



Hvordan utforske artsmangfoldet i havet?

Kunnskap om marint liv er viktig både for næring og forvaltning av miljø og marine ressurser. De enhetene som vi antar er naturlige grupper av organismer og kaller «arter» er helt fundamentale i vår forståelse av det biologiske mangfoldet. Men hvordan definerer, identifiserer og navngir vi disse enhetene? Og hvordan vet vi at forskere som studerer og kommuniserer informasjon om en bestemt navngitt art i realiteten har studert den samme arten?

Katrine Kongshavn, Jon A. Kongsrud, Endre Willassen

Prøvene av dyr og planter i tradisjonelle vitenskapelige samlinger skal bidra til en felles forståelse av hva som kjennetegner individer med et gitt artsnavn. Men beskrivelser av ytre og indre artskjennetegn med ord og bilder er ofte utilstrekkelige, både for artsavgrensning og for identifikasjon av arter. DNA-sekvenser kan gi oss ny innsikt i artsmangfoldet og artsspesifikke DNA-strekkoder kan hjelpe oss å identifisere arter, selv når ytre kjennetegn ikke kan brukes. Strekkoder med tilhørende artsdokumentasjon i åpne databaser kan også gi en større sikkerhet for at artsideifikasjoner er korrekte og at forskere i ulike land benytter samme navn på de samme artene. Universitetsmuseet i Bergen deltar nå i en global kampanje for å karakterisere arter med DNA-strekkoder slik at dette kan bli mulig. Her presenterer vi noe av det vi for tiden gjør med marine evertebrater (Fig 1).

■ Fig. 1. Noen av dyregruppene vi arbeider med; her ser vi slangestjerne, boblesnegl, pelsmollusk, børstemark, tanglus, reke, kommakreps, kråkebolle, mudderhummer, spøkelseskreps og krabber. Den lilla børstemarken øverst til høyre er en *Nereis pelagica* med hale laget av dens egen genetiske strekkode. (Foto: K. Kongshavn)





Norwegian Barcode of Life (NorBOL)⁽¹⁾ er et nasjonalt nettverk av forskningsinstitusjoner som samarbeider om DNA-strekkoding (Fig. 2).



■ Fig. 2. NorBOL-logo.

Prosjektet finansieres blant annet av Norges forskningsråd og Artsprosjektet⁽²⁾ og målet er å samle genetiske strekkoder for 20 000 norske arter innen prosjektets utløp i 2018. NorBOL har etablert fire regionale

knutepunkt med ansvar for koordinering av ulike dyre- og plantegrupper. Her har Universitetsmuseet i Bergen ved Evertebratsamlingen⁽³⁾ ansvaret for strekkoding av marine evertebrater, de marine virvelløse dyrene (Fig. 2). Målet er å lage et digitalt referansebibliotek av artsspesifikke, standardiserte DNA sekvenser som skal være en ressurs for forskning og forvaltning av biologisk mangfold. NorBOL inngår videre som regionalt knutepunkt for det store internasjonale prosjektet International Barcode of Life (iBOL)⁽⁴⁾.

Nytt tilfang av materiale

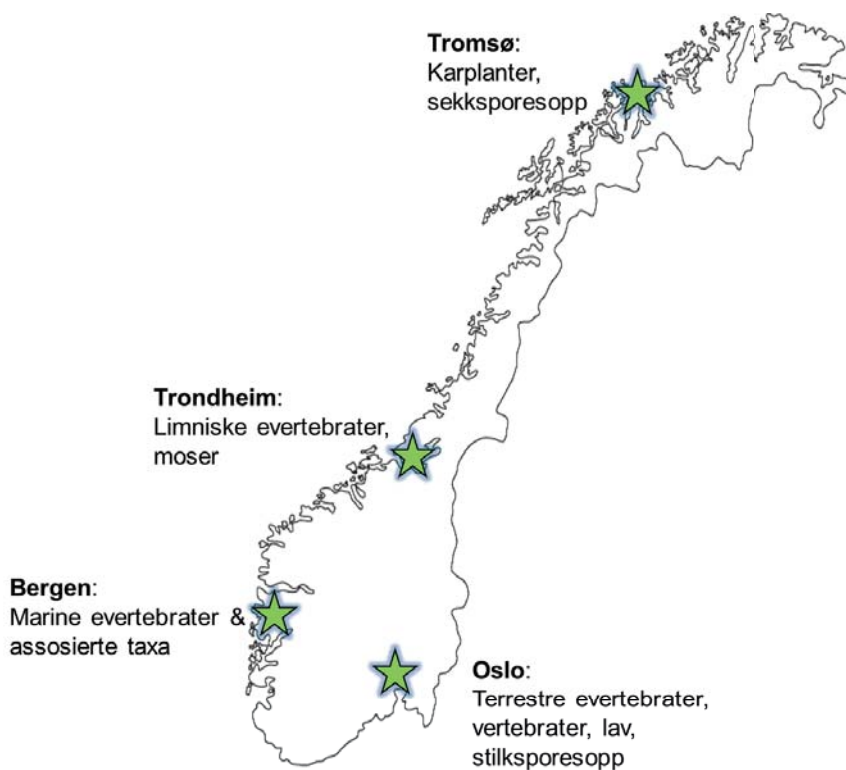
Ifølge Artsprosjektet er én av fem arter i Norge ukjente. Det er vanskelig å telle ukjente enheter, så dette er selvfølgelig kvalifiserte

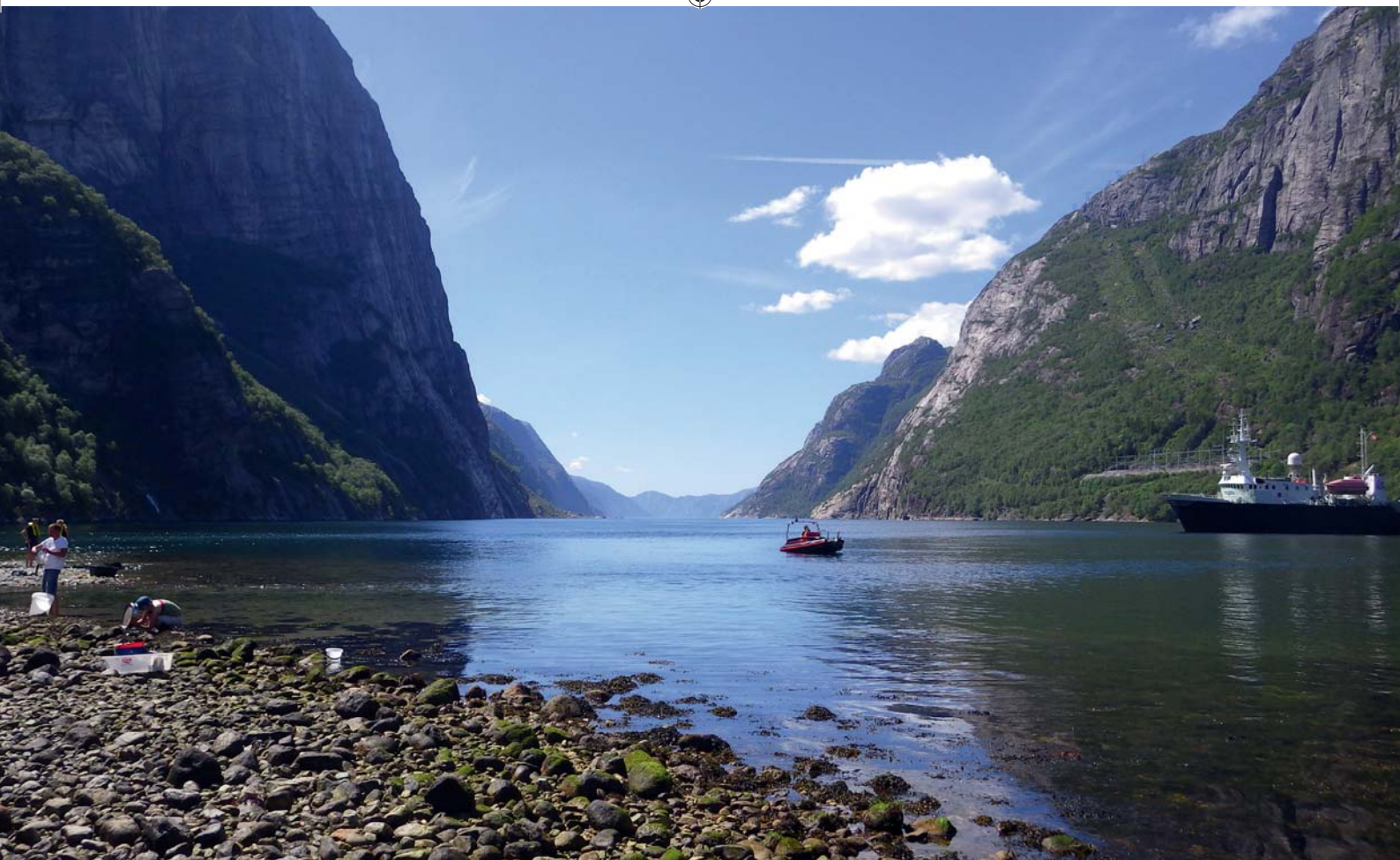
beregninger. Det omfatter dyr og planter «til lands og til vanns, og i lufta med» – men det er vel naturlig å anta at vi vet minst om det som lever der mennesket ikke kan leve, og at vi der vet mer om de store organismene enn om de små. Det er et stort behov for oppdatert kunnskap om marint liv, ikke minst etterspurt fra industri og forvaltning i Norge. Til tross for dette er en svært liten del av det kjente artsmangfoldet av marine evertebrater blitt studert med DNA-strekkoding. Derfor har Universitetsmuseet i de senere årene satset aktivt på innsamling av marint materiale som kan strekkodes med DNA. Innsamling og taksonomisk bearbeiding av mange marine organismegrupper er svært ressurskrevende, og vi ønsker derfor å dra nytte av de fordelene som ligger i å strekkode materiale som samles inn gjennom eksisterende prosjekter. Det foreliggende materialet er blant annet anskaffet gjennom omfattende inventeringer i Skagerrak, ved Mørkekysten, og MAREANO-prosjektets⁽⁵⁾ innsamlinger i Nord- og Midt-Norge. I tillegg foretar vi egne innsamlinger gjennom dagsturstokt med F/F Hans Brattstrøm, og «museumstokt» med F/F Håkon Mosby (2012, 2014) (Figs. 4, 9).

Hva er barcoding?

Såkalt «DNA barcoding», genetisk strekkoding av arter, er et av de nyere verktøyene vi har for å arbeide med artsmangfold. DNA-strekkoding ble opprinnelig lansert som en metode for *identifikasjon av kjente arter*⁽⁶⁾. Det kalles «barcoding» på grunn av likheten med strekkodene en finner på kommersielle varer (Fig. 5). Ved å lese en strekkode skal

■ Fig. 3. De fire NorBOL-nodene og deres hovedansvarsområder. Ved hver node er det ansatt en barcode-manager som koordinerer arbeidet med de respektive gruppene.





■ Fig. 4. Nydelig dag i felt; littoralsoneinnsamling i Lysebotnen. Til høyre ser vi forskningsskipet "Håkon Mosby".

en altså få vite hvilken art en har DNA fra og få et vitenskapelig navn på arten. Det vitenskapelige navnet er igjen nøkkelen til den publiserte litteraturen om arten. I praksis skal dette åpne døren til den vitenska-

■ Fig. 5. Eksempler på strekkoder: øverst en kommersiell strekkode på en fin trykksak, nederst en genetisk strekkode med en sjøhare (*Aplysia punctata*).



pelige kunnskapen om den gitte arten. En viktig forutsetning for at en DNA-strekkode kan brukes til artsidentifikasjon er at det finnes en tilsvarende sekvens fra identifiserte arter i et kvalitetssikret bibliotek av DNA-data. Om man tenker litt etter, er det selvsagt at forbindelsen mellom artsnavn og DNA-sekvens allerede må være etablert, dersom DNA-sekvenser skal brukes på denne måten. Og det er først og fremst dette som er oppdraget til NorBOL: Finne ett eller flere individer av alle arter av flercellede organismer som finnes (eller kan komme til å finnes) i norsk territorium, identifisere disse til art med tradisjonelle metoder, og deretter merke arten digitalt med en unik strekkode.

Hvordan gjør vi det?

Tradisjonelle vitenskapelige samlinger av marine dyr er ofte fikserte i formalin. Dette stoffet ødelegger DNA, så vi er i stor grad nødt til å samle nytt materiale for DNA-undersøkelser. Å finne artene i naturen er en formidabel oppgave i seg selv, men arbeidet som følger etter dette er også svært ressurskrevende. Prøvetaking i marint miljø er dyrt og tidkrevende. Derfor søker vi å økonomisere innsamlingene ved å knytte oss til pågående forskningsprosjekter ved Havforskningsinstituttet og andre relevante institusjoner. Dessuten er såkalt taksonomisk kompetanse en sjelden vare og vi forsøker derfor å engasjere spesialister på ulike dyregrupper til å bidra med artsbestemmelser. Det innebærer bredt samarbeid med mange



■ Fig. 6. En fylt plate med prøver; i hver av de 95 små brønnene ligger en liten bit med vev som skal sendes til analyse.

zoologer i inn- og utland.

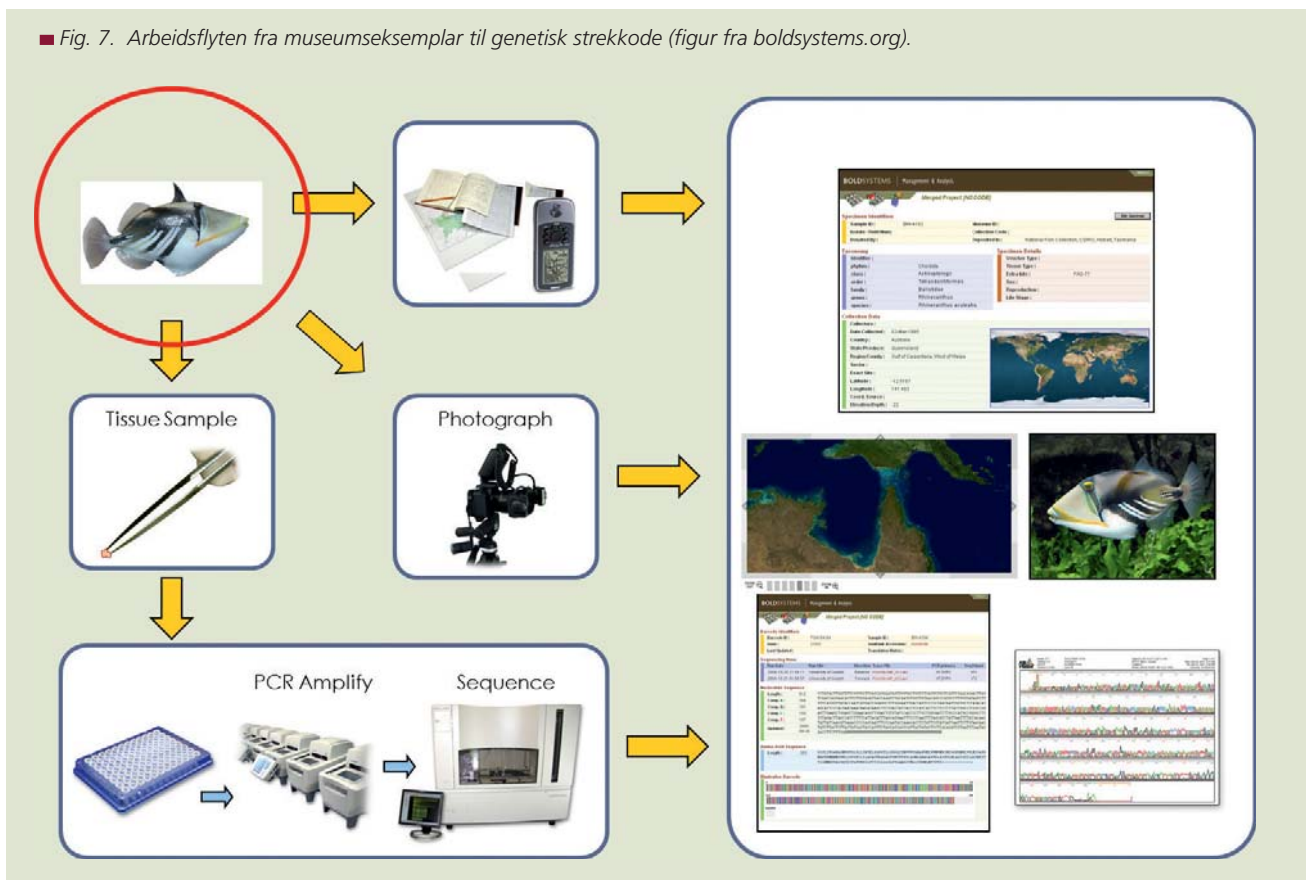
Først må prøver plukkes og sorteres til ulike dyregrupper. Deretter må de identifiseres, fortrinnsvis til artsnivå. Etter det blir prosessen i arbeidet som følger: Inntil fem representative individ for en art pluk-

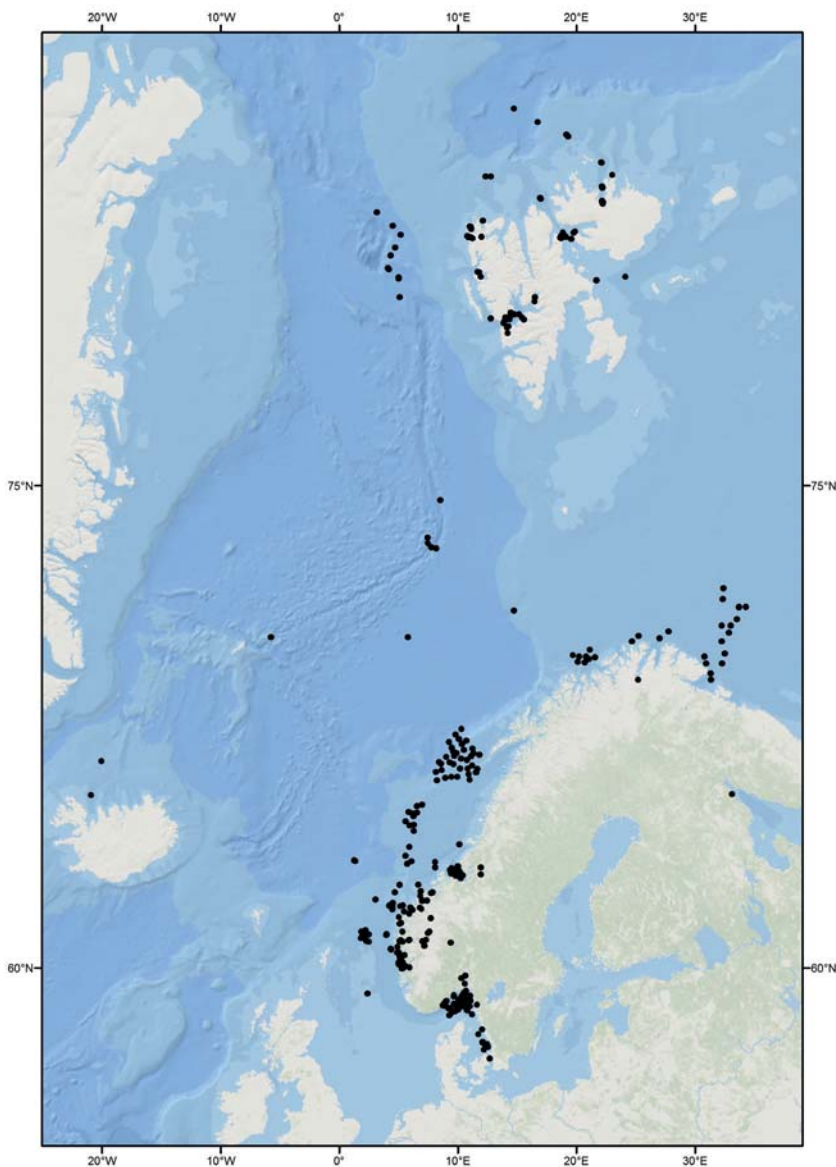
kes ut til DNA-sekvensering. Tilhørende fysiske data registreres og hvert dyr fotograferes, etiketteres og katalogiseres for innlemmelse i den vitenskapelige samlingen. Dette er en viktig del av dokumentasjonsprosessen, et poeng vi senere kom-

mer tilbake til.

Vi tar så en liten bit vev fra dyret, 1-2 mm³, som skal brukes til uttrekk av DNA. De utplukkede vevsbitene plasseres med stor nøyaktighet i brønner på spesialdesignede plater med plass til 95 prøver (Fig. 6), og platene sendes til Canadian Center of DNA Barcoding (CCDB)⁽⁷⁾, som er partner i NorBOL-prosjektet og per år bearbeider over en million prøver fra hele verden for DNA-sekvensering. En video om virksomheten til dette laboratoriet finnes på YouTube⁽⁸⁾. Om alt går etter planen i deres robotiserte massesekvenseringsfabrikk, vil CCDB laste opp sekvenser av arvestoffet

■ Fig. 7. Arbeidsflyten fra museumseksemplar til genetisk strekkode (figur fra boldsystems.org).





■ Fig 8. Kartet viser hvor vi har sendt inn prøver fra så langt i prosjektet.

(DNA) fra våre prøver til databasen BOLD⁽⁹⁾. BOLD har en nettbasert arbeidsplattform der vi kan analysere og bearbeide data videre før de til slutt publiseres og gis åpen tilgang for alle som har internett (Fig. 7).

Hva har vi gjort?

Så langt har vi sendt inn 2376 prøver ifra 677 kjente arter til analyse. Disse er samlet inn i fra hele Norskekysten

og i noen tilfeller utenfor norsk territorialområde (Fig. 8).

Vi hadde svært lite materiale fra Sør-Vestlandet som egnet seg til genetisk arbeid. Dermed ble årets museumstokt lagt til Lysefjorden i Rogaland. Dette toktet hadde innsamling ved Stord og Karmøy på vei sørover, og samlet så materiale fra en rekke lokaliteter fra Lysefjordens munning og helt inn til Lyse-

botnen. Forskerne ombord var på jakt etter ulike dyregrupper. Øverst på ønskelisten sto børstemark, pelsmollusker og boblesnegler, samt ulike fiskearter. Disse dyrene fanges ikke nødvendigvis opp i de samme redskapene, så det var nødvendig å benytte en del ulike redskap for å samle materialet. Vi brukte en kombinasjon av grabb, RP-slede (epibentisk slede), reketrål, strandnot og trekantskrape (Fig. 4, 9). I alt tok vi prøver på 30 stasjoner, - ikke verst på tre og en halv dag!

Per i dag har DNA-laboratoriet i Canada framskaffet DNA-sekvenser fra 386 av de 677 innsendte artene. Vi venter i skrivende stund på resultater av den siste innsendingen vår. Det betyr at 570 av disse prøvene så langt ikke er blitt analysert. Vi krysser fingrene for at antallet sekvenserte arter gjør et hopp når dette er fullført.

Børstemark, eller polychaeter, er den gruppen vi har arbeidet mest intensivt med så langt. Dette er en svært artsrik gruppe, med over 700 kjente arter i norske farvann. Hele 1425 av de innsendte prøvene hører til i denne gruppa (Fig. 10), og vi er nå den nest største bidragsyteren i BOLD på børstemark (Fig. 11). Dette arbeidet inngår i stor grad i prosjektet «Biologisk mangfold hos flerbørstemark (Polychaeta) i norske farvann» (PolyNor)⁽¹¹⁾.

Dessverre har vi erfart at de standardiserte rutinene for DNA-sekvensering, som har vist seg å være vellykket spesielt for dyregrupper som insekter, krepsdyr og fisk, ikke uten videre virker på alle dyr. Særlig har mange av børstemarkene vært en utfordring. Problemene kan ha ulike årsaker knyttet til selve poly-





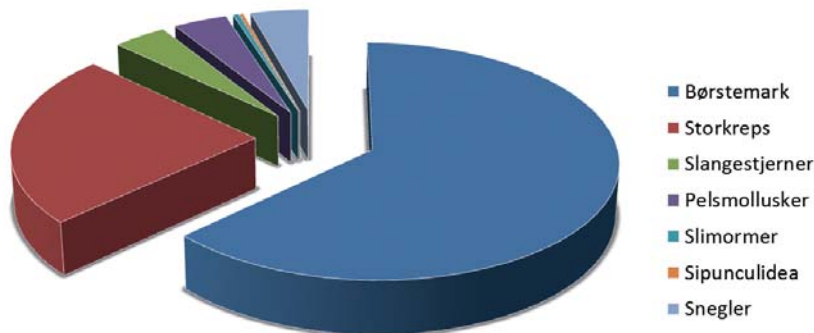
merasekjedereaksjonen (PCR). Det er prosessen som kopierer og oppkonsentrerer DNA før sekvenseringen kan begynne. For at reaksjonen skal virke, må det området som skal sekvenseres fra genomet ha et feste punkt for de såkalte «primerne», to korte DNA-sekvenser som tilsettes reaksjonsblandingen og skal være startpunkt for kopieringen av DNA fra prøven (se en tidligere utgave av Årboken⁽¹²⁾). Det kan se ut som dette området er så ulikt og variabelt i mange børstemarkgrupper at de primerne som vanligvis benyttes ikke fester seg der. Dette er utfordringer som blant annet jobbes med i PolyNor-prosjektet (Fig. 12).

BOLD - det store «biblioteket»

I BOLD samler vi informasjon om dyret, dvs. hvilken art det er og dens plassering i det taksonomiske hierarkiet. Ettersom taksonomi er en dynamisk vitenskap, gjelder det å oppdatere navnebruk mot det som er siste status i databaser som f.eks. WORMS⁽¹⁰⁾. Vi legger også inn hvem som har artsbestemt dyret (med kontaktadresse), hvor det ble samlet inn (med opplysninger om geografiske koordinater og dybde), osv. Dette er typer av data som naturhistorikere tradisjonelt har samlet for å utforske artsmangfoldet rundt oss. Det nye er altså at slike data også knyttes til en genetisk strekkode i form av DNA, med oversettelse til det proteinet som DNA-et koder for.

Ved Evertebratsamlingen gjør vi også en betydelig innsats der vi strekkoder materiale fra kysten av Vest-Afrika. Andre laboratorier,

■ Fig. 9. Leting etter små, små snegler i blant festet til tarestilkene.



■ Fig. 10. Prosentvis fordeling av dyregruppene vi har sendt inn i fra norsk farvann så langt.

blant annet i Canada, Tyskland, Storbritannia og Portugal, har også levert omfattende bidrag av strekkoder til BOLD-systemet. Derfor er det etter hvert mulig å sammenligne strekkodesekvenser fra større geografiske områder og få et bedre bilde av utbredelsen til arten med en gitt sekvens og dens nærmeste «slektninger».

Om arten vi har sekvensert viser seg å allerede ligge inne i databasen, vil den nye sekvensen lenkes til de andre eksemplarene med matchende strekkode i en såkalt «bin». Dette nye bioinformatiske systemet har frambragt svært mange interessante resultater med ulike typer ny kunnskap. Blant annet observerer vi at ulike laboratorier har sendt inn prøver av antatt forskjellige arter som viser seg å ha helt like sekvenser. Det innebærer at en «bin» kan inneholde flere artsnavn. Det finnes flere forklaringer på hvorfor dette er tilfelle. Én mulig forklaring er at

arten er feilbestemt. Personen A har identifisert dyret som tilhørende art X, men det viser seg ved nærmere undersøkelse at A tok feil. Dyret var en Y. Slike tilfeller av feilbestemmelser finnes det sikkert mange av i publikasjoner og databaser. Problemet er at de ofte er vanskelige å oppdage, men dette er noe som strekkoding kan avsløre.

En annen mulig forklaring på at like sekvenser har ulike artsnavn er at disse antatt ulike artene faktisk er samme art. For å undersøke dette

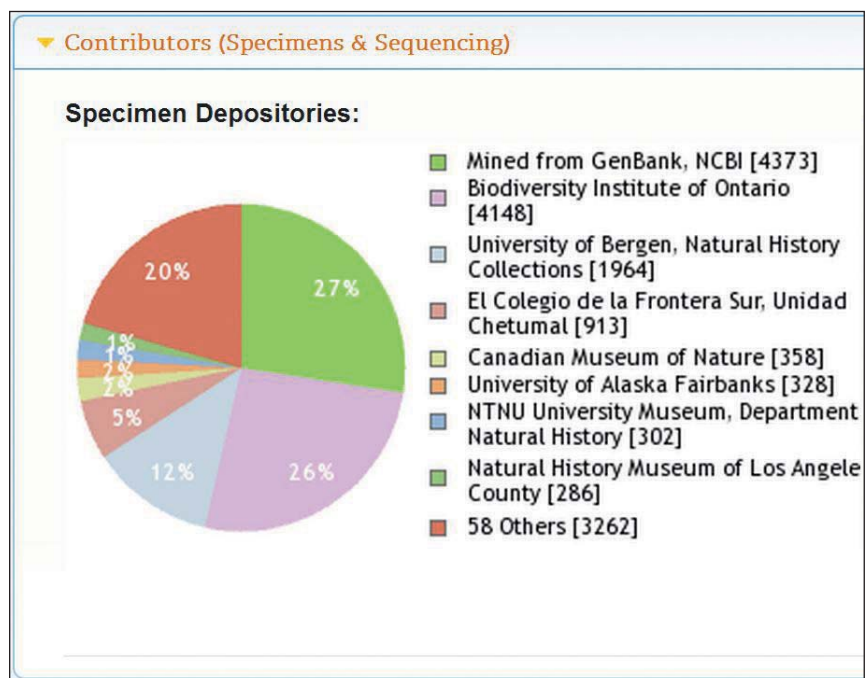
må det foretas en kritisk sammenligning av materiale fra de aktuelle artene. Slik fant for eksempel Ingvar Byrkjedal og hans kolleger⁽¹³⁾ at to «arter» av norske fisk i realiteten bare var ulikt utseende hunner og hanner av den samme arten, nemlig vortekjeks. De to ulike artsnavnene blir derfor *synonymer*, ulike navn på den samme arten. Vanligvis er det da det eldste navnet som er det riktige vitenskapelige navnet på arten.

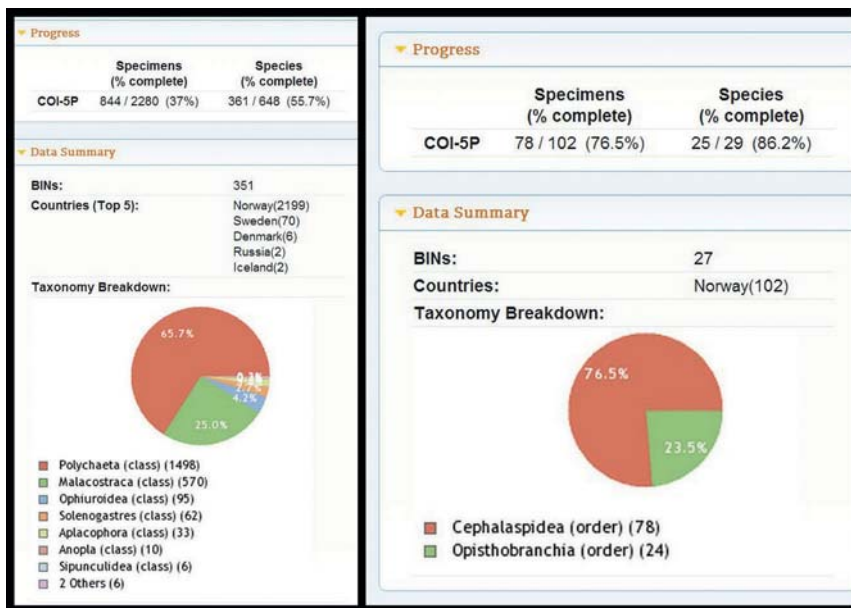
På denne måten kan den genetiske strekkodingen også hjelpe oss med å få ryddet opp i en del uregelmessigheter i taksonomien. Forskere fra ulike språk- og forskningstradisjoner har fått et nytt redskap til å oppdage slike problemer og til å samstemme sin forståelse av hvilke arter som finnes, hva de skal hete og hvordan de er utbredte.

Kryptiske arter

Sekvenseringen av våre dyr avslører ikke så rent sjelden at det som har

■ Fig. 11. Et utsnitt av BOLD-databasens (<http://www.boldsystems.org/>) nettside for børstemark (*Polychaeta*) viser at Universitetsmuseene i Bergen og Trondheim er langt framme blant leverandørene av materiale til strekkoding (den øverste linjen er «mined from GenBank», dvs. at det er automatisk uthentet fra en annen database).





■ Fig. 12. Foreløpig status i august 2014 - vi venter i øyeblikket på resultater av 570 prøver som nylig ble sendt inn. Så langt har 386 av 677 arter fått strekkoder. Det viser seg at særlig børstemarkene (*Polychaeta*) er vanskelige å få til.

blitt ansett for å være én art (gjerne med svært vid geografisk utbredelse) synes å være flere arter. Det kan være fordi den genetiske forskjellen mellom individer er svært stor, eller fordi plasseringen av sekvensene i et avstammingsstre ikke er som forventet. Kanskje finnes det også forskjeller i bygningstrekk som har blitt oversett? I slike tilfeller vil vi helst sekvensere flere gener, blant annet fra det nukleære genomet. Dessuten vil vi utføre nye undersøkelser av bygningstrekk, anatomi og økologi for å vurdere om forskjellene innebærer at det må opprettes nye arter. Det er ikke uvanlig at man i ettertid kan finne små detaljer i utseendet som gjør at man faktisk kan skille de kryptiske artene morfologisk når de først er indikert genetisk. Det er spesielt i forbindelse med slike observasjoner at DNA-strekkoding har skapt kontroverser mellom forskere med ulike filosofier. Et hovedpoeng fra kritikere er at strekkodene da benyttes til å *definere* arter i stedet for som et hjelpemiddel til å indentifisere allerede kjente arter.

En nærmere gjennomgang av denne problematikken er utenfor rammene for denne artikkelen, fordi det også ville krever en omfattende redegjørelse av hva «arter» egentlig er. Men det er verdt å minne om at den standardiserte strekkodesekvensen kommer fra mitokondrier, disse små bakteriene som for ca. 2 milliarder år siden ble innlemmet som faste komponenter i cellene til planter og dyr, og som har en viktig funksjon i energiomsetningen i kroppen. Hos de fleste dyrene arves mitokondriene bare fra mor og de vil derfor kunne ha et annet arvemønster enn kjernegenomet, der de viktigste evolusjonsbegivenhetene i dannelsen av arter foregår.

Muséenes rolle

En av de store fordelene med DNA-strekkoder er de kan hjelpe oss å identifisere arter, selv når de ytre kjennetegn som vanligvis brukes ikke forekommer. Dette har blant annet gitt muligheter for å kontrollere matvareproduksjonen og avsløre stor grad av feilmerking av

kjøtt og fisk som omsettes i de internasjonale markedene. Vi husker ramaskriket da britene oppdaget hestekjøtt på frossenpizzaen. I USA har kontroller av sjømat funnet at mellom 30 og 70 prosent av fisken som serveres på sushi-restauranter er andre arter enn det de er oppgitt å være. Men det er klart at dersom DNA-strekkoder skal gi oss fasit på artsbestemmelser, så må strekkodene være kvalitetssikret og etterprøvbare. Derfor er dyret som vevsprøven ble tatt fra en særdeles viktig del av dokumentasjonsgrunnlaget. Vi registrerer⁽¹⁴⁾, med en viss selvtilfredshet, at det skrives følgende i en artikkel i amerikansk Wikipedia om feilmerking av sjømat: «Forfatterne av artikkelen "What can biological barcoding do for marine biology?"⁽¹⁵⁾ forklarer grunnen til at den amerikanske regjeringen mener at «gyldige fiskestandarder» er viktig. For at DNA-strekkoding skal bli vellykket er det kritisk at sammenhengen mellom sekvens og museumsprøve opprettholdes. Deposering av en «voucher» (det vil si individet som DNA ble tatt fra) vil sikre at alle resultater som legges inn i Genbank eller lignende databaser kan sjekkes og korrigeres...».

Det er allerede tydelig at en del helt like sekvenser i databasene er merket med ulike artsnavn fra ulike institusjoner og laboratorier der DNA-sekvensering pågår. Det innebærer at søk med ukjente sekvenser i BOLD og Genbank sine «identifiseringsmaskiner» ikke nødvendig-





vis vil gi entydige svar på hvilken art du har sekvensert. Slike tilfeller viser klart hvilket potensiale DNA-strekkoding har som instrument for å avsløre feilbestemmelser og taksonomiske problemer. Og framfor alt da er det at «vouchersamlingen», altså de konserverte dyrene som prøvene ble tatt fra, kommer til sin fulle rett i sammenlignende studier og taksonomisk revisjonsarbeid. Dette er selve kjernevirksomheten i vitenskapelige naturhistoriske samlinger, og DNA-undersøkelser har vist at det er langt igjen før vi med en viss rett kan påstå at vi har veldig god kunnskap om den norske marine faunaen.

Lenker og referanser:

- 1) <http://www.norbol.org/>
- 2) <http://www.artsdatabanken.no/artsprosjektet>
- 3) <http://evertebrat.b.uib.no/>
- 4) <http://ibol.org/>
- 5) <http://mareano.no/>
- 6) Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L. & deWaard, J. R. (2003) Biological identifications through DNA barcodes. Proc. R. Soc. Lond. B 270, 313–321. (doi:10.1098/rspb.2002.2218)
- 7) <http://www.ccdb.ca/>
- 8) http://www.youtube.com/watch?feature=player_embedded&v=RdgpTPmjE0
- 9) <http://boldsystems.org/>
- 10) <http://www.marinespecies.org/>
- 11) <http://www.ntnu.no/vitenskapsmuseet/mangfold-flerborstemark>
- 12) Willassen, Endre (2006) Årbok for Bergen Museum 2005:18-25
- 13) Byrkjedal, I., Rees, D. & Willassen E. (2007) Lumping lumpsuckers: molecular and morphological insights into the taxonomic status of *Eumicrotremus spinosus* (Fabricius, 1776) and *Eumicrotremus eggvinii* Koefoed, 1956 (Teleostei: Cyclopteridae). Journal of Fish Biology 71:111 - 131. DOI: 10.1111/j.1095-8649.2007.01550.x
- 14) http://en.wikipedia.org/wiki/Seafood_mislabelling
- 15) Schander, C. & Willassen, E. (2005) What can biological barcoding do for marine biology? Marine Biology Research 1:79-83

