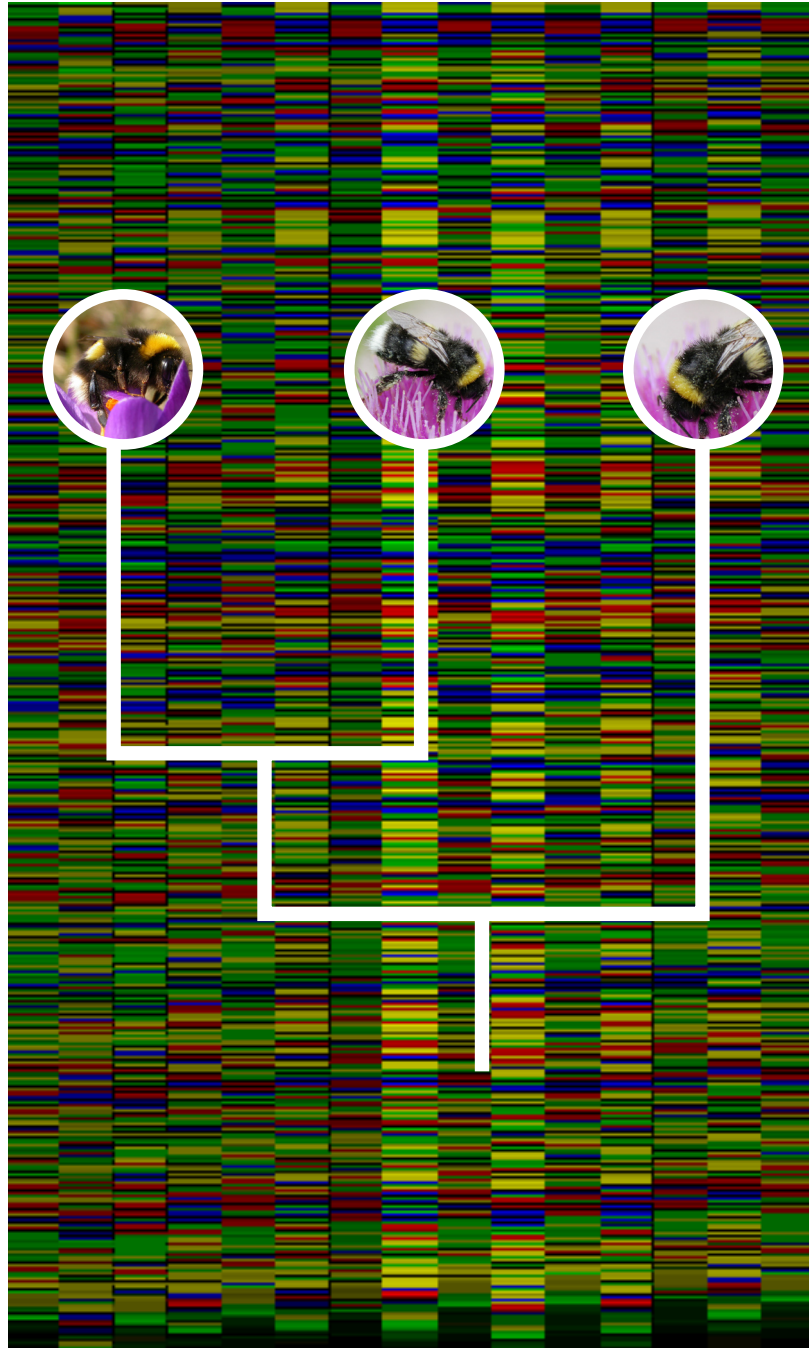


DNA-baserade metoder för taxonomisk bestämning ('DNA barcoding'): Potentiella tillämpningar för effektivare miljöövervakning.



Thomas Lyrholm
PM från Naturhistoriska riksmuseet. 2009:2



Rapportering av uppdrag 228 0706 från Naturvårdsverket

Denna rapport är resultatet av ett uppdrag till Naturhistoriska riksmuseet att utreda tillämpningen av DNA-baserade metoder för taxonomisk bestämning, främst s.k. 'DNA barcoding' ('DNA-streckkodning'), inom miljöövervakningen. I utredningen ges en bakgrund till och tekniska detaljer rörande denna teknik, inklusive dess möjligheter och begränsningar. Vidare görs en behovsanalys baserat på intervjuer med miljöövervakningshandläggare, ansvariga för utförande av delprogram och olika taxonomisk expertis. Omvärldsanalyser som visar på hur tekniken använts i olika liknande sammanhang och på olika taxa med relevans för miljöövervakningen görs också. Baserat på detta ges exempel på potentiella tillämpningar i miljöövervakningen, samt hur tekniken medger kostnadseffektiva och automatiserade lösningar i storskaliga undersökningar. Tekniken har stor potential att lösa taxonomiska bestämningsproblem som idag begränsar miljöövervakningen genom att den bl.a. medger bestämning av taxa och livsstadier som annars är svåra och resurskrävande att identifiera. Uppdraget utfördes under augusti 2007-maj 2008 (föreliggande rapport är något reviderad jämfört med rapporten till Naturvårdsverket 2008-05-31).

Förstasidans illustration: Fylogenetiskt träd ovanpå en gelbild från DNA-sekvensering: Annica Roos och Thomas Lyrholm (Naturhistoriska riksmuseet). Foto: Lars-Åke Janzon (Naturhistoriska riksmuseet).

Eventuella frågor angående rapporten besvaras av författaren:

*Thomas Lyrholm
Naturhistoriska riksmuseet
Box 50007
104 05 Stockholm*

*Telefon: 08-51954158
E-post: thomas.lyrholm@nrm.se*

Denna rapport bör citeras: Lyrholm, T. 2009. DNA-baserade metoder för taxonomisk bestämning ('DNA barcoding'): Potentiella tillämpningar för effektivare miljöövervakning. Naturhistoriska riksmuseets småskriftserie 2009:2.

ISSN: 0585-3249

DNA-BASERADE METODER FÖR
TAXONOMISK BESTÄMNING ('DNA BARCODING'):
Potentiella tillämpningar för effektivare miljöövervakning

Thomas Lyrholm
Naturhistoriska riksmuseet

En utredning för Naturvårdsverket
2008-05-31 (rev. 2009)

| | |
|--|-----------|
| SAMMANFATTNING | 3 |
| UPPDRAGET | 4 |
| BAKGRUND OCH SYFTE | 4 |
| UPPDRAGETS OMFATTNING | 5 |
| UTFÖRANDE OCH INFORMATIONSKÄLLOR | 5 |
| DNA-BASERADE METODER FÖR TAXONOMISK BESTÄMNING | 5 |
| BAKGRUND | 5 |
| <i>Effektivare taxonomiska metoder</i> | 5 |
| <i>Molekylär systematik och taxonomi</i> | 6 |
| <i>DNA baserad artidentifikation</i> | 6 |
| DNA BARCODING | 7 |
| <i>DNA markörer för taxonomisk bestämning</i> | 12 |
| <i>Globala sekvensdatabaser</i> | 16 |
| <i>Kritik och potentiella felkällor</i> | 18 |
| <i>Sammanfattning</i> | 19 |
| DNA BARCODING I MILJÖÖVERVAKNING | 20 |
| BEHOVSANALYS FRÅN INTERVJUER | 20 |
| FRÅGESTÄLLNINGAR | 21 |
| POTENTIELLA TILLÄMPNINGAR I MILJÖÖVERVAKNINGEN | 22 |
| <i>Landmiljöer (skog, fjäll och våtmarker)</i> | 23 |
| <i>Vattenmiljöer (sjöar, vattendrag, kust och hav)</i> | 26 |
| <i>Praktiska faktorer</i> | 30 |
| <i>Kostnadseffektivitet och automatisering</i> | 31 |
| REKOMMENDATIONER | 31 |
| UTVECKLINGSMÖJLIGHETER | 32 |
| APPENDIX 1 | 34 |
| METODER FÖR BESTÄMNING AV DNA SEKvens | 34 |
| <i>Preparera fram DNA ur provmaterial</i> | 34 |
| <i>Isolera rätt bit: Polymerase Chain Reaction (PCR)</i> | 34 |
| <i>Sekvensering</i> | 36 |
| ALTERNATIVA METODER | 37 |
| <i>Selektiv PCR</i> | 37 |
| <i>Kvantitativ PCR (qPCR), realtids-PCR</i> | 39 |
| <i>PCR-RFLP</i> | 39 |
| <i>Hybridiseringar på 'arrays' och dylikt</i> | 40 |
| <i>Pyrosequencing</i> | 40 |
| <i>454</i> | 40 |
| APPENDIX 2 | 41 |
| INTERVJUKÄLLOR | 41 |
| REFERENSER | 42 |

SAMMANFATTNING

Denna utredning behandlar DNA-baserade metoder för taxonomisk identifikation, främst s.k. *DNA barcoding*, och dess potential för att bidra till en effektivare och säkrare bestämning av olika taxa i miljöövervakningen.

Inom miljöövervakningen finns exempel på taxa där bestämningar till lägre nivå, främst art, vore önskvärdt och det finns också behov av att utveckla övervakningen till att omfatta fler arter och/eller organismgrupper. Olika skäl till att dessa behov inte tillfredsställs finns, däribland brist på taxonomisk expertis och effektiva, tillförlitliga bestämningsmetoder. DNA-baserade bestämningar har här en potential att bidra till utveckling av övervakningsprogrammen.

DNA barcoding är en globalt etablerad form för DNA-baserad taxonomisk bestämning vilken är organiserad inom nätverket *Consortium for the Barcoding of Life*. Standardiserade PCR-primers används för att ta fram diagnostiska DNA sekvenser för överenskomna loci från arter som bestämts med olika tekniker och organisera dessa i en referensdatabas tillsammans med belägginformation. Informationen är globalt tillgänglig över Internet och kopplas till andra biodiversitetsdatabaser. Bestämning av okända prov görs genom jämförelser av dessas DNA sekvenser med de i referensdatabasen, vilket är beroende av att inomartsvariationen är mycket mindre än divergensen mellan arter.

I utredningen ges en bakgrund till och tekniska detaljer rörande denna teknik. Vidare görs en behovsanalys baserat på intervjuer med miljöövervakningshandläggare, ansvariga för utförande av delprogram och olika taxonomisk expertis. Omvärldsanalyser som visar på hur tekniken använts i olika liknande sammanhang och på olika taxa med relevans för miljöövervakningen görs också. Baserat på detta ges exempel på potentiella tillämpningar i miljöövervakningen.

För Naturvårdsverket rekommenderas att en (eller flera) pilotstudie(r) görs på taxa som identifierats som mest intressanta för miljöövervakningen. Detta innebär att en referensdatabas med de aktuella standardiserade DNA sekvenserna byggs upp i samarbete med taxonomisk och genetisk expertis, vilket bör inkludera nödvändig belägginformation. Efter att sekvensvariationen inom och mellan de aktuella arterna kartlagts kan försök med rutinmässig bestämning av prover från DNA sekvenserna utföras. Det är av stor vikt att referensdatabasen innehåller tillräckligt många exemplar av varje art och med tillräckligt stor geografisk täckning för att ge en fullgod bild av variationen inom arter och med ett representativt taxonomiskt urval.

Utredningen ger också exempel på utvecklingsmöjligheter när DNA sekvensvariationen för de ingående taxa är väl kartlagd med utnyttjande av olika tekniker för effektivisering i bestämningsarbetet. Vidare beskrivs hur bestämningar potentiellt kan automatiseras i hög grad med dessa tekniker för ökad kostnadseffektivitet.

UPPDRAGET

Bakgrund och syfte

Miljöövervakningen syftar till att följa förändringar i miljön och följa upp av riksdagen beslutade miljö kvalitetsmål, samt uppfylla åtaganden av bevarande av miljön, naturtyper och arter som följer av EU-direktiv och internationella konventioner. För detta har olika undersökningstyper tagits fram av Naturvårdsverket (NV), vilket inkluderar bl.a. regelbunden inventering och dokumentation av olika variabler för ett antal organismgrupper. Dessa har vanligen valts ut för deras egenskaper som indikatorarter på variation i miljön, ekologisk betydelse eller av bevarandeskäl. De ingående organismerna bestäms till varierande grad av taxonomisk upplösning. Olika skäl kan finnas till att vissa taxa inte bestäms till art utan högre taxonomisk nivå, inklusive brist på behov av högre upplösning, brist på taxonomisk expertis, oklar taxonomi, resursbegränsningar och brist på metoder som kan medge mer detaljerad bestämning på ett effektivt sätt för svårbestämda arter.

En högre grad av taxonomisk upplösning samt inkluderande av fler taxa i miljöövervakningen är önskvärd av flera skäl, inte minst då ett nytt miljö kvalitetsmål för bevarande och hållbart nyttjande av biologisk mångfald infördes 2005, *Ett rikt växt- och djurliv*, i linje med internationella åtaganden i konventionen om biologisk mångfald, CBD. Uppföljning av detta mål medför betydande behov för kartläggning och kontinuerlig uppföljning av svenska arter och effektivare metoder för taxonomisk bestämning.

Naturhistoriska riksmuseet (NRM) har länge arbetat med utveckling och tillämpning av molekylärsystematiska metoder och initierade 2006 ett projekt för att ta fram standardiserade DNA sekvenser för svenska vertebrater att ingå i databaserna för ett större internationellt initiativ, *Consortium for the Barcoding of Life (CBOL)*. Detta innebär inledningsfasen på vad som vi hoppas kan bli en kontinuerlig insats i svenska laboratorier för att registrera artspecifika DNA sekvenser (DNA-”streckkoder”) för alla svenska arter (eller högre taxa där artbestämning ej är möjligt eller osäkert).

Som en följd av att denna verksamhet presenterades för handläggare vid NV gavs föreliggande uppdrag för att utreda potentiella tillämpningar inom miljöövervakningen av främst DNA-baserade tekniker men också bildigenkänning för taxonomisk bestämning. Utredningen bör också vara av intresse för vissa andra verksamheter inom NV, särskilt Naturresursavdelningens inventeringsverksamhet och Natura 2000 bevakning, samt övervakningen av invasiva arter. Tillämpning av metoderna är också användbart i andra sammanhang, såsom för tullens kontroll av handel med utrotningshotade djur och växter som regleras av CITES, rättsgenetiska undersökningar (t.ex. av illegal jakt), kontroll av innehållet i livsmedel, ekologisk forskning, m.m.

Uppdragets omfattning

Uppdraget är koncentrerat till taxonomisk bestämning inom miljöövervakningen, och molekylära metoder för tillämpning inom t.ex. fylogenetisk och systematisk forskning, populationsgenetik eller funktionella ekologiska frågeställningar utreds icke.

Vidare har p.g.a. tidsskäl utredningen begränsats till ett urval av metoder som främst är relevanta för den typ av DNA-sekvensbaserad artbestämning som i huvudsak behandlas. Exempel på möjliga tillämpningar i olika situationer och på olika typer av taxa ges, liksom en genomgång av förutsättningar för att metoderna skall vara tillämpbara. Vidare ges förslag på satsningar för att göra framsteg inom området.

Utförande och informationskällor

Behovsanalys utfördes genom intervjuer med handläggare inom den nationella miljöövervakningen på NV, samt ett urval av ansvariga utförare för några av delprogrammen och annan expertis.

Information om metoder och deras tillämpningar inhämtades genom litteraturstudier, Internet, intervjuer och egen erfarenhet.

Omvärldsanalyser utfördes främst genom litteraturstudier och Internet, samt till viss del intervjuer. Vidare deltog jag i ett symposium inför nionde partsmötet med CBD, där vetenskapliga frågeställningar kring biodiversitetsstudier diskuterades (*Biodiversity Research – Safeguarding the Future*, sponsrad av bl.a. DIVERSITAS). Av särskild relevans var ett tema kring metoder för inventering av biologisk mångfald, där DNA 'barcoding' var huvudsaklig fokus.

DNA-BASERADE METODER FÖR TAXONOMISK BESTÄMNING

Bakgrund

En mängd metoder för att undersöka olika typer av variation i DNA finns tillgå för att utföra taxonomiska bestämningar till varierande grad av upplösning och precision. Huvuddelen av denna utredning berör den mest etablerade typen av analys, som bygger på att en standardiserad bit DNA sekvenseras och jämförs med motsvarande sekvenser i en referensdatabas, men alternativa tekniker kommer nämnas kortfattat. I Appendix 1 ges en översikt och förklaring över de laborativa metoder som berörs till stöd för de läsare som inte är bekanta med dessa.

Effektivare taxonomiska metoder

Samtidigt som hoten mot den biologiska mångfalden och förlusten av arter accelererar utarmas också den taxonomiska kompetensen. Behovet av att kartlägga och följa utvecklingen

av den biologiska mångfalden är större än någonsin, men endast en bråkdel av arterna är ens upptäckta. Nya teknologier behöver således användas för att effektivisera den taxonomiska och systematiska forskningen, kartlägga den biologiska mångfalden och sprida kunskap och metoder på fler utövare. Ur detta har följaktligen växt initiativ för att samordna taxonomiska databaser med biodiversitetsinformation och utnyttja nya teknologier för artbestämning och fylogenetiska analyser baserat på t.ex. högupplösta digitalfoton och genetiska data, främst DNA sekvenser. Allt kan lätt göras tillgängligt över Internet och exempelvis finns målsättningen att upprätta digitala uppslagsverk med all relevant information för varje art, *Encyclopedia of Life* (Wilson, 2003) www.eol.org, vilket kan samordnas med biodiversitetsdatabaser som *Global Biodiversity Information Facility* (GBIF, www.gbif.se).

Molekylär systematik och taxonomi

Molekylära metoder som främst utnyttjar informationen från DNA sekvenser har blivit ett mycket viktigt verktyg i taxonomisk och systematisk forskning. Till fördelarna hör bl.a. att mycket lite material behövs för att karaktärisera arter med DNA-baserade metoder, att DNA variation (med rätt urval av sekvens) förväntas direkt avspegla släktskap, att ett mycket stor urval av karaktärer blir tillgängligt, samt att en välutvecklad teoribildning och analysmetoder finns för de molekylära evolutionära processerna som gör att fylogener kan studeras på ett kvantitativt och objektivt sätt.

I många fall har molekylärsystematiken lett till upptäckter av arter som inte kunnat urskiljas morfologiskt, till revisioner av etablerade släktskap utifrån ”traditionella” metoder (t.ex. morfologi) och ibland till nya insikter om hur morfologiska och andra anpassningar utvecklats oberoende av varandra i olika utvecklingslinjer. Men ofta har också de molekylära metoderna bekräftat vad andra metoder redan indikerat och på så sätt styrkt etablerade uppfattningar om arternas släktskap. Mycket tyder på att i många fall där inkongruens har rapporterats har detta inte testats på ett rigoröst sätt eftersom de traditionella klassificeringarna varit baserade på tolkningar (Brower *et al.*, 1996). Det finns dock fall där molekylära metoder inte förmått lösa upp diversiteten hos arter som divergerat i morfologiska karaktärer (vilket kan ha många orsaker, t.ex. unga divergenser, hybridisering, olämpligt vald DNA sekvens, m.m.). Molekylära och andra metoder, baserade på t.ex. morfologi, beteende etc., ska således inte ses i motsatsförhållande utan som komplement till varandra (Hillis, 1987), och kan i bästa fall läggas samman i en enhetlig metaanalys.

Med allt bättre analytiska metoder och allt effektivare molekylära metoder för att ta fram sekvensdata förväntas taxonomi bli alltmer DNA baserad (Tautz *et al.*, 2003; Vogler, Monaghan, 2007), men dessa data måste också tolkas i sitt evolutionära sammanhang, vilket kräver komplettering med andra typer av data och analyser (Vogler, Monaghan, 2007). För vissa organismer som med svårighet kan bestämmas utifrån morfologiska karaktärer utgör DNA sekvenser den viktigaste informationskällan för kartläggning av biodiversitet och evolutionära släktskap, och begreppet DNA taxonomi har vuxit fram (Tautz *et al.*, 2003).

DNA baserad artidentifikation

Ur den molekylära systematiken växte förslag om att DNA-baserade metoder skulle användas för att fylla behovet av effektivare artidentifikation i en tid av bristande tillgång på

”traditionella” taxonomiska experter och på så sätt skynda på kartläggningen av jordens biodiversitet (Hebert *et al.*, 2003; Tautz *et al.*, 2003)

Olika arter har olika genetiska sammansättning. För att kunna skilja på arter genom genetiska skillnader behövs metoder som utgör en balans mellan att dels vara baserat på en tillräckligt liten del av genomet för att vara praktiskt och ekonomiskt analyserbar, dels innehålla tillräcklig fylogenetisk information för att medge tillförlitlighet i bestämningarna. Andra aspekter att ta hänsyn till är att metoderna ska vara så generellt tillämpbara som möjligt och standardiserade.

Med detta som utgångspunkt har det internationella initiativet *The Barcoding of Life* tagits för att kartlägga artdiversitet genetiskt och ge förutsättningar för rutinmässig taxonomisk bestämning med DNA teknik. Detta utgör huvudtemat i denna utredning, men exempel på andra angreppssätt kommer också ges.

DNA Barcoding

The Consortium for the Barcoding of Life (CBOL) (<http://barcoding.si.edu/>) är ett internationellt nätverk för att registrera arter genom standardiserade diagnostiska DNA sekvenser och samordna detta i en databas, *Barcode of Life Data Systems* (BOLD) (Ratnasingham, Hebert, 2007) som är tillgänglig och sökbar över Internet (<http://www.barcodinglife.org>). Efter att en kanadensisk forskargrupp tagit initiativ till projektet (Hebert *et al.* 2003) har konsortiet utvecklats till ett globalt samarbete innefattande över 150 organisationer i 45 länder. Här återfinns bl.a. naturhistoriska museer (däribland Naturhistoriska riksmuseet NRM), herbarier, provbanker, och biodiversitetsarkiv, tillsammans med akademisk och kommersiell expertis i taxonomi, genomik, elektronik och datavetenskap. I Europa har nätverket organiserats inom EU:s taxonomiska nätverk *European Distributed Taxonomy Initiative* (EDIT) (se <http://www.ecbol.org/>) och en nordisk gren är också under uppbyggnad (ett första möte sponsrat av GBIF Danmark och GBIF Sverige ägde rum 2007).

CBOL har satt det ambitiösa målet att jordens alla upptäckta eukaryota arter skall vara DNA registrerade inom 20 år (Ratnasingham, Hebert, 2007). Genom unika DNA sekvenser länkat till namngivna och beskrivna arter skapas ett arkiv för effektivare artbestämning som är globalt tillgängligt och kopplat till annan biologisk information. NRM arbetar för närvarande med DNA registreringen av svenska vertebrater (över 800 arter) i projektet ”*En DNA-nyckel till alla Sveriges ryggradsdjur*” finansierat av Formas, och en av våra forskare, Doc. Per Ericson är koordinator för registreringen av alla palearktiska fåglar.

Tekniken är särskilt väletablerad på djur, men tillämpningar på andra organismer utvecklas kontinuerligt.

Hur taxa identifieras

Principen för att bestämma ett okänt exemplar är:

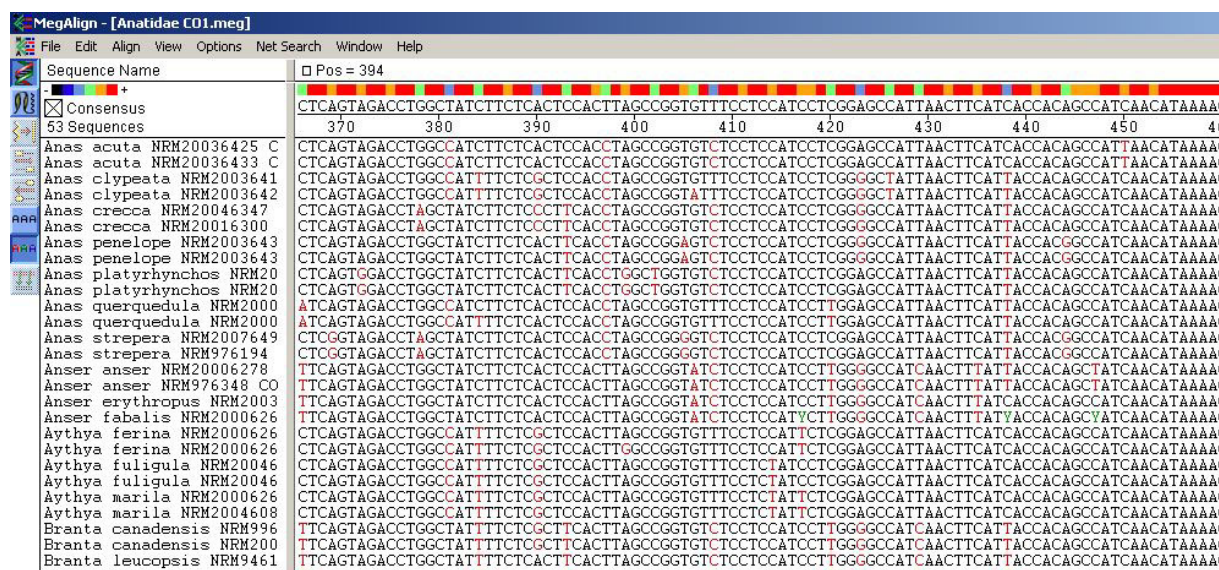
1. Ta fram DNA sekvensen för den överenskomna genen
2. Jämför sekvensen med motsvarande befintliga sekvenser i referensdatabasen över definierade taxa (vilka beskrivits med diverse metoder, inklusive klassiska morfologiska bestämningar).

- Bestäm taxonomisk tillhörighet utifrån likheten med sekvenserna i databasen. Om en exakt överensstämmelse erhålls anses arten bestämd, men om detta inte är fallet vidtar andra bedömningar enligt nedan.

Gener som är tillräckligt variabla för att särskilja närbesläktade arter uppvisar ofta också viss variation inom arten. Således är det viktigt att tillräckligt många individer, och tillräckligt stor geografisk täckning, sekvensas för varje art samt att databasen har tät taxonomisk täckning. Baserat på variationen inom och mellan arter bedöms huruvida en sekvensvariant (allel, haplotyp) som inte återfinns i databasen ska sägas representera inom-artsvariation eller falla utanför denna.

Om ingen exakt överensstämmelse finns mellan frågesekvensen och referensdatabasen används som en av flera bedömningsmetoder ofta ett tröskelvärde för sekvensskillnad för att avgöra om den undersökta sekvensen skall grupperas med ett befintligt taxon eller utgöra ett nytt taxon i databasen (för vilket ytterligare undersökningar behövs för att avgöra dess taxonomiska status).

I BOLD skapas en jämförelse (*alignment* – se Fig 1 för principen) mellan den inskickade sekvensen och de i databasen och en sökrutin används för att hitta närmaste överensstämmelse. Om denna är <1% skillnad från fråge-sekvensen anses arten identifierad (om flera taxa i databasen uppfyller detta kriterium visas alla). Om ingen överensstämmelse hittas på art-nivå, men en referenssekvens stämmer med <3% skillnad anses identifikation till släkte ha uppnåtts. I andra fall sker ingen identifikation, men information om de 100 närmaste sekvenserna presenteras i en taxonomisk hierarki (Ratnasingham, Hebert, 2007).



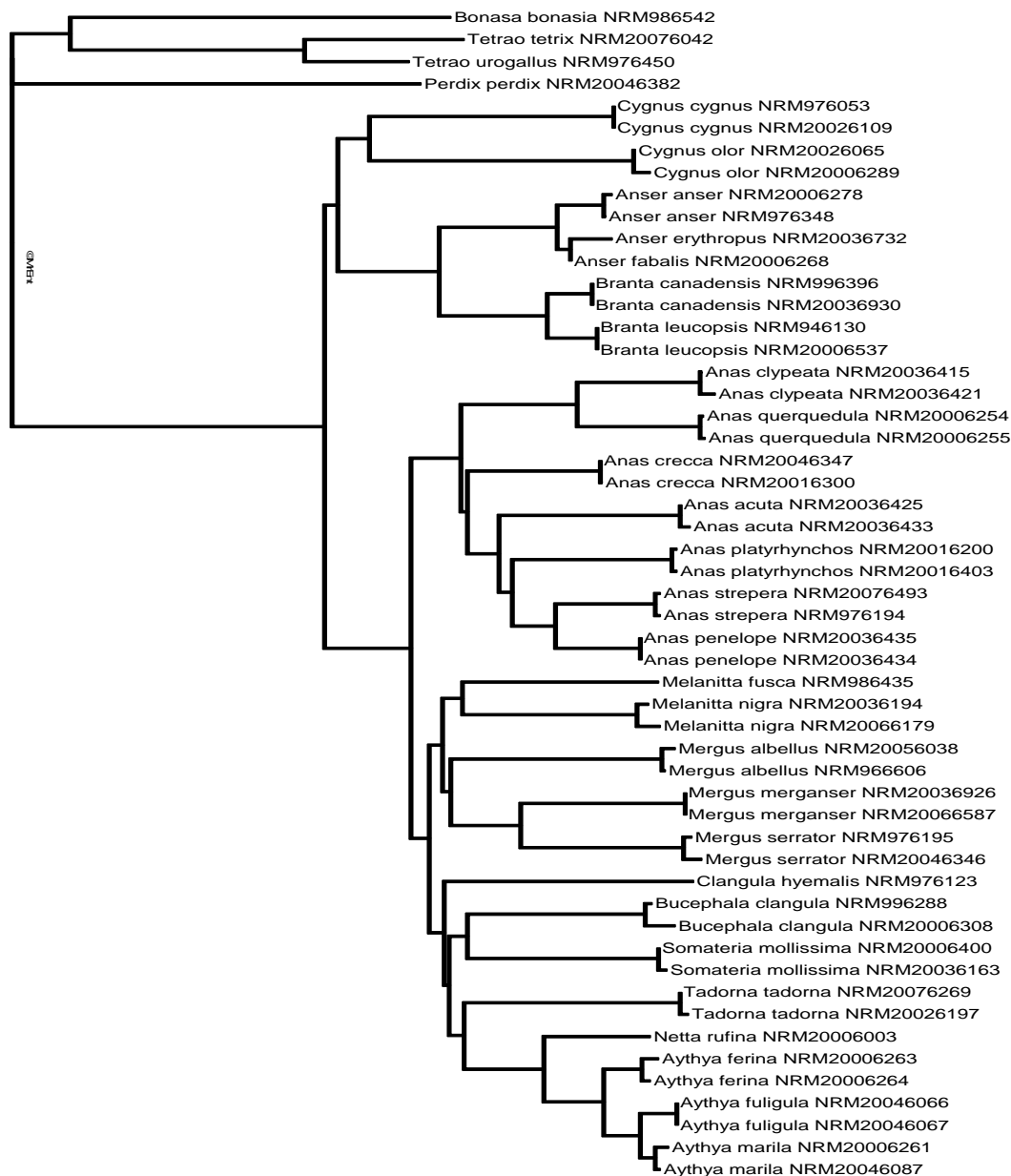
Figur 1 Exempel på sekvensjämförelse ('alignment') mellan arter av andfåglar (NRMs projekt på svenska vertebrater).

Det har också föreslagits att 10 gånger den genomsnittliga intraspecifika skillnaden skulle kunna användas som tumregel för att särskilja arter (när standardsekvensen mtDNA COI används) (Hebert *et al.*, 2003). De påpekar också vikten av att tröskelvärden utvärderas i olika regioner och taxonomiska grupper, inte minst vad gäller grupper med olika livshistorier, populationsstruktur och andra faktorer som kan påverka divergensen.

En alternativ bedömningsmetod baseras på identifiering av organismens klad-tillhörighet i en trädrekonstruktion (Fig. 2). Vanligen används distansbaserade metoder, som baseras på graden av skillnader mellan sekvenser, i exempelvis trädbyggande metoder som *Neighbor-Joining* (NJ) (Hebert *et al.*, 2003; Saitou, Nei, 1987). De distansbaserade metoderna har dock kritiserats av såväl teoretiska som praktiska skäl, och exempelvis karaktärsbaserade (DeSalle *et al.*, 2005; Rach *et al.*, 2008) och statistiska (Matz, Nielsen, 2005; Nielsen, Matz, 2006) metoder har utvecklats för att ge tillförlitligare analyser.

Likaså är användandet av tröskelvärden för att avgöra taxonomisk avgränsning kritiserad, bl.a. beroende på att problemen med överlapp mellan variationen inom arter och divergensen mellan dem underskattats och att generella tröskelvärden saknar teoretisk eller empirisk grund (Meyer, Paulay, 2005; Moritz, Cicero, 2004). Tillförlitligheten i detta angreppssätt varierar också mycket mellan olika taxa. Sannolikheterna för att på ett korrekt sätt identifiera en sekvens mellan flera närbesläktade arter är dessutom beroende bl.a. av effektiv populationsstorlek, tiden sedan artseparation och mutationshastighet, så barcoding måste ta hänsyn till de underliggande populationsgenetiska processerna (Meyer, Paulay, 2005; Nielsen, Matz, 2006).

Avgörande för metodernas tillförlitlighet är också ifall frågesekvensens art finns representerad i referensdatabasen eller ej. Detta har undersökts med simuleringar (Ross *et al.*, 2008). När den finns ger distansbaserade jämförelser av sekvensernas likhet samt trädmetoder som tillåter att frågesekvensen hamnar som syster till artens klad oftare korrekt identifikation än en strikt trädmetod som kräver att sekvensen faller inom artens klad. När däremot arten inte finns i referensdatabasen är det endast den strikta trädmetoden som ger en bra gardering emot falska positiva svar, vilken dock kräver mycket datorkraft. Detta innebär också att i den initiala fasen av barcoding-projekt skall den sistnämnda metoden användas, samtidigt som man bör vara noga med att inkludera så mycket som möjligt av inomartsvariationen i referensdatabasen. När sedan gruppens taxonomi är väl representerad kan andra metoder som kräver mindre datorkapacitet användas vid behov (Ross *et al.*, 2008).



Figur 2 Exempel på klustring av arters sekvenser i en trädanalys, från NRMs projekt på svenska vertebrater. Här jämförs andfåglar. Notera att samma arter länkas tillsammans, och de långa avstånden mellan arter jämfört med inom.

Motiveringar till DNA barcoding

CBOL för fram tio motiveringar till DNA streckkodning, vilka redovisas och kommenteras nedan:

1. *Tekniken fungerar på små delar.* DNA tekniken behöver mycket lite utgångsmaterial eftersom DNA mångfaldigas med PCR. Detta gör att känsligt material inte behöver förstöras, att arter kan identifieras från djur- eller växtdelar i t.ex. processad mat, och i produkter från handel med fridlysta arter. Vidare ger det möjlighet att studera ekologiska interaktioner genom studier av bytessammansättning i t.ex. spillning och matsmältningskanalen. Man kan också identifiera arter i svåra situationer som växtrötter eller svamphyfer i jordprover.
2. *Alla livsstadier kan identifieras.* Många arter är mycket svåra att identifiera i vissa livsstadier, t.ex. larver, ägg, pollen, etc., och där kan DNA tekniken vara den enda eller mycket enklare möjlighet till artidentifiering.
3. *Särskiljer kryptiska arter.* Genom DNA sekvenser kan arter som är mycket lika i utseende urskiljas, vilket annars kunde ha krävt särskild expertis eller t.o.m. inte upptäckts alls.
4. *Säkrare bedömningar.* DNA sekvensen fungerar som en digital identifikationskod med de fyra nukleotiderna som enheter (därav liknelsen med streckkoder) för en specifik del av genomet, vilken används objektivt och därför är mindre sannolik att feltolkas än morfologiska beskrivningar. Det är också lätt att genom databaser distribuera dessa identifikationer globalt.
5. *Spridning av expertis.* Taxonomer är experter på bara ett litet urval av jordens arter, medan artbestämningar från DNA kan användas av betydligt flera och därmed få större spridning. Detta förväntas öka registreringen av kända och upptäckten av okända arter betydligt.
6. *Demokratisering av tillgång.* Ett bibliotek av standardiserade DNA koder förväntas öka tillgängligheten på artinformation, så att fler kan identifiera arter. Å andra sidan kan användas att tekniken är så högteknologisk i jämförelse med t.ex. morfologiska karaktärer att det begränsa möjligheterna att använda dem för forskare, naturvårdare och andra i utvecklingsländer.
7. *Möjliggör elektroniska handburna artbestämningsapparater.* Konsortiet har visionen att man skall kunna bestämma DNA sekvensen i fält med handburna maskiner. Med nu tillgänglig teknik förefaller det dock avlägset (eller t.o.m. orealistiskt). Visserligen finns alltmer portabel utrustning som kan användas utanför ett vanligt laboratorium, men det är långt ifrån den handhållna ”allt-i-ett” maskin som förutspås av CBOL.
8. *Bidrar till kartläggningen av livets träd.* Genom att genetiskt karaktärisera de arter som identifierats underlättas fylogenetisk rekonstruktion av livets träd och inplacandet av nyupptäckta arter.

9. *Visar värdet av samlingar.* Insamling och katalogisering av DNA koder från världens naturhistoriska samlingar, herbarier etc. kan stärka samlingarnas betydelse i kartläggningen av biologisk mångfald.
10. *Skyndar på referensverket Encyclopedia of Life.* Artregister med DNA sekvenser kopplat till namngivna beläggsexemplar (s.k. *vouchers*) kommer underlätta allmänhetens tillgång till information och slutförandet av web-katalogen *Encyclopedia of Life* som ska innehålla en mängd information om varje art.

Tilläggas kan också att för arter där morfologisk variation p.g.a. fenotypisk plasticitet, miljöfaktorer, könsdimorfism m.m. kan vilseleda visuell identifikation är DNA bestämning ett viktigt bidrag för att öka tillförlitligheten (Birky, 2007).

De begränsade data som en kort sekvens från ett eller ett par genfragment utgör och som används i barcoding ger i allmänhet otillräcklig upplösning och tillförlitlighet för fylogenetiska analyser, men kan ingå som komplement till andra data. Den jämförande analysen av likheter och skillnader mellan arter som ingår i barcodingstudier kan dock underlätta urvalet av taxa för fylogenetiska analyser, och exemplar som inte kan hänföras till kända arter ger en indikation på att ytterligare analyser bör göras för att utreda dess taxonomiska status och släktskap (Hajibabaei *et al.*, 2007b).

DNA markörer för taxonomisk bestämning

För att möjliggöra storskalig och praktiskt tillämpbar bestämning av många taxa har man inriktat valet av markör på liten del av genomet som lätt kan användas för snabb och effektiv artbestämning.

För att en sekvensregion (t.ex. del av gen) ska vara användbar för taxonomisk bestämning enligt barcoding-principen bör den bl.a.:

1. Uppvisa liten variation inom arten i förhållande till divergensen mellan arter
2. Kunna amplifieras specifikt med generella PCR-primers för många olika taxa
3. Innehålla tillräcklig fylogenetisk information

Genom att markören standardiseras inom konsortiet kan de för undersökningarna nödvändiga referensdatabaserna byggas upp.

Djur

För molekylär taxonomi, artbestämning och systematik på djur är sekvenser från mitokondrie DNA (mtDNA) den i särklass mest använda typen av data. Barcoding-konsortiet har valt en partiell sekvens (c:a 650 baspar) av genen cytokrom c oxidas I (cox 1, eller COI) i mtDNA (Hebert *et al.*, 2003) och de föreslår att denna har potential att kunna användas generellt för alla djurarter utifrån framgångar som erhållits på många olika taxa.

Egenskaper hos mtDNA

MtDNA är en cirkulär DNA molekyl i mitokondrierna separat från övriga genomet och flera egenskaper bidrar till dess användbarhet:

1. *Hög substitutionshastighet.* Punktvisa substitutioner av nukleotider sker med flerfaldigt högre hastighet i mtDNA än i det nukleära genomet vilket ger potential för högre fylogenetisk upplösning.

2. *Haploid matrilinjell nedärvning.* Mitokondrier nedärvs (nästan) bara från modern till avkomman. Haploidi gör att det är okomplicerat att sekvensera och jämföra DNA från olika individer då man bl.a. slipper klona för att separera heterozygota alleler. Det ger också låg N_e (effektiv populationsstorlek) för mtDNA, $1/4$ i jämförelse med N_e för det nukleära genomet hos en diploid organism (allt annat lika). Den lägre N_e gör att divergenser mellan arter snabbare avspeglas i mtDNA.

3. *Avsaknad av rekombination,* vilket förenklar fylogenetisk rekonstruktion. Visserligen förekommer heteroplasm, d.v.s. olika mtDNA typer inom en individ (och cell), men varianterna är sällsynta i jämförelse med den normala, mestadels förekommande i somatiska snarare än könsceller och individbaserade DNA analyser uppvisar normalt homoplasm. Således kan man i praktiken utgå ifrån att olika delar av mtDNA genomet kommer från samma obrutna utvecklingslinjer.

4. *Enkel genorganisation* där intron, pseudogener m.m. vanligen saknas. Genorganisationen är också liknande över stora taxonomiska avstånd, med vissa undantag, vilket förenklar det experimentella upplägget. Flankerande sekvenser till olika gener är ofta tillräckligt konserverade för att generella PCR-primers kan användas för flera arter.

Det finns dock avvikelser från detta och komplikationer kan uppstå. Observationer av ett litet bidrag från fadern har gjorts i vissa fall (Ingman, Gyllensten, 2001; Kvist *et al.*, 2003), vilket kan ge upphov till viss heteroplasm. Hos en del organismer kan detta bidrag vara betydande, t.ex. musslor, och rekombination har dokumenterats (Ladoukakis, Zouros, 2001; Ujvari *et al.*, 2007). Rekombination kan kanske förklara skillnader i genorganisation mellan närstående taxa (Dowton, Campbell, 2001). Ett annat särskilt fenomen som i vissa fall kan komplicera analyser är att p.g.a. att en förflyttning av gensegment från mitokondrier till kärn-DNA är en del av den evolutionära processen så förekommer en del nukleära kopior av mtDNA gener (eller delar av dem), oftast som pseudogener (Bensasson *et al.*, 2001). Detta bör man vara uppmärksam på när man använder PCR för att kopiera en mtDNA sekvens, då risken finns att en kärn-kopia erhålls, särskilt om man inte använder mycket specifika PCR-primers (vilket t.ex. kan vara fallet när man vill studera flera arter med samma primers, eller är osäker på mållartens primer sekvens). Normalt är dock risken mycket liten av flera skäl, och man kan misstänka att så skett om t.ex. oväntat lite variation förekommer eller sekvensen avviker mycket från det som närstående arter uppvisar, samt om polymorfism uppvisas i samma nukleotidposition (ser ut som en "heterozygot"). Slutligen har påpekats att olika former av selektion påverkar mtDNA i sådan omfattning att man inte kan betrakta evolutionen som neutral i denna molekyl (Ballard, Whitlock, 2004). En intressant aspekt på detta är att eftersom generna i mtDNA är sammanlänkade i en molekyl påverkar selektion i en gen variationen i hela molekylen genom s.k. *hitchhiking*, och detta kan drivas även av indirekt selektion t.ex. från interaktioner mellan nukleära loci och mtDNA eller olika selektionsfaktorer som nedärvs främst från modern, såsom symbiontiska eller parasitiska mikroorganismer som nedärvs tillsammans med mtDNA i äggen i t.ex. flera insekter, nematoder och Arthropoder (se t.ex. (Hurst, Jiggins, 2005). Detta kan bl.a. påverka diversitet och divergens, samt ge upphov till parafyli. Exempelvis fann man att bland nio undersökta

närbesläktade *Drosophila* arter hade bara tre unika barcoding-sekvenser, vilket ansågs sannolikt bero på den symbiontiska parasiten *Wolbachia* (Hurst, Jiggins, 2005).

Generellt gäller dock fortfarande att mtDNA har stor betydelse och användbarhet i evolutionära studier på djur, och även om inkongruens mellan taxonomiska grupperingar från mtDNA och de från traditionella metoder observeras är de ovanligare än kongruens (Vogler, Monaghan, 2007). Av ovannämnda och andra skäl finns dock anledning att vara vaksam på potentiella felkällor vid användandet av mtDNA såväl i populationsstudier som i systematik, och inse att mtDNA ger en begränsad bild som inte behöver överensstämja med art- eller populationsuppdelningar, varför fler loci från den nukleära genomet bör komplettera analyserna (Ballard, Whitlock, 2004). De potentiella felkällorna är dock i de flesta fall förmodligen inte lika allvarliga för identifikationen av arter (eller högre taxa) i 'barcoding', då det inte är fråga om att rekonstruera arternas släktskap, men i vissa fall finns risk för felaktig bestämning (främst på artnivå).

En positiv egenskap rörande mtDNA är också att det finns många kopior per cell, upp till flera tusen, till skillnad från det nukleära genomet som, i en diploid art, endast har två kromosomkopior. Det gör att man mycket enklare kan få ut tillräckligt material ur även mycket små eller svårt nedbrutna vävnader.

mtDNA COI

Valet av gen i mtDNA för barcoding på djur, COI, baserades bl.a. på att studier visat att variationen inom arten är liten i förhållande till mellan arter, och att arter identifierades på ett robust sätt för många taxa med denna sekvens. Dessutom är det lätt att använda samma generella "primers" för många olika arter för att kopiera denna sekvens med PCR (modifieringar behövs dock ibland, särskilt vid byte mellan avlägsna taxonomiska grupper).

Generellt rapporteras mtDNA COI fungera väl för bestämning av många olika djurtaxa, och utifrån ett antal studier från olika taxa har >95% av arterna kunnat urskiljas (Hajibabaei *et al.*, 2007b).

Det finns dock undantag, och att basera artidentifiering på endast mtDNA COI (eller någon annan enstaka gen) är omdebatterat. I flera fall har också påvisats att ytterligare data behövs för tillförlitlig artidentifiering, och för ett antal taxa har andra DNA sekvenser visat sig vara bättre och/eller har etablerats som standard oberoende av CBOL. Exempelvis har nukleära ribosomala regioner (rDNA) använts i olika djur, t.ex. i meiofauna (Markmann, Tautz, 2005), skalbaggar (Monaghan *et al.*, 2005) och i sötvattensmusslor (Källersjö *et al.*, 2005) (i de två senare fallen erhöles också överensstämmande fylogener med mtDNA), och för valar används sedan länge mtDNA kontrollregionen och cytokrom b (Ross *et al.*, 2003). Vidare har exempelvis studier på amfibier indikerat att mtDNA 16S RNA sekvenser fungerar bättre än COI för artidentifikation (Vences *et al.*, 2005). Ett EU-projekt för att katalogisera fiskarter utifrån DNA sekvenser, FishTrace (www.fishtrace.org), där NRM ingår, har inriktat sig på cytokrom b och en del av den nukleära genen rhodopsin (Sevilla *et al.*, 2007).

Växter

Hos växter uppvisar mtDNA en mycket mer komplicerad bild, med stor variation i storlek och genorganisation, mycket heteroplasm och rekombination, variation mellan taxa i nedärvningsmönster och en långsammare evolutionshastighet på sekvensnivå. I

växtsystematiken, liksom för taxonomisk bestämning, används därför företrädesvis kloroplastens DNA (cpDNA) och vissa delar av det nukleära genomet (ofta rDNA) (Chase *et al.*, 2005; Kress *et al.*, 2005; Lahaye *et al.*, 2008). cpDNA är liksom mtDNA i djuren en haploid, cirkulär molekyl, dock betydligt större. Nedärvningen kan vara såväl matrilineell som paternell eller en kombination av dessa. Något som ytterligare komplicerar genetiken hos växter är att utbyte mellan de olika genomen i kärnan, mitokondrier och kloroplaster inte är ovanliga. Evolutionshastigheten är relativt långsam hos såväl cpDNA som mtDNA, betydligt långsammare än i mtDNA hos djur.

Det har visat sig svårt att hitta någon generellt användbar gen för barcoding i växter. För taxonomisk identifiering av landväxter, där ju hybridisering är vanligt förekommande, rekommenderas en kombination av ytterligare nukleära segment i tillägg till organellsekvenser (Chase *et al.*, 2005). Det har rapporterats att delar av plastidgenen *matK* förefaller vara generellt tillämpbar på blomväxter (Lahaye *et al.*, 2008), och ungefär 90% av arterna identifierades korrekt i den studien. CBOL-konsortiet har nyligen enats om en rekommendation att använda en kombination av plastid-loci *rbcL+matK* som standard för barcoding av växter (Hollingsworth *et al.*, 2009).

Svampar m.fl.

COI har dock inte sin användning begränsad till djur, den har t.ex. visat sig fungera bra på vissa svampar (Seifert *et al.*, 2007) och brun- och rödalger (Lane *et al.*, 2007). Den stora variationsrikedomen av svampar vad gäller bl.a. deras artbildningsprocesser och evolutionshastighet innebär dock att man inte kan förväntas hitta ett artidentifikationssystem baserat på en enda sekvensregion för alla taxa, och många praktiska problem att överföra analysystem mellan arter har rapporterats (Summerbell *et al.*, 2005). De vanligaste typerna av markörer för taxonomi i svampar är *Internal Transcribed Spacers* (ITS) i nukleärt ribosomalt DNA.

Experimentell utprovning

Generellt gäller alltså att för organismer som tidigare inte studerats i nämnvärd omfattning, eller där en etablerad barcoding-markör inte påvisats som lämplig sekvens för artidentifikation, måste man experimentera sig fram till rätt strategi, och en kombination av sekvensregioner kan vara lämpligt (Tautz *et al.*, 2003). DNA 'barcoding' är till stor del på utvecklingsstadiet vad gäller svampar.

Tabell 1. Från (Hajibabaei *et al.*, 2007b). Vanliga DNA markörer för artidentifiering

| Gene ^a | Genomic location | Number of sequences | | | |
|--------------------------|------------------|---------------------|--------|----------|--------|
| | | Animals | Plants | Protists | Fungi |
| COI-barcode ^b | Mitochondria | 195 777 | 520 | 1931 | 410 |
| 16S-rDNA | Mitochondria | 41 381 | 221 | 2059 | 285 |
| <i>cytb</i> | Mitochondria | 88 324 | 165 | 1920 | 1084 |
| ITS1-rDNA | Nucleus | 12 175 | 57 693 | 68 839 | 56 675 |
| ITS2-rDNA | Nucleus | 13 923 | 58 065 | 67 332 | 56 349 |
| 18S-rDNA | Nucleus | 21 063 | 17 121 | 32 290 | 33 327 |
| <i>rbcl</i> | Plastid | NA ^c | 30 663 | 37 328 | NA |

^a Gene abbreviations: COI, cytochrome *c* oxidase I; *cytb*, cytochrome *b*; ITS, internal transcribed spacer; *rbcl*, large subunit of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase.

^b COI-barcode statistics are retrieved from Barcode of Life Data systems (<http://www.barcodinglife.org>). Statistics for other loci are retrieved from GenBank.

^c NA, not applicable.

Globala sekvensdatabaser

BOLD

Vid en avräkning 28 maj 2008 hade drygt 400000 streckkodssekvenser från drygt 50000 beskrivna arter registrerats i CBOL-konsortiets databas *Barcode of Life Data Systems* (BOLD) (<http://www.barcodinglife.org>) (se Fig. 3). Baserat på siffror från januari kan nämnas att tillväxten för närvarande sker med c:a 72000 sekvenser per månad. Majoriteten av dessa utgörs hittills av insekter, särskilt Lepidoptera, följt av ryggradsdjur, särskilt däggdjur, fiskar och fåglar. Referensdatabasen innehåller bara kvalitetsgranskade sekvenser för de arter som finns i tre eller fler exemplar med mindre än 2% inomartsvariation, och vars taxonomi kan granskas genom länkar till beläggsexemplar.

Kingdoms of life being barcoded

Specimen Records : 545,153 Specimens with Barcodes : 400,145 Species with Barcodes : 53,009

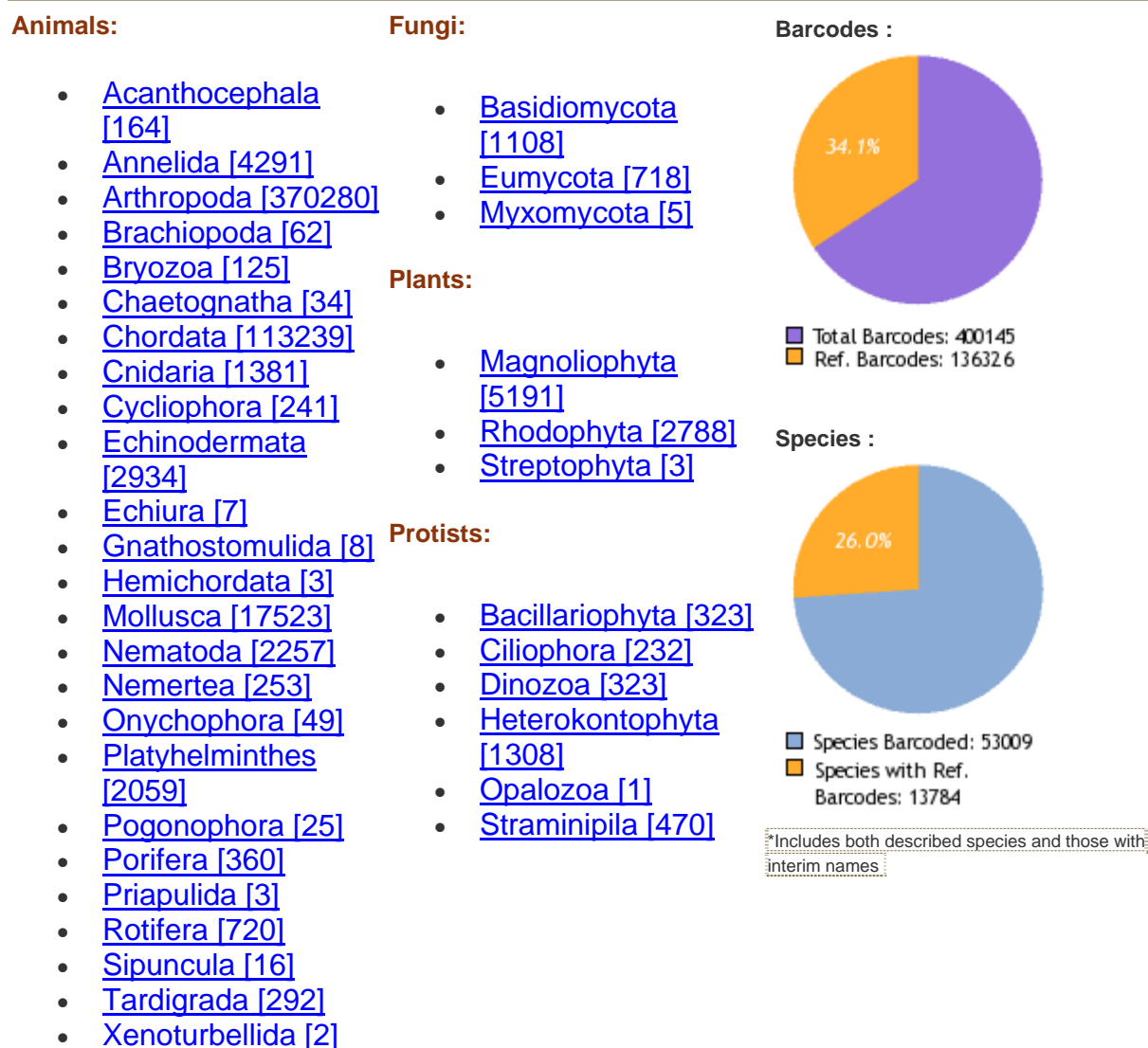


Fig 3. Översikt över taxa som återfinns med sekvenser i BOLD 28 maj 2008. © Biodiversity Institute of Ontario.

Andra sekvensdatabaser

De generellt dominerande databaserna för nukleotidsekvenser av alla slag är GenBank som administreras av amerikanska National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov), och dess europeiska och japanska motsvarigheter (EMBL resp. DDBJ, vilka dagligen utväxlar data med GenBank). DNA sekvenser för betydligt fler arter är i nuläget registrerade i GenBank än i BOLD (och sekvenserna från BOLD överförs också till Genbank). GenBanks sekvenser är dock inte i allmänhet insamlade och organiserade för

taxonomiska syften, består av en mängd olika sekvenser från diverse delar av genomen, och oftast inte med hög taxonomisk täckning (t.ex. bara från några enstaka arter inom en ordning). Följaktligen finns ingen standardiserad gen för att rutinmässigt sekvensa och söka efter i databasen för artidentifiering. Dessutom är sekvenserna oftast inte åtföljda med beläggande information om arten (*vouchers*), eller granskade vad gäller terminologi etc. Slutligen finns oftast ingen möjlighet att kvalitetsgranska sekvenserna, d.v.s. genom tillgång till rådata.

Barcoding-projektet fyller således en viktig funktion genom att det är utvecklat med artidentifikation som syfte och är systematiskt organiserat för detta. En tid efter att CBOL hade initierats ingicks också ett avtal med NCBI för arkivering av standardiserade barcoding-sekvenser i GenBank tillsammans med relevant övrig information (Savolainen *et al.*, 2005). GenBank har också infört ett särskilt identifierande nyckelord BARCODE för standardiserade barcode sekvenser. Det finns också intentioner att de taxonomiska sekvensdatabaserna skall integreras med andra biodiversitetsdatabaser, t.ex. GTI och GBIF (Savolainen *et al.*, 2005).

Systematiska sekvensdatabaser för särskilda grupper har skapats i andra sammanhang tidigare (om än i mindre omfattning), exempelvis för valar och papegojor vilket fått användning inom bl.a. övervakning av illegal handel (Ross *et al.*, 2003) <http://www.cebl.auckland.ac.nz:9000/page/gateway/title>. I dessa används mtDNA kontrollregion och cytokrom b som alternativ till COI (sedan lång tid innan BOLD initierades). Som tidigare också nämnts finns en DNA-databas över fiskarter, *FishTrace* (www.fishtrace.org) i vilken används cyt b och rhodopsin generna.

Kritik och potentiella felkällor

CBOL har fått olika typer av kritik som delvis belyser potentiella fallgropar, i andra fall verkar bygga på missförstånd.

Exempel på det senare är att barcoding kritiserats för att man inte kan utreda arternas släktskap, deras systematik, utifrån de begränsade data som en enstaka DNA sekvens utgör. Förespråkare för barcoding är överlag medvetna om detta problem och framhäver att syftet med tekniken är inte att ersätta traditionella systematiska metoder utan att utgöra ett verktyg för snabb och effektiv identifiering av arter som redan beskrivits (DeSalle, 2006; Savolainen *et al.*, 2005). Man påpekar dock att tekniken potentiellt kan underlätta upptäckten av nya arter när undersökta sekvenser inte matchar de i databasen, men för att bekräfta detta krävs ytterligare kompletterande data.

Exempel på andra typer av kritik ges nedan, vilka tar upp problem som är mest allvarliga för systematiska analyser, men som i vissa fall kan vara felkällor i artbestämning att vara uppmärksam på.

Barcoding kan ej ersätta traditionell taxonomi Artbildning är en komplicerad process med många bidragande faktorer och ett delfragment av en gen kan inte innefatta detta, medan integrerande och morfologiska studier baseras på ett antal komplexa karaktärer (Will, Rubinoff, 2004).

Genträd kontra arträd Olika delar av genomet har olika utvecklingshistoria, och särskilt i diploida eller polyploida arter består genomen av en mosaik av olika linjer (Avisé, 1994). Barcoding som baseras på ett litet genfragment från mtDNA, med en annan

utvecklingshistoria än det nukleära genomet, blir då en otillräcklig representation av arters historia och divergens. Det förekommer att mtDNA fylogener uppvisar annan bild än de från nukleära gener varför mtDNA kan ge en felaktig uppfattning av artförhållanden (Moritz, Cicero, 2004). I en översikt bland olika djurgrupper fann man att 23% av arterna uppvisade parafyletiska/polyfyletiska mtDNA linjer (Pilot *et al.*, 2006), vilket kan ha olika orsaker (som t.ex. hybridisering, ofullständig linjesortering, felaktig taxonomi, m.m.). Av exempelvis ovannämnda skäl rekommenderas en kombination av DNA sekvenser från olika delar av såväl nukleära som organellgenom (och andra typer av data) för taxonomiska utredningar och för att öka säkerheten i artbestämningar (Rubinoff, 2006; Will, Rubinoff, 2004).

Bristfälliga kriterier för arttillhörighet Att använda ett tröskelvärde i genetiska skillnader för när en provsekvens ska anses tillhöra en art i databasen eller inte är godtyckligt, utan tydlig koppling till artbegrepp, inplacering av sekvenser i distansbaserade träd ger ofta osäkra kladtillhörigheter, och de fenetiska metoderna anses sakna evolutionär koppling till artbildningsprocessen (Rubinoff, 2006; Wheeler, 2005; Will, Rubinoff, 2004). Dessutom har den s.k. ”*barcoding gap*”, d.v.s. att variationen inom arten är mycket mindre än mellan arter, i flera fall visat sig inte existera, och mtDNA linjer som är mer lika mellan närbesläktade arter än inom arten har dokumenterats (se t.ex. (Meyer, Paulay, 2005; Moritz, Cicero, 2004; Wiemers, Fiedler, 2007), och se ovan). Alternativ till de jämförande fenetiska metoderna för att avgöra sekvensernas taxonomiska tillhörighet är t.ex. karaktärsbaserade (Rach *et al.*, 2008) och statistiska (Hebert *et al.*, 2003; Matz, Nielsen, 2005; Nielsen, Matz, 2006) metoder, men ofullständig linjeseparation och parafyli kan i vissa fall alltså vara problematiska.

Unga artbildningar missas Relaterat till ovanstående är det problem som uppstår där artbildningen inte fortgått under tillräckligt lång tid för att genetiskt karaktäristiska egenskaper skall kunna detekteras, vilket dels beror på problemet med ofullständig linjesortering, och dels på mutationshastigheten i den undersökta sekvensen. Genom att utnyttja fler markörer med olika substitutionshastighet kan man dock anpassa upplösningen vid behov. Unga artbildningar är ofta också svåra att upptäcka med andra metoder, och det finns exempel på där DNA bestämningar bättre detekterar dessa divergenser.

Ej för identifikation av nya arter Barcoding kan inte avgöra taxonomisk tillhörighet för prover som inte matchas i databasen och anses därför av kritiker inte, i motsats till vad som anfördes av CBOL, kunna användas för inventering av mångfalden av nya arter (Rubinoff, 2006). Även de som anför denna kritik erkänner dock att för vissa organismer som saknar tydliga karaktärer, t.ex. olika mikroorganismer, är DNA baserade metoder oftast enda alternativet för kartläggning av mångfalden.

Sammanfattning

Barcoding baserat på väl underbyggda diagnostiska sekvenser skall ses som ett effektivt verktyg för taxonomisk identifiering, inte nödvändigtvis för fylogenetisk analys för att utreda systematiken och definiera taxa. Identifiering av arter görs utifrån redan utredd taxonomi baserat på information från olika tekniker.

En referensdatabas mot vilken undersökta sekvenser ska jämföras behöver ha tät taxonomisk täckning och omfatta variationen inom arterna som ska undersökas utmed deras geografiska utbredning.

Om taxonomisk identifiering av den undersökta sekvensen inte kan göras i referensmaterialet behövs fördjupade analyser med mer och andra typer av data för att utreda provets taxonomiska status.

Olika typer av felkällor bör tas hänsyn till och bevakas, inklusive parafyli, hybridisering och introgression, m.m., och särskilt i taxa där snabb radiation och unga artbildningar kan vara aktuella är risken för dylika felkällor störst.

Barcoding bör inte ses som synonymt med begränsningen till att använda COI som markör i enlighet med CBOL. För djur är COI en bra startpunkt, men för varje taxonomisk grupp, region etc. bör naturligtvis den mest lämpliga markören (eller flera markörer) utredas. Tillförlitligheten kan ökas genom att kombinera mtDNA och nukleärt DNA.

För dåligt utredda taxonomiska grupper kan barcoding möjligen indikera diversitet och vilka grupperingar som kan förväntas, men ytterligare data behövs för tillförlitligt utreda systematiken. Barcoding i sig själv kan inte utgöra dokumentationen av nya arter.

Ibland kan det vara fallet att den använda sekvensen inte förmår identifiera individer till art men till högre taxonomiska nivåer, t.ex. familj, släkte etc. Kostnad och arbetsinsats för att komplettera med sekvenser från ytterligare loci måste då vägas mot behovet av till vilken nivå identifikationen måste göras.

För ytterligare information om olika delar av *DNA barcoding*-verksamheten, se t.ex.:

www.barcodinglife.org

<http://www.dnabarcodes.org/>

<http://barcoding.si.edu/>

<http://phe.rockefeller.edu/barcode/blog/>

<http://www.barcodinglife.org/views/login.php>

<http://www.ecbol.org/>

<http://www.fishbol.org/index.php>

www.kew.org/barcoding

<http://www.polarbarcoding.org/>

<http://www.marinebarcoding.org/>

<http://www.cmarz.org/>

<http://www.barcodingbirds.org/>

DNA BARCODING I MILJÖÖVERVAKNING

I följande avsnitt diskuteras behov, möjligheter, begränsningar och potentiella applikationsområden inom miljöövervakningen.

Behovsanalys från intervjuer

Intervjuerna gav vid handen ett generellt intresse för utökade möjligheter till bestämning av svåridentifierade taxa och effektivisering av löpande inventeringsarbete. Dock var det inte en entydig bild av de mer precisa behoven och det var inte i alla fall som bedömningar av de ansvariga handläggarna vid NV överensstämde med synpunkterna från de som är ansvariga

för utförandet. Exempel på behov som potentiellt skulle kunna tillfredsställas med de beskrivna teknikerna ges för olika programområden.

Behoven av till vilken detaljnivå taxonomisk bestämning bör ske och omfattningen av arter som ska ingå i undersökningarna styrs i hög grad av syftet med programmen. Sålunda var en vanlig bedömning att begränsningarna inte låg i problemen med taxonomisk bestämning eftersom behovet av ökad detaljnivå var underordnat behoven för tillförlitlig kvantifiering av t.ex. biomassa, täckningsgrad etc. Vidare behöver i många fall bestämningarna utföras på plats i naturen. Andra faktorer som kan ha högre prioritet är också t.ex. möjligheten att bedöma toxiciteten i akvatiska plankton.

Icke desto mindre ansåg de flesta som intervjuats att om effektiva metoder till tillförlitlig bestämning fanns tillgängliga för mer detaljerade bestämmingsmöjligheter av viktiga taxa som idag ingår eller för utökning till nya taxa så skulle det vara ett viktigt bidrag till programmen. Det kan exempelvis röra sig om växter som är svårbedömda när de inte blommar, arter som klumpas ihop för att man inte kan skilja på dem, organismer som inte kan bestämmas visuellt utan mikroskopering, svåra livsstadier etc. Exempel på potentiella tillämpningar ges i utredningen.

Generellt är tillgången till och återväxten av taxonomer ett problem i kartläggningen och övervakningen av biologisk mångfald såväl globalt som i Sverige, vilket återspeglades i kommentarer i intervjuerna. Sålunda förekommer att svårbestämda arter måste skickas till en expert på just den gruppen, vilket kan vara utomlands, och en vanlig kommentar var också att sådana experter ofta börjar bli gamla och man ser inte att yngre förmågor kommer till.

När DNA-baserade metoder kan användas för artbestämning kan det medge effektivare rutiner utan beroende av ovan nämnda expertis. En förutsättning är dock att metodiken baseras på välgrundad taxonomi och belägginformation, och den taxonomiska expertisen behövs i detta sammanhang därför när art- eller taxaspecificiteten av de använda sekvenserna ska verifieras och dokumenteras med tillhörande information i databaser. Dessutom måste exemplar vars DNA sekvens inte återfinns i databasen eller grupperas med kända taxa undersökas närmare för att utreda deras taxonomiska tillhörighet. Sålunda kommer behovet av taxonomer alltid finnas i olika faser av bestämningsarbetet, men de molekylära metoderna medger att bestämningsrutiner i löpande övervakning till större grad kan ”automatiseras” och spridas på fler utövare.

Betydande besparingar av tid (och därmed pengar) kan nås genom att molekylära metoder kan användas relativt storskaligt för vissa material, och även i de fall där det inte är aktuellt kan det vara mer effektivt i jämförelse med tidsåtgången för att hitta rätt expert, packa och skicka material och vänta på svaret.

Frågeställningar

Vilken typ av teknik som ska användas och svårighetsgraden att lyckas med bestämningen är bl.a. beroende av problemställningen. Således finns t.ex. följande alternativa frågeställningar, vilka diskuteras mer utförligt senare:

Finns arten A? Den enklaste typen av problem är att identifiera en viss art genom att detektera en känd, artspezifisk sekvens. Förutsatt att man kan vara säker på att variationen inom arten

täcks in av undersökningen finns olika typer av teknik att tillgå, varav en del är ganska enkla. I komplexa blandprov kan det ändå vara komplicerat.

Vad är detta? Ett fynd skall identifieras genom att dess sekvens jämförs mot en databas av kända taxa. I den enklare situationen har man t.ex. en insekt för vilken man har viss kunskap om taxonomisk tillhörighet, vilket underlättar bedömningen av rimligheten i svaret. Ett svårare fall är att ha delar av en organism, ägg, etc.

Vilka arter finns här? Det mest komplicerade scenariot är att försöka identifiera så många ingående organismer som möjligt i ett blandprov, s.k. metaanalys. En total kartläggning är oftast inte möjligt, men till viss grad kan flera taxa inom en urvald organismgrupp identifieras under rätt betingelser.

För kvantitativa behov tillkommer dessutom:

Hur mycket finns av A? Kvantifiering av en urvald art kan under vissa betingelser utföras molekylärt till varierande precision.

Vad är relativa förekomsten av A, B, ... Även detta går i vissa fall att undersöka simultant molekylärt, men är mer komplicerat och kan ibland ge oförutsedda resultat.

Potentiella tillämpningar i miljöövervakningen

Utifrån intervjuundersökningarna kan följande exempel på potentiell tillämpningar av de beskrivna teknikerna ges. En heltäckande kartläggning av problemområden där fullständigare och säkrare artbestämning efterfrågas och där de föreslagna metoderna skulle kunna vara en lösning har dock inte varit möjlig inom ramen för denna utredning. För detta skulle förmodligen en samlad diskussion mellan ingående aktörer var en produktiv väg framåt, exempelvis genom en workshop, hearing e.dyl.

Generellt baseras nuvarande miljöövervakning till stor del på arter eller högre taxa som man valt ut bl.a. för att de ska vara lätta att bestämma, ofta med kravet att det ska kunna göras i fält. Bestämningar som kräver hög grad av expertis, träning och är tidskrävande undviks i allmänhet. Detta gör att programmen inte är fullständiga när det gäller övervakning av biologisk mångfald, och här finns således potential för utveckling med utnyttjande av t.ex. DNA-baserade tekniker, vilket kan underlätta uppföljning och utvärdering av miljökvalitesmål.

De här beskrivna metoderna kan också vara aktuella i olika sammanhang inom verksamhetsområdet, d.v.s antingen som effektivisering och/eller kvalitetssäkring av bestämning av nu ingående organismgrupper eller för att utvidga programmen till helt nya övervakningsverksamheter.

Olika moment inom delprogrammen har olika syften och för detta olika krav på vilka organismer som ingår och till vilken nivå de ska bestämmas.

Landmiljöer (skog, fjäll och våtmarker)

För följande organismgrupper ansågs bättre möjligheter till mer detaljerad taxonomisk bestämning vara önskvärt:

- *Kärlväxter* Synen på behovet av mer detaljerad bestämning varierade mellan de intervjuade. Det är önskvärt med mer detaljerad bestämning för vissa grupper, men det är underordnat möjligheterna till kvantifiering. Bestämningsbehovet styrs i hög grad av möjligheterna att kunna identifiera taxa i fält med samtidig mängdbedömning (täckningsgrad). Vissa kärlväxter klumpas ihop p.g.a. bestämningssvårigheter i fält, t.ex. humleblomster och nejlikrot. Det är dock relativt få kärlväxter som inte kan bestämmas till önskad nivå i fält inom NILS, och det ansågs tveksamt om de ytterligare kostnaderna för insamling, hantering etc. som nya metoder skulle kräva var motiverade överallt. Mest intressant skulle det vara i myrar, våtmarker och gräsmarker. Möjligheterna att med DNA kunna bestämma växter som inte kan identifieras när de inte blommar ansågs intressant. Bättre möjligheter att bestämma många gräs- och starrarter är också önskvärt.
- *Mossor* Här rådde samstämmighet i att bättre bestämningsmöjligheter vore önskvärt.
- *Lavar* Lavar undersöks bl.a. för att de är viktiga indikatorarter p.g.a. sin känslighet för miljöpåverkan. Detta gör också att många är hotade arter och behöver följas av bevarandeskäl, och de har viktig ekologisk funktion. De arter som inkluderas ska kunna bestämmas i fält, och svårbestämda arter bör inte plockas, vilket begränsar urvalet. DNA-metodiken skulle dock medge att man behöver ett mycket litet prov, och man skulle möjligen kunna erhålla tillräckligt med DNA genom att t.ex. gnugga ett filter mot laven utan att göra ingrepp som reducerar täckningsgraden. För många lavar är provtagningen dock komplicerad (t.ex. för att det är svårt att urskilja olika mikroskopiska lavsvampar).
- *Underjordiska svamphyfer och mykorrhiza* DNA-baserad bestämningsmetodik kan öppna möjligheter för att utvidga övervakningen till dessa ekologiska viktiga organismer, för vilket det finns få eller inga andra bestämningsmöjligheter.
- *Insekter* Ett mycket begränsat urval av insekter ingår idag i programmen, bl.a. vedlevande, jordlöpare, hopprätvingar, humlor, fjärilar och dyngbaggar. Delvis begränsas urvalet av tillgång på taxonomisk expertis och bestämningsmöjligheter, men insamlingsresurser är också begränsande. Även bland ingående insekter uppstår ibland bestämningssvårigheter, och t.ex. humlor uppges vara svåra att artbestämma. DNA-baserade metoder skulle kunna innebära möjligheter att bl.a. utöka det taxonomiska urvalet, kvalitetssäkra bestämningar och öka detaljnivån i bestämningarna. Eventuellt skulle också en effektivisering av insamlingar kunna ske då molekylära bestämningsmetoder är oberoende av utvecklingsstadium. Metoden gör det också möjligt att bestämma delar av organismer, vilket t.ex. skulle underlätta studier av mull- och vedlevande arter som lätt går sönder under insamlingen när stubbar o.dyl bearbetas. Bestämningsarbetet med traditionella metoder är här svårt och kostsamt och skulle potentiellt kunna underlättas med DNA-teknikerna. Inom NILS planerades också en utökning av studier av dynglevande insekter, vilken dock fick avskrivas bl.a. p.g.a. morfologiska bestämningsproblem och därmed förknippade kostnader.

- *Nematoder, mikroorganismer m.m.* En mängd ekologiskt mycket viktiga organismer kan svårligen eller inte alls bestämmas utifrån morfologiska karaktärer, och kräver tidsödande mikroskopiska tekniker. DNA-baserade metoder öppnar därför upp helt nya möjligheter till kartläggning och övervakning av den underjordiska biodiversiteten.
- *Vilt DNA-baserade analyser av spillning från vilt* har blivit en etablerad metodik, och olika metoder kan användas för såväl artbestämning som könnsbestämning, populationsgenetik och inventering av populationsstorlekar (Bidlack *et al.*, 2007; Flagstad *et al.*, 2004). Metoderna har rutinmässigt använts i bl.a. rovdjursövervakningen, men är generellt tillämpbara för att ta fram mtDNA sekvenser för 'barcoding' på olika viltarter. Uppskattning av populationsstorlekar använder sig av en annan metodik än den för taxonomisk bestämning. Det baseras vanligen på individspecifika DNA profiler av den alleliska variationen i korta repetitiva motiv, s.k. mikrosatelliter, från en kombination av flera loci spridda i kärn-DNA. Individbestämningen medger då populationsuppskattning genom märkning-återfångst beräkningar, studier av individuella spridningsmönster, och undersökning av identiteten av rovdjur som slagit t.ex. tamdjur, m.m., under förutsättning att datakvalitet noggrant granskas (Palsbøll, 1999; Palsbøll *et al.*, 1997; Taberlet, Luikart, 1999).

En generell kommentar var att vinsten med noggrannare eller utvidgade bestämningar måste vägas mot kostnaderna, och om ytterligare insamlingar krävs medför det hanteringskostnader och tid som minskar sannolikheten för att nya metoder införs.

Kommentarer och relevanta observationer från omvärlden

Som tidigare nämnts har det varit varierande framgång i att hitta lämpliga artspecifika DNA sekvenser för generell användning i identifikation av växtarter. Nyligen rapporterades dock att en del av plastidgenen *matK* har potential som generellt tillämpbar på blomväxter (Lahaye *et al.*, 2008). Den användes med framgång i betydligt artrikare miljöer än de svenska, och ledde bl.a. till upptäckten av flertalet kryptiska arter bland >1000 orkideer, och >90 % av arterna identifierades korrekt i studien. Med den artfattigare svenska floran bör artbestämningar kunna göras i högre grad (förutom för hybrider och apomikter) såväl med denna som andra markörer, t.ex. ITS-sekvenser (Källersjö, pers. komm.).

En arbetsgrupp för 'streckkodning' av växter har bildats inom CBOL, med en egen hemsida (www.kew.org/barcoding). Förutom arbetet med att bygga upp referensdatabasen utprovar gruppen också olika markörer för att ge generella rekommendationer.

Ett Nordiskt-Baltiskt projekt bedrivs för att samla ITS ribosomala DNA sekvenser (rDNA) för bestämning av ectomykorrhizasvampar (asco- och basidiomyceter) i en gemensam, tillgänglig databas som kallas UNITE (<http://unite.ut.ee>) (Koljalg *et al.*, 2005). Exempelvis institutionerna för systematisk botanik vid GU och för mykologi och patologi vid SLU är verksamma inom området.

En forskare vid NRM, Juan Santos-Gonzalez, använder olika molekylära tekniker för att studera diversiteten hos endo-mycorrhiza, vilka har stor ekologisk betydelse men är svåridentifierade, samt hur diversiteten påverkas genom olika miljöfaktorer och mänsklig aktivitet, såsom kvävegödsling.

Nyligen har också föreslagits, baserat på studier av *Penicillium*, att mtDNA COI, som ju är den huvudsakliga sekvensen som används för streckkodning av djur, har potential för användning även på svampar (Seifert *et al.*, 2007).

Generellt för svampar och lavar, särskilt kryptiska former, gäller dock att mycket forskning fortfarande krävs för att utreda taxonomiska förhållanden, vilket begränsar tillämpligheten av barcoding i övervakning. Vidare är det betydande provtagningsproblem (t.ex. kan individer av kryptiska underjordiska former ej särskiljas och omfattande kloning krävs). Dessutom måste man vanligen odla svampen. De molekylära metoderna är en viktig del i det utredande taxonomiska och systematiska arbetet. De kan också medge relativa mått på diversiteten relaterat till olika lokaler, påverkansfaktorer etc. Det kan också nämnas att studier vid SLU (Anders Dahlberg) visat att vad gäller ecto-mykorrhiza är synliga fruktkroppar en dålig indikator på vad som faktiskt finns under jorden associerat med rötterna.

Som en av flera partners ingår en forskare vid NRM, Lars Hedenäs, i ett planerat EU-projekt (ansökan under behandling), *PleuroEuro – Solving moss relationships for biodiversity management, biomonitoring and biological cleaning*. Projektet syftar till att ta fram lämpliga DNA-markörer för taxonomisk identifiering av pleurocarpa mossor, samt bygga upp en referenstadbaser för DNA barcoding.

Den djurgrupp som hittills dominerar i BOLD är insekter, och många studier har visat på COI-sekvensens användbarhet för artbestämning (men också ibland på svårigheter). Humlor, som ju nämndes som svåra att bestämma i miljöövervakningen, har exempelvis kunnat bestämmas och kryptiska arter upptäckas med COI (Murray *et al.*, 2008).

DNA bestämningar kunde ge bättre möjligheter att identifiera skadeinsekter på larvstadiet, och flera arter är också svåridentifierade som vuxna. Till dessa hör exempelvis ängsstinkflyn, bladlöss och andra växtsugare, långhorningar, gallmyggor, olika skalbaggar och fjärilar. Bland dåligt kända grupper med larver som är nedbrytare och lever i markskiktet kan nämnas puckelfflugor, svampmyggor och vissa gallmyggor. Parasitsteklar kan vara känsliga för miljöförändringar och intressanta ur miljöövervakningsynpunkt men är svåra att identifiera traditionellt.

Då insektfaunan utgör en så stor del av den terrestra biodiversiteten och är av stor ekologisk betydelse vore det önskvärt att övervaka fler taxa. Det s.k. Malaise-fälleprojektet som drivs av NRM med stöd av Artdatabanken är en unik satsning på insamling och bestämning av svenska insekter, och många nya arter upptäcks i det pågående bestämningsarbetet. Om detta följdes upp med att ta fram DNA-streckkoder skulle en utvidgning av övervakningsmöjligheterna för många fler taxa underlättas. En långsiktigt kontinuerlig fortsättning på fällprojektet skulle medge att följa trender i diversiteten, upptäcka invandrande arter, m.m.

Bland markorganismer är nematoder potentiellt viktiga indikatorer på markens tillstånd. Baserat på taxaspecifika sekvenser i COI eller nukleära rDNA har möjligheterna till detektion och kvantifiering (baserat på qPCR) av nematoder i komplexa blandprover påvisats, och en fördel med nematoder som indikator (jämfört med t.ex. bakterier eller svampar) är att de relativt lätt kan isoleras (Blaxter *et al.*, 2005; Holterman *et al.*, 2008; MacMillan *et al.*, 2006). Det är framförallt två ordningar, Monochida och Dorylaimida, som innehåller majoriteten av störningskänsliga familjer, och utvecklingen av DNA baserade system för effektiv bestämning

och kvantifiering av dessa (särskilt den förstnämnda) har kommit långt (Holterman *et al.*, 2008).

Bland nematoder finns också viktiga parasiter, både på växter och djur, och exempelvis insekter som blir infekterade dör. Dessa nematoder förekommer som dauerlarver i jorden tillsammans med larverna från andra, oskadliga nematoder, men olika larver kan ej skiljas från varandra okulärt, och vill man kunna bedöma risken för parasitangrepp på insektsfaunan skulle DNA bestämning behövas. Det har också diskuterats huruvida 'mördarsnigeln' (spansk skogssnigel) bör bekämpas med parasitiska nematoder, men det kan vara olämpligt att använda arter som ej finns i Sverige. Denna förekomst är dock okänd, och vill man utreda detta behöver man metoder för att bestämma dauerlarverna. Eftersom parasitiska nematoder används kommersiellt i vissa biologiska bekämpningssyften, kan DNA bestämningar vara generellt av vikt för att övervaka och följa upp ekologiska konsekvenser av sådana aktiviteter (MacMillan *et al.*, 2006).

För större maskar, vilka också i många fall är svåra att bestämma för icke-specialister, har t.ex. studier på daggmaskar visat att COI-streckkoder kan identifiera arter (86 exemplar med 28 arter från sex släkten identifierades till 100 %) (Huang *et al.*, 2007). Rotatorier och Tardigrada är också svåridentifierade, och kräver mikroskopering. DNA bestämning kunde här vara till stor hjälp, liksom för protozoer (se även kommentarer nedan rörande vattenmiljöer).

Vattenmiljöer (sjöar, vattendrag, kust och hav)

I akvatiska miljöövervakningsprogram ansågs främst nedanstående grupper vara i störst behov av säkrare och effektivare bestämningsmetoder:

- *Plankton* Såväl i marin som limnisk miljö är bristen på taxonomisk expertis särskilt begränsande för zooplankton, vilka endast ingår i begränsad omfattning i dagens miljöövervakning. Även fytoplankton är ofta svårbestämd. Bestämningar med traditionella metoder är särskilt svåra för nano- och picoplankton och DNA-baserade metoder kan här vara särskilt effektiviserande. För plankton är också behoven och potentialen störst vad gäller utveckling av automatiserade metoder för storskaliga material.
- *Bentiska evertebrater* Olika synpunkter framkom vad gäller bentiska evertebrater, och bl.a. ansågs det tveksamt om vinsten med molekylära bestämningsmetoder skulle vara så stor då en stor del av kostnader och tid går åt till själva provtagningen, sällning och hantering. Å andra sidan framgår av bedömningsgrunderna för marina mjukbottensamhällen att det är av stor vikt att bestämningarna görs till lägsta möjliga nivå, och särskilt *Hydrobia*, *Oligochaeta* och *Chironomidae* framhålls som svårbestämda med traditionella metoder (för samtliga dessa har 'barcoding' utprovats).
- *Rotatoria* Det framgår av handledningarna till undersökningstyperna för djurplankton att hjuldjur ofta är svåra att bestämma och behöver mikroskoperas, vilket är en tidskrävande process.

- *Protozoa* ingår i begränsad omfattning p.g.a. bestämmingssvårigheter, vilket också gäller många andra encelliga organismer (se äv. plankton ovan).
- *Cyanobakterier* Metoder som medger effektivare och säkrare bestämning av cyanobakterier vore önskvärt, särskilt om det leder till att undersökningar kan göras med större täckning geografiskt, i djupled och över tid (i dagsläget görs stora extrapolationer).
- *Invasiva arter* Metoder för tidig upptäckt av spridningen av främmande arter som kan vara potentiellt skadliga efterfrågas.
- *Musslor* kan oftast bestämmas i adulta stadier, men för larver och juveniler kan det vara svårt eller omöjligt att göra visuellt. Då det är viktigt att bedöma spridningsmönster av musslor, såväl skyddsvärda, t.ex. flodpärlmussla, som invasiva arter (t.ex. kinesisk dammussla), kan molekylära metoder för identifikation av svårbestämda stadier vara välkomna (Källersjö *et al.*, 2005). Vid NRM har exempelvis DNA-kodning på glochidier utförts (Källersjö *et al.*, 2005), vilket möjliggör studier av spridning via fisk.
- *Barlastvatten* Många av de invasiva arter som kommer till våra vatten transporteras med fartygens barlastvatten. Molekylära metoder skulle potentiellt kunna användas för att undersöka förekomsten i tankarna för utökad riskbedömning.
- *Miljöbetingad morfologisk variation* Ett problem som nämndes var att bestämningar ibland kan vilseledas av att morfologisk variation kan induceras av miljöförändringar. I exempelvis *Bosmina* misstänks många av varianterna bero på miljö snarare än artbildning, och DNA-baserade metoder har här hjälpt till att påvisa detta.
- *Kryptiska taxa* Likartat utseende hos närstående arter som därför riskerar felaktigt bestämmas som samma är också ett problem, och *Daphnia* gavs som ett exempel där DNA-baserade metoder bör underlätta bestämningen.
- *Sällsynta arter* Bättre möjligheter att upptäcka sällsynta arter efterfrågas, vilket t.ex. kan göras med DNA-baserade metoder även i blandprov där den eftersökta arten är i liten minoritet.
- *Mikroorganismer* En stor del av biomassan och ekologiskt viktiga funktioner utgörs av bakterier och andra mikroorganismer, vilket förbises i dagens miljöövervakning. Molekylära metoder för storskalig kartläggning och uppföljning av samhällenas sammansättning vore mycket värdefullt.

Många andra egenskaper som ska bedömas inkluderar t.ex. äggförekomst, biomassa, livsstadier, storlek etc., och därför är inte artbestämning i sig oftast tillräckligt (vilket även gäller många övervakade landorganismer). DNA-baserade metoder kan följaktligen inte ersätta visuell inspektion i många fall, men kan komplettera vid svåra bestämningsproblem.

Eftersom PCR-amplifiering inte diskriminerar levande och dött material (om det senare inte är för nedbrutet) är andra tekniker viktiga för att följa beståndsutveckling, t.ex. kan man använda FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*- en hybridisering till känd DNA sekvens direkt på

kromosomen i levande celler) tillsammans med mikroskopering för att bestämning av planktonalger (Gorokhova, muntlig information).

Generellt anges i handledningarna tillgång till taxonomisk expertis och felaktigheter i bestämmingslitteratur som ett problem. Vidare behöver interkalibreringar göras t.ex. mellan olika länders undersökningar runt Östersjön. Här skulle DNA-baserade bestämningar kunna underlätta kvalitetssäkringen.

Klassiska metoder, t.ex. Uttermöhl, för plankton, vilket används i övervakningen, uppges ha stora brister och missar mycket av de små fytoplankton. Samtidigt är det viktigt att ta hänsyn till den långsiktiga kontinuiteten och jämförbarheten över tid och rum i undersökningsmetodik. Exempelvis utgör HELCOMs undersökningsprogram en bas sedan många år i de olika ländernas övervakningsprogram runt Östersjön. Följaktligen är det inte lämpligt att helt ersätta vanligt förekommande undersökningsmetoder med nya molekylära, utan snarare komplettera dem.

Kommentarer och relevanta observationer från omvärlden

Det 11:e internationella Rotifera-mötet diskuterade särskilt 'barcoding' och man ansåg bl.a. att DNA teknik visat sig vara ett effektivt instrument för att bestämma hjuldjur och att upptäcka kryptiska arter, samtidigt som man pekade på vikten av att tillgängliggöra belägginformation med sekvenserna (foton, teckningar, videos etc.), och att nå enighet om artbegrepp (Birky, 2007).

Eftersom DNA analyser är oberoende av utvecklingsstadium är det ett utmärkt instrument för att spåra spridningen av olika organismers larvstadier. Som exempel kommer snart alla svenska fiskar vara karakteriserade i 'barcoding' (genom NRM:s projekt inom barcoding och FishTrace) och studier av spridningen av olika yngelstadier underlättas. Intressanta möjligheter är t.ex. att kvantifiera rekryteringsframgång från ägg till vuxen fisk (vilket kan relateras till miljöfaktorer, predationstryck etc.). Se också 'fiskgrenen' av CBOL, *The Fish Barcode of Life Initiative* (www.fishbol.org).

Många marina arter kan i inventeringar inte artbestämmas p.g.a. kryptisk morfologi och/eller brist på tillgång till taxonomisk expertis, bl.a. nematoder, plattmaskar och nemertiner, och i dessa grupper bör DNA bestämning utgöra ett viktigt bidrag (Schander, Willassen, 2005). Den satsning på inventering av marina arter som nu görs i svenska vatten i Artdatabankens regi kunde eventuellt kompletteras med uppbyggnaden av DNA barcoding referensdatabaser med belägginformation för utvalda taxa.

Stora internationella insatser görs nu för att utveckla DNA barcoding för marina organismer som en del av kartläggningen av marina biodiversiteten, exempelvis i *Census of Marine Life* (<http://www.coml.org/>), vari ingår bl.a. olika barcoding projekt (samordnat med CBOL) under benämningen *Marine Barcode of Life* (<http://www.marinebarcoding.org/>), och ett delprogram som kan nämnas är barcoding på zooplankton (<http://www.cmarz.org/barcode.html>).

Inom det europeiska nätverket för studier av marin biodiversitet, MARBEF (www.marbef.org) ingår delar av relevans för DNA baserad bestämning av marina organismer, främst inom mikrop planktonprojektet MARPLAN (<http://www.marbef.org/projects/marplan/index.php>).

Det är stort behov för bättre metoder att karaktärisera och kvantifiera nano- och picoplankton, vilka är av stor ekologisk betydelse och utgör bas i näringskedjan, men i stort är okarakteriserade. Johan Wikner och Agneta Andersson, Umeå universitet, ingår i en internationell BONUS-ansökan som genom att utnyttja de senaste sekvensteknologierna, vilka lämpar sig särskilt väl för storskaliga kartläggningar av miljöprover, syftar till att utveckla kvantitativa PCR-metoder för detektion och uppföljning av populationscykler i dessa organismer.

Ett EU-finansierat konsortium, "Fish and Chips", syftar till att ta fram artspecifika DNA sekvenser och använda dessa för att konstruera "mikroarrayer", vilka simultant kan detektera tusentals varianter, för identifikation av arter av europeiska fiskar, fytoplankton och evertebrater (se <http://www.fish-and-chips.uni-bremen.de/PostNuke/html/>).

Snabb detektion och i vissa fall kvantifiering kan vara särskilt viktig när det gäller invasiva eller toxiska arter, och artspecifika DNA-tekniker används alltmer (för en översikt, se (Darling, Blum, 2007)). Exempelvis har kvantitativ realtids-PCR (qPCR) använts för att detektera och kvantifiera toxiska dinoflagellater av släktet *Alexandrium* (Galluzzi *et al.*, 2004) och planktonalgerna *Chatonella subsalsa* samt *Heterosigma akashiwo* (vilka dödar fisk och vars toxiner kan vara hälsovådliga för människor) (Coyne *et al.*, 2005).

En workshop hölls på Kristinebergs Marinbiologiska Station 2005 för att jämföra och interkalibrera såväl klassiska som molekylära tekniker för identifiering och kvantifiering av fytoplankton (Godhe, *et al.*, 2007). Jämförelsen med qPCR är dock något oklar då 'logistiska problem' nämndes med försöket – för ytterligare information kontakta anna.godhe@marinecol.gu.se.

Marina invasiva arter transporteras ofta med barlastvatten. Specifik detektion av den invasiva och toxiska dinoflagellaten *Gymnodinium catenum* i Australien i såväl barlastvatten som i havsvatten, även vid mycket låga koncentrationer, visar på potentialen i denna teknik för övervakning och tidig varning (Patil *et al.*, 2005).

Ett annat exempel på detektion av en invasiv art med DNA teknik: Elena Gorokhova (Stockholms universitet) har genom användning av artspezifisk PCR (där alltså primers utformats för att endast amplifiera målarten) kunna påvisa den invasiva hinnkräftan *Cercopagis pengoi* i magen på zooplankton i Östersjön vilket visar att den integrerats som byte i ekosystemet (Gorokhova, 2006). Ytterligare utveckling av DNA baserad teknik för detektion av främmande arter i Östersjön är planerad inom en BONUS-ansökan där Dr. Gorokhova ingår.

DNA-bestämningar är generellt alltmer tillämpade för att studera diet hos predatorer (Kingston, Rosel, 2004).

Vad gäller limniska zooplankton har *Svenska zooplanktonprojektet* gjort en omfattande kartläggning av kvantitativa djurplanktonundersökningar som gjorts i Sverige (Persson, Svensson, 2004) och en taxonomisk redogörelse är under utarbetande. Detta kan vara ett viktigt underlag ifall en satsning på DNA barcoding av limniska djurplankton planeras.

Praktiska faktorer

Konservering, preparering av DNA och PCR

Det finns olika typer av sätt att ta till vara prover för DNA analys som samlats in i fält. Generellt är det inte särskilt kritiskt för de analysmetoder som beskrivs här om analyserna sker inom rimlig tid (någon månad). Exempel på konservering:

- Frysning är alltid bra där det går
- Etanol $\geq 70\%$ fungerar bra på djur (vid lång förvaring kan dock pH förändring ge problem)
- Torkning med Si-gel
- Även lufttorkning för vissa prover (t.ex. växtdel kan skickas i ett rör, en skottspets från mossa i ett kuvert etc.). Det är viktigt undvika att provet blir fuktigt och möglar.
- mättad koksaltlösning med 20% DMSO (djurvävnader)

Formalin bör undvikas!

För beläggexemplar, vilka är nödvändiga vid uppbyggnaden av en referensdatabas, är konserveringskraven striktare och följer etablerade riktlinjer.

För vissa organismer, t.ex. växter, kan man också använda ett särskilt Whatmanfilter som genom gnuggning får lite celler, och filtret kan stoppas i ett kuvert och skickas till laboratoriet. Filter kan också användas för att suga upp lite blod från ett djur. Andra enkla redskap kan t.ex. vara tandpetare. Således är ofta kostnaden för själva provtagningsproceduren obetydlig.

De minsta organismerna kan kräva särskilda extraktionsmetoder. Exempelvis rapporterades (Birky, 2007) att vanliga spinkolumner (t.ex. QiaGen) fungerade dåligt på enstaka hjuldjur (fler individer behövs), medan Chelex fungerar bättre. Chelex är däremot sämre för långtidsförvaring.

Jämförelser vid preparering av DNA för analys av jordlevande nematoder visade att såväl isolerade individer som analys av totalt DNA från jordprov fungerade väl i bestämning och kvantifiering med qPCR (MacMillan *et al.*, 2006), men jordprovet fick inte vara under 1 g. Helst skulle jordprovet vara omkring 10 g. Att tänka på vid amplifiering av DNA från miljöprover är också att man kan få upp såväl levande som döda individer, då DNA från de senare finns kvar i analyserbart skick en tid efter att djuren dött. Detta kan följaktligen vilseleda analyser som är inriktat på att bara bestämma levande individer.

Ett relaterat problem är också att med generella primers kan det finnas risk i vissa fall att analyserna av samlingsprover (miljöprover) kompliceras av att byten som finns i tarmkanalen på konsumenter amplifieras samtidigt. Detta är inte så problematiskt om man isolerat målorganismer och vet vad man förväntar sig (det kan t.o.m. vara intressant information då om bytesval), men i samlingsprov kan det kanske leda till felaktiga slutsatser om vad som finns levande i provet.

Kostnadseffektivitet och automatisering

Det är inte möjligt i nuläget att ge en kvantitativ jämförelse mellan kostnaderna för bestämningar baserat på DNA barcoding och relaterade tekniker och de som 'traditionellt' används (såsom visuella bestämningar utifrån morfologi, m.m.). Det är många faktorer som påverkar olika typer av situationer, såsom provmängder, typ av organism, provmedium, vilken taxonomisk nivå är önskvärd, tidsåtgång för manuella metoder etc., vilket inte går att uppskatta utan mer specifika kravprofiler. Däremot kan några generella observationer göras.

Att sekvensera ett prov för att ta fram en sekvens för DNA barcoding, från DNA extraktion till färdig sekvens, kostar omkring 40-100 kr beroende på val av metoder och komponenter (i Sverige – det är billigare att skicka till Korea).

Men till skillnad från manuella metoder (t.ex. visuella bestämningar i mikroskop) ökar inte kostnaderna linjärt med antal prover. Vid högre grad av automatisering ges större kostnadsbesparingar. Med DNA-baserade tekniker kan största delen av processen automatiseras, och eftersom personalkostnader vanligen är största kostnadsmassan i Sverige kan storskaliga DNA tekniker leda till kostnadsbesparingar. Även om inte robotar används för automatisering (se nedan) kan ett antal prover processas parallellt genom användning av multipipetter (vanligen åtta eller tolv samtidiga pipetteringar). Vid automatisering och mindre reaktionsvolymmer kan kostnaderna per prov åtminstone halveras.

Det vanligaste formatet för att strömlinjeform DNA-analyser är att 96 prover behandlas samtidigt i mikrotiterplattor (men maskiner för 384 prover finns och utvecklingen går mot över 1000). Genom robotisering kan närmare 100 prover således processas på i stort sett samma tid som ett prov skulle ta. Dessutom är dessa processer billigare i förbrukningsvaror, då större inköp blir billigare, och reaktionsvolymmer kan minskas. En annan fördel med automatisering är att risken för felpipetteringar (och därmed förväxling av prover) elimineras.

För vissa typer av organismer är automatisering av DNA extraktioner möjligt (t.ex. mikroorganismer, små maskar, plankton m.m.), men för andra, med mer svårnedbrutna vävnader (t.ex. blomväxter eller djurhud) som kräver mer mekanisk bearbetning är detta svårare.

DNA-analyserna är som mest fördelaktiga kostnadsmissigt när det gäller små och svåridentifierade organismer som t.ex. kräver preparering och mikroskopering för identifikation.

Det bör också nämnas att utvecklingen av teknologierna för DNA analyser går mycket snabbt, med ständigt nya sekvenseringsteknologier som dramatiskt ökar kapaciteten samtidigt som kostnaderna minskar.

Rekommendationer

Naturvårdsverket bör utföra en pilotstudie i DNA 'barcoding' för ett urval av taxa intressanta för miljöövervakningen, vilket kommer kräva att en referensdatabas med standardsekvenser byggs upp av taxonomiskt identifierade individer, inklusive beläggsexemplar. För vertebrater kommer snart en sådan finnas färdig, men för de flesta andra organismer får man börja från grunden.

För att underlätta utförandet bör urvalet av de organismer som ska ingå i en sådan studie bl.a. utgå ifrån att närbesläktade organismer studerats och visat sig fungera med överenskommen standardmarkör för 'barcoding' och finns i referensdatabas, att taxonomisk expertis finns tillgänglig för identifikation och att de ingående taxa identifierats som prioriterade för bestämning i miljöövervakningen.

För mer omfattande implementering i miljöövervakningen krävs långsiktigt arbete med att bygga upp referensdatabaser över prioriterade taxa.

Det är av stor vikt att vid uppbyggnaden av referensdatabaser tillräckligt många individer och tillräckligt stor geografisk täckning ingår för varje art för att kartlägga inomartsvariationen. Det är också viktigt med ett representativt taxonomiskt urval.

För att enas om prioritering av taxa aktuella för DNA 'barcoding' kan det vara lämpligt att arrangera en 'workshop' med utövare och handläggare inom miljöövervakningen samt övriga berörda, inklusive taxonomer och molekylärsystematiker.

Utvecklingsmöjligheter

När DNA 'barcoding' visat att ett antal arter (eller högre taxa) av intresse kan identifieras på ett robust sätt och deras karaktäristiska sekvenser kartlagts, kan vidareutveckling ske genom applicering av andra tekniker.

'Screening'

Olika typer av snabba karteringar kan ske genom att man tillverkar art (taxa) specifika detektionssystem baserat på t.ex. prober som används i kvantitativ realtids-PCR (qPCR) för att detektera och kvantifiera förekomst eller genom syntetisering av specifika oligonukleotider som immobiliseras på 'mikroarrayer' för simultan detektion av många taxa.

Det har visat sig att för taxa där robusta 'barcodes' påvisats är det också möjligt att uppnå goda bestämningsmöjligheter från betydligt kortare fragment av barcodingsekvensen, omkring 50-150 baspar, vilket underlättar konstruktionen av högpresterande mikroarrayer (Hajibabaei *et al.*, 2007a).

'Miljösekvensering' med nya teknologier

Ett område på starkt tillväxt är s.k. 'environmental sequencing' eller miljösekvensering, där totalprov från t.ex. vatten eller ett jordprov sekvenseras för bestämning av ingående taxa (Blaxter *et al.*, 2005). Den nya sekvenseringsplattformen 454 från Roche (se <https://www.roche-applied-science.com/sis/sequencing/index.jsp> och (Margulies *et al.*, 2005)) har öppnat upp helt nya möjligheter inom detta område. Tekniken bygger på s.k. emulsions-PCR och pyrosekvensering (det sistnämnda uppfanns på KTH, se (Ronaghi *et al.*, 1998)) i picotiterplattor, vilket bl.a. innebär att DNA-templaten binds som enskilda molekyler till mycket små kulor som hamnar i separata brunnar, där de sekvenseras genom syntes. Tidigare när man skulle sekvensa miljöprover var man tvungen att göra omfattande kloning av fragmenten för att skilja ut de olika sekvenserna som representerar olika individer, men detta behöver man nu inte göra eftersom de enskilda molekylerna i varje brunn analyseras separat.

Tekniken ger dock bara korta sekvenser, upp till omkring 100-200 baspar. Följaktligen behöver barcoding-fragmenten anpassas (liksom för mikroarrayer ovan). Vanligen är det inte möjligt att analysera långa fragment i nedbrutna prover, varför tekniken är lämplig för prover av sämre status. Tekniken ger en mycket omfattande täckning, och över 100 000 sekvenser kan erhållas i en körning (av vilka många blir duplikat).

Vid biodiversitetskonferensen *Biodiversity Research – Safeguarding the future* i Bonn presenterade den franske forskaren Pierre Taberlet ett par studier som demonstrerade möjligheterna med denna teknik. Bland annat berättade han om hur tekniken, som är mycket känslig, kunde användas för att detektera DNA i vattenprover i våtmarker där grodor vistas, d.v.s. detekterbart grod-DNA fanns löst i vattnet (Ficetola *et al.*, 2008). Vidare visade han hur de genom att utnyttja en kortare sekvens för barcoding av växter (en del av kloroplastens trnL (UAA) intron) kunde analysera dieten i björns spillning och identifiera en mängd växtarter samtidigt (Valentini *et al.*, 2009). Ytterligare ett fascinerande projekt var att med samma teknik och barcoding-markör detektera ett antal växtarter samtidigt från jordprover i permafrost utan synligt växtmaterial, vilket antas representera flertusenårigt material.

Utrustningen för dessa analyser är dyr och kraven stora på lokaler och kompetens, varför det i nuläget är bäst att låta de laboratorier som har erfarenhet av tekniken utföra analyserna (t.ex. KTH). Tekniken utvecklas dock fortfarande, och längre sekvenser är inom räckhåll, liksom billigare analyser. Även om en körning är ganska dyr (ett par tiotal tusen kronor) är totalkostnaden per reaktion billigare än vanlig sekvensering. Sammanfattningsvis kan tekniken användas för storskalig taxonomisk bestämning av många taxa samtidigt i miljöprov (ett intressant projekt att följa blir t.ex. det som tidigare nämndes planeras utföras av bl.a. Johan Wikner/Agneta Andersson och partners för att med bl.a. denna teknik kartlägga nano- och picoplankton i Östersjön, föremål för en BONUS-ansökan).

Appendix 1

Metoder för bestämning av DNA sekvens

En mängd tekniker finns för att ge snabba, tillförlitliga identifieringar av variation i DNA sekvens. Ett urval av metoder mest relevanta för det aktuella området beskrivs nedan.

De olika presenterade teknikerna kräver olika hög grad av specialistkompetens. Ingen av metoderna kan dock användas på ett tillförlitligt och kvantitativt sätt utan någon som helst erfarenhet av laborativa DNA analyser.

Preparera fram DNA ur provmaterial

Det första steget när man har erhållit ett prov av en organism är att DNA skall renas ur provet, d.v.s. cellrester, proteiner m.m. som kan påverka senare analyser skall avlägsnas och DNA isoleras i ren form. Först bryts vävnads materialet ned genom t.ex. inkubering under värme i särskild buffertlösning med tillsatts av vävnadsnedbrytande enzym, som proteinas K. Därefter renas blandningen, vilket traditionellt vanligen har utförts genom stegvis tillsatser av fenol, kloroform och etanol/salt. Detta är fortfarande en vanlig metod som är förhållandevis billig och ger bra resultat. Eftersom detta dock innebär användning av hälso- och miljöskadliga organiska lösningmedel och är relativt tidskrävande är det numera allt vanligare att alternativa metoder används, och kommersiellt framtagna satser är robusta, användarvänliga och prisvärda. Beroende på hur svårnedbrytbara materialen är kan renat DNA erhållas efter ett par timmar, eller i svåra fall ½-1 dygn.

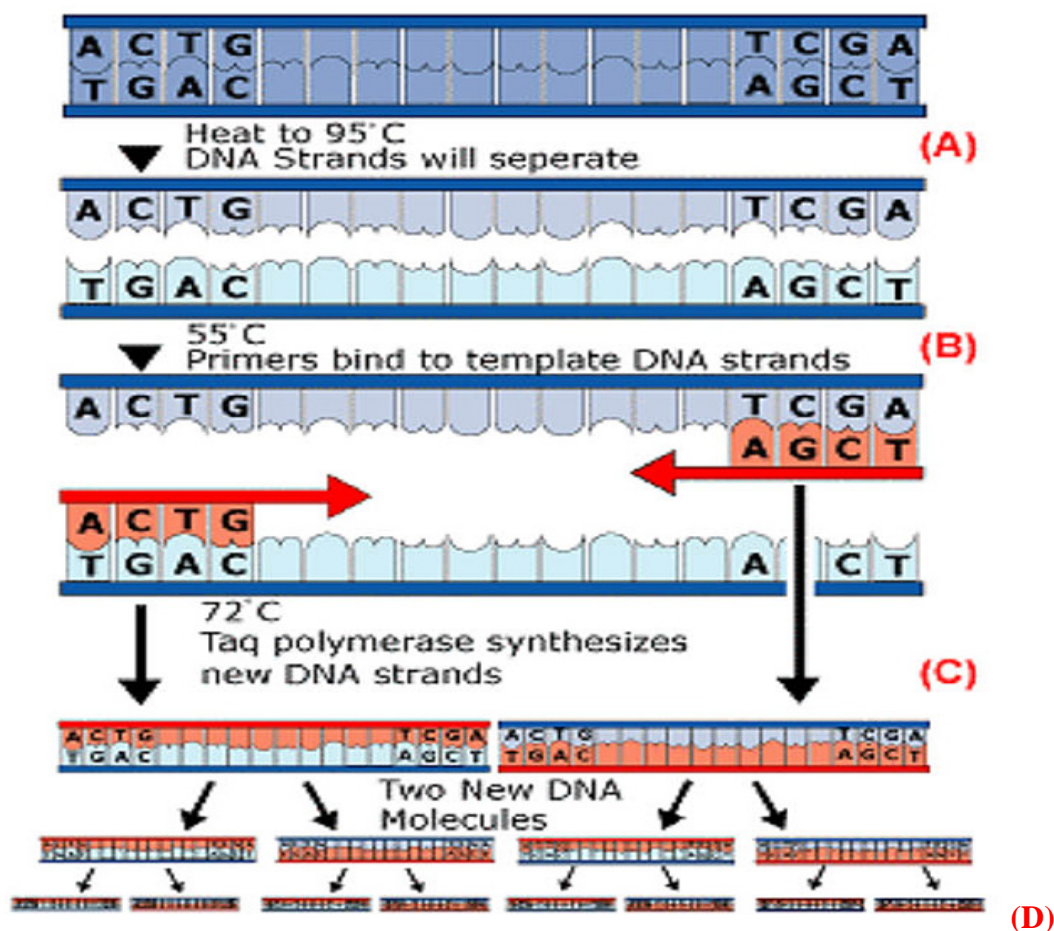
Pris per prov är från några kronor till c:a 20 kr beroende på metod.

Isolera rätt bit: Polymerase Chain Reaction (PCR)

En av de mest använda teknikerna i DNA forskning och grundläggande för övriga DNA-baserade metoder i denna utredning är enzymatisk kopiering av DNA, *Polymerase Chain Reaction (PCR)* (Saiki *et al.*, 1988). Tekniken uppfanns av Kary Mullis, för vilket han fick Nobelpriset 1993. Metoden används för att specifikt kopiera och mångfaldiga en gen eller annan kort DNA sekvens som man vill analysera (se Fig 4). Med hjälp av kännedom om sekvenserna som flankerar den sekvensregion som ska kopieras konstrueras ett par korta syntetiska oligonukleotider (*primers*) som är komplementära (d.v.s. passar) vardera de motsatta enkelsträngarna i DNA spiralen. Primersekvensen kan man ofta hitta i en databas, publikation eller härleda genom jämförelse mellan närbesläktade taxa. I annat fall kan mer omfattande förberedelser behövas, såsom sekvensering av klonade fragment. Ett DNA polymeras som är särskilt tåligt mot upphettning (ursprungligen utvunnet ur bakterier som lever i heta källor) blandas med genomiskt DNA, många exemplar av primerparet, de fyra nukleotiderna och en buffertlösning.

- A.** Genom upphettning till c:a 95 grader separeras DNA-strängarna.
- B.** När temperaturen sänks en aning (den s.k. *annealing* temperaturen, vilken varierar bl.a. beroende på primerlängden och sammansättning av nukleotider – vanligen omkring 50-65 grader) fastnar primers vid de specifika sekvenserna som flankerar den del som ska kopieras.
- C.** DNA polymeraset börjar inkorporera fria nukleotider på vardera strängen där primers ska förlängas, och temperaturen höjs till den optimala för enzymet, vanligen omkring 72 grader. Således kopieras båda strängarna av den önskade sekvensregionen.
- D.** Cykeln upprepas och denna gång när denatureringen sker kommer även de nya kopiorna släppas fria som korta enkelsträngar, vilka slutar i vardera primersekvensen. På dessa korta strängar fäster den fria primern på motsatta sidan om den ände som slutar med den andra primern, och vid kopiering kan endast en kopia över den önskade regionen skapas. Dessa kopior fungerar sedan som templat i efterföljande cykler och på detta sätt sker sedan en exponentiell tillväxt av de korta, utvalda kopiorna.

Hela processen är automatiserad i maskiner och tar vanligen ett par timmar. Olika varianter av PCR-maskiner kan normalt ta upp till 96 eller 384 prover (vissa kan ta färre eller fler), vilket alltså gör det möjligt att kopiera utvalda sekvenser från så många individer på ett par timmar (per maskin). Resultatet kontrolleras vanligen genom visualisering på en agarosgel, där det kopierade fragmentets storlek kan verifieras mot en känd storleksmarkör, och inga andra band än det önskade ska framträda (i annat fall har amplifieringen varit ospecifik).



Figur 4. Principen för DNA kopiering (amplifiering) med PCR.
(från NOAA; se även animation: www.maxanim.com/genetics/PCR/PCR.htm)

Kostnader:

PCR maskiner varierar kraftigt i pris såväl mellan märken och tillverkningsprincip som beroende av hur många prover som ska hanteras samtidigt.

En maskin för 96 prover av god kvalitet kostar omkring 30.000 kr.

Att köra en 20 ul PCR reaktion kostar omkring 10 kr.

Sekvensering

När det fragment (gen eller annan DNA region) tagits fram som skall sekvensbestämmas, vidtar själva sekvensreaktionen. Den i särklass vanligaste metoden är s.k. kedjeterminering, även kallad Sanger-sekvensering (Sanger *et al.*, 1977). Detta utförs numer i princip på samma sätt som i PCR reaktionen ovan, dock med ett par viktiga modifikationer: vissa av de många nukleotiderna av de fyra typerna är modifierade till s.k. terminatorer som när de inkorporeras av polymeraset leder till ett stopp i extensionen. Genom en noggrann avvägning av proportionerna mellan vanliga och modifierade nukleotider uppnås en slumpvis process som resulterar i en blandning av oliklånga, syntetiserade fragment. Alla positioner där ett A är sista basen utgör en samling fragment med olika längder, alla som slutar med C en annan uppsättning längder, osv. När alla fragmenten ordnas från kortaste till längsta genom att separeras på en gel (eller numera oftast i en polymer i tunna kapillär), skiljer det en bas mellan varje och detta ger DNA sekvensen. Processen sker nu vanligen automatiskt genom att terminatorerna är märkta med olika färger som fluoresceras av en laserstråle och avläses optiskt.

På detta sätt kan DNA sekvenser på vanligen upp till 500-800 baser bestämmas med god kvalitet inom några timmar.

Kostnad för en automatiserad DNA sekvens är c:a 30-50 kr, beroende på olika faktorer.

(för en mer utförlig beskrivning, se t.ex. http://en.wikipedia.org/wiki/DNA_sequencing)

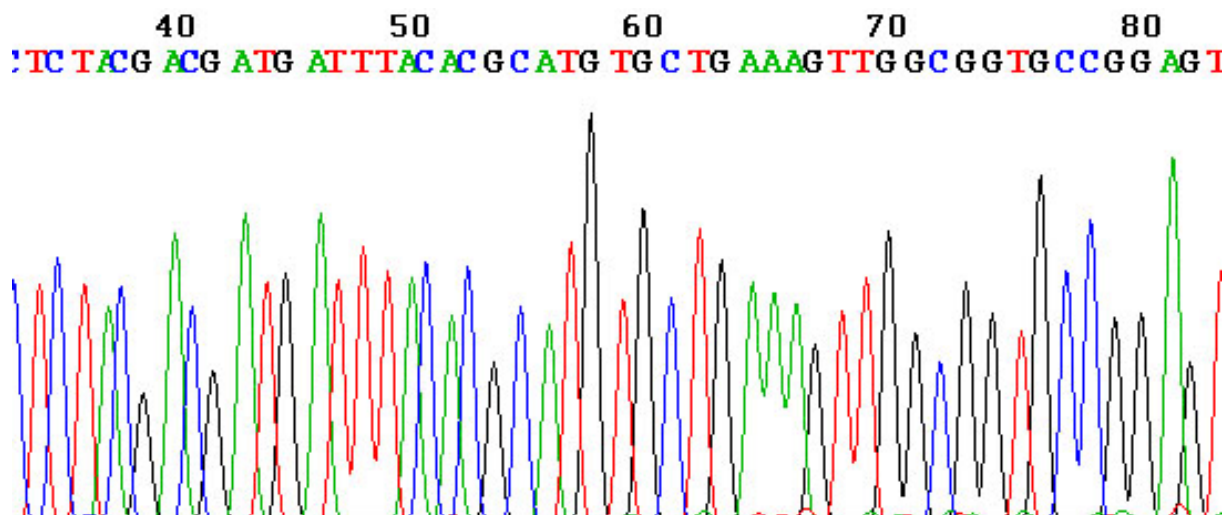


Fig 5. Segment av en avläst DNA sekvens med automatiserad fluorescenssteknologi.

Således är kostnaden för en DNA sekvensering från extraktion till färdig sekvens omkring 60-80 kr. Det ska dock noteras att kostnaderna tenderar att sjunka kontinuerligt, och att storskaliga analyser där 96 eller fler prover analyseras parallellt är betydligt billigare utslaget per prov.

Dessutom är nu det allt vanligare att prover skickas till stora laboratorier utomlands, främst i länder med lägre arbetskostnader. Således kan t.ex. 96 prover sekvenseras i Korea för omkring 20 kr/prov (om man skickar färdig PCR produkt och primers), medan individuella prover kostar c:a 30 kr.

Alternativa metoder

Det finns ett antal alternativa metoder att undersöka variation i DNA sekvenser, vilka inte bygger på att man läser av sekvensen utan detekterar varianter som man vet kan förekomma. Dessa skulle man kunna kalla 'indirekta' metoder, till skillnad från 'direkt' sekvensering av DNA. Förutsättningen är dock kännedom om variationen i DNA sekvenserna, vilka tagits fram enligt ovan. Dessa metoder kan i varierande grad vara tillämpliga för ändamålet att identifiera arter, och exempel på sådana tekniker ges här.

Selektiv PCR

Amplifiering med PCR kräver att vardera primer fäster vid DNA templatet tillräckligt bra för att sitta kvar vid kopieringen, vilket bl.a. innebär att det måste vara nära nog fullkomlig överensstämmelse mellan templat och primer sekvens, särskilt i 3'-änden där förlängningen sker. Detta gör det möjligt att kunna detektera arter direkt med PCR genom att använda primers som är specifika för varje art. Ett enkelt ja/nej svar erhålls då. Flera orsaker gör dock att detta inte är praktiskt som generell metod. För att skilja många arter behöver man hitta loci där arterna konsekvent skiljer sig vid primersekvensen men inte inom arten, vilket är opraktiskt och inte realistiskt för många taxa. Särskilt för närbesläktade arter finns det också risk att metoden är otillförlitlig. Dels kan det hända att arterna inte skiljer sig så mycket vid en specifik gen att man kan vara säker på att den ena men inte den andra amplifieras (falsk

positiv), och dels finns risk att den skillnad mellan arterna i sekvens vid primer stället som används för detektion (en eller några nukleotiders skillnad vid primerns 3' ände där okomplimentäritet inte leder till amplifiering) också finns som polymorfism inom arten (falsk negativ). Om istället metoder som baseras på sekvensering av det aktuella fragmentet används så upptäcks sådana polymorfismer.

I vissa fall fungerar dock ett sådant system, t.ex. om man vill påvisa en viss eller några art(er) eller organismgrupp som klart skiljer sig från andra med påvisat fixerade skillnader. Vilken region (gen) man inriktar sitt urval av primers på är bl.a. beroende av den genetiska divergensen mellan och diversiteten inom de taxa som ska bestämmas, vilken taxonomisk upplösning man eftersträvar och med vilken säkerhet specificitet uppnås. En högre upplösning kan också uppnås genom att kombinera primers för fler loci. Artspecifik (taxaspecifik) PCR skiljer sig från den generella tillämpning som t.ex. 'DNA barcoding' baseras på, där man väljer DNA region utifrån att få så många arter som möjligt att amplifieras med samma primers, och löser upp arterna genom direkt jämförelse av den mellanliggande sekvens som amplifieras. En fördel med det sistnämnda är att man slipper utveckla nya primers för varje organismgrupp där arter ska bestämmas, och att högre upplösning ges, medan taxa-specifik PCR är snabbare, enklare (kräver ju ingen sekvensering) och billigare. Bestämning med PCR ger också möjlighet till viss samtidig kvantifiering (se qPCR nedan). En annan fundamental skillnad är förstås att i bestämning med selektiv PCR inriktar man sig på att detektera förutbestämda arter (taxa) medan andra arter som kan ingå i provet (t.ex. ett planktondrag) inte upptäcks. Möjligheten till specifik detektion är dock ofta en fördel när man t.ex. vill söka efter en eller flera taxa i samma blandning av DNA. Detektionen kan automatiseras genom att man använder fluorescerance färg i realtids-PCR (se nedan).

Olika grad av komplexitet i applikationer kan vara t.ex. att utföra först en PCR med generella primers för den grupp organismer man vill isolera, sedan utföra ytterligare en PCR på dessa produkter med interna, specifika primers (s.k. 'nested' PCR). Det är ofta lättare att uppnå en högre grad av specificitet på detta sätt.

En variant på bestämning direkt med PCR är att använda samma primers för de olika arterna man vill upplösa men välja det locus som amplifieras så att det innehåller en artspecifik längdvariation i den mellanliggande sekvensen. Exempelvis har längdvariation i intron som amplifieras med generella primers i flankerande exon använts för att urskilja arter och hybrider av *Salix* (Trung *et al.*, 2008) och nematoder (Nikolaidis, Scouras, 2002). Vidare används ibland uppsättningar av primers som specifikt detekterar olika taxa i blandade prov genom amplifiering av loci med storleksvariation (Jarman *et al.*, 2006; Ono *et al.*, 2007). Genom storleksseparation när PCR produkterna körs i en gel kan variationen lätt avläsas. Genom att använda PCR primers med fluorescerande inmärkning kan detektionen ske i automatiska sekvenseringsmaskiner för ökad effektivitet (se, t.ex (Hamilton *et al.*, 2008)).

En praktisk fråga att tänka på är att i tillägg till de negativa kontroller man vanligen har (d.v.s. reaktionslösningar utan mål-DNA) för att upptäcka kontamination, bör man också ha positiva kontroller, då avsaknaden av en produkt alternativt kan bero på misslyckade reaktioner istället för avsaknad av den aktuella arten.

Kvantitativ PCR (qPCR), realtids-PCR

Eftersom kopiering av DNA sker i stort sett exponentiellt med en fördubbling i varje cykel kan utgångsmängden DNA uppskattas utifrån mätintervall under kopieringen med användning av den teoretiska modellen över tillväxtkurvan och kalibrering med en känd DNA-koncentration. Detta är grunden till kvantitativ PCR (qPCR). Vanligen utförs detta på avancerade instrument i realtid, s.k. realtids-PCR, där en sekvensspecifik fluorescerande markör (*probe*) eller en interkalerande fluorescerande färg inkorporeras i den kopierade DNA molekylen. En avläsning sker vid den tröskelnivå då den fluorescerande signalen detekteras. Genom jämförelse med standardkurvan med känd DNA koncentration kan antalet startkopior av DNA i det undersökta provet härledas. För de flesta ändamål är användningen av en sekvensspecifik probe att föredra, eftersom användningen av interkalerande färg och generella primers dels kan påverkas av detektion av primer-dimer (en artefakt i PCR där de ingående primers amplifieras ihop), dels detekteras också eventuella ospecifika amplifieringar av annat än målsekvensen. Genom en kombination av sekvensspecifika prober med olika färger kan också fler prover detekteras samtidigt (multiplex).

Tekniken kan användas dels för att i realtid detektera en målsekvens, t.ex. en ”DNA-streckkod” för artbestämning (under vissa förutsättningar, se ovan om PCR), dels för kvantifiering. Att i praktiken bestämma antalet av en viss organism är dock svårt, i synnerhet för mer komplexa flercelliga organismer, men relativa mått på förekomsten är lättare att uppnå.

Särskilt intressant är möjligheterna att kunna detektera flera olika målsekvenser i blandade prov, t.ex. när man har flera arter plankton från ett vattenprov. Det har varit svårt att detektera fler än två sekvenser samtidigt, bl.a. p.g.a. brist på detektionsfärger som ej överlappar i emissionspektra, och överlappen gör att problemen påverkar varandra. Dock har försök med nyligen utvecklad teknik visat att man nu kan detektera flera, och bl.a. har samtidig detektering och kvantifiering av fem olika plasmid-DNA sekvenser i blandning uppnåtts.

I varje aktuell situation behövs noggranna kalibreringsexperiment innan systemet kan användas rutinemässigt.

PCR-RFLP

Om ett begränsat urval av taxa ska urskiljas kan detta ofta göras med en enkel metod att kontrollera varianter som amplifierats med PCR. I vissa fall kan taxaspecifika sekvenser diagnostiseras med hjälp av restriktionsenzymer (olika sådana enzymer klipper DNA strängen vid för varje enzym specifika sekvenssignaturer). Först amplifieras ett utvalt fragment med primers specifika för den organismgrupp ur vilket man i nästa steg vill urskilja arterna. Den erhållna produkten klyvs sedan med ett eller flera lämpliga restriktionsenzym för att erhålla fler mindre fragment med artspecifika storlekar, vilka kan visualiseras på en gel. Tekniken kallas *PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)*. Denna teknik har använts i många sammanhang, t.ex. för att urskilja olika arter av rovdjur från spillningsprov (Bidlack *et al.*, 2007), och kryptiska arter av humlor (Ellis *et al.*, 2006).

Hybridiseringar på 'arrays' och dylikt

En bra översikt över array-teknologier finns på http://en.wikipedia.org/wiki/DNA_microarray.

Pyrosequencing

Se (Ronaghi *et al.*, 1998) och www.biotage.com eller <http://www.pyrosequencing.com/>

454

se <https://www.roche-applied-science.com/sis/sequencing/index.jsp> samt (Margulies *et al.*, 2005).

Appendix 2

Intervjukällor

Naturvårdsverket:

Ola Inghe
Sverker Evans
Tove Lundberg
Håkan Marklund
Ulrika Stensdotter

SLU:

Anders Glimskär, NILS
Gunnar Persson, inst. F. miljöanalys
Göran Ståhl, RIS

UmU:

Johan Wikner

SU:

Elena Ghorokhova
Gunilla Ejdung

SMHI:

Bengt Karlsson

NRM

Martin Irestedt
Juan Santos
Lars Hedenäs
Sven Boström
Björn Sohlenius
Fredrik Ronquist
Ulf Jondelius
Mats Swedin
Mari Källersjö

Universitetet i Grenoble

Pierre Taberlet

Hafok AB
Mats Blomqvist

Referenser

- Avise JC (1994) *Molecular Markers, Natural History and Evolution* Chapman and Hall, New York.
- Ballard JWO, Whitlock MC (2004) The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology* **13**, 729-744.
- Bensasson D, Zhang D-X, Hartl DL, Hewitt GM (2001) Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. *Trends in Ecology & Evolution* **16**, 314-321.
- Bidlack A, Reed S, Palsbøll P, Getz W (2007) Characterization of a western North American carnivore community using PCR-RFLP of cytochrome b obtained from fecal samples. *Conservation Genetics* **8**, 1511-1513.
- Birky C (2007) Workshop on barcoded DNA: application to rotifer phylogeny, evolution, and systematics. *Hydrobiologia* **593**, 175-183.
- Blaxter M, Mann J, Chapman T, *et al.* (2005) Defining operational taxonomic units using DNA barcode data. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **360**, 1935-1943.
- Brower AVZ, DeSalle R, Vogler A (1996) GENE TREES, SPECIES TREES, AND SYSTEMATICS: A Cladistic Perspective. *Annual Review of Ecology and Systematics* **27**, 423-450.
- Chase MW, Salamin N, Wilkinson M, *et al.* (2005) Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **360**, 1889-1895.
- Coyne KJ, Handy SM, Demir E, *et al.* (2005) Improved quantitative real-time PCR for enumeration of harmful algal species in field samples using an exogenous DNA reference standard. *Limnology and Oceanography: Methods* **3**, 381-391.
- Darling J, Blum M (2007) DNA-based methods for monitoring invasive species: a review and prospectus. *Biological Invasions* **9**, 751-765.
- DeSalle R, Egan MG, Siddall M (2005) The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **360**, 1905-1916.
- DeSalle ROB (2006) Species Discovery versus Species Identification in DNA Barcoding Efforts: Response to Rubinoff. *Conservation Biology* **20**, 1545-1547.
- Dowton M, Campbell NJH (2001) Intramitochondrial recombination - is it why some mitochondrial genes sleep around? *Trends in Ecology & Evolution* **16**, 269-271.
- Ellis JS, Knight ME, Carvell C, Goulson D (2006) Cryptic species identification: a simple diagnostic tool for discriminating between two problematic bumblebee species. *Molecular Ecology Notes* **6**, 540-542.
- Ficetola GF, Miaud C, Pompanon Fo, Taberlet P (2008) Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters* **4**, 423-425.
- Flagstad O, Hedmark EVA, Landa A, *et al.* (2004) Colonization History and Noninvasive Monitoring of a Reestablished Wolverine Population. *Conservation Biology* **18**, 676-688.
- Galluzzi L, Penna A, Bertozzini E, *et al.* (2004) Development of a Real-Time PCR Assay for Rapid Detection and Quantification of *Alexandrium minutum* (a Dinoflagellate). *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 1199-1206.
- Godhe A, *et al* (2007) Intercalibration of classical and molecular techniques for identification of *Alexandrium fundyense* (Dinophyceae) and estimation of cell densities. *Harmful Algae* **6**, 56-72.

- Gorokhova E (2006) Molecular identification of the invasive cladoceran *Cercopagis pengoi* (Cladocera: Onychopoda) in stomachs of predators. *Limnology and Oceanography: Methods* **4**, 1-6.
- Hajibabaei M, Singer G, Clare E, Hebert P (2007a) Design and applicability of DNA arrays and DNA barcodes in biodiversity monitoring. *BMC Biology* **5**, 24.
- Hajibabaei M, Singer GAC, Hebert PDN, Hickey DA (2007b) DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends in Genetics* **23**, 167-172.
- Hamilton PB, Adams ER, Malele II, Gibson WC (2008) A novel, high-throughput technique for species identification reveals a new species of tsetse-transmitted trypanosome related to the *Trypanosoma brucei* subgenus, *Trypanozoon*. *Infection, Genetics and Evolution* **8**, 26-33.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **270**, 313-321.
- Hillis DM (1987) Molecular versus morphological approaches to systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* **18**, 23-42.
- Hollingsworth PM, Forrest LL, Spouge JL, *et al.* (2009) A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 12794-12797.
- Holterman M, Rybarczyk K, Van Den Elsen S, *et al.* (2008) A ribosomal DNA-based framework for the detection and quantification of stress-sensitive nematode families in terrestrial habitats. *Molecular Ecology Resources* **8**, 23-34.
- Huang J, Xu Q, Sun ZJ, Tang GL, Su ZY (2007) Identifying earthworms through DNA barcodes. *Pedobiologia* **51**, 301-309.
- Hurst GDD, Jiggins FM (2005) Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **272**, 1525-1534.
- Ingman M, Gyllensten U (2001) Analysis of the Complete Human mtDNA Genome: Methodology and Inferences for Human Evolution. *J Hered* **92**, 454-461.
- Jarman SN, Redd KS, Gales NJ (2006) Group-specific primers for amplifying DNA sequences that identify Amphipoda, Cephalopoda, Echinodermata, Gastropoda, Isopoda, Ostracoda and Thoracica. *Molecular Ecology Notes* **6**, 268-271.
- Kingston SE, Rosel PE (2004) Genetic Differentiation among Recently Diverged Delphinid Taxa Determined Using AFLP Markers. *J Hered* **95**, 1-10.
- Koljalg U, Larsson K-H, Abarenkov K, *et al.* (2005) UNITE: a database providing web-based methods for the molecular identification of ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist* **166**, 1063-1068.
- Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA, Weigt LA, Janzen DH (2005) Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**, 8369-8374.
- Kvist L, Martens J, Nazarenko AA, Orell M (2003) Paternal Leakage of Mitochondrial DNA in the Great Tit (*Parus major*). *Mol Biol Evol* **20**, 243-247.
- Källersjö M, von Proschwitz T, Lundberg S, Eldenäs P, Erseus C (2005) Evaluation of ITS rDNA as a complement to mitochondrial gene sequences for phylogenetic studies in freshwater mussels: an example using Unionidae from north-western Europe. *Zoologica Scripta* **34**, 415-424.
- Ladoukakis ED, Zouros E (2001) Direct Evidence for Homologous Recombination in Mussel (*Mytilus galloprovincialis*) Mitochondrial DNA. *Mol Biol Evol* **18**, 1168-1175.
- Lahaye R, van der Bank M, Bogarin D, *et al.* (2008) DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 2923-2928.

- Lane CE, Lindstrom SC, Saunders GW (2007) A molecular assessment of northeast Pacific Alaria species (Laminariales, Phaeophyceae) with reference to the utility of DNA barcoding. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **44**, 634-648.
- MacMillan K, Blok V, Young I, Crawford J, Wilson MJ (2006) Quantification of the slug parasitic nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita* from soil samples using real time qPCR. *International Journal for Parasitology* **36**, 1453-1461.
- Margulies M, Egholm M, Altman WE, *et al.* (2005) Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* **437**, 376-380.
- Markmann M, Tautz D (2005) Reverse taxonomy: an approach towards determining the diversity of meiobenthic organisms based on ribosomal RNA signature sequences. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **360**, 1917-1924.
- Matz MV, Nielsen R (2005) A likelihood ratio test for species membership based on DNA sequence data. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **360**, 1969-1974.
- Meyer CP, Paulay G (2005) DNA Barcoding: Error Rates Based on Comprehensive Sampling. *PLoS Biology* **3**, e422.
- Monaghan MT, Balke M, Gregory TR, Vogler AP (2005) DNA-based species delineation in tropical beetles using mitochondrial and nuclear markers. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **360**, 1925-1933.
- Moritz C, Cicero C (2004) DNA Barcoding: Promise and Pitfalls. *PLoS Biology* **2**, e354.
- Murray T, Fitzpatrick Ú, Brown M, Paxton R (2008) Cryptic species diversity in a widespread bumble bee complex revealed using mitochondrial DNA RFLPs. *Conservation Genetics* **9**, 653-666.
- Nielsen R, Matz M (2006) Statistical Approaches for DNA Barcoding. *Systematic Biology* **55**, 162 - 169.
- Nikolaidis N, Scouras ZG (2002) A polymerase chain reaction (PCR) application for free-living nematodes (Rhabditida) discrimination. *Molecular Ecology Notes* **2**, 248-249.
- Ono K, Satoh M, Yoshida T, *et al.* (2007) Species identification of animal cells by nested PCR targeted to mitochondrial DNA. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* **43**, 168-175.
- Palsbøll PJ (1999) Genetic tagging: contemporary molecular ecology. *Biological Journal of the Linnean Society* **68**, 3-22.
- Palsbøll PJ, Allen J, Berube M, *et al.* (1997) Genetic tagging of humpback whales. *Nature* **388**, 767-769.
- Patil J, Gunasekera R, Deagle B, Bax N, Blackburn S (2005) Development and Evaluation of a PCR Based Assay for Detection of the Toxic Dinoflagellate, *Gymnodinium catenatum*(Graham) in Ballast Water and Environmental Samples. *Biological Invasions* **7**, 983-994.
- Persson G, Svensson J-E (2004) Kvantitativa djurplanktonundersökningar i Sverige. När, var, hur och varför? Institutionen för miljöanalys, SLU.
- Pilot M, Jedrzejewski W, Branicki W, *et al.* (2006) Ecological factors influence population genetic structure of European grey wolves. *Molecular Ecology* **15**, 4533-4553.
- Rach J, DeSalle R, Sarkar IN, Schierwater B, Hadrys H (2008) Character-based DNA barcoding allows discrimination of genera, species and populations in Odonata. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **275**, 237-247.
- Ratnasingham S, Hebert PDN (2007) BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular Ecology Notes* **7**, 355-364.
- Ronaghi M, Uhlén M, Nyren P (1998) DNA SEQUENCING: A Sequencing Method Based on Real-Time Pyrophosphate. *Science* **281**, 363-365.

- Ross HA, Lento GM, Dalebout ML, *et al.* (2003) DNA Surveillance: Web-Based Molecular Identification of Whales, Dolphins, and Porpoises. *J Hered* **94**, 111-114.
- Ross HA, Murugan S, Li WLS (2008) Testing the Reliability of Genetic Methods of Species Identification via Simulation. *Systematic Biology* **57**, 216-230.
- Rubinoff D (2006) Utility of Mitochondrial DNA Barcodes in Species Conservation. *Conservation Biology* **20**, 1026-1033.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, *et al.* (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**, 406-425.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **74**, 5463-5467.
- Savolainen V, Cowan RS, Vogler AP, Roderick GK, Lane R (2005) Towards writing the encyclopaedia of life: an introduction to DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **360**, 1805-1811.
- Schander C, Willassen E (2005) What can biological barcoding do for marine biology? *Marine Biology Research* **1**, 79-83.
- Seifert KA, Samson RA, deWaard JR, *et al.* (2007) Prospects for fungus identification using CO1 DNA barcodes, with *Penicillium* as a test case. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 3901-3906.
- Sevilla RG, Diez A, Noren M, *et al.* (2007) Primers and polymerase chain reaction conditions for DNA barcoding teleost fish based on the mitochondrial cytochrome b and nuclear rhodopsin genes. *Molecular Ecology Notes* **7**, 730-734.
- Summerbell RC, Lévesque CA, Seifert KA, *et al.* (2005) Microcoding: the second step in DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **360**, 1897-1903.
- Taberlet P, Luikart G (1999) Non-invasive genetic sampling and individual identification. *Biological Journal of the Linnean Society* **68**, 41-55.
- Tautz D, Arctander P, Minelli A, Thomas RH, Vogler AP (2003) A plea for DNA taxonomy. *Trends in Ecology & Evolution* **18**, 70-74.
- Trung LQ, Van Puyvelde K, Triest L (2008) Consensus primers of *cyp73* genes discriminate willow species and hybrids (*Salix*, Salicaceae). *Molecular Ecology Resources* **8**, 455-458.
- Ujvari B, Dowton M, Madsen T (2007) Mitochondrial DNA recombination in a free-ranging Australian lizard. *Biology Letters* **3**, 189-192.
- Valentini A, Pompanon F, Taberlet P (2009) DNA barcoding for ecologists. *Trends in Ecology & Evolution* **24**, 110-117.
- Vences M, Thomas M, van der Meijden A, Chiari Y, Vieites DR (2005) Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. *Frontiers in Zoology* **2**, 1-12.
- Wheeler QD (2005) Losing the plot: DNA "barcodes" and taxonomy. *Cladistics* **21**, 405-407.
- Wiemers M, Fiedler K (2007) Does the DNA barcoding gap exist? - a case study in blue butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae). *Frontiers in Zoology* **4**, 8.
- Will KW, Rubinoff D (2004) Myth of the molecule: DNA barcodes for species cannot replace morphology for identification and classification. *Cladistics* **20**, 47-55.
- Wilson EO (2003) The encyclopedia of life. *Trends in Ecology & Evolution* **18**, 77-80.
- Vogler AP, Monaghan MT (2007) Recent advances in DNA taxonomy. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* **45**, 1-10.

Tidigare utgivet i samma serie:

1. Förgiftar vi naturen? Tom Lötmarker 1966
2. Djuriskt/mänskligt beteende Lennart Steen & Lars Fält 1967
3. Tandens i kultur, fantasi och verklighet Tor Ørvig 1968
4. Dinosaurier från Kina: dinosauriernas värld Krister Brood 1989
5. Den svenska Sydpolexpeditionen 1901-1903 Krister Brood 1989
6. Inventering av nissöga (*Cobitis taenia*) i Edsviken, Stockholms län, 2004. Basinventering inom Edsvikensamarbetet och Natura 2000. PM från Forskningsavdelningen, Naturhistoriska riksmuseet. 2004:1. Stefan Lundberg & Bo Delling 2004
7. Inventering av stormusslor i Albysjön, Tyresö kommun, 2004. Basinventering inom Tyresåsamarbetet. PM från Forskningsavdelningen, Naturhistoriska riksmuseet. 2004:2. Stefan Lundberg 2004
8. Inventering av bottenfaunan i bäck mellan Flaten och Drevviken, Stockholms stad 2004. En naturvärdesbedömning utifrån bottenfaunans artrikedom. PM från Forskningsavdelningen, Naturhistoriska riksmuseet. 2004:3. Erland Dannelid & Stefan Lundberg 2004
9. Bottenfaunan i Sättraån, Stockholms stad 2004. Utvecklingen efter ett år med kontinuerligt vattenflöde. PM från Naturhistoriska riksmuseet. 2005:1. Christina Ekström & Stefan Lundberg 2005
10. Bottenfaunan i fem vattendrag runt Edsviken. Resultat från undersökningar 2004. PM från Naturhistoriska riksmuseet. 2006:1. Stefan Lundberg & Christina Ekström 2006
11. Inventering av stormusslor i Edsån, 2005. Basinventering inom Oxundaåns vattenvårdsprojekt. PM från Naturhistoriska riksmuseet. 2006:2. John Tapper & Stefan Lundberg 2006
12. Inventering av stormusslor i Fysingen, 2005. Basinventering inom Oxundaåns vattenvårdsprojekt. PM från Naturhistoriska riksmuseet. 2006:3. John Tapper & Stefan Lundberg 2006
13. Liv i vattnet vid Tisnaren. Bottenfaunaundersökningar i Tisnarens vattenområde, 2001. PM från Naturhistoriska riksmuseet. 2006:4. Stefan Lundberg & Urban Pettersson 2006
14. Miljöbokslut 2006. Naturhistoriska riksmuseets miljöledningssystem. PM från Naturhistoriska riksmuseet. 2007:1. Stefan Lundberg & Yvonne Arremo 2007
15. Mälarens stormusselfauna. Resultat från inventeringar längs Mälarens stränder. PM från Naturhistoriska riksmuseet. 2007:2. Stefan Lundberg & Ted von Proschwitz 2007
16. Mälarens stormusselfauna. Lokalbeskrivningar. PM från Naturhistoriska riksmuseet. 2007:3. Stefan Lundberg & Ted von Proschwitz 2007
17. Miljöövervakningsstrategi för stormusslor. Utveckling av nationell miljöövervakning för sötvattenslevande stormusslor 2008. PM från Naturhistoriska riksmuseet. 2008:1. Stefan Lundberg & Jakob Bergengren 2008.
18. Inventering av stormusslor i Svennevadsån-Skogaån, Örebro län, 2007-2008: Miljöövervakning och utredning av åtgärdsbehov. PM från Naturhistoriska riksmuseet. 2008:2. Stefan Lundberg, Urban Pettersson & John Tapper 2008
19. Miljöbokslut 2007, Naturhistoriska riksmuseets miljöledningssystem. PM från Naturhistoriska riksmuseet. 2008:3. Stefan Lundberg & Yvonne Arremo 2008
20. Street Life under ytan. Resultat från dykinventering i Fyrisån inom Uppsala stad 2008. PM från Naturhistoriska riksmuseet. 2008:4. Stefan Lundberg 2008
21. Miljöbokslut 2008, Naturhistoriska riksmuseets miljöledningssystem. PM från Naturhistoriska riksmuseet. 2009:1. Stefan Lundberg & Yvonne Arremo 2009