotografert via mikroskop. Bak hodet ses fjærmygglarvens karakteristiske falske fot.



**Fig. 8.** Fjærmygg-imago *Cricotopus sylvestris*, fotografert via mikroskop. Voksne hannindivider har tydelige fjærformede antenner.

**Tabell 1.** Tabellen viser de ulike grupperingene basert på clustere i TaxonID tree. Gruppene har fått navn etter arten de representerer forutsatt at gruppen har treff med andre registrerte arter i BOLD eller Genbank med prosentvis likhet på 98 % eller mer. De andre gruppene har fått navn etter nærmeste takson med mest prosentvis genetisk likhet i BOLD. Antall treff med 98 % genetisk likhet eller mer i BOLD og Genbank står listet opp henholdsvis under kolonne fire og fem, mens antall treff med 95 % eller mer står listet opp under kolonne tre. Antallet i kolonne fire kommer ikke i tillegg til antallet i kolonne tre, men er en del av dette antallet. Sammenligningen med BOLD ble utført i januar, 2014. Takson-gruppene som er blitt bestemt til art i etterkant av denne sammenligningen, er merket med en stjerne (\*).

| Takson                                        | Prøver per takson | Prøver i BOLD med >=95 % likhet | Prøver i BOLD med >=98 % likhet | Prøver i Genbank med >=98 % likhet | Nærmeste geografiske treff                 |
|-----------------------------------------------|-------------------|---------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------------|
| <b>Trichoptera</b>                            |                   |                                 |                                 |                                    |                                            |
| <b>Polycentropodidae</b>                      |                   |                                 |                                 |                                    |                                            |
| <i>Holocentropus picicornis</i>               | 1                 | 8                               | 8                               | 1                                  | Norge: Finnmark                            |
| <b>Diptera</b>                                |                   |                                 |                                 |                                    |                                            |
| <b>Dixidae</b>                                |                   |                                 |                                 |                                    |                                            |
| <i>Dixella aestivalis</i> *                   | 2                 | 2                               | 2                               | 0                                  | Canada                                     |
| <b>Chaoboridae</b>                            |                   |                                 |                                 |                                    |                                            |
| <i>Chaoborus crystallinus</i> *               | 3                 | 0                               | 0                               | 0                                  |                                            |
| <b>Chironomidae</b>                           |                   |                                 |                                 |                                    |                                            |
| <b>Chironominae</b>                           |                   |                                 |                                 |                                    |                                            |
| Chironominae (individ RIN_CH63)               | 1                 | 0                               | 0                               | 0                                  | Norge: Hordaland                           |
| <i>Chironomus</i> (cluster 1)                 | 1                 | 1                               | 1                               | 0                                  | Norge: Sør-Trøndelag                       |
| <i>Chironomus</i> (cluster 2)                 | 3                 | 13                              | 12                              | 0                                  | Bulgaria                                   |
| <i>Chironomus</i> (cluster 3)                 | 2                 | 78                              | 1                               | 2                                  | Norge: Sør-Trøndelag                       |
| <i>Dicrotendipes lobiger</i>                  | 4                 | 3                               | 3                               | 0                                  | Finland                                    |
| <i>Parachironomus parilis</i>                 | 2                 | 3                               | 3                               | 0                                  | Finland                                    |
| <i>Paratanytarsus laccophilus</i> (cluster 1) | 1                 | >26                             | >26                             | 0                                  | Norge: Finnmark                            |
| <i>Paratanytarsus laccophilus</i> (cluster 2) | 2                 | 11                              | 11                              | 0                                  | Canada                                     |
| <i>Polypedilum arundineti</i>                 | 1                 | 3                               | 3                               | 0                                  | Norge: Sør-Trøndelag                       |
| <i>Polypedilum tritum</i>                     | 2                 | 3                               | 3                               | 0                                  | Norge: Sør-Trøndelag                       |
| <i>Synendotendipes impar</i>                  | 12                | 6                               | 6                               | 0                                  | Norge: Sør-Trøndelag, Østfold, Finnmark    |
| <b>Orthocladinae</b>                          |                   |                                 |                                 |                                    |                                            |
| <i>Acricotopus</i> *                          | 3                 | 0                               | 0                               | 0                                  |                                            |
| <i>Corynoneura</i>                            | 7                 | 42                              | 21                              | 5                                  | Norge: Sør-Trøndelag                       |
| <i>Cricotopus sylvestris</i> *                | 16                | >70                             | 38                              | 24                                 | Norge: Sør-Trøndelag, Telemark, Svalbard   |
| <i>Halocladus variabilis</i>                  | 1                 | 59                              | 59                              | 5                                  | Norge: Telemark, Hordaland, Finnmark       |
| <i>Limnophyes minimus</i>                     | 2                 | 40                              | 40                              | 0                                  | Norge: Oppland, Finnmark, Oslo, Buskerud   |
| <i>Metriocnemus eurynotus</i>                 | 1                 | 15                              | 1                               | 0                                  | Norge: Sør-Trøndelag                       |
| <i>Metriocnemus fuscipes</i>                  | 1                 | 9                               | 5                               | 0                                  | Norge: Finnmark                            |
| <i>Metriocnemus picipes</i>                   | 2                 | 12                              | 12                              | 0                                  | Norge: Telemark, Oslo, Hordaland, Finnmark |
| Orthocladinae (individ RIN_CH45)              | 1                 | 1                               | 0                               | 0                                  | Norge: Sør-Trøndelag                       |
| <i>Orthocladus</i> (Cluster 1)                | 1                 | 1                               | 1                               | 0                                  | Norge: Finnmark                            |
| <i>Orthocladus</i> (Cluster 2)                | 1                 | 7                               | 0                               | 0                                  | Canada                                     |
| <i>Psectrocladius schliezi/limbatellus</i>    | 3                 | 16                              | 4                               | 2                                  | Sverige                                    |
| <i>Pseudosmittia trilobata</i> *              | 1                 | 0                               | 0                               | 0                                  |                                            |
| <b>Tanypodinae</b>                            |                   |                                 |                                 |                                    |                                            |
| <i>Ablabesmyia monilis</i> (cluster 1)        | 2                 | 7                               | 1                               | 0                                  | Norge: Finnmark                            |
| <i>Ablabesmyia monilis</i> (cluster 2)        | 5                 | 16                              | 9                               | 2                                  | Norge: Sør-Trøndelag, Oppland, Finnmark    |
| <i>Guttipeloplia guttipennis</i>              | 5                 | 2                               | 2                               | 0                                  | Finland                                    |
| <i>Natarsia punctata</i>                      | 1                 | 7                               | 7                               | 0                                  | Norge: Sør-Trøndelag, Oslo, Finnmark       |
| <i>Psectrotanypus varius</i> *                | 1                 | 0                               | 0                               | 0                                  |                                            |
| <b>Totalt</b>                                 | <b>91</b>         |                                 |                                 |                                    |                                            |



## Diskusjon

Strekkodingsprosjektet med prøver fra dammen ved Ringve botaniske hage gir innblikk i en strekkodingsprosess som like gjerne kunne vært del av et kartleggingsarbeid i forbindelse med en utredning. Til et slikt formål burde materialet vært innsamlet til forskjellige tider på året og ved forskjellige lokaliteter i og ved dammen. Sett bort fra dette, vil den tekniske behandlingen av materialet foregå omtrent på samme måte, uansett bakgrunn for sekvensering.

Å bruke Chironomidae som prøvemateriale har vært interessant, da denne insektfamilien er en viktig biologisk indikatorgruppe for overvåkning av akvatiske miljø, spesielt med tanke på forurensning av akvatiske miljø i urbane strøk (Carew, Pettigrove, Metzeling, & Hoffmann 2013; Ekrem et al. 2007). En av konklusjonene fra dette prosjektet, er at arbeidet som følger med DNA-strekkingsteknologien åpner for en effektiv kartlegging av små organismer som insekter og edderkoppdyr. Metoden forutsetter streng systematikk og god teknikk, men krever ikke ekspertise på artsnivå. En videre forutsetning er et godt referansesystem. Imidlertid har vi sett fra prosjektet at kontaminering av prøver samt feilregistreringer av taksonomi i BOLD er mulige feilkilder som kan forstyrre resultatene.

I dag er det flere organisasjoner og institusjoner som samler inn sekvenser til den internasjonale strekkodingsdatabasen BOLD, og databasen er i rask vekst. I denne undersøkelsen var 75 % av alle artene fra de innsendte vevsprøvene registrert i BOLD, tilsvarende 24 av 32 arter totalt. Dette er ikke tilfredsstillende i forhold til å kartlegge Chironomidae-forekomster kun på grunnlag av sammenligning med data fra BOLD. Når det er sagt, er Chironomidae en familie som inneholder 6220 beskrevne arter (P. Ashe pers. med.), og mange av dem er hjemmehørende i Norge. Sekvensering av alle fjærmygg i Norge vil ta tid.

For andre norske leddyr kan dekningsgraden i BOLD være høyere enn den var for Chironomidae i dette prosjektet. Det er også viktig å ta i betraktning at sammenligningen med BOLD ble utført i januar 2014, og sekvensering av Chironomidae er et arbeid som foregår kontinuerlig. Det vil si at antall treff i BOLD kan variere mye med kort tids mellomrom.

Per 12.5.2014 var 3 469 512 sekvenser registrert i BOLD, mens 213 899 forskjellige arter var sekvensert. Registrering av strekkoder og arter blir levert av forskjellige institusjoner fortløpende. Målet da prosjektet ble aktivert i 2010 var å sekvensere 5 000 000 prøver fra

500 000 forskjellige arter innen 2015, hvilket er et mål som ser ut til å være innenfor rekkevidde (BOLD Systems 2014).

I Norge jobbes det kontinuerlig med kartlegging av biologisk mangfold, men DNA-strekkoding har inntil nylig ikke vært en sentral del av dette arbeidet. Artsdatabanken, som er underlagt Kunnskapsdepartementet, har ansvar for det norske artsprosjektet. Artsprosjektet har som formål å skaffe til veie mer kunnskap om artsmangfoldet i Norge, med fokus på arter vi enda vet lite om. Denne kunnskapen skal blant annet ligge til grunn for forvaltningen av naturmangfoldet. Artsprosjektet bidrar til å samle inn vevsprøver til strekkoding slik at vi på sikt kan bygge opp et bibliotek av DNA-strekkoder der alle arter i Norge er representert (Artsdatabanken).

Artdatabankens database er et viktig verktøy i offentlig forvaltning. Denne tjenesten kan brukes i tilfeller hvor det skal undersøkes om et planlagt inngrep kan få negative følger for biologisk mangfold. I slike tilfeller må det undersøkes om tiltakets planlagte plassering eller funksjon vil komme i konflikt med habitater for rødlistearter. Ofte krever dette at det settes i gang en feltbefaring i det aktuelle området i forbindelse med en konsekvensutredning, slik det går fram av Plan- og bygningsloven (2008, § 4-2, 2. ledd). I slike tilfeller vil DNA-strekkoding og BOLD kunne være viktige, ressursbesparende verktøy i kartleggingsarbeidet.

Det er særlig i forbindelse med identifikasjon av kryptiske arter, som vanligvis krever spesiell ekspertise, at et verktøy som DNA-strekkoding vil ha stor betydning. Et eksempel på kryptiske arter av Chironomidae som er blitt avslørt gjennom DNA-strekkoding, er *Micropsectra neoappendica*, og *Micropsectra subletteorum*. Disse to artene er nesten morfologisk identiske med tilsvarende europeiske arter, men de er genetisk ulike (Anderson, Stur, & Ekrem 2013). Artskartlegging av små uanselige kryptiske arter er tidkrevende, og det er kanskje derfor lett å overse nødvendigheten av slik kartlegging (Carew et al. 2013).

DNA-strekkoding vil også kunne avsløre kryptiske artskomplekser. Et kryptisk artskompleks er en gruppe med arter som er morfologisk like og som kan ha relativt like nisjer, men som reproducerer uavhengig av hverandre. Ved hjelp av fylogenetisk analyse, har man funnet ut at den tidligere antatte arten *Cordylocheres scorpioides* i virkeligheten var flere genetisk ulike arter (Wilcox, Hugg, Zeh, & Zeh 1997). I Costa Rica har man ved hjelp av DNA-strekkoding av museumseksemplarer av sommerfuglarten *Astraptes fulgerator*, funnet ut at denne er et kompleks av minst ti ulike arter (Hebert, Penton, Burns, Janzen, & Hallwachs 2004).

Slike eksempler kan gjøre utslag i at en art som tidligere var antatt å være en generalist, kan vise seg å være et artskompleks av spesialister med små nisjer, eller at én sjelden art kan vise seg i realiteten å være flere *enda* sjeldnere arter. Slik kunnskap er helt essensiell når man skal forvalte og bevare arter og deres leveområder (Bickford et al. 2006).

Ved morfologisk identifikasjon er det mye informasjon som går tapt. Morfologisk identifikasjon av hunner i familien Chironomidae har vært vesentlig vanskeligere enn for hanner, om ikke umulig. Studier har vist at dersom man ser bort fra hunnene i et kartleggingsprosjekt kan så mye som 27 % av artene ikke bli oppdaget. DNA-strekkoding er i slike tilfeller helt nødvendig for å oppdage alle artene (Ekrem, Stur, & Hebert 2010).

En av de mest essensielle forskjellene mellom artsbestemming basert på DNA-strekkoding, og artsbestemming basert på morfologisk identifikasjon, er at eksemplaret ikke nødvendigvis må være i god stand med den førstnevnte metoden. Siden teknologien benytter seg av ett bestemt gen som skiller mellom arter men ikke mellom individer, er det ikke så nøye om man har et komplett eksemplar av et standard voksenindivid. Dette er en stor fordel med DNA-strekkoding; man vil også kunne bestemme til riktig art på bakgrunn av ødelagte og ugjenkjennelige individer, samt fragmenter av organismer, ekskrementer, pupper/larver og lignende (Ekrem & Jordal 2005).

Andre fordeler med DNA-strekkoding er at utarbeiding av et referansebibliotek av DNA-sekvenser er første steg mot en felles oversikt over verdens arter. Det er ikke usannsynlig at en vil oppnå en bedre forståelse for slektskapssammenhenger og arters distribusjon i verden. Samtidig vil en kanskje oppnå en global overensstemmelse når det gjelder navnsetting og hvor man skal sette skillet mellom nært beslektede bestander; skal man godta stor genetisk variasjon innad i en art, eller dele gruppen i flere uavhengige arter?

Også innenfor forvaltning knyttet til handel med trua arter kan DNA-strekkoding spille en betydelig rolle. Eksempelvis kan grensekontroller benytte DNA-strekkoding til å avsløre om produkter inneholder DNA fra utrydningstrua arter på CITES-konvensjonens liste. CITES-konvensjonen skal hindre at trua arter omsettes, og er en av flere internasjonale avtaler vedrørende bevaring av biologisk mangfold som er ratifisert i Norge (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora).

I et natur- og miljøforvaltningsperspektiv har DNA-strekkoding flere bruksområder. Som nevnt tidligere kan teknologien blant annet benyttes i kartlegging av arter, avsløring av

kryptiske artskomplekser og innenfor CITES-arbeidet. Dersom DNA-strekkoding en dag blir en naturlig del av prosesser knyttet til miljømessig forvaltningsarbeid, kan dette være ressursbesparende i form av tid og penger. Oppretting av protokoller der DNA-strekkoding er et sentralt begrep, bør med tiden bli et mål for offentlig og privat planlegging i forbindelse med konsekvensutredninger.

*Miljøstrekkoding* er en metode innenfor DNA-strekkoding som trolig vil ha et stort potensial innenfor artskartlegging, spesielt med tanke på sjeldne og fremmede arter. Miljøstrekkoding vil si å kjøre sekvensanalyse fra en miljøprøve, altså en prøve som inneholder DNA fra flere organismer. På den måten avdekkes tilstedeværelsen av flere arter som holder til i det respektive miljøet (Thomsen et al. 2012). Arter som holder til i og ved vann vil avgi noe DNA til miljøet. Dette er i hovedsak DNA fra avføring, urin eller hudceller (Haile et al. 2009). Slikt DNA vil få ganske jevn fordeling i vann (Andersen et al. 2011). DNA som er tilstede i vannkilder som innsjøer, dammer og bekker har vist seg å være nær kontemporær med tilstedeværelsen av arter som avsetter DNA (Thomsen et al. 2012).

Next Generation Sequencing, eller NGS, er en teknologi som kjører sekvensering av multiple DNA-sekvenser parallelt, og har vist seg spesielt hensiktsmessig å bruke i tilfeller hvor materialet har stort omfang (Norwegian Sequencing Centre 2013). Denne teknologien åpner for effektivt å sekvensere flere arter samtidig ut fra en miljøprøve, som for eksempel en vannprøve fra en dam, en jord- eller bunnslamprøve, eller en prøve fra et dyrs mageinnhold (Hajibabaei, Spall, Shokralla, & van Konyenburg 2012).

Til sammenligning med konvensjonell Sanger-sekvensering, som allerede har vært benyttet i noen tiår, er NGS en raskere og billigere metode dersom man skal foreta sekvenseringer av et større omfang. NGS koblet med miljøstrekkoding muliggjør kartlegging og overvåking av organismer i ulike miljø på en effektiv og fullstendig måte (Hajibabaei et al. 2012). Denne framgangsmåten kan være mindre kostbar enn tradisjonell overvåkning basert på tellinger og sporing, siden man ikke må ansette eksperter for å bestemme de vanskeligste artene.

Miljøstrekkoding koblet med NGS kan også si noe om antall individer av hver art som er å finne i et habitat, som for eksempel en dam. Det har vist seg at forholdet er likt mellom antall sekvenser i prøven og det faktiske bestandstallet fra miljøet hvor prøven er hentet (Thomsen et al. 2012; Carew et al. 2013). Fremdeles er det noen utfordringer knyttet til denne bruken av NGS, som gjør det nødvendig med mer forskning før NGS kan benyttes til å avdekke hvor mange arter som er tilstede i et miljø (Stein, Martinez, Stiles, Miller, & Zakharov 2014).

Forskning har vist at preserverende etanol-prøver med innhold av hele eksemplarer av forskjellige bentiske makroinvertebrater var like egnet som sekvenseringsmateriale som en homogenisert blanding av DNA fra bentiske makroinvertebrater og vann. I begge prøvene ble alle artene sekvensert med NGS. Denne undersøkelsen slår fast at det ikke er nødvendig å forringe materialet gjennom en homogeniseringsprosess slik at organismer ikke lenger er morfologisk gjenkjennbare ved bruk av NGS (Hajibabaei et al. 2012).

Ulempen med NGS har tidligere vært at man ikke kan gå inn og si hvilken sekvens som hører til hvilket eksemplar, men nyere forskning har avdekket en metode for å gjøre nettopp dette. Gjennom unik merking av ulike individprøvers DNA i strekkodingsprosessen, kan NGS benyttes også når man ønsker å sekvensere arter og samtidig beholde individene som referanser (Shokralla et al. 2014).

Miljøstrekkoding egner seg dårlig til å påvise arter som har et levesett som gjør at de avgir lite DNA til miljøet de holder til i. I et forsøk med miljøstrekkoding var oppdagbarheten av oter (*Lutra lutra*) kun på 27 %, i motsetning til en oppdagbarhet på 91-100 % for de fleste andre fokusartene i forsøket. At dette tallet var så lavt i forhold til de andre artene, kan ha en sammenheng med oterens vide arealbruk, både på land og i vann. På de lokalitetene hvor det ikke var mulig å påvise fokusartene med tradisjonelle registreringsmetoder, ble de derimot påvist av DNA i miljøprøver. Dette indikerer at miljøstrekkoding kan være en mer nøyaktig metode enn tradisjonelle registreringsmetoder når forekomsten av arter er spesielt lav (Thomsen et al. 2012).

NGS har et stort potensial til å oppdage sjeldne arter, herunder trua og fremmede arter. Disse to gruppene er særdeles viktige å overvåke, med tanke på å hindre tap av biologisk mangfold. Ifølge miljødirektoratet er det helt essensielt at fremmede arter oppdages tidligst mulig, altså mens det ennå er lave forekomster. På den måten kan mottiltak iverksettes tidlig og hindre at arten får spre seg videre (Miljødirektoratet 2010).

Stein et al. (2014) har foretatt undersøkelser i USA vedrørende kostnader av Sanger-sekvensering og NGS sammenlignet med tradisjonell kartlegging basert på morfologi. Resultatene viste at Sanger-sekvensering var et dyrere alternativ til tradisjonell kartlegging, mens NGS var like kostbart eller noe billigere. Per individ var kostnadene US\$2 - \$5 med Sanger-sekvensering, og 50¢ - \$2 med NGS avhengig av plattform og størrelsen på prosjektet. Artikkelen slår fast at NGS ennå ikke er en billigere metode enn tradisjonell kartlegging, men tidsbruken av NGS er vesentlig kortere; sammenlignet med en typisk tidsbruk på seks

måneder med tradisjonell overvåkning, kan NGS levere ferdige data i løpet av noen få dager. I forhold til norsk prisnivå, er det i denne undersøkelsen benyttet en veldig lav sats for morfologisk identifisering, spesielt for invertebrater (T. Ekrem pers. med.). Situasjonen i Norge kan derfor være annerledes med tanke på sammenligning av priser.

NGS er ennå kostbart, men det er mulig å redusere kostnadene gjennom å sende flere ulike miljøprøver i én og samme kjøring. Med denne metoden må sekvensene tilsettes en markør slik at man etterpå kan finne ut hvilken prøve de ulike sekvensene stammer fra. Dette forutsetter blant annet at diversiteten i prøvene er kjent (M. Skage pers. med.). Antall sekvenser som sendes inn til NGS er også med på å avgjøre kostnadene. Antallet sekvenser avhenger av hvor mange arter en forventer å finne, men også om man kun er interessert i å finne de vanligste artene. For å avdekke de sjeldne artene kan det være nødvendig å sende inn mange miljøprøver for å få ut et stort antall sekvenser, som igjen øker sannsynligheten for å finne sjeldne arter i prøven.

En organisasjon som tilbyr NGS-tjenester i Norge er Norwegian Sequencing Centre (NSC) som er tilknyttet Oslo Universitetssykehus og Universitetet i Oslo. Det finnes flere ulike teknologiske plattformer innen NGS, som for eksempel: Illumina Miseq, Illumina Hiseq, 454 pyrosequencing, Pacbio og Ion Torrent. Disse plattformene skiller seg fra hverandre ved at de har ulik behandlingstid, kapasitet, resultat og krav til input (Norwegian Sequencing Centre 2013). For å bruke slike plattformer må sekvensene behandles slik at de kan sammenlignes med referanser i BOLD. Det finnes flere ulike bioinformatiske verktøy som behandler, filtrerer og sammenligner NGS-sekvenser med referansebibliotek, samtidig som det pågår en stor utvikling på dette feltet (T. Ekrem pers. med.).

Offentlig sektor bruker ikke vesentlige midler på kartlegging av arter i dag. Ofte blir informasjon fra databaser som «Naturbase» og «Artskart» benyttet framfor ny kartlegging. Det er vanligere at private aktører gir oppdrag om kartlegging og konsekvensutredninger etter pålegg fra de offentlige myndighetene. Skal vi tro forskerne som mener at naturmiljøet snart vil få et mye sterkere fokus i verdenssammenheng, kan det tenkes at det med tiden vil bli større behov for utvidet artskartlegging, også i offentlig sammenheng i Norge. Etterspørselen etter en mer effektiv løsning for artskartlegging kan derfor innen kort tid være økende.

## Konklusjon

NGS har flere klare fordeler når det kommer til å bestemme multiple DNA-sekvenser på én gang. Fremdeles finnes noen svakheter, som manglende protokoller og begrensninger i forhold til hvilke arter som kan kartlegges med denne teknologien. Likevel peker flere rapporter mot at dette er en metode som kan være hensiktsmessig å bruke i framtidig, norsk naturforvaltning og kartlegging. Norges naturmangfoldlov er ennå fersk og mulighetene er store for at det vil bli enda mer fokus på konsekvensutredninger og bevaring i nær framtid. Med NGS er det mulig at både kostnader og saksbehandlingstid knyttet til artskartlegging blir redusert. Konsekvensene av dette kan være at artskartlegging blir mer nøyaktig gjennomført og at naturmiljøet blir gitt større hensyn i planleggingsøyemed. Etter hvert som teknologien blir mer avansert, vil også metoden bli rimeligere.

I framtiden vil kanskje miljøprøver koblet med DNA-strekkoding bli en standardisert metode for å kartlegge artsforekomster i offentlig og privat forvaltning. Kanskje det til og med vil finnes en maskin som både foretar sekvensering av miljøprøver og sammenligner disse med DNA-strekkoder fra ulike databaser. Dette ser ut til å være en framtidvisjon som ikke nødvendigvis er så langt unna virkeligheten i dag. Foreløpig trengs det mer forskning og testing før NGS kan bli en standardisert metode innenfor artskartlegging.

## Litteraturliste

- Andersen, K., Bird, K. L., Rasmussen, M., Haile, J., Breuning-Madsen, H., Kjær, K. H.,... Willerslev, E. (2011). Metabarcoding of 'Dirt' DNA from soil reflects vertebrate biodiversity. *Molecular Ecology*, 21(8). doi: 10.1111/j.1365-294X.2011.05261.x
- Andersen, T., Cranston, P. S., & Epler, J. H. (2013). *Chironomidae of the Holarctic Region: Keys and diagnoses – Larvae*. Lund: Media-Tryck.
- Anderson, A. M., Stur, E., & Ekrem, T. (2013). Molecular and morphological methods reveal cryptic diversity and three new species of Nearctic *Micropsectra* (Diptera: Chironomidae). *Freshwater Science*, 32(3). doi: 10.1899/12-026.1
- Artsdatabanken. *Artsprosjektet*. Hentet 10. desember 2013 fra:  
<http://www.artsdatabanken.no/artsprosjektet>
- Barcode of Life. *What is DNA Barcoding?* Hentet 10. desember 2013 fra:  
<http://www.barcodeoflife.org/content/about/what-dna-barcoding>
- Bickford, D., Lohman, D. J., Sodhi, N. S., Ng, P. K. L., Meier, R., Winker, K.,... Das, I. (2006). Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 22(3). doi: 10.1016/j.tree.2006.11.004
- BOLD Systems. (2014). *Sequence Statistics*. Hentet 12. mai 2014 fra:  
<http://www.boldsystems.org/>
- Carew, M. E., Pettigrove, V. J., Metzeling, L., & Hoffmann, A. A. (2013). Environmental monitoring using next generation sequencing: rapid identification of macroinvertebrate bioindicator species. *Frontiers in Zoology*, 10(45). doi: 10.1186/1742-9994-10-45
- Convention on Biological Diversity. *History of the Convention*. Hentet 18. mai 2014 fra:  
<http://www.cbd.int/history/>



Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. *What is CITES?* Hentet 28. mars 2014 fra:

<http://webh01.ua.ac.be/funmorph/raoul/fylsyst/Bickford2007.pdf>

Det norske nettverket for DNA-strekkoding. (2014a). *Norwegian Barcode of Life (NorBOL)*.

Hentet 12. mai 2014 fra: <http://www.norbol.org/deltakere/>

Det norske nettverket for DNA-strekkoding. (2014b). *NorBOL blir nasjonal*

*forskningsinfrastruktur for DNA-strekkoding*. Hentet 18. februar 2014 fra:

<http://www.norbol.org/norbol-blir-nasjonal-forskningsinfrastruktur-for-dna-strekkoding/>

Disney, R. H. L. (1999). *British Dixidae (Meniscus Midges) and Thaumaleidae (Trickle Midges): Keys with Ecological Notes*, 56-67. Ambleside: Freshwater Biological Association.

Ekrem, T., & Jordal, B. H. (2005). Organismer med strekkoder: artsbestemming med DNA-sekvenser. *Naturen*, 129(4), 154-160.

Ekrem, T., Stur, E., & Hebert, P. D. N. (2010). Females do count: Documenting Chironomidae (Diptera) species diversity using DNA barcoding. *Organisms Diversity & Evolution*, 10(5). doi: 10.1007/s13127-010-0034-y

Ekrem, T., Williassen, E., & Stur, E. (2007). A comprehensive DNA sequence library is essential for identification with DNA barcodes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 43(2). doi: 10.1016/j.ympev.2006.11.021

Haile, J., Froese D. G., Macphee, R. D. E., Roberts, R. G., Arnold, L.J., Reyes, A. V.,...Willerslev, E. (2009). Ancient DNA reveals late survival of mammoth and horse in interior Alaska. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(52). doi: 10.1073/pnas.0912510106

- Hajibabaei, M., Spall, J. L., Shokralla, S., & van Konynenburg, S. (2012). Assessing biodiversity of a freshwater benthic macroinvertebrate community through nondestructive environmental barcoding of DNA from preservative ethanol. *BMC Ecology*, 12(28). doi: 10.1186/1472-6785-12-28
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & deWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *The royal Society*, 270(1512). doi: 10.1098/rspb.2002.2218
- Hebert, P. D. N., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H., & Hallwachs, W. (2004). Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(41). doi: 10.1073/pnas.0406166101
- Hirvenoja, M. (1973). Revision der Gattung Cricotopus van der Wulp und ihrer Verwandten (Diptera Chironomidae). *Annales Zoologici Fennici*, 10(1), 258-285.
- International Barcode of Life. (a). *What is DNA Barcoding?* Hentet 10. desember 2013 fra: <http://ibol.org/about-us/what-is-dna-barcoding/>
- International Barcode of Life. (b). *What is iBOL?* Hentet 10. desember 2013 fra: <http://ibol.org/about-us/what-is-ibol/>
- Miljødirektoratet. (2010). *Fremmede skadelige arter: Hva gjør vi med dem?* DN-fakta. Hentet 1. april 2014 fra: <http://www.miljodirektoratet.no/old/dirnat/attachment/1415/Fremmede%20skadelige%20arterNY.pdf>
- Norwegian Sequencing Centre. (2013). *HTS*. Hentet 15. mai 2014 fra: <http://www.sequencing.uio.no/hts/>
- Pilgrim, E. M., Jackson, S. A., Swenson, S., Turcsanyi, I., Friedman, E., Weight, L., & Bagley, M. J. (2011). Incorporation of DNA barcoding into a large-scale biomonitoring program: opportunities and pitfalls. *Journal of the North American Benthological Society*, 30(1). doi: 10.1899/10-012.1

- Plan- og bygningsloven. (2008). (2012, 10. august). *Lov om planlegging og byggesaksbehandling (Plan- og bygningsloven)*. Hentet 1. mai 2014 fra: <http://lovdata.no/dokument/NL/lov/2008-06-27-71?q=pbl>
- Ratnasingham, S., & Hebert, P. D. N. (2007). BARCODING BOLD: The Barcode of Life Data System ([www.barcodingoflife.org](http://www.barcodingoflife.org)). *Molecular Ecology Notes*, 7(3). doi: 10.1111/j.1471-8286.2006.01678.x
- Shokralla, S., Gibson, J. F., Nikbakht, H., Janzen, D. H., Hallwachs, W., & Hajibabaei, M. (2014). Next-generation DNA barcoding: using next-generation sequencing to enhance and accelerate DNA barcode capture from single specimens. *Molecular Ecology Resources*, 14(3). doi: 10.1111/1755-0998.12236
- Stein, E. D., Martinez, M. C., Stiles, S., Miller, P. E., & Zakharov, E. (2014). Is DNA Barcoding Actually Cheaper and Faster than Traditional Morphological Methods: Results from a Survey of Freshwater Bioassessment Efforts in the United States? *PLoS ONE*, 9(4). doi: 10.1371/journal.pone.0095525
- Thomsen, P. F., Kielgast, J., Iversen, L. L., Wiuf, C., Rasmussen, M., Gilbert, M. T. P., ... Willerslev, E. (2012). Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular Ecology*, 21(11). doi: 10.1111/j.1365-294X.2011.05418.x
- Wilcox, T. P., Hugg, L., Zeh, J. A., & Zeh, D. W. (1997). Molecular Phylogenetics and Evolution: Mitochondrial DNA Sequencing Reveals Extreme Genetic Differentiation in a Cryptic Species Complex of Neotropical Pseudoscorpions. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 7(2). doi: 10.1006/mpev.1996.0388

## Vedleggsliste

- a) BOLD-utfyllingsskjema, specimen data: voucher info
- b) BOLD-utfyllingsskjema, specimen data: taxonomy
- c) BOLD-utfyllingsskjema, specimen data: specimen details
- d) BOLD-utfyllingsskjema, specimen data: collection data
- e) BOLD-utfyllingsskjema, image data
- f) CCDB Record-skjema
- g) TaxonID Tree

SpecimenData\_BOLD [Kompatibilitetsmodus] - Microsoft Excel ikke-kommersiell bruk

Ark

Utskrift

Kopier

Lim inn

Hjem

Sideoppsett

Formler

Data

Se gjennom

Vising

Bytt tekst

Slå sammen og midtstill

Justering

Standard

Tall

Betinget formatering som tabell

Stiler

Celler

Format

Slett

Sett inn

Collettiler

Formater som tabell

Formateringsstiler

Autosummer

Fyll

Fjern

Sorter og Søk etter filter

Søk etter og merk

Redigering

A3RIN\_CH01

| Specimen Info Metadata |          |           |                        |
|------------------------|----------|-----------|------------------------|
| Sample ID              | Field ID | Museum ID | Institution Storing    |
| RINL_CH01              |          | NTNU-YM   | NTNU University Museum |
| RINL_CH02              |          | NTNU-YM   | NTNU University Museum |
| RINL_CH03              |          | NTNU-YM   | NTNU University Museum |
| RINL_CH04              |          | NTNU-YM   | NTNU University Museum |
| RINL_CH05              |          | NTNU-YM   | NTNU University Museum |
| RINL_CH06              |          | NTNU-YM   | NTNU University Museum |
| RINL_CH07              |          | NTNU-YM   | NTNU University Museum |
| RINL_CH08              |          | NTNU-YM   | NTNU University Museum |
| RINL_CH09              |          | NTNU-YM   | NTNU University Museum |
| RINL_CH10              |          | NTNU-YM   | NTNU University Museum |
| RINL_CH11              |          | NTNU-YM   | NTNU University Museum |
| RINL_CH12              |          | NTNU-YM   | NTNU University Museum |
| RINL_CH13              |          | NTNU-YM   | NTNU University Museum |
| RINL_CH14              |          | NTNU-YM   | NTNU University Museum |
| RINL_CH15              |          | NTNU-YM   | NTNU University Museum |
| RINL_CH16              |          | NTNU-YM   | NTNU University Museum |
| RINL_CH17              |          | NTNU-YM   | NTNU University Museum |
| RINL_CH18              |          | NTNU-YM   | NTNU University Museum |
| RINL_CH19              |          | NTNU-YM   | NTNU University Museum |
| RINL_CH20              |          | NTNU-YM   | NTNU University Museum |
| RINL_CH21              |          | NTNU-YM   | NTNU University Museum |
| RINL_CH22              |          | NTNU-YM   | NTNU University Museum |
| RINL_CH23              |          | NTNU-YM   | NTNU University Museum |
| RINL_CH24              |          | NTNU-YM   | NTNU University Museum |
| RINL_CH25              |          | NTNU-YM   | NTNU University Museum |
| RINL_CH26              |          | NTNU-YM   | NTNU University Museum |
| RINL_CH27              |          | NTNU-YM   | NTNU University Museum |
| RINL_CH28              |          | NTNU-YM   | NTNU University Museum |
| RINL_CH29              |          | NTNU-YM   | NTNU University Museum |
| RINL_CH30              |          | NTNU-YM   | NTNU University Museum |
| RINL_CH31              |          | NTNU-YM   | NTNU University Museum |
| RINL_CH32              |          | NTNU-YM   | NTNU University Museum |
| RINL_CH33              |          | NTNU-YM   | NTNU University Museum |
| RINL_CH34              |          | NTNU-YM   | NTNU University Museum |
| RINL_CH35              |          | NTNU-YM   | NTNU University Museum |
| RINL_CH36              |          | NTNU-YM   | NTNU University Museum |
| RINL_CH37              |          | NTNU-YM   | NTNU University Museum |
| RINL_CH38              |          | NTNU-YM   | NTNU University Museum |
| RINL_CH39              |          | NTNU-YM   | NTNU University Museum |
| RINL_CH40              |          | NTNU-YM   | NTNU University Museum |

Voucher InfoTaxonomySpecimen DetailsCollection Data

Antall: 9585 %

<

[illegible]

[illegible]



ImageData [Skribeskyttet] [Kompatibilitetsmodus] - Microsoft Excel ikke-kommersiell bruk

| F54 |              |                   |               |             |             |                  |           |            |                                                                 |
|-----|--------------|-------------------|---------------|-------------|-------------|------------------|-----------|------------|-----------------------------------------------------------------|
|     | A            | B                 | C             | D           | E           | F                | G         | H          | J                                                               |
|     | Image File   | Original Specimen | View Metadata | Caption     | Measurement | Measurement Type | Sample Id | Process Id | License Holder                                                  |
| 1   |              |                   |               |             |             |                  |           |            | License                                                         |
| 2   | RIN_CH01.jpg | yes               | Dorsal        | Male, adult |             |                  | RIN_CH01  |            | Mona Saurasaunet, NTNU Museum of Natural History and Archeology |
| 3   | RIN_CH02.jpg | yes               | Dorsal        | Male, adult |             |                  | RIN_CH02  |            | Mona Saurasaunet, NTNU Museum of Natural History and Archeology |
| 4   | RIN_CH03.jpg | yes               | Lateral       | Male, adult |             |                  | RIN_CH03  |            | Mona Saurasaunet, NTNU Museum of Natural History and Archeology |
| 5   | RIN_CH04.jpg | yes               | Lateral       | Male, adult |             |                  | RIN_CH04  |            | Mona Saurasaunet, NTNU Museum of Natural History and Archeology |
| 6   | RIN_CH05.jpg | yes               | Lateral       | Male, adult |             |                  | RIN_CH05  |            | Mona Saurasaunet, NTNU Museum of Natural History and Archeology |
| 7   | RIN_CH06.jpg | yes               | Ventral       | Male, adult |             |                  | RIN_CH06  |            | Mona Saurasaunet, NTNU Museum of Natural History and Archeology |
| 8   | RIN_CH07.jpg | yes               | Dorsal        | Male, adult |             |                  | RIN_CH07  |            | Mona Saurasaunet, NTNU Museum of Natural History and Archeology |
| 9   | RIN_CH08.jpg | yes               | Lateral       | Male, adult |             |                  | RIN_CH08  |            | Mona Saurasaunet, NTNU Museum of Natural History and Archeology |
| 10  | RIN_CH09.jpg | yes               | Lateral       | Male, adult |             |                  | RIN_CH09  |            | Mona Saurasaunet, NTNU Museum of Natural History and Archeology |
| 11  | RIN_CH10.jpg | yes               | Lateral       | Male, adult |             |                  | RIN_CH10  |            | Mona Saurasaunet, NTNU Museum of Natural History and Archeology |
| 12  | RIN_CH11.jpg | yes               | Lateral       | Male, adult |             |                  | RIN_CH11  |            | Mona Saurasaunet, NTNU Museum of Natural History and Archeology |
| 13  | RIN_CH12.jpg | yes               | Ventral       | Male, adult |             |                  | RIN_CH12  |            | Mona Saurasaunet, NTNU Museum of Natural History and Archeology |
| 14  | RIN_CH13.jpg | yes               | Dorsal        | Male, adult |             |                  | RIN_CH13  |            | Mona Saurasaunet, NTNU Museum of Natural History and Archeology |
| 15  | RIN_CH14.jpg | yes               | Dorsal        | Male, adult |             |                  | RIN_CH14  |            | Mona Saurasaunet, NTNU Museum of Natural History and Archeology |
| 16  | RIN_CH15.jpg | yes               | Lateral       | Male, adult |             |                  | RIN_CH15  |            | Mona Saurasaunet, NTNU Museum of Natural History and Archeology |
| 17  | RIN_CH16.jpg | yes               | Dorsal        | Male, adult |             |                  | RIN_CH16  |            | Mona Saurasaunet, NTNU Museum of Natural History and Archeology |
| 18  | RIN_CH17.jpg | yes               | Ventral       | Male, adult |             |                  | RIN_CH17  |            | Mona Saurasaunet, NTNU Museum of Natural History and Archeology |
| 19  | RIN_CH18.jpg | yes               | Lateral       | Male, adult |             |                  | RIN_CH18  |            | Mona Saurasaunet, NTNU Museum of Natural History and Archeology |
| 20  | RIN_CH19.jpg | yes               | Dorsal        | Male, adult |             |                  | RIN_CH19  |            | Mona Saurasaunet, NTNU Museum of Natural History and Archeology |
| 21  | RIN_CH20.jpg | yes               | Dorsal        | Male, adult |             |                  | RIN_CH20  |            | Mona Saurasaunet, NTNU Museum of Natural History and Archeology |
| 22  | RIN_CH21.jpg | yes               | Lateral       | Male, adult |             |                  | RIN_CH21  |            | Mona Saurasaunet, NTNU Museum of Natural History and Archeology |
| 23  | RIN_CH22.jpg | yes               | Lateral       | Male, adult |             |                  | RIN_CH22  |            | Mona Saurasaunet, NTNU Museum of Natural History and Archeology |
| 24  | RIN_CH23.jpg | yes               | Lateral       | Male, adult |             |                  | RIN_CH23  |            | Mona Saurasaunet, NTNU Museum of Natural History and Archeology |
| 25  | RIN_CH24.jpg | yes               | Lateral       | Male, adult |             |                  | RIN_CH24  |            | Mona Saurasaunet, NTNU Museum of Natural History and Archeology |
| 26  | RIN_CH25.jpg | yes               | Dorsal        | Male, adult |             |                  | RIN_CH25  |            | Mona Saurasaunet, NTNU Museum of Natural History and Archeology |
| 27  | RIN_CH26.jpg | yes               | Dorsal        | Male, adult |             |                  | RIN_CH26  |            | Mona Saurasaunet, NTNU Museum of Natural History and Archeology |
| 28  | RIN_CH27.jpg | yes               | Lateral       | Male, adult |             |                  | RIN_CH27  |            | Mona Saurasaunet, NTNU Museum of Natural History and Archeology |
| 29  | RIN_CH28.jpg | yes               | Lateral       | Male, adult |             |                  | RIN_CH28  |            | Mona Saurasaunet, NTNU Museum of Natural History and Archeology |
| 30  | RIN_CH29.jpg | yes               | Lateral       | Male, adult |             |                  | RIN_CH29  |            | Mona Saurasaunet, NTNU Museum of Natural History and Archeology |
| 31  | RIN_CH30.jpg | yes               | Lateral       | Larva       |             |                  | RIN_CH30  |            | Mona Saurasaunet, NTNU Museum of Natural History and Archeology |

**CCDB-Record [Kompatibilitetsmodus] - Microsoft Excel ikke-kommersiell bruk**

Hjem | Fil | Klipp ut | Kopier | Lim inn | Utklippsavstave | Skrift | Sideoppsett | Formler | Data | Se gjennom | Vising

Arial | 8 | A<sup>+</sup> A<sup>-</sup> | B | I | U | T | S | K | F | G | H | I | J | K | L | M | N | O

B85 | RIN\_CH84

---

## Canadian Centre for DNA Barcoding SAMPLE RECORD DATA INPUT SHEET version 4.3.1

**Select type of sampling**

iBOL theme: WG1.7 Freshwater life [Xin Zhou]

☒ Multiple array (up to 10 tube racks, microplates or blotting cards)

**microplate**

**CCDB Number**

|  |            |
|--|------------|
|  | CCDB-20210 |
|--|------------|

**Enter columnar array of CCDB numbers:  
in numerical order (up to 10 numbers)  
next cell will appear after  
you fill the previous one**

**NOTE: Use the same type of medium  
throughout the array**

Type or paste Sample ID's for your samples  
into the white cells on the left (column B)

**NOTE: Do not enter data for control tube H12**

After completing data entry, rename this file to *incorporate  
CCDB number(s) as shown here:* **CCDB-20210-20210\_Record.xls**

**Windows users: Click to auto save this file name onto your desktop (enable**

**Please ensure that your data submission meets the following criteria:**

Sample ID's are unique identifiers unambiguously linking each tissue sample with the corresponding BOLD record and collection voucher specimen

The order of Sample ID's in this CCDB record should match the position of the corresponding tubes, wells or blotting circles (refer to sample layout map on next sheet)



| 1  | Sample Locator | Sample ID |  |
|----|----------------|-----------|--|
| 2  | CCDB-20210 A01 | RIN_CH01  |  |
| 3  | CCDB-20210 A02 | RIN_CH02  |  |
| 4  | CCDB-20210 A03 | RIN_CH03  |  |
| 5  | CCDB-20210 A04 | RIN_CH04  |  |
| 6  | CCDB-20210 A05 | RIN_CH05  |  |
| 7  | CCDB-20210 A06 | RIN_CH06  |  |
| 8  | CCDB-20210 A07 | RIN_CH07  |  |
| 9  | CCDB-20210 A08 | RIN_CH08  |  |
| 10 | CCDB-20210 A09 | RIN_CH09  |  |
| 11 | CCDB-20210 A10 | RIN_CH10  |  |
| 12 | CCDB-20210 A11 | RIN_CH11  |  |
| 13 | CCDB-20210 A12 | RIN_CH12  |  |
| 14 | CCDB-20210 B01 | RIN_CH13  |  |
| 15 | CCDB-20210 B02 | RIN_CH14  |  |
| 16 | CCDB-20210 B03 | RIN_CH15  |  |
| 17 | CCDB-20210 B04 | RIN_CH16  |  |
| 18 | CCDB-20210 B05 | RIN_CH17  |  |
| 19 | CCDB-20210 B06 | RIN_CH18  |  |
| 20 | CCDB-20210 B07 | RIN_CH19  |  |
| 21 | CCDB-20210 B08 | RIN_CH20  |  |
| 22 | CCDB-20210 B09 | RIN_CH21  |  |
| 23 | CCDB-20210 B10 | RIN_CH22  |  |
| 24 | CCDB-20210 B11 | RIN_CH23  |  |
| 25 | CCDB-20210 B12 | RIN_CH24  |  |
| 26 | CCDB-20210 C01 | RIN_CH25  |  |
| 27 | CCDB-20210 C02 | RIN_CH26  |  |

Submission results | For lab use only | **DATA INPUT** | iBOL BMTA and Data Policy

