

Vinnsla og vöruþróun  
Processing and Product  
Development

Líftækni  
Biotechnology



Matvælaöryggi  
Food Safety



# Þróun erfðagreiningaraðferðar til tegundaákvörðunar helstu nytjastofna Íslands

Sigurlaug Skírnisdóttir  
Þorsteinn Sigurðsson  
Ólafur K. Pálsson  
Sigríður Hjörleifsdóttir

Erfðir og eldi

Skýrsla Matís 17-09  
Maí 2009

ISSN 1670-7192

# Þróun erfðagreiningaraðferðar til tegundaákvörðunar helstu nytjastofna Íslands

**MATÍS – Prokaria**

Maí 2009

Sigurlaug Skírnisdóttir<sup>1)</sup>  
Þorsteinn Sigurðsson<sup>2)</sup>  
Ólafur K. Pálsson<sup>2)</sup>  
Sigríður Hjörleifsdóttir<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Matís-Prokaria, Gylfaflöt 5, 112 Reykjavík

<sup>2)</sup> Hafrannsóknastofnunin, Skúlagata 4, 101 Reykjavík



**HAFRANNSÓKNASTOFNUNIN**

<i>Titill / Title</i>	<b>Þróun erfðagreiningaraðferðar til tegundaákvörðunar helstu nytjastofna Íslands / Species identification of Icelandic marine organisms using a genetic analyzes technique</b>		
<i>Höfundar / Authors</i>	Sigurlaug Skírnisdóttir <sup>1</sup> , Þorsteinn Sigurðsson <sup>2</sup> , Ólafur K. Pálsson <sup>2</sup> , Sigríður Hjörleifsdóttir <sup>1</sup> <sup>1</sup> Matis ohf <sup>2</sup> Hafrannsóknastofnunin		
<i>Skýrsla / Report no.</i>	17-09	<i>Útgáfudagur / Date:</i>	Maí 2009
<i>Verknr. / project no.</i>	2211 1788		
<i>Styrktaraðilar / funding:</i>	AVS rannsóknasjóður í sjávarútvegi		
<i>Ágríp á íslensku:</i>	<p>Eins og nafn verkefnisins „Þróun erfðagreiningaraðferðar til tegundaákvörðunar helstu nytjastofna Íslands“ (tilvísunarnúmer AVS R 012-07 (08)) gefur til kynna, þá var markmið verkefnisins að þróa hraðvirka og ábyggilega erfðagreiningaraðferð til að tegundagreina íslenska nytjastofna sjávar. Engin fljótleg og áreiðanleg greiningaraðferð var til fyrir íslenska nytjastofna sjávar sem eru á hinum ýmsu líf- og vinnslustigum. Fram að þessu hafa útlitsgreiningar verið ráðandi í tegundagreiningum flóknari lífvera en sú vinna krefst mjög þjálfðra flokkunarfræðinga og er sú aðferð að öllu jöfnu tímafrek. Margar sjávarlífverur, egg, lirfur, seiði og ungvíði fiska er mjög erfitt að greina út frá útlitseinkennum. Ef sýni eru ekki heil eða greina á óþroskuð lífform þá geta sérfræðingar jafnvel ekki greint sýnið til tegundar.</p> <p>Raðgreining á tegundaágreinandi genum (merkigenum) er öflug og fljótleg aðferð til að tegundagreina óþekktar lífverur. Í verkefninu voru 26 nytjastofnar sjávar rannsakaðir. Erfðaefni var einangrað úr sýnunum en síðan voru hvatberagenin cytochrome c oxidase subunit 1 (COI), cytochrome b (Cytb) og 16S RNA (16S) mögnuð upp með varðveittum vísam og því næst raðgreind. Aðferðin var þekkt en nokkur vinna var í því að finna réttu vísana og mögnunaraðstæðurnar fyrir hina ýmsu hópa. Búið er að samþykkja það á alþjóðavísu að nota COI genið sem merkigen og nokkur stór raðgreiningarverkefni eru í gangi þar sem stórir og öflugir gagnabankar eru í uppbyggingu (s.s. “Barcode of Life”). Í verkefninu voru COI, Cytb og 16S genin hlutaraðgreind fyrir nytjastofnana en alls voru 1-5 einstaklingar skoðaðir fyrir hverja tegund. Þessum röðum var safnað í gagnabanka sem var útbúinn ásamt birtum röðum fyrir þessar tegundir og annarra skyldra tegunda.</p> <p>Þegar búið var að þróa aðferðina og koma gagnabankanum upp var næmni aðferðarinnar könnuð með þremur gerðum óþekktara sýna (blind sýni). Í fyrsta lagi voru sýni fengin úr fiskverslunum, í öðru lagi voru sýni úr sýnasafni Hafrannsóknarstofnunarinnar greind og að lokum voru greind seiði sem voru 2-8 cm löng. Í öllum tilvikum tókst að tegundagreina óþekktu sýnin með DNA erfðagreiningaraðferðinni en útlitsgreiningar á seiðunum voru nokkuð erfiðar.</p> <p>DNA tegundagreining er mun hraðvirkari, ódýrari og nákvæmari en hefðbundnar útlitsgreiningar. Þessi aðferð kemur því sterkt inn í atvinnulífið til að tryggja öruggar greiningar á öllum lífsformum nytjastofnanna, til greiningar blandaðra sýna úr sjó og til tegundagreiningar á öllum vinnslustigum sjávarafurða. Matis-Prokaria hefur nú þegar fengið viðskipti út á svona greiningarþjónustu.</p>		
<i>Lýkilorð á íslensku:</i>	<i>Tegundargreining, nytjastofnar sjávar, 16S, COI, Cytb.</i>		

*Summary in English:*

The goal of the project “Species identification of Icelandic marine organisms using a genetic analyzes technique” (project no. AVS R 012-07 (08)) was to develop a sequencing databank for three chronometer mitochondria genes for 26 Icelandic marine species. Furthermore, to develop a DNA protocol to analyze mixed unknown samples, such as juveniles of fishes and identification of fishes in fish stores.

Classical morphological identification of marine species is time-consuming and depends on a high degree of taxonomic expertise. This expertise is currently falling short, therefore, in many cases the identification of a species is the major bottleneck in marine biodiversity and ecosystem research. On demand, molecular diagnostic techniques have proven to be successful species identification tools. Recently, DNA barcoding has been highly accepted as a rapid, cost-effective and broadly applicable tool for species identification. Currently, the three most common DNA barcoding targets are the mitochondrial genes cytochrome c oxidase I (COI), cytochrome b (Cytb) and 16S RNA (16S). For DNA barcoding, the mtDNA gene, cytochrome c oxidase I (COI), has been highlighted as the genetic marker for species identification in huge international projects, like the project “Barcode of Life”. In this project we did a partial sequencing of these three genes of 26 Icelandic marine organisms that are utilized in Iceland. The method is straight forward; DNA is isolated from the specimen, the three genes are PCR amplified in separated reactions by using universal primers and then sequenced. A database was developed, saving the sequences obtained in the project for the three genes.

Finally, 24 unknown samples (blind samples) were analyzed. Part of the samples were fish fillets from fish shops, some were samples from the databank of MRI and some samples were juvenile fishes that were difficult to identify by morphology. All samples were species identified easily by using the sequencing method, supporting the importance of the method.

DNA species identification is more rapid, cost-effective and more accurate than the classical morphological identification method. Therefore, this method is an important tool for the industry to ensure reliable identification of marine organisms in all life stages and process stages. Matis-Prokaira has already customers for such identification services.

*English keywords:*      *Barcoding, marine species identification, 16S, COI, Cytb*

## EFNISYFIRLIT

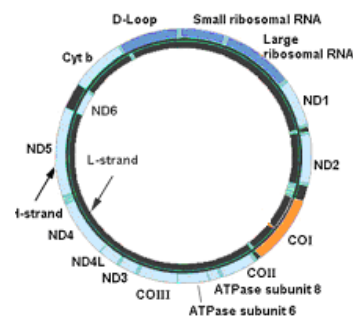
1. INNGANGUR.....	1
2. FRAMKVÆMD .....	4
2.1 Söfnun sýna úr 26 nytjastofnum við Ísland.....	4
2.2 DNA einangrun .....	4
2.3 Mögnun á COI, Cytb og 16S genum.....	4
2.4 Raðgreining á COI, Cytb og 16S genum.....	5
2.5 Gagnabanki með raðir COI, Cytb og 16S gena.....	6
2.6 Blind rannsókn á óþekktum sýnum.....	7
3. NIÐURSTÖÐUR .....	8
3.1 Söfnun sýna úr 26 nytjastofnum við Ísland.....	8
3.2 DNA einangrun .....	8
3.3 Mögnun á COI, Cytb og 16S genum.....	8
3.4 Raðgreining á COI, Cytb og 16S genum.....	9
3.5 Gagnabanki með raðir COI, Cytb og 16S gena.....	11
3.6 Blind rannsókn á óþekktum sýnum.....	16
4. UMRÆÐUR OG ÁLYKTANIR.....	18
5. ÞAKKARORÐ .....	21
6. HEIMILDIR .....	22

# 1. INNGANGUR

Markmið verkefnisins var að þróa hraðvirka og ábyggilega erfðagreiningaraðferð til að tegundagreina íslenska nytjastofna sjávar. Aðferðin var tvíþætt. Annars vegar að útbúa gagnabanka sem innihélt raðgreiningar á þremur tegundaaðgreinandi genum fyrir þá 26 íslensku nytjastofna sjávar sem Hafrannsóknastofnunin hefur á skrá sinni. Hins vegar að þróa DNA aðferðafræði til að greina óþekkt sýni með því að nota upplýsingarnar í gagnabankanum. Engin fljótleg og áreiðanleg greiningaraðferð var til fyrir íslenska nytjastofna sjávar sem eru á hinum ýmsu líf- og vinnslustigum og þess vegna var mikil þörf fyrir góða og örugga aðferð. Margar sjávarlífverur, egg, lírfur, seiði og ungið fiski, er mjög erfitt að greina út frá útlitseinkennum. Þær aðferðir sem notaðar eru að mestu í dag eru mjög tímafrekar og krefjast mikillar þjálfunar í flokkunar- og greiningarfræðum. Greiningarvinnan er þess vegna oft mikill flöskuháls. Einnig er hægt að nota aðferðina til að greina magainnihald fiski og til að skera úr um vafamál á fiskimörkuðum sem er sívaxandi vandamál (fiskur eldur undir röngu tegundarheiti).

Raðgreining á tegundaaðgreinandi genum (merkigenum) er öflug og fljótleg aðferð til að tegundagreina óþekktar lífverur. Þessi aðferð hefur verið mikið notuð til tegundagreiningar á bakteríum í gegnum tíðina en nú er hún notuð í vaxandi mæli til greiningar á flóknari lífverum. Alþjóðlega verkefnið "Barcode of Life" er glögg dæmi þess en í því er búið að samþykkja að nota hvatberagenið cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) sem merkigen fyrir margar fylkingar lífvera (Ratnasingham and Hebert 2007). Við rannsóknir á flóknum lífverum er hentugra að nota merkigen sem eru staðsett í hvatberaerfðaefninu en gen sem staðsett eru í kjarnaerfðaefninu. Ástæðan er m.a. sú að einungis ein gerð finnst í hverjum einstaklingi (þó er heteroplasmid þekkt) og að hvatberaerfðaefnið endurraðast ekki. Einnig er kostur að það eru nokkur hundruð og upp í þúsundir hvatbera í hverri frumu sem eykur fjölda eintaka genanna (Mynd 1). Þetta gerir því mögnun á hvatberagenum mun auðveldari en mögnun á genum sem eru staðsett í kjarnaerfðaefni þegar unnið er með lítið eða lélegt DNA sýni (Hebert et al. 2003a; Hebert et al. 2003b).

**Mynd 1.** Uppbygging hvatberaerfðaefnis. Þrettán proteínkóðandi gen eru í hvatberaerfðaefninu en tvö þeirra voru notuð í verkefninu, COI og Cytb. Að auki er 16S RNA genið staðsett þarna en það var einnig notað sem merkigen í verkefninu.



Það eru aðallega tvær ástæður sem gera COI genið að mjög álitlegum kosti fyrir tegundagreiningar. Í fyrsta lagi er 5'endi þess mjög varðveittur og búið er að hanna vísapör sem eru það öflug að

þau eiga að geta magnað upp flestallar dýrafylkingar (phyla). Í öðru lagi inniheldur COI genið meiri erfðafræðilegar upplýsingar en öll hin hvatberagenin þar sem þriðji basinn í tákna sýnir háa stökkbreytistöðni. Breytileiki COI innan tegundar er venjulega minni en 1% en svæðið í hvatberageninu COI sem er venjulega notað til tegundarákvörðunar er u.þ.b. 600 basa langt. Rannsóknir hafa sýnt að COI genið er mjög hentugt til að tegundagreina fugla, fiðrildi, fiska, flugur og marga aðra dýrahópa (Hebert et al. 2003a; Hebert et al. 2003b; Ward et al. 2008a; Ward et al. 2005; Waugh 2007). Hins vegar hefur COI ekki reynst hentugt til að tegundagreina plöntur þar sem breytileiki innan gensins er það lágur í plöntum en önnur gen hafa verið valin til þess (Kress et al. 2005).

Það er margt sem gerir 16S genið að góðum kosti til að meta skyldleika lífvera. Það finnst í öllum lífverum og er mjög vel varðveitt m.t.t. byggingar og virkni (De Rijk et al. 1992). Rannsóknir hafa sýnt að auðveldara er að magna 16S genið upp en COI en vísasetið sem er notað er varðveittara í 16S en COI (Aliabadian et al. 2009; Vences et al. 2005). Í sumum tilvikum er ekki hægt að nota 16S genið til að greina á milli mjög skyldar tegunda en þá er gott að hafa önnur gen til hliðsjónar eins og COI. Cytochrome b genið (Cytb) hefur einnig verið notað á árangursríkan hátt í erfðarannsóknum á ýmsum tegundum hryggdýra en hefur þó verið minna notað en hin genin tvö (Hsieh et al. 2001; Kochzius et al. 2008; Lemer et al. 2007; Sevilla et al. 2007; Smith and Patton 1991; Ward et al. 2008b).

Notkun merkigena til að greina fiska og önnur hryggdýr er t.t.l. nýtilkomin og þ.a.l. er listinn ekki tæmandi í gagnaböndum. Nýjar upplýsingar bætast við dag frá degi og sem dæmi má nefna að þann 14. september 2006 var búið að raðgreina COI genið í 2346 fiskitegundum en 2. febrúar 2009 var talan kom upp í 5876 (sjá síðuna <http://www.fishbol.org/progress.php>). Þekktar eru rúmlega 29.000 fisktegundir þannig að það er enn langt í land. Einnig eru til í gagnagrunni greiningar á þessum þremur genum fyrir nokkrar tegundir úr verkefninu „Fish and Chips“ sem 6. rammaáætlun Evrópusambandsins styrkti og Prokaria var þátttakandi í (Kochzius et al. 2008).

Fram að þessu hafa útlitsgreiningar verið ráðandi í tegundagreiningum flóknari lífvera en sú vinna krefst mjög þjálfaðra flokkunarfræðinga. Ef sýni eru ekki heil eða greina á óproskuð lífform þá getur það jafnvel verið sérfræðingi ómögulegt að greina sýnið til tegundar. Einnig eru tilvik um náskyldar tegundir sem eru það líkar útlits, að nær ómögulegt er að greina á milli tegundanna með útlitsgreiningum en raðgreiningar gera það kleift (Ward et al. 2008b; Ward et al. 2005). Greining á eggjum, seiðum, fisklirfum og ungvíði er mikilvæg í rannsóknum á nýliðun fiskistofna og getur jafnframt nýst við fiskveiðistjórnun. T.d. hafa erfðafræðilegar rannsóknir á þorskseggjum í Írska hafinu sýnt að fjöldi þorskseggja hafi verið mjög ofmetinn með hefðbundinni greiningu (Fox et al. 2005). Rannsóknir á fæðuháttum fiska og fjölstofnatengsl eru einnig mikilvægur þáttur í að skilja áhrif og orsakir breytinga á stofnstærð fiskistofna. Í þessu tilliti eru rannsóknir á fæðu og magainnihaldi fiska mikilvægar en greining magainnihalds getur oft á tíðum verið erfið ef einungis eru notaðar útlitsgreiningar. Með örlitlu vefjasýni er hægt að

nota raðgreiningu merkigena til að greina þessi lífsform og magainnihald með öruggum hætti og á mun skemmri tíma en ella væri hægt.

Falsanir á fiskmörkuðum virðist vera orðið sívaxandi vandamál. Þetta kom skýrt fram á ráðstefnu í EU-6 verkefninu "Marine Genomics" í október 2006. Stundum er verið að selja unna vöru líkt og fiskiflök sem erfitt er að greina. Í nýlegri grein eftir Wong og Hanner sýna niðurstöður að allt að 25% seldra fiskafurða á mörkuðum og á veitingahúsum í N-Ameríku eru seldar undir röngu tegundarnafni og þá er venjulega verið að selja vöruna sem dýrari tegund (Wong and Hanner 2008). Það er því afar mikilvægt fyrir fiskkaupendur að vera vissir um að þeir séu að fá það sem þeir borguðu fyrir. Að auki er talið líklegt að í framtíðinni verði það vaxandi krafa kaupandans að allur seldur fiskur hafi vottaða DNA tegundagreiningu til að koma í veg fyrir svona falsanir (Rasmussen and Morrissey 2009).

Í verkefninu voru hvatberagenin COI, 16S og Cytb notuð sem merkigen fyrir íslensku nytjastofnana 26. Þótt eitt gen sé fræðilega nóg til að greina nytjastofnana þá eykst næmnin til muna með því að nota þrjú ólík gen og það kom berlega í ljós í þessu verkefni. Gagnabanki sem innihélt raðgreiningaupplýsingar fyrir genin þrjú var útbúinn en raðgreiningar voru gerðar á 1-5 einstaklingum fyrir hverja tegund. Raðgreiningaupplýsingar úr gagnabönkum á netinu voru einnig settar inn í gagnabankann og notaðar til viðmiðunar. Með því að safna öllum þessum upplýsingum saman á einn stað og koma þeim í aðgengilegt form í gagnabanka sem hægt er að leita í og setja nýjar raðir inn í, þá er hægt gera greiningu á óþekktum lífverum á mun skemmri tíma og á nákvæmari hátt en áður hefur verið beitt héraendis.

DNA tegundagreining er mun hraðvirkari, ódýrari og nákvæmari en hefðbundnar útlitsgreiningar (Hebert et al. 2004). Þessi aðferð kemur því sterkt inn í atvinnulífið til að tryggja öruggar greiningar á öllum lífsformum nytjastofnanna, til greiningar blandaðra sýna úr sjó og til tegundagreiningar á öllum vinnslustigum fiskiafurða.



## 2. FRAMKVÆMD

### 2.1 Söfnun sýna úr 26 nytjastofnum við Ísland

Samkvæmt lista Hafrannsóknastofnunarinnar í nóvember 2006 þá voru eftirfarandi 26 nytjastofnar við Ísland: blálanga (*Molva dypterygia*), djúpkarfi (*Sebastes mentella*), grálúða (*Reinhardtius hippoglossoides*), gulllax (*Argentina silus*), hrognkelsi (*Cyclopterus lumpus*), humar (*Nephrops norvegicus*), hörpuðiskur (*Chlamys islandica*), gullkarfi (*Sebastes marinus*), keila (*Brosme brosme*), kolmenni (*Micromesistius poutassou*), kúfskel<sup>1</sup> (*Arctica islandica*), langa (*Molva molva*), langlúra (*Glyptocephalus cynoglossus*), loðna (*Mallotus villosus*), lúða (*Hippoglossus hippoglossus*), rækja (*Pandalus borealis*), sandkoli (*Limanda limanda*), síld (*Clupea harengus*), skarkoli (*Pleuronectes platessa*), skrápflúra (*Hippoglossoides platessoides*), skötuselur (*Lophius piscatorius*), steinbitur (*Anarhichas lupus*), stórkjafra (*Lepidorhombus whiffiagonis*), ufsi (*Pollachius virens*), ýsa (*Melanogrammus aeglefinus*) og þorskur (*Gadus morhua*). Fengin voru sýni úr 3-6 einstaklingum af hverri tegund. Tálkn eða annar vefur var settur strax í 92% etanól og sýnin síðan geymd við -20°C þar til þau voru rannsökuð. Upplýsingar um hvert sýni var skráð, s.s. dagssetning og veiðistaður ásamt líffræðilegum upplýsingum um lífveruna.

### 2.2 DNA einangrun

DNA var einangrað úr 3-6 einstaklingum fyrir allar 26 tegundirnar sem listaðar eru fyrir ofan. Þar sem sýnin voru ólík að gæðum og úr mismunandi vefjum, voru nokkrar DNA einangrunaraðferðir prófaðar og þær notaðar á mismunandi stigum vinnunnar. DNA einangrunaraðferð frá Macherey-Nagel (Nucleospin 96 Tissue) var prófuð, notuð var blanda af þeirri aðferð og Agowa segulkúluhreinsun en einnig var hrein Agowa segulkúluhreinsun gerð samkvæmt leiðbeiningum frá framleiðanda (Agowa GmbH).

### 2.3 Mögnun á COI, Cytb og 16S genum

Að DNA einangruninni lokinni var næsta skref að magna upp merkigenin Cytb, 16S og COI í aðskildum hvörfum með svokallaðri PCR mögnunaraðferð. Genin þrjú voru mögnuð upp í 15 µl rúmmáli og voru eftirfarandi: 1-3 µl af DNA (mismunandi þynningar notaðar), 0,25 til 1,5 µl af 10 mM dNTP, 1,5 µl af 10x polymerase buffer, 0,3 µl af Teg DNA polymerasa (3U/µl, Matís-Prokaria) eða aðrir polymerarasar (DynaZyme, Phusion og Taq Gold), 0,0125 eða 0,05 µl af 100 µM fram- og afturvísun (sjá Töflu 1) og fyllt upp með vatni að 15 µl. PCR ferillinn var eftirfarandi: 94°C í 4:00 og síðan 30-35 hringir af 94°C í 30-50 sek, þáttapörunarhitastig á bilinu 45°C til 59°C í 30-50 sek og 72°C í 30-90 sek (sjá Töflu 1). Í lokin var hitun við 72°C í 7 mín. PCR mögnunin var gerð í Peltier Thermal Cycler PTC-225 (MJ Research) eða Tetrad 2 Peltier Thermal Cycler (BioRad) tækjum. Notaðir voru bæði PCR vísar sem voru hannaðir hjá Matís-Prokaria og síðan þekktir vísar (Dahlgren et al. 2000; Espineira et al. 2008; Folmer et al. 1994;

<sup>1</sup> Lífveran er einnig þekkt sem kúskel en sérfræðingar Hafrannsóknastofnunarinnar nota heitið kúfskel.

Ivanova et al. 2007; Kappner and Bieler 2006; Matsumoto and Hayami 2000; Mikkelsen et al. 2006; Palumbi 1996; Podsiadlowski and Bartolomaeus 2005; Ward et al. 2005). PCR hvörf voru endurtekin og PCR aðstæðum breytt ef mögnun fékkst ekki. Eftir PCR mögnum voru PCR afurðirnar settar á 0,7% TAE agarósagel til að skoða stærðir og gæði mögnunar. Notaður var 1 KB ladder til stærðar- og magngreiningar á mögnunarfurðunum (New England Biolabs).

**Tafla 1.** PCR vísar sem voru prófaðir í verkefninu til að magna upp genin COI, 16S og Cytb.

Gen	Vísanafn	PCR blanda	báttapörunarhitastig	Primer sequence	Heimild-hönnun
16S	16fiF140	PCR1	54°C	5'-CGYAAGGGAAHGCTGAAA-3'	Matis-Prokaria hönnun
16S	16fiR1524	PCR1	54°C	5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGTAG-3'	Matis-Prokaria hönnun
Cytb	CytbF	PCR2	52°C	5'-GGCTGATTTCGGGAATATGCAYGCNAAYGG-3'	Matis-Prokaria hönnun
Cytb	CytbR	PCR2	52°C	5'-GGGAATGGATCGTAGAATTCRTANGCRAA-3'	Matis-Prokaria hönnun
COI	cox1-Fish-F	PCR3	59°C	5'-TTCTCAACTAACCAAAAAGAYATYGG-3'	Matis-Prokaria hönnun
COI	cox1-Fish-R	PCR3	59°C	5'-TAGACTTCTGGGTGGCCRAARAAYCA-3'	Matis-Prokaria hönnun
COI	Ward_FishF1+M13	PCR 4	52°C	5'-TGTA AAAACGACGGCCAGTCAACCAACCAAAAGACATTGGCAC-3'	Ward et al., 2005
COI	Ward_FishF2+M13	PCR4	52°C	5'-TGTA AAAACGACGGCCAGTCAACTAATCATAAAGATATCGGCAC-3'	Ward et al., 2005
COI	Ward_FishR2+M13	PCR4	52°C	5'-CAGGAAACAGCTATGACACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA-3'	Ward et al., 2005
COI	Ivan FishR1+M13	PCR4	52°C	5'-CAGGAAACAGCTATGACACTTCAGGGTGCCGAARAAYCARAA-3'	Ivanova et al., 2007
16S	16Sar	PCR5	50°C	5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3'	Palumbi, 1996
16S	16Sbr	PCR5	50°C	5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3'	Palumbi, 1996
16S	16Sar-ALT	PCR6	48°C	5'-GCCTGTTTATCAAAAACATSG-3'	Mikkelsen et al., 2006
16S	16Sbr-ALT	PCR6	48°C	5'-CCGGTCTGAACTCAGATCATGT-3'	Mikkelsen et al., 2006
16S	16SL3-Ven	PCR7	58°C	5'-GCAAYGAGAGTTGTRCTAAGGTAGC-3'	Kappner & Bieler, 2006
16S	16SH1-Ven	PCR7	58°C	5'-ATAATCCAACATCGAGGTCGCAAA-3'	Kappner & Bieler, 2006
COI	LCO1490	PCR8	45°C	5'-GGTCAACAATCATAAAGATATTGG-3'	Folmer et al., 1994
COI	HC02198	PCR8	45°C	5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'	Folmer et al., 1994
COI	COIF-ALT	PCR9	48°C	5'-ACAAATCAYAARGAYATYGG-3'	Mikkelsen et al., 2006
COI	COIR-ALT	PCR9	48°C	5'-TTCAGGRTGCCRAARAAYCA-3'	Mikkelsen et al., 2006
Cytb	L14735	PCR10 og 11	50°C og 54°C	5'-AAAAACCCCGTTGTTATTCACTA-3'	Espineira et al., 2008
Cytb	TRUCCYTB-R	PCR10	54°C	5'-CCGACTTCGGGATTACAAGACCG-3'	Espineira et al., 2008
Cytb	H15149AD	PCR11	50°C	5'-CCCTCARAATGAYATTGCTCTCA-3'	Espineira et al., 2008
COI	Horpud_COI-F	PCR12	52°C	5'-ATYGGNGGNTTYGGNAAYTG-3'	Matsumoto and Hayami, 2000
COI	Horpud_COI-R	PCR12	52°C	5'-ATNGCRAAYTTYGGNTC-3'	Matsumoto and Hayami, 2000
16S	Crust-16S-F	PCR13	48	5'-GGACCTCGATGTGGATTAA-3'	Podsiadlowski and Bartolomaeus, 2005
16S	Crust-16S-R	PCR13	48	5'-CCGGTCTGAACTCAYATC-3'	Podsiadlowski and Bartolomaeus, 2005
Cytb	Cytb_397-F	PCR14	46°C	5'-YWYTRCCTTGGRRCARATATC-3'	Dahlgren et al., 2000
Cytb	Cytb_811-R	PCR14	46°C	5'-GCRWAYARAARTAYCAITCWGG-3'	Dahlgren et al., 2000
COI	LCO1490-Ven	PCR15	50-55°C	5'-ATTATTTCAGAACCAATCATAAAGATATTGG-3'	Kappner Bieler, 2006# 952
COI	HCOI-900Ven	PCR15	50-55°C	5'-TGTAGGAATGACAAATAAAAAGTTAC-3'	Kappner Bieler, 2006# 952

## 2.4 Raðgreining á COI, Cytb og 16S genum

Fyrir raðgreiningu voru PCR afurðirnar (2,5 µl) hreinsaðar með ExoSAP-it PCR Clean-up Kit en notuð var 0,25 µl ensímblanda og hitastigull samkvæmt leiðbeiningum framleiðanda (GE Healthcare). Síðan voru mögnunarfurðirnar raðgreindar en raðgreiningahvörfin voru gerð með BigDye terminators version 3.1v eftir leiðbeiningum frá framleiðanda (Applied Biosystems). PCR afurðirnar voru raðgreindar beint með því að nota innri vísa eða PCR vísana sjálfa fyrir hvert gen frá báðum endum (Tafla 2). Notaðir voru bæði raðgreiningavísar sem voru hannaðir hjá Matis-Prokaria og síðan þekktir vísar (Dahlgren et al. 2000; Espineira et al. 2008; Folmer et al. 1994; Kappner and Bieler 2006; Matsumoto and Hayami 2000; Messing 1983; Mikkelsen et al. 2006; Palumbi 1996; Podsiadlowski and Bartolomaeus 2005). ABI PRISM 3730 raðgreinir (Applied Biosystems) var notaður í greininguna.

Eftir raðgreiningu voru raðgreiningagögnin flutt yfir í forritið Sequencher 4.7 (Gene Codes Corporation). Þar voru raðirnar yfirfarnar og raðgreiningar úr sömu tegundum sameinaðar og samraðanir skoðaðar. Til viðmiðunar voru raðir sömu eða skyldra tegunda úr GenBank hafðar til hliðsjónar ef þær voru fyrir hendi.

**Tafla 2.** Raðgreiningarvísar sem voru notaðir í raðgreiningu á genum COI, 16S og Cytb í verkefninu.

Gen	Vísanafn	PCR blanda	Primer sequence	Heimild-hönnun
16S	16sar-L	PCR1	5'-CGCCTGTTTAACAAAAACAT-3'	Palumbi, 1996
16S	16fiseq1463	PCR1	5'-TGCACCATTAGGATGTCCTGATCCAAC-3'	Matís-Prokaria hönnun
Cytb	CytbFseq	PCR2	5'-GGCTGATTCCGGAATATGCA-3'	Matís-Prokaria hönnun
Cytb	CytbRseq	PCR2	5'-GGGAATGGATCGTAGAATTGC-3'	Matís-Prokaria hönnun
COI	cox1-Fish-F	PCR3	5'-TTCTCAACTAACCAAYAAAGAYATYGG-3'	Matís-Prokaria hönnun
COI	cox1-Fish-R	PCR3	5'-TAGACTTCTGGGTGGCCRAARAAYCA-3'	Matís-Prokaria hönnun
COI	M13F_SS	PCR4	5'-TGTAACACGACGGCCAGT-3'	Messing, 1983
COI	M13R_SS	PCR4	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'	Messing, 1983
16S	16Sar	PCR5	5'-CGCCTGTTTATCAAAAAACAT-3'	Palumbi, 1996
16S	16Sbr	PCR5	5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3'	Palumbi, 1996
16S	16Sar-ALT	PCR6	5'-GCCTGTTTATCAAAAAACATSG-3'	Mikkelsen et al., 2006
16S	16Sbr-ALT	PCR6	5'-CCGGTCTGAACTCAGATCATGT-3'	Mikkelsen et al., 2006
16S	16SL3-Ven	PCR7	5'-GCAAYGAGAGTTGTRCTAAGGTAGC-3'	Kappner & Bieler., 2006
16S	16SH1-Ven	PCR7	5'-ATAATCCAACATCGAGGTCGCAA-3'	Kappner & Bieler., 2006
COI	LCO1490	PCR8	5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'	Folmer et al., 1994
COI	HC02198	PCR8	5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'	Folmer et al., 1994
COI	COIF-ALT	PCR9	5'-ACAAATCAYAARGAYATYGG-3'	Mikkelsen et al., 2006
COI	COIR-ALT	PCR9	5'-TTCAGGRTGNCCRAARAAYCA-3'	Mikkelsen et al., 2006
Cytb	L14735	PCR10 og 11	5'-AAAAACCACCGTTGTTATTCAACTA-3'	Espineira eta al., 2008
Cytb	TRUCCYTB-R	PCR10	5'-CCGACTTCCGGATTACAAGACCG-3'	Espineira eta al., 2008
Cytb	H15149AD	PCR11	5'-CCICCTCARAATGAYATTGCTCCTCA-3'	Espineira eta al., 2008
COI	Horpud_COI-F	PCR12	5'-ATYGGNGGNTTYGGNAAYTG-3'	Matsumoto and Hayami, 2000
COI	Horpud_COI-R	PCR12	5'-ATNGCRAAYTTYGGNTC-3'	Matsumoto and Hayami, 2000
16S	Crust-16S-F	PCR13	5'-GCGACCTCGATGTTGGATTAA-3'	Podsiadlowski and Bartolomeaus, 2005
16S	Crust-16S-R	PCR13	5'-CCGGTCTGAACTCAYATC-3'	Podsiadlowski and Bartolomeaus, 2005
Cytb	CytB_811-R	PCR14	5'-GCRWAYARAAARTAYCAYTCWGG-3'	Dahlgren et al., 2000
Cytb	CytB_402-Fseq	PCR14	5'-CCTTGGGGCAGATATCTTTTTG-3'	Dahlgren et al., 2000
COI	LCO1490-Ven	PCR15	5'-ATTATTCAGAACCAATCATAAAGATATTGG-3'	Kappner Bieler, 2006#952
COI	HCOI-900Ven	PCR15	5'-TGTAGGAATAGCAATAATAAAAGTTAC-3'	Kappner Bieler, 2006#952

## 2.5 Gagnabanki með raðir COI, Cytb og 16S gena

Leitað var í gagnabökum á netinu eftir raðgreiningum úr þeim 26 nytjastofnum sem rannsakaðir voru hérna og skyldum tegundum fyrir genin COI, Cytb og 16S. Einnig voru raðgreiningar fyrir sömu tegundir úr Evrópuverkefninu „Fish and Chips“ notaðar en þær eru geymdar í einkagagnabanka á netinu. Raðir úr gagnabönkum voru fluttar út í FASTA formati og settar inn í forritið BioEdit version 7.0.9.0 og gagnabanki útbúinn fyrir hvert gen (Hall 1999).

Í verkefninu urðu til raðgreiningaupplýsingar fyrir genin COI, Cytb og 16S úr 1-5 einstaklingum 26 nytjastofna við Ísland. Eftir samröðun í forritinu Sequencher voru raðirnar settar inn í gagnabankann þar sem þekktar raðir voru fyrir hendi. Samröðun var gerð fyrir allar raðirnar í forritinu BioEdit með því að nota samröðunarforritið ClustalW sem er fylgir BioEdit

forritinu. Því næst voru raðirnar jafnaðar í lengd og neighbor joining skyldleikatré útbúin fyrir hvert þessara þriggja gena með því að nota forritin ClustalX version 2.0.9 (Larkin et al. 2007) og NJ Plot (Perriere and Gouy 1996). Fyrir genin COI og Cytb voru bæði útbúin tré út frá DNA og próteinröðum. Þegar 16S tréð var útbúið voru göt fjarlægð.

Gerð var BLAST leit fyrir allar COI, Cytb og 16S raðir sem voru fengnar í verkefninu (Zhang et al. 2000). COI raðirnar voru einnig settar í BOLD leit til að fá tegundarsamsvörun en BOLD gagnabankinn inniheldur mun áreiðanlegri COI raðgreiningar en GenBank þar sem sérfræðingar hafa yfirfarið raðirnar (Hubert et al. 2008; Ratnasingham and Hebert 2007; Zhang et al. 2000).

## **2.6 Blind rannsókn á óþekktum sýnum**

Þegar búið var að þróa aðferðina og koma gagnabankanum upp var næmni aðferðarinnar könnuð með þremur gerðum óþekkttra sýna (blind sýni). Í fyrsta lagi voru fengin 8 sýni úr fiskborðum fiskbúðanna Fiskisögu á Stórhöfða og Gallery fisks í Nethyl. Starfsmenn frá Matís-Prokaria fóru í fiskbúðirnar og fengu sýni af sem fjölbreyttustum tegundum. Þessi sýni voru úr ferskum flökum í fiskborðunum nema eitt sýnið var fiskréttur í karrýsósu. Í öðru lagi voru 10 sýni úr sýnasafni Hafrannsóknarstofnunarinnar greind blint. Að lokum voru greind 6 seiði sem voru 2-8 cm löng en þau voru fengin úr sýnatökuferð Hafrannsóknastofnunarinnar sem farin var í ágúst 2008. Sérfræðingar Hafrannsóknarstofnunarinnar framkvæmdu aðskilda tegundagreiningu á seiðunum með hefðbundinni útlitsgreiningu.

Farið var í gegnum allt greiningarferlið, frá fyrsta skrefi DNA einangrunar, að lokaskrefi í tegundagreiningu fyrir öll sýnin eins og lýst er að framan. Í einu tilviki voru notaðir vísar sem ekki voru notaðir í verkhlutum 2.3 og 2.4 (PCR11). Sýnin úr fiskbúðunum voru skoluð með eimuðu vatni fyrir DNA einangrunina en sýnið í karrýsósunni var þvegið sérstaklega vel. Sýnin voru merkt með númerum og að rannsókn lokinni var áreiðanleiki og næmni aðferðarinnar metin. Raðgreiningar úr öllum óþekktum sýnum var samræðað við gagnagrunninn og skyldleiki viðkomandi sýnis var fundinn út frá samröðuninni. Einnig var gerð BLAST og BOLD gagnabankaleit (Ratnasingham and Hebert 2007; Zhang et al. 2000).

### 3. NIÐURSTÖÐUR

#### 3.1 Söfnun sýna úr 26 nytjastofnum við Ísland

Fengin voru sýni úr öllum nytjastofnunum 26 og í flestum tilvikum voru það 3 sýni af hverri tegund en að hámarki voru 6 sýni fengin. Ekki þurfti að safna sýnum af öllum tegundunum þar sem til voru íslensk sýni úr EU-6 verkefninu „Fish and Chips“ hjá Matís-Prokaria. Upplýsingar um sýnin voru skráðar, s.s. dagsetning og veiðistaður ásamt líffræðilegum upplýsingum um lífverurnar.

#### 3.2 DNA einangrun

Fyrsta skrefið í greiningarferlinu var að einangra DNA úr sýnunum. DNA var einangrað fyrst úr 3 sýnum fyrir hverja tegund en það var gert á mismunandi tímum eftir því hvenær sýnin komu í hús hjá Matís-Prokaria. DNA einangrunaraðferðin frá Macherey-Nagel (Nucleospin 96 Tissue) skilaði ekki því DNA magni sem reiknað var með. Hins vegar fékkst nokkuð gott DNA (sem var síðan notað í seinni skref vinnunnar) með því að nota Agowa segulkúluhreinsun og með því að blanda saman Macherey-Nagel aðferðinni og Aowa segulkúluhreinsuninni. Í flestum tilvikum tókst að einangra gott DNA en þar sem vefjagerðir voru mismunandi þá voru heimtur mismiklar. Í nokkrum tilvikum þurfti að einangra DNA úr 5-6 sýnum fyrir tegundina en einnig þurfti að endureinangra DNA úr nokkrum sýnum þar sem heimtur voru litlar.

#### 3.3 Mögnun á COI, Cytb og 16S genum

Mikil þróunarvinna var í því að finna hentugustu PCR aðstæðurnar. Miserfitt reyndist að ná góðum PCR afurðum úr tegundunum og sérstaklega reyndust tegundirnar kúfiskel, hörpudiskur, rækja og humar vera erfiðar. Prófaðir voru mismunandi DNA polymerasar og vísar, styrk var breytt á nukleotíðum, rúmmáli í hvarfinu var breytt og prófaðir voru mismunandi DNA styrkir. Byrjað var að magna genin upp með vísapörum 1-3 (sjá Töflu 1) og nokkuð auðvelt var að fá mögnun á genunum með þeim vísam í flestum tegundunum. Í nokkrum tilvikum reyndist ekki mögulegt að fá mögnun með þessum vísam þrátt fyrir margendurtekna PCR tilraunir og DNA endureinangrunarhvorf. Í þeim tilvikum þurfti að nota sértæka vísa en mjög erfitt er að útbúa eitt vísapar (fyrir hvert gen) sem á að magna upp allar tegundirnar eins fjölbreyttar og þær eru (fiskar, skelfiskur og krabbadýr) (Tafla 3). Í sumum tilvikum gæti skýringin verið lágur DNA styrkur en það var ekki alltaf raunin. Stundum var DNA styrkurinn hár en ekki tókst að magna genið upp. Í þeim tilvikum gæti skýringin verið sú að einhverjir DNA polymerasa hindrar hafi verið í DNA-inu.

Það tókst að fá PCR úr öllum tegundunum nema hörpudiski (COI) og rækju (16S) en ekki tókst að magna upp þessi gen þrátt fyrir margendurtekna vinnu og notkun margra mismunandi vísa. Hins vegar fékkst PCR á minni bút sem virtist vera eitthvað „gervigen“ (pseudogen) en það hefur áður verið greint (Northrup 2008).

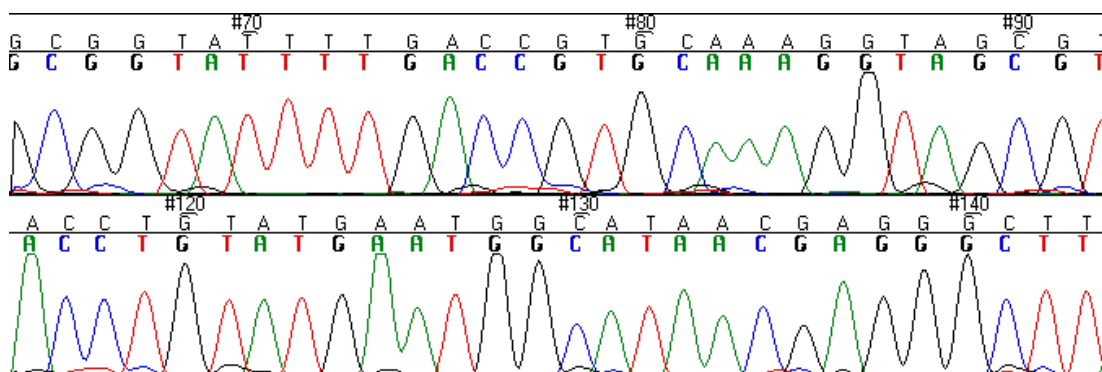
**Tafla 3.** Upplýsingar um PCR vísapörin sem notuð voru til mögnunar á genunum COI, CytB og 16S fyrir 26 nytjastofnana Íslands. Vísispar samsvarar upplýsingum í Töflu 1.

Ísl. heiti	16S	Cytb	COI
Blálanga	PCR1	PCR2	PCR3
Djúpkarfi	PCR1	PCR2	PCR3
Grálúða	PCR1	PCR2	PCR3
Gulllax	PCR1	PCR2	PCR3
Hrognkelsi	PCR1	PCR2	PCR3
Humar	PCR7	PCR2	PCR3 og PCR8
Hörpudiskur	PCR5	PCR14	PCR8 -pseudogen
Karfi = gullkarfi	PCR1	PCR2	PCR3
Keila	PCR1	PCR2	PCR3
Kolmunni	PCR1	PCR2	PCR3
Kúfskel	PCR5, 6 og 7	PCR2	PCR9
Langa	PCR1	PCR2	PCR3
Langlúra	PCR1	PCR2	PCR3
Loðna	PCR1	PCR2	PCR3
Lúða	PCR1	PCR2	PCR3
Rækja	Náðist ekki	PCR2	PCR3
Sandkoli	PCR1	PCR2	PCR3
Síld	PCR1	PCR2	PCR3 og PCR4
Skarkoli	PCR1	PCR2	PCR3
Skrápfúra	PCR1	PCR2	PCR3
Skötuselur	PCR1	PCR2	PCR3
Steinbitur	PCR1	PCR2	PCR3
Stórkjafra	PCR1	PCR2	PCR3
Ufsi	PCR1	PCR2	PCR3
Ýsa	PCR1	PCR2	PCR3
Þorskur	PCR1	PCR2	PCR3

### 3.4 Raðgreining á COI, Cytb og 16S genum

Reynt var að ná um 500 bp samfelldri röð og hvert sýni var raðgreint a.m.k. 3 sinnum frá hvorum enda. Í nokkrum tilvikum fékkst raðgreining þótt ekki væri sjáanleg PCR mögnun (sjá lið 3.3). Í Töflu 4 er samantekt á því hvað mörg sýni gáfu raðgreiningar fyrir hvert gen fyrir hverja tegund. Reynt var eftir fremsta megni að ná raðgreiningu á hverju geni fyrir 3 einstaklinga með að gera endurtekningar á PCR hvörfum eins og lýst hefur verið að ofan (Tafla 4). Raðirnar voru settar saman og samraðað með forritinu Sequencher fyrir hvert sýni og hvert gen (Mynd 2). Allar raðirnar voru yfirfarnar í forritinu og til hliðsjónar voru notaðar raðir sömu tegunda af netinu og úr „Fish and Chips“ verkefninu ef þær voru fyrir hendi (Tafla 5). Auðvelt var að raðgreina 16S og Cytb genin en nokkuð erfiðara var að raðgreina COI genið. Ekki tókst að raðgreina COI genið í hörpudiski og 16S genið í rækju. Hins vegar fékkst PCR og raðgreining á minni bút sem virðist vera eitthvað COI „gervigen“ (pseudogen) sem hefur áður fundist í hörpudiski (Northrup 2008).

**Mynd 2.** Dæmi um 16S raðgreiningarniðurstöður birtar í forritinu Sequencher fyrir langlúru.



**Tafla 4.** Samantekt á fjölda raðgreindra sýna í verkefninu fyrir genin 16S, Cytb og COI fyrir 26 nytjastofna Íslands.

Ísl. heiti	Latneskt heiti	16S raðgreint	Cytb raðgreint	COI raðgreint
Blálanga	<i>Molva dypterygia</i>	3	3	3
Djúpkarfi	<i>Sebastes mentella</i>	3	3	3
Grálúða	<i>Reinhardtius hippoglossoides</i>	5	3	1
Gullax	<i>Argentina silus</i>	3	3	3
Hrognkelsi	<i>Cyclopterus lumpus</i>	3	3	3
Humar	<i>Nephrops norvegicus</i>	3	2	3
Hörpudiskur	<i>Chlamys islandica</i>	2	3	3-pseudogen
Karfi =gullkarfi	<i>Sebastes marinus</i>	3	3	3
Keila	<i>Brosme brosme</i>	3	3	1
Kolmunni	<i>Micromesistius poutassou</i>	3	3	3
Kúfiskel	<i>Arctica islandica</i>	3	3	3
Langa	<i>Molva molva</i>	3	3	3
Langlúra	<i>Glyptocephalus cynoglossus</i>	3	3	3
Loðna	<i>Mallotus villosus</i>	3	3	3
Lúða	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	3	3	2
Rækja	<i>Pandalus borealis</i>	Engin raðgreining	2	3
Sandkoli	<i>Limanda limanda</i>	3	3	3
Sild	<i>Clupea harengus</i>	3	3	3
Skarkoli	<i>Pleuronectes platessa</i>	3	3	3
Skráplúra	<i>Hippoglossoides platessoides</i>	3	3	2
Skötuselur	<i>Lophius piscatorius</i>	3	3	3
Steinbítur	<i>Anarhichas lupus</i>	3	3	3
Stórkjaftha	<i>Lepidorhombus whiffiagonis</i>	2	1	1
Úfsi	<i>Pollachius virens</i>	3	3	3
Ýsa	<i>Melanogrammus aeglefinus</i>	3	3	1
Porskur	<i>Gadus morhua</i>	3	3	1

### 3.5 Gagnabanki með raðir COI, Cytb og 16S gena

Útbúnir voru þrjár aðskildir gagnabankar í forritinu BioEdit, þ.e. einn fyrir hvert gen. Leitað var á netinu eftir röðum fyrir genin þrjú fyrir nytjafiskategundirnar og skyldar tegundir og raðirnar fluttar út í FASTA formati. Ekki eru til birtar raðir fyrir allar nytjafiskategundirnar 26 sem rannsakaðar voru í verkefninu. Í sumum tilvikum var ekki hægt að nota raðir úr gagnabönkunum þar sem raðir voru stundum af öðrum svæðum í geninu, raðgreinda svæðið var mjög stutt eða áberandi var að raðgreiningin var mjög léleg. Í lok verkefnisins voru til nothæfar raðir fyrir um 80% greininganna fyrir genin þrjú í gagnabönkunum á netinu (GenBank) (Tafla 5) en við upphaf verkefnisins vantaði um þriðjung raðanna fyrir þessi gen. Mikið er til af COI raðgreiningum í BOLD gagnabankanum en þær eru ekki allar birtar þannig að þær raðir eru ekki aðgengilegar (public). BOLD gagnabankinn er hins vegar mjög hentugur til að gera leit í og til að staðfesta tegundagreiningar út frá COI en raðirnar þar eru í mörgum tilvikum mun áreiðanlegri en þær sem eru í GenBank þar sem sérfræðingar hafa yfirfarið BOLD raðirnar alveg sérstaklega.

Allar raðir sem fengust í verkefninu fyrir íslensku nytjastofnana voru settar í gagnabankana okkar sem innihélt raðir út gagnabönkum á netinu. Auðvelt er að bæta upplýsingum inn í gagnabankann, hægt er að skoða samsvörum við aðrar raðir inn í honum og finna út skyldleika lífvera m.a. með fjarlægðarútreikningum og skyldleikatrájum. Í samröðuninni kom í ljós að ekki var mikill munur á DNA röðum milli sýna innan tegundar en okkar raðir voru í sumum tilvikum eitthvað röðum úr gagnabönkum af netinu. Fyrir próteinkóðandi genin COI og Cytb voru breytingarnar þöglar (breyting í 3 basa) innan tegundar. Þetta undirstrikar enn frekar þörfina fyrir það að raðgreina íslensk sýni. Útbúin voru DNA skyldleikatré með neighbor-joining aðferð og á Myndum 3-5 má sjá þetta fyrir genin þrjú. Alls voru 520 samraðaðir basar notaðir fyrir Cytb téð, 475 basar fyrir COI tréð og 649 basar fyrir 16S tréð. Einnig voru gerð sambærileg tré fyrir genin COI og Cytb út frá próteinkóðandi röðum þeirra en þau tré eru ekki birt hérna (voru sambærileg en áhrif þöglulla breytinga sjást ekki á þeim tréjum). Í Töflu 5 er listað upp hvaða raðgreiningar eru til í gagnabönkum á netinu og í „Fish and Chips“ gagnabankanum fyrir hina 26 íslensku nytjastofna.



**Tafla 5.** Upplýsingar um þær raðgreiningar sem eru til í gagnabönkum á netinu og í „Fish and Chips“ gagnabankanum fyrir genin 16S, COI, og Cytb fyrir íslensku nytjastofnana 26. Ekki voru alltaf sömu svæði raðgreind (stutt eða léleg ekki höfð í tré). Uppgefin aðgangsnúmer eru þau sem voru notuð í skyldleikatriám (sjá Myndir 3, 4 og 5). Leitin var gerð í gagnabönkum frá 10. til 12. mars 2009.

Ísl. heiti	Latneskt heiti	Gagnabankar á netinu*			"Fish and Chips" gagnabanki		
		16S	Cytb	COI	16S	Cytb	COI
Blálanga	<i>Molva dypterygia</i>	AJ517848 (annað svæði)	AJ517493 (annað svæði)	BOLD	Ekki til	Ekki til	Ekki til
Djúpkarfi	<i>Sebastes mentella</i>	DQ678249	DQ678455	DQ678352	Ekki til	Já	Ekki til
Grálúða	<i>Reinhardtius hippoglossoides</i>	AM749133	AM749131	NC_009711	Ekki til	Ekki til	Ekki til
Gulllax	<i>Argentina silus</i>	Ekki til	EU492323	BOLD	Ekki til	Ekki til	Ekki til
Hrognkelsi	<i>Cyclopterus lumpus</i>	EF508340	AM498333	AM498313	Já	Já	Ekki til
Humar	<i>Nephrops norvegicus</i>	FJ174889	Ekki til	FJ174945	Ekki til	Ekki til	Ekki til
Hörpudiskur	<i>Chlamys islandica</i>	AJ243573	EU127908-stutt	AB033665	Ekki til	Ekki til	Ekki til
Karfi =gullkarfi	<i>Sebastes marinus</i>	AF518225 (endar lélegir)	EF456022	BOLD	Ekki til	Já	Ekki til
Keila	<i>Brosme brosme</i>	AJ315617 (stutt)	DQ174037	DQ173989 (annað svæði)	Ekki til	Ekki til	Ekki til
Kolmurni	<i>Micromesistius poutassou</i>	AY850366 (léleg)	DQ174069	DQ174019 (annað svæði)	Já	Ekki til	Ekki til
Kúfskel	<i>Arctica islandica</i>	DQ184755	AF202095	DQ184853	Ekki til	Ekki til	Ekki til
Langa	<i>Molva molva</i>	AJ315619 (stutt)	EF427584	DQ174021 (annað svæði)	Ekki til	Já	Ekki til
Langlúra	<i>Glyptocephalus cynoglossus</i>	AF420447	EU492157	EU513640	Já	Ekki til	Ekki til
Loðna	<i>Mallotus villosus</i>	DQ397094	FJ010878	FJ205582	Já	Já	Ekki til
Lúða	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	AM749125	EU492151	NC_009709	Ekki til	Já-stutt	Ekki til
Rækja	<i>Pandalus borealis</i>	FJ403244	FJ403244	FJ403244	Ekki til	Ekki til	Ekki til
Sandkóli	<i>Limanda limanda</i>	AY368897	EU224010	EU513669	Já	Já	Já
Sild	<i>Clupea harengus</i>	DQ912078	EU552602	AM911176	Já	Já	Já
Skarkoli	<i>Pleuronectes platessa</i>	AY157328	EU224075	EU513682	Já	Ekki til	Já
Skráplúra	<i>Hippoglossoides platessoides</i>	AF488427	EU492111	EU513651	Já	Ekki til	Já
Skötuselur	<i>Lophius piscatorius</i>	AM939933 (annað svæði)	EF439544	BOLD	Já	Já	Já
Steinbitur	<i>Anarhichas lupus</i>	EF427916	EF455983	NC_009773	Já	Ekki til	Ekki til
Stórkjálfa	<i>Lepidorhombus whiffiagonis</i>	AY359667	EU036446	EU513702	Já	Já	Já
Úfsi	<i>Pollachius virens</i>	DQ356945	DQ356945	DQ356945	Já	Já	Ekki til
Ýsa	<i>Melanogrammus aeglefinus</i>	AM489717	EU224013	DQ356942	Já	Ekki til	Ekki til
Þorskur	<i>Gadus morhua</i>	AM489716	AM489716	DQ356939	Já	Já	Já

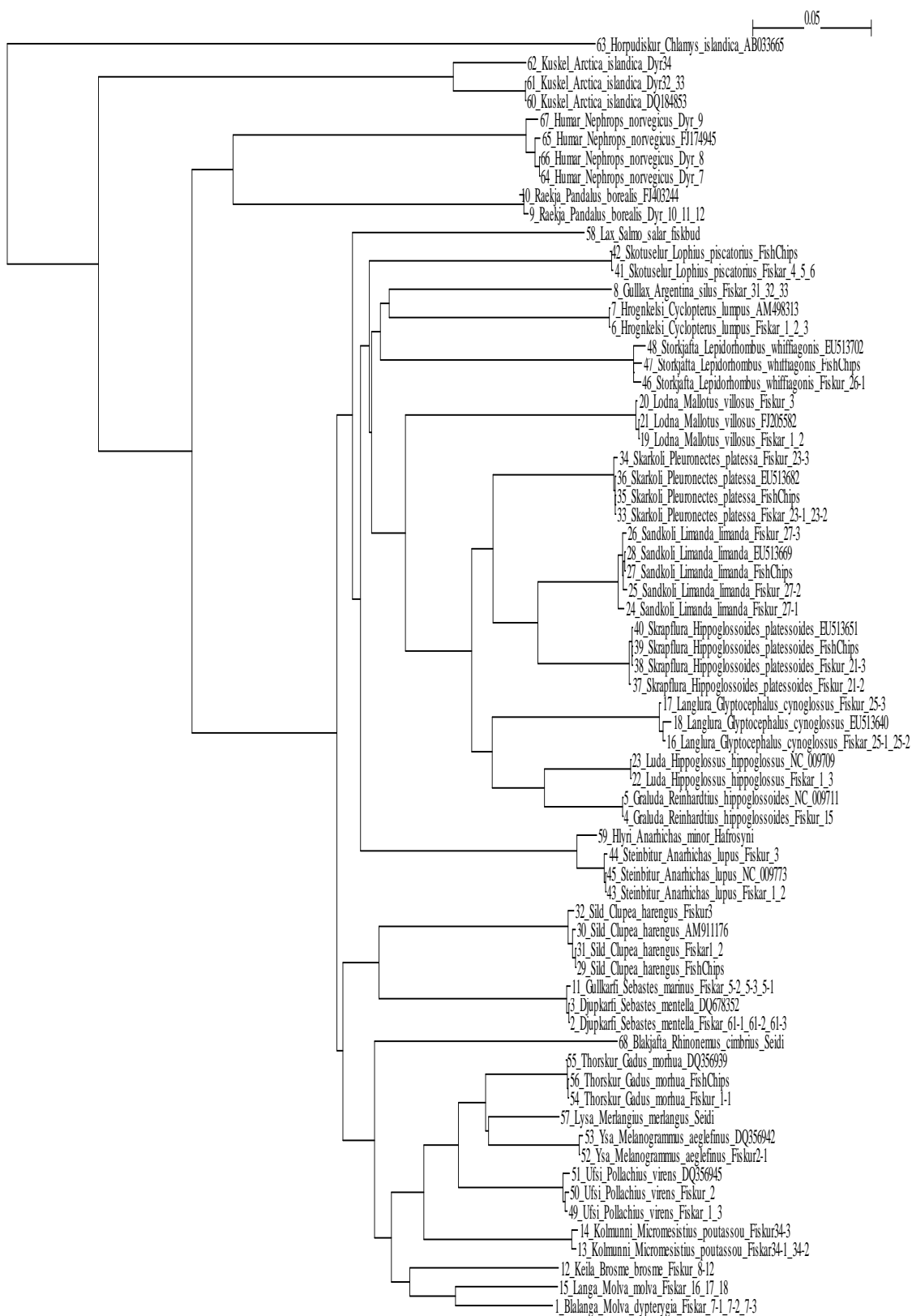
\*BOLD: Röð fyrir tegundina er til í BOLD gagnabanka á netinu (<http://www.barcodinglife.org/views/idrequest.php>)

en röðin er ekki aðgengileg.

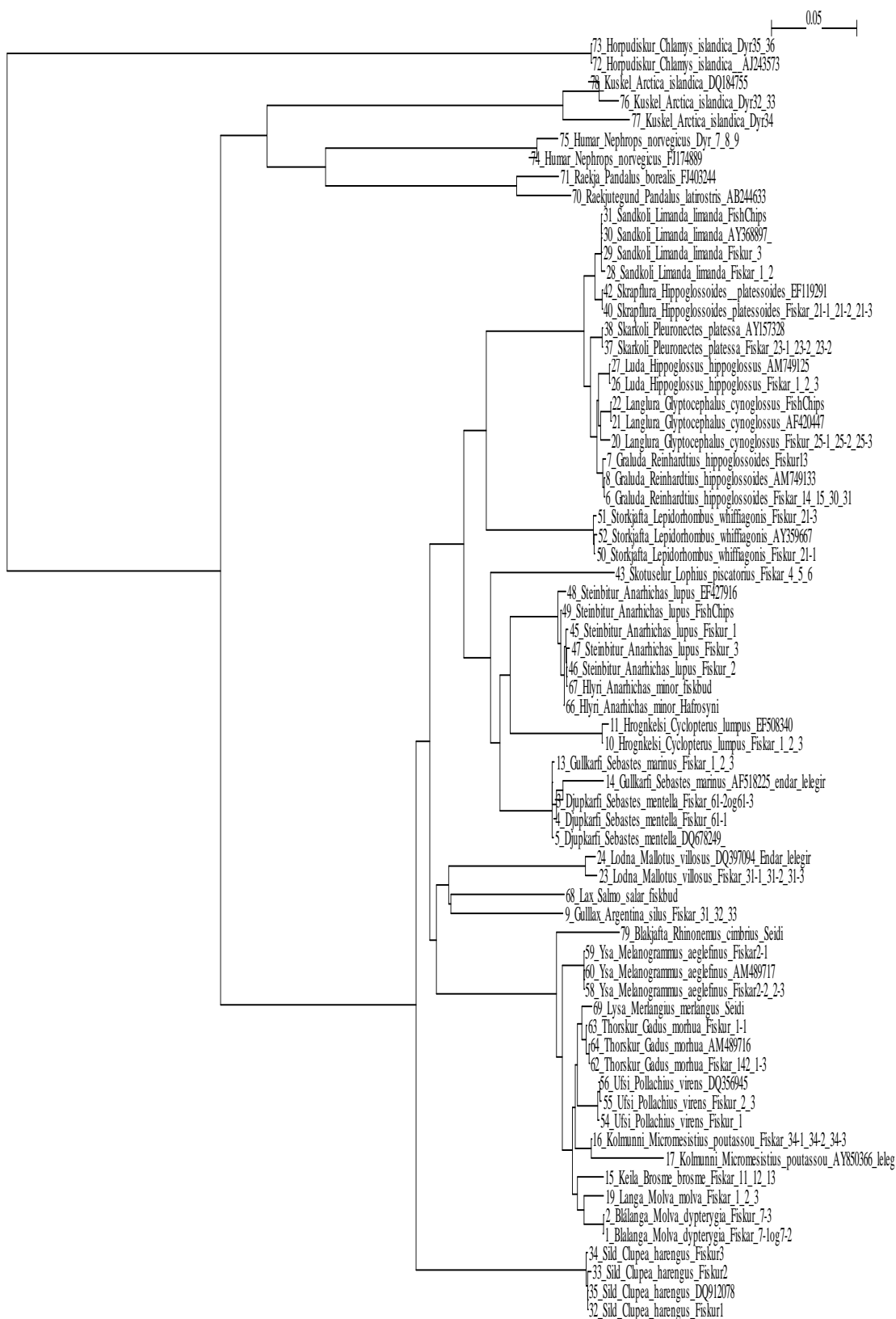
Ekki til: Röð er ekki til fyrir tegundina í GenBank.

Já: Góð röð er til fyrir tegundina í GenBank.

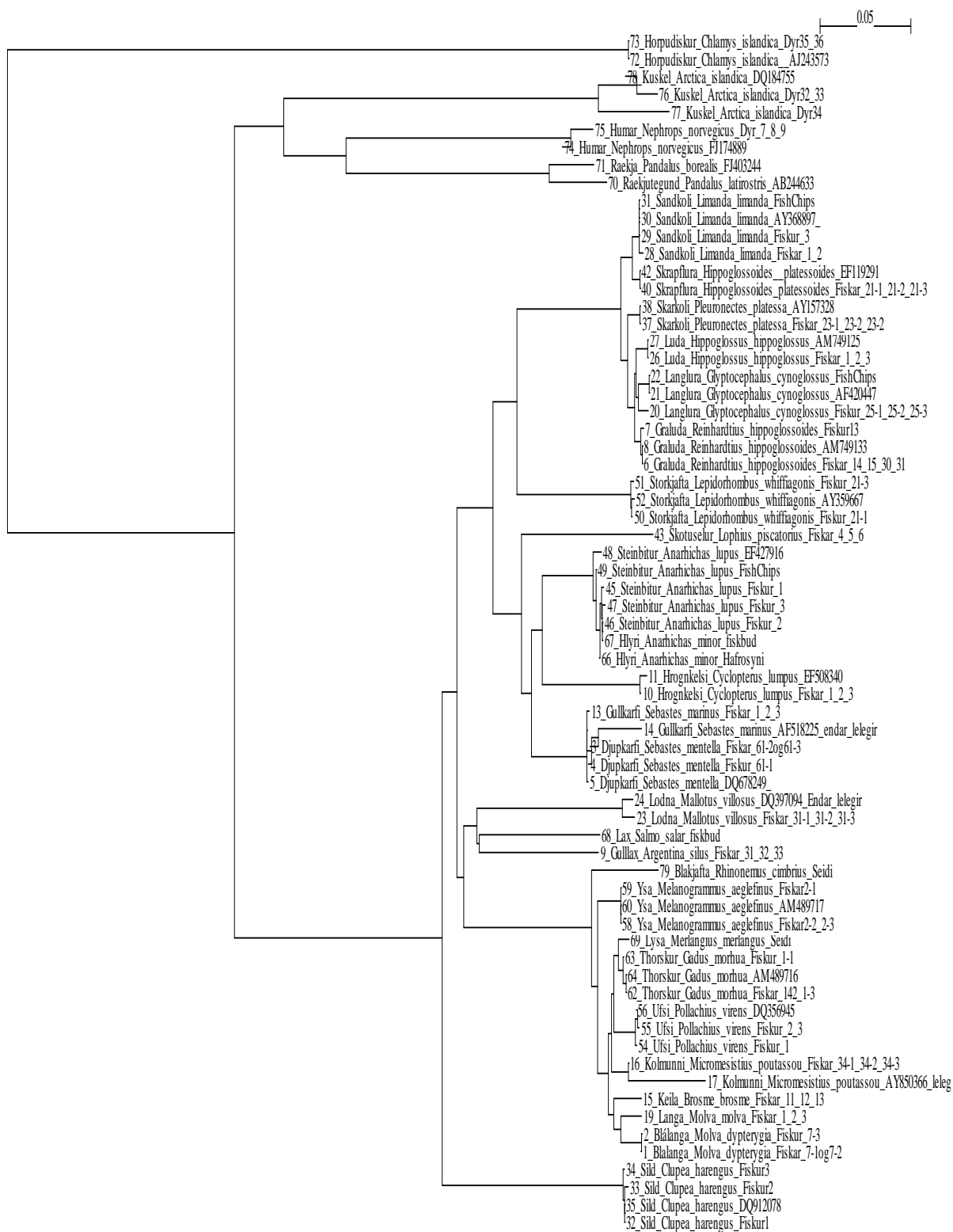
**Mynd 3.** COI skyldleikatré útbúið út frá DNA raðgreiningu (475 basar) fyrir nytjastofna Íslands. Tréð er gert með neighbor-joining aðferð.



**Mynd 4.** 16S skyldleikatré útbúið út frá DNA raðgreiningu (649 basar) fyrir nytjastofna Íslands. Tréð er gert með neighbor-joining aðferð.



**Mynd 5.** Cytb skyldleikatré útbúið út frá DNA raðgreiningu (520 basar) fyrir nytjastofna Íslands. Tréð er gert með neighbor-joining aðferð.



### 3.6 Blind rannsókn á óþekktum sýnum

Öll óþekktu sýnin voru greind til tegunda með einu eða öllum genunum (16S, Cytb og COI). Alls voru 11 sýni greind með öllum þremur genum, 11 með 2 genum og 2 sýni náðist einungis að greina með einu geni (Tafla 6).

Óþekktu sýnin úr fiskbúðunum voru í samræmi við tegundaupplýsingar starfmannna fiskbúðanna. Sýnið í karrýsósunni var auðvelt að greina (F5) en það var eina sýnið sem var ekki ferskt (Tafla 6). Sýni F2 var greint samhljóma sem hlýri (*Anarhichas minor*) með leit í GenBank og BOLD gagnabankanum. Þar sem hlýri er ekki talinn sem nytjastofn Íslands þá áttum við ekki til raðgreiningar í gagnabanka okkar. Sýni F8 var raðgreint með öllum genunum þremur en samhljóma greining var að þetta væri lax (*Salmo salar*) með leit í GenBank og BOLD gagnabankanum. Lax er ekki á nytjastofnalistanum, o.þ.l. voru ekki til raðgreiningar í gagnabanka okkar.

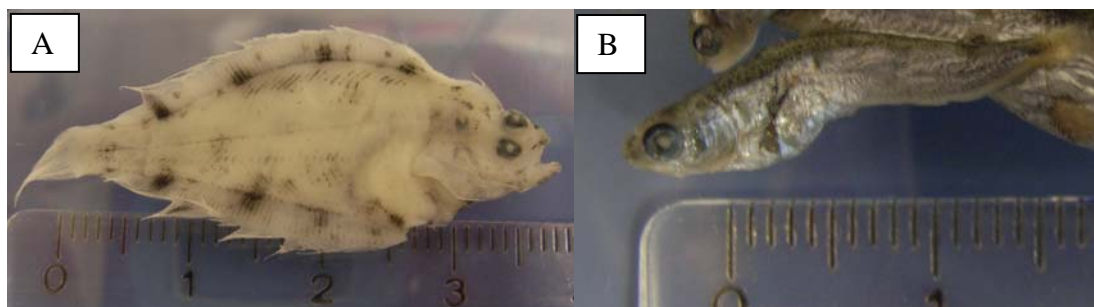
Sýnin 10 úr sýnasafni Hafrannsóknastofnunarinnar gáfu einnig samhljóma niðurstöður, þ.e. útlitsgreiningar sérfræðinga stofnunarinnar og okkar raðgreiningarniðurstöður. Sýni H10 var greint sem hlýri (*Anarhichas minor*) líkt og sýni F2 en öll hin sýnin voru greind til nytjastofna Íslands (Tafla 6).

Sérfræðingum Hafrannsóknastofnunarinnar reyndist nokkuð erfitt að greina seiðin til tegunda með útlitsgreiningum með alveg öruggum hætti. Þeir greindu seiði S1-1, S2-1 og S3-1 sem skrápflúru (*Hippoglossoides platessoides*), töldu að seiði S4-1 gæti mögulega verið ískóð (*Boreogadus saida*) og seiði S5-1 sem mögulega blákjöftu (*Rhinonemus cimbricus*) eða rauða sæveslu (*Gaidropsarus argentatus*). Raðgreiningar staðfestu að S1-1, S2-1 og S3-1 voru skrápflúra (Mynd 6A). Raðgreiningar á Cytb geninu á sýni S4-1 sýndu fram á að þetta væri ískóð. Það náðist að raðgreina sýni S5-1 með öllum genunum þremur; COI, Cyt og 16S. Við leit fannst engin tegundasamsvörun í almennum gagnabönkum. Hins vegar var hægt að greina seiðið til tegundar með því að leita í BOLD gagnabankanum (COI raðgreiningar) og þá kom í ljós að þetta var blákjafna (*Rhinonemus cimbricus*) sem er ekki á nytjastofnalista Hafrannsóknastofnunarinnar (Mynd 6B). Raðirnar fyrir blákjöftu sem við öfluðum í verkefninu fyrir þessi þrjú gen eru því hrein viðbót við okkar gagnabanka þar sem engar birtar raðir eru til fyrri tegundina. Seiði S5-2 var ekki greint til tegundar út frá útliti en raðgreiningar á 16S og COI genunum gáfu þá samhljóma niðurstöðu að þetta væri lýsa (*Merlangius merlangus*) með leit í GenBank og BOLD gagnabankanum. Lýsa er ekki á lista nytjastofna Íslands, o.þ.l. þá áttum við ekki til raðgreiningar í gagnabanka okkar.

**Tafla 6.** Samantekt á raðgreiningarniðurstöðum fyrir genin 16S, Cytb og COI fyrir blind sýni sem voru greind í rannsókninni. MP stendur fyrir Matis-Prokaria gagnabankann.

Sýna no.	Blínt sýni	Íslenskt heiti	Latneskt heiti	16S	Cytb	COI	Athugasemd
F1	Fiskbúð	Þorskur	<i>Gadus morhua</i>	Staðfest; Blast og MP	Staðfest; Blast og MP	Kom ekki	Ekki á lista yfir nýjastofna Íslands
F2	Fiskbúð	Hlýri	<i>Anarhichas minor</i>	Staðfest; Blast	Staðfest; Blast	Kom ekki	
F3	Fiskbúð	Ýsa	<i>Melanogrammus aeglefinus</i>	Staðfest; Blast og MP	Staðfest; Blast og MP	Kom ekki	
F4	Fiskbúð	Lúða	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	Staðfest; Blast og MP	Staðfest; Blast og MP	Staðfest; BOLD og MP	
F5	Fiskbúð	Steinbitur	<i>Anarhichas lupus</i>	Staðfest; Blast og MP	Staðfest; Blast og MP	Kom ekki	
F6	Fiskbúð	Skátusestur	<i>Lophius piscatorius</i>	Staðfest; Blast og MP	Staðfest; Blast og MP	Staðfest; BOLD og MP	
F7	Fiskbúð	Langa	<i>Molva molva</i>	Staðfest; MP	Staðfest; MP	Kom ekki	
F8	Fiskbúð	Lax	<i>Salmo salar</i>	Staðfest; Blast	Staðfest; Blast	Staðfest; BOLD og MP	
H1	Hafró sýnasafn	Þorskur	<i>Gadus morhua</i>	Staðfest; Blast og MP	Staðfest; Blast og MP	Staðfest; BOLD og MP	16S róð ekki til í gagnabánkum Ekki á lista yfir nýjastofna Íslands
H2	Hafró sýnasafn	Steinbitur	<i>Anarhichas lupus</i>	Staðfest; Blast og MP	Staðfest; Blast og MP	Staðfest; BOLD og MP	
H3	Hafró sýnasafn	Skarkoli	<i>Pleuronectes platessa</i>	Staðfest; Blast og MP	Staðfest; Blast og MP	Kom ekki	
H4	Hafró sýnasafn	Ýsa	<i>Melanogrammus aeglefinus</i>	Staðfest; Blast og MP	Staðfest; Blast og MP	Kom ekki	
H5	Hafró sýnasafn	Ufsi	<i>Pollachius virens</i>	Staðfest; Blast og MP	Staðfest; Blast og MP	Staðfest; BOLD og MP	
H6	Hafró sýnasafn	Loöna	<i>Mallotus villosus</i>	Staðfest; Blast og MP	Staðfest; Blast og MP	Staðfest; BOLD og MP	
H7	Hafró sýnasafn	Skráplúru	<i>Hippoglossoides platessoides</i>	Staðfest; Blast og MP	Staðfest; Blast og MP	Kom ekki	
H8	Hafró sýnasafn	Gullkarfi	<i>Sebastes marinus</i>	Staðfest; Blast og MP	Staðfest; Blast og MP	Staðfest; BOLD og MP	
H9	Hafró sýnasafn	Bíalanga	<i>Molva dypterygia</i>	Staðfest; Blast og MP	Staðfest; Blast og MP	Staðfest; BOLD og MP	
H10	Hafró sýnasafn	Hlýri	<i>Anarhichas minor</i>	Staðfest; Blast	Staðfest; Blast og MP	Staðfest; BOLD	
S1-1	Seiði	Skráplúru	<i>Hippoglossoides platessoides</i>	Staðfest; Blast og MP	Kom ekki	Kom ekki	
S2-1	Seiði	Skráplúru	<i>Hippoglossoides platessoides</i>	Kom ekki	Staðfest; Blast og MP	Staðfest; BOLD og MP	
S3-1	Seiði	Skráplúru	<i>Hippoglossoides platessoides</i>	Staðfest; Blast og MP	Kom ekki	Staðfest; BOLD og MP	
S4-1	Seiði	Ísköði	<i>Boreogadus saida</i>	Kom ekki	Staðfest; Blast	Kom ekki	
S5-1	Seiði	Bíakjarta	<i>Rhinonemus cimbricus</i>	Engin róð í gagnabánkum	Engin róð í gagnabánkum	Staðfest; BOLD	
S5-2	Seiði	Lýsa	<i>Merlangius merlangus</i>	Staðfest; Blast	Kom ekki	Staðfest; BOLD	

**Mynd 6.** A) Mynd af seiði 3-1 sem var greint til tegundarinnar skráplúru (*Hippoglossoides platessoides*) með raðgreiningu á genunum 16S og COI. B) Mynd af seiði 5-1 sem var greint til tegundarinnar blákjöftu (*Rhinonemus cimbricus*) með raðgreiningu á geninu COI og staðfesting fengin út frá BOLD gagnabankanum.



## 4. UMRÆÐUR OG ÁLYKTANIR

Í þessu verkefni varð til mikil uppbygging á þekkingu og tækni í erfðafræði nytjastofna við Ísland. Afraksturinn er mælanlegur í magni raða úr nytjastofnunum 26 fyrir genin COI, Cytb og 16S en uppbyggingin á gagnabanka með þessum röðum og öðrum skyldum röðum af netinu er mikilvæg fyrir íslenskan sjávarútveg. Hvort tveggja varð hagnýtt um leið og það varð til. Öflugur gagnabanki sem inniheldur raðir fyrir íslenska nytjastofna getur nýst við almennar hafrannsóknir og einnig við rekjanleika fisktegunda. Matís-Prokaria mun geta selt greiningaþjónustu til innlendra og erlendra aðila s.s. sjávarútvegsfyrirtækja, fiskkaupenda og ríkisstofnanna. Áætlað er að Matís-Prokaria muni bjóða innlendum og erlendum aðilum greiningarþjónustuna en nú þegar hefur fyrirtækið selt svona þjónustu til fyrirtækja á Íslandi. Rannsókn sem þessi er ekki einkaleyfishæf en gagnabankinn sem inniheldur samræðaðar raðir fyrir hverja tegund og var lokaafurð verkefnisins er eign Matís-Prokaria sem mun hafa nýtingarrétt á gagnabankanum eins og greint var frá í umsókn verkefnisins.

Krafa markaðsins er hraði og nákvæmni og þess vegna er nauðsynlegt fyrir íslenskan sjávarútveg að aðlagast hratt og vera opinn fyrir nýrri tækni og aðferðafræði. Sú aðferðafræði sem við notuðum í þessu verkefni hefur ekki verið notuð hér á landi en erlendis eru margir aðilar sem nota þessa aðferðafræði (sbr. "Fish and Chips" verkefnið innan EU-6 og „Barcode of Life") (Kochzius et al. 2008). Líta má á raðgreiningu merkigena sem fingrafar lífveranna sem er óbrigðult (Hebert et al. 2003a; Hebert et al. 2003b; Ward et al. 2008a; Ward et al. 2005; Waugh 2007). Aðferðin mun nýtast þeim strax sem stunda rannsóknir við að tegundagreina nytjastofna Íslendinga úr sjó hvort sem um er að ræða egg, seiði, lifur, ungvíði eða fullorðna einstaklinga í kringum Ísland og í öðrum höfum. Aðferðin getur jafnframt nýst við að skera úr um hlutföll tegunda í lífsýnum, t.d. lifusýna sem safnað er á Íslandsmiðum en þau er bæði erfitt og tímafrekt að tegundagreina út frá útlitsgreiningum. Aðferðin mun einnig verða mikilvægt tól til að skera úr um vafamál á fiskmörkuðum. Í flestum tilvikum yrðu það fiskkaupendur sem myndu hafa áhuga á greiningarþjónustu af þessu tagi. Ekki er ólíklegt að í framtíðinni verði gerð krafa frá fiskkaupendum að tegundavottorð fylgi sölnunni. Með þessari aðferðafræði er því verið að opna nýjar leiðir í tegundagreiningu sýna.

Þegar raðgreiningarupplýsingum úr gagnabönkum á netinu og okkar raðgreiningum var samræðað kom í ljós DNA breytileiki sem bendir til stofnamunar innan tegunda. Fyrir genin COI og Cytb voru breytingarnar í öllum tilvikum þöglar en það er í samræmi við fyrri niðurstöður (Arnason et al. 2000; Simon et al. 1994). Stundum voru gæði raða í gagnabönkum á netinu ekki mikill og í þeim tilvikum notuðum við ekki þær raðgreiningar. Þess vegna var mikilvægt fyrir okkur að greina okkar sýni sjálf og hafa raðir inni sem við vitum hvaðan eru upprunnar og að gæðin eru 100%. Í upphafi verkefnisins kom í ljós við leit í gagnabönkum á netinu að það vantaði raðgreiningar fyrir um þriðjung tegundanna. Upplýsingarnar sem var safnað í verkefninu eru því mjög mikilvæg viðbót við það sem fyrir er. Hins vegar má benda á, að á meðan á verkefninu stóð þá bættist mikið við af nýjum röðum í gagnabanka á netinu.

Pótt COI genið sé það gen sem mest er notað við rannsóknir sem þessar ((Hebert et al. 2003a; Hebert et al. 2003b) þá kom það vel í ljós hve hentugt var að nota 16S og Cytb genin með. COI genið var í sumum tilvikum erfiðaðar í PCR mögnun og raðgreiningu en hin tvö og því stuðningur við verkefnið og úrvinnslu gagnanna að hafa hin tvö til hjálpar. Á því svæði sem var raðgreint þá voru próteinraðir COI og Cytb genanna alveg eins fyrir náskyldu tegundirnar gullkarfa og djúpkarfa en basaraðirnar voru frábrugðnar á 1-2 bösum. Það sama var uppi á teningnum fyrir tegundirnar hlýra og steinbít, þar var 9-12 basamunur en próteinröðin var sú sama. Það er þekkt fyrir nokkrar mjög skyldar fisktegundir að COI getur ekki greint á milli þeirra og í þeim tilvikum er nauðsynlegt að nota flokkunarsérfræðinga til hjálpar (Hajibabaei et al. 2006; Ward et al. 2005). Eins og í greiningu á blindu sýnunum þá náðist ekki alltaf að raðgreina COI genið en sýnin voru tegundagreind með 16S og/eða Cytb genunum. Fimm af 24 blindum sýnum sem greind voru í verkefninu tilheyrðu ekki nytjastofnum Íslands en það voru lax, hlýri, lýsa, ískóð og blákjafta. Þrátt fyrir að við ættum ekki þekkt sýni og raðgreiningar fyrir þessar tegundir fyrir genin þrjú, þá gátum við tegundagreint sýnin þar sem gögn voru til í gagnaböndum á netinu. Með okkar greiningum bætist við gagnabankana og þá eru til raðgreiningar á íslenskum sýnum.

Markmiðum verkefnisins var náð að fullu en til að ná settum markmiðum voru kraftar og kunnátta tveggja öflugra rannsóknahópa sameinaðir. Starfsmenn Hafrannsóknastofnunarinnar öfluðu sýna og greindu sýnin til tegunda en sameindalíffræðingar fyrirtækisins Matís-Prokaria unnu alla erfðafræðivinnuna. Óvissuþættir verkefnisins voru ekki miklir þar sem um var að ræða þekktu aðferðafræði og tækni sem þegar var í notkun hjá umsækjendum og þeir hafa mikla reynslu af og þau vandamál sem upp komu voru leyst af kunnáttu. Prófað var mikið magn PCR- og raðgreiningarvísa og hönnuð var aðferðafræði sem hentar vel á rannsóknarstofu Matís-Prokaria. Þessi uppbygging þekkingar og kunnáttu starfsmanna mun auðvelda alla vinnu í framtíðinni þegar Matís-Prokaria fer að selja greiningarþjónustu til fyrirtækja og einstaklinga. Engin fljótleg og áreiðanleg greiningaraðferð var til fyrir íslenska nytjastofna sjávar og þess vegna var mikil þörf fyrir góða og örugga aðferð sem viðskiptavinir geta nýtt sér.

Á styrktímabilinu var reynt að fá eggjamassa og magainnihald fiska til greiningar en við munum ekki fá þau sýni fyrr en í haust (haustleiðangur Hafrannsóknastofnunarinnar). Núna er búið að þróa greiningaraðferðina og finna bestu greiningarvísa fyrir hina ýmsu flokka nytjastofnana þannig að aðferðin er orðin mjög aðgengileg. Það væri því mjög áhugavert framtíðarverkefni fyrir báða styrkhafa að greina fiskiegg (t.d með svifsýnum) sem og magainnihald úr nytjastofnum til að nýta afurð verkefnis til fulls. Slíkar rannsóknir gætu varpað ljósi á hversu umfangsmikið át ýmissa nytjafiska gæti verið á eggjum, lirlum og seiðum nytjastofna. Sem dæmi má nefna að Hafrannsóknastofnunin gerði forkönnun á fæðu síldar vorið og sumarið 2007, en þær athuganir bentu til þess að síld æti töluvert magn af eggjum og lirlum annarra nytjastofna. Hafrannsóknastofnunin sótti um styrk til AVS sjóðsins til framhaldsrannsókna á fæðu síldarinnar en fékk ekki. Þær niðurstöður sem fengust í því verkefni sem þessi lokaskýrsla fjallar um gætu nýst til greiningar á magainnihaldi og gætu hugsanlega



auðveldað við að meta magn hvernar tegundar eggja, lirfa og seiða í mögum og þar með varpað ljósi á fæðuvistfræðileg tengsl nytjafiska í hafinu við Ísland.

## 5. ÞAKKARORÐ

Aðstandendur verkefnisins vilja þakka AVS rannsóknarsjóði í sjávarútvegi fyrir framlag til rannsóknarinnar. Einnig viljum við þakka starfsmönnum fiskbúðanna Galleryfisks við Nethyl og Fiskisögu á Stórhöfða í Reykjavík fyrir að taka svona vel á móti starfsmönnum Matís-Prokaria þegar fengin voru sýni úr fiskborðum þeirra til greiningar á blindum sýnum. Að auki fær starfsfólk Hraðfrystihúss Þórshafnar þakkir fyrir að útvega sýni af kúfiskel.

## 6. HEIMILDIR

- Aliabadian M, Kaboli M, Nijman V, Vences M (2009) Molecular identification of birds: performance of distance-based DNA barcoding in three genes to delimit parapatric species. *PLoS ONE* 4:e4119
- Amason E, Petersen PH, Kristinsson K, Sigurgislason H, Palsson S (2000) Mitochondrial cytochrome b DNA sequence variation of Atlantic cod from Iceland and Greenland. *J Fish Biol* 56:409-430
- Dahlgren TG, Weinberg JR, Halanych KM (2000) Phylogeography of the ocean quahog (*Arctica islandica*): influences of paleoclimate on genetic diversity and species range. *Mar Biol* 137:487-495
- De Rijk P, Neefs JM, Van de Peer Y, De Wachter R (1992) Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. *Nucleic Acids Res* 20 Suppl:2075-89
- Espineira M, Gonzalez-Lavin N, Vieites JM, Santaclara FJ (2008) Development of a method for the genetic identification of flatfish species on the basis of mitochondrial DNA sequences. *J Agric Food Chem* 56:8954-61
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol* 3:294-299
- Fox CJ, Taylor MI, Pereyra R, Villasana MI, Rico C (2005) TaqMan DNA technology confirms likely overestimation of cod (*Gadus morhua* L.) egg abundance in the Irish Sea: implications for the assessment of the cod stock and mapping of spawning areas using egg-based methods. *Mol Ecol* 14:879-84
- Hajibabaei M, Janzen DH, Burns JM, Hallwachs W, Hebert PD (2006) DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:968-71
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41:95-98
- Hebert PD, Penton EH, Burns JM, Janzen DH, Hallwachs W (2004) Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:14812-7
- Hebert PD, Ratnasingham S, deWaard JR (2003a) Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc Biol Sci* 270 Suppl 1:S96-9
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, DeWaard JR (2003b) Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc London Ser B-Biol Sci* 270:313-322
- Hsieh HM, Chiang HL, Tsai LC, Lai SY, Huang NE, Linacre A, Lee JC (2001) Cytochrome b gene for species identification of the conservation animals. *Forensic Sci Int* 122:7-18
- Hubert N, Hanner R, Holm E, Mandrak NE, Taylor E, Burrige M, Watkinson D, Dumont P, Curry A, Bentzen P, Zhang J, April J, Bernatchez L (2008) Identifying Canadian freshwater fishes through DNA barcodes. *PLoS Biol* 3:e2490
- Ivanova NV, Zemplak TS, Hanner RH, Hebert PDN (2007) Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Mol Ecol Notes* 7:544 - 548
- Kappner I, Bieler R (2006) Phylogeny of venus clams (Bivalvia: Venerinae) as inferred from nuclear and mitochondrial gene sequences. *Mol Phylogenet Evol* 40:317-331
- Kochzius M, Nolte M, Weber H, Silkenbeumer N, Hjorleifsdottir S, Hreggvidsson GO, Marteinson V, Kappel K, Planes S, Tinti F, Magoulas A, Garcia Vazquez E, Turan C, Hervet C, Campo Falgueras D, Antoniou A, Landi M, Blohm D (2008) DNA microarrays for identifying fishes. *Mar Biotechnol (NY)* 10:207-17
- Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA, Weigt LA, Janzen DH (2005) Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:8369-74
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947-8
- Lemer S, Aurelle D, Vigliola L, Durand JD, Borsa P (2007) Cytochrome b barcoding, molecular systematics and geographic differentiation in rabbitfishes (Siganidae). *C R Biol* 330:86-94
- Matsumoto M, Hayami I (2000) Phylogenetic analysis of the family *Pectinidae* (Bivalvia) based on mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I. *J Moll Stud* 66:477-488
- Messing J (1983) New M13 vectors for cloning. *Methods Enzymol* 101:20-78

- Mikkelsen PM, Bieler R, Kappner I, Rawlings TA (2006) Phylogeny of Veneroidea (Mollusca: Bivalvia) based on morphology and molecules. *Zool J Linn Soc* 148:439–521
- Northrup V (2008) The partial mitochondrial DNA and phylogenetic relationships of the Iceland scallop (*Chlamys islandica*) Biology. Acadia University, Wolfville, Canada, pp 93
- Palumbi SR (1996) Nucleic acids II: The polymerase chain reaction. In: Hills DM, Moritz C, Mable BK (eds) *Molecular systematics*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, pp 205–247
- Perriere G, Gouy M (1996) WWW-query: an on-line retrieval system for biological sequence banks. *Biochimie* 78:364-9
- Podsiadlowski L, Bartolomaeus T (2005) Organization of the mitochondrial genome of mantis shrimp *Pseudosquilla ciliata* (Crustacea: Stomatopoda). *Mar Biotechnol* (NY) 7:618-24
- Rasmussen RS, Morrissey MT (2009) Application of DNA-based methods to identify fish and seafood substitution on the commercial market. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 8:118-137
- Ratnasingham S, Hebert PDN (2007) BOLD: The Barcode of Life Data System ([www.barcodinglife.org](http://www.barcodinglife.org)). *Mol Ecol Notes* 7:355-364
- Sevilla RG, Diez A, Norén M, Mouchel O, Jérôme M, Verrez-Bagnis V, van Pelt H, Favre-Krey L, Krey G, Bautista JM (2007) Primers and polymerase chain reaction conditions for DNA barcoding teleost fish based on the mitochondrial cytochrome b and nuclear rhodopsin genes. *Mol Ecol Notes* 7:730-734
- Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P (1994) Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann Entomol Soc Am* 87: 651–701
- Smith MF, Patton JL (1991) Variation in mitochondrial cytochrome b sequence in natural populations of South American akodontine rodents (Muridae: Sigmodontinae). *Mol Biol Evol* 8:85-103
- 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. *Front Zool* 2:5
- Ward RD, Holmes BH, White WT, Last PR (2008a) DNA barcoding Australasian chondrichthyans: results and potential uses in conservation. *Marine and Freshwater Research* 59:57-71
- Ward RD, Holmes BH, Yearsley GK (2008b) DNA barcoding reveals a likely second species of Asian sea bass (barramundi) (*Lates calcarifer*). *J Fish Biol* 72:458-463
- Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PD (2005) DNA barcoding Australia's fish species. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360:1847-57
- Waugh J (2007) DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. *Bioessays* 29:188-97
- Wong EH-K, Hanner HR (2008) DNA barcoding detects market substitution in North American seafood. *Food Res Int* 41:828-837
- Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W (2000) A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol* 7:203-14