



UNIVERSITETET I AGDER

USN Universitetet
i Sørøst-Norge

Mastergradsavhandling i Akvatisk økologi
2018

Kopepoder langs Skagerrakkysten

- En oversikt basert på morfologisk og molekylærgenetisk identifisering

Camilla V. Strandkogen Moseid

Veileder

Audun Slettan

Tone Falkenhaus

Universitetet i Agder

Fakultet for teknologi og realfag

Institutt for naturvitenskapelige fag

Universitetet i Sørøst-Norge

Fakultet for allmennvitenskapelige fag

Institutt for natur-, helse- og miljøvernfaq

© Camilla S. Moseid 2018

Masteroppgave i Akvatisk økologi, retning marin økologi, 2018.

Innlevert som oppgave i emnet BIO500 Masteroppgave.

Akvatisk økologi er et felles masterprogram mellom Universitetet i Agder (UiA) og Universitetet i Sørøst-Norge (USN), med spesialisering innenfor marin økologi (ved UiA) eller ferskvannøkologi (ved USN).

Alle rettigheter reservert. Ingen deler av denne oppgaven kan kopieres uten tillatelse fra forfatteren.

Masteroppgaven er gjennomført og godkjent som et ledd i utdanningen ved UiA og USN, og er godkjent som en del av utdanningen. Denne godkjenningen innebærer ikke at universitet/høgskolen inntår for de metoder som er anvendt og de konklusjoner som er trukket.

Universitetet i Agder
Fakultet for teknologi og realfag
Institutt for naturvitenskapelige fag
Gimlemoen
4604 Kristiansand

<http://www.uia.no>

© 2018 Camilla S. Moseid

Denne avhandlingen representerer 60 studiepoeng

Sammendrag

Kopepoder (hoppekreps) er den viktigste gruppen av dyreplankton i våre farvann, og er av stor betydning for næringskjeden i havet siden de spiser planteplankton, og er selv en viktig næringskilde for en rekke forskjellige dyregrupper. De driver for det meste rundt med havstrømmene og er følsomme for miljøforandringer. Kunnskap om hvilke arter vi finner hvor kan derfor si noe om tilstanden i det marine miljøet og om dette er i endring. Det er behov for mer kunnskap om kopepoder i Skagerrak og Nordsjøen, derfor er det viktig med gode metoder for å identifisere hvilke kopepodearter vi har her, og for å overvåke dem over tid.

Kopepoder har tradisjonelt blitt identifisert morfologisk, det vil si at man bestemmer hvilken art det er ved å se på ytre kjennetegn som form, lengde på antenner, antall segmenter på kroppen osv. Mange arter er svært like og det kan derfor være vanskelig å bestemme med sikkerhet. De siste tiårene har man testet forskjellige metoder for å identifisere kopepoder ved hjelp av DNA, såkalte molekylærgenetiske metoder. Man har funnet noen gen-sekvenser som er like innenfor en art, men hvor det er stor variasjon mellom arter. Ved å bruke denne delen av DNA-et i et individ man har funnet, kan man sammenligne med en database, og ut fra det bestemme hvilken art det er.

I denne oppgaven har jeg identifisert kopepoder fra forskjellige stasjoner langs Skagerrakkysten, med både morfologisk metode og ved sammenlikning av DNA-sekvensen til målgenene 18S og COI med en database (metabarcoding). Sekvenseringen ble utført ved nestegenerasjons DNA-sekvenseringsteknologi (Illumina MiSeq). Med morfologisk metode ble det identifisert 21 taxa, mens med identifisering ved DNA gav 19 taxa for 18S-genet og 28 taxa for COI-genet. Noen taxa ble identifisert med flere metoder, og totalt ble det identifisert 50 forskjellige taxa av kopepoder. Med identifisering ved DNA fant jeg tre arter (*Acartia hudsonica*, *Calanus euxinus* og *Euchaeta concinna*) som ikke regnes som hjemmehørende i våre farvann.

I oppgaven har jeg også brukt artsspesifikk deteksjon med qPCR for å påvise *Acartia tonsa* i en håvtrekkprøve. Jeg brukte COI som målgen, og PCR-produktene fra positive qPCR-analyser ble sekvensert for å verifisere resultatene. *A.tonsa* ble påvist i tre av åtte håvtrekkprøver.

Ved å bruke identifisering med molekylærgenetiske metoder i tillegg til morfologisk identifisering, oppdager man flere taxa av kopepoder, og det blir mulig å identifisere arter som er vanskelig å skille morfologisk. Molekylærgenetiske metoder kan også brukes til artsspesifikk deteksjon av *A.tonsa* i en håvtrekkprøve.

Abstract

The most important group of zooplankton in our waters, are copepods. They are an important part of the food web of the oceans. They eat microalgae and are important food for others. They float with the currents and are sensible to environmental change. Knowledge of species and their extension can predict changes in the marine environment. We need more knowledge about copepods in Skagerrak and the North Sea, and it is important to have good methods both for identification and for monitoring.

Traditionally, copepods have been identified morphologically by looking at features such as shape, length of antennules, number of segments on their body and so on. Many species look almost identical and can be hard to discriminate. Over the last decades different methods for identifying copepods by their DNA has been tested, so called molecular genetic techniques. Genes that are similar between species, but different between species, has been identified. By using these parts of DNA as targets, it is possible to make an alignment to a database and identify species from the results.

In this thesis I have identified copepods from different stations in Skagerrak both with morphological method and by comparing DNA sequences from the genes 18S and COI with a database (metabarcoding). Sequencing was performed with Next Generation Sequencing (Illumina MiSeq). 21 taxa was identified using the morphological method. With the metabarcoding with the 18S gene 19 taxa was identified, and with COI gene the result was 28 taxa. Some of the taxa was identified with more than one method, so the total number of taxa identified all together was 50. Three species (*Acartia hudsonica*, *Calanus euxinus* og *Euchaeta concinna*) are not familiar in Skagerrak.

I performed species-specific identification with qPCR to find *Acartia tonsa* in a pooled sample. I used COI as target and the PCR-products from positive analyses with qPCR was verified by sequencing. *A.tonsa* was detected in three out of eight pooled samples.

When using molecular techniques for identification together with morphologically identification, more taxa of copepods can be detected. It is also possible to identify species that are hard to separate morphologically. Molecular techniques can also be used for species-specific detection of *A.tonsa* in a pooled sample.

Innholdsfortegnelse

Sammendrag	1
Abstract	2
Innholdsfortegnelse	3
Forord.....	5
1 Innledning	6
1.1 Bakgrunn	6
1.2 Morfologisk identifisering av kopepoder	9
1.3 Molekylærgenetisk identifisering	11
1.3.1 Isolering av DNA	13
1.3.2 Metabarcoding.....	14
1.4 Artsspesifikk deteksjon ved qPCR	18
2 Problemstilling	21
3 Metoder.....	22
3.1 Beskrivelse av prøvestasjonene.....	22
3.2 Innsamling av zooplankton	24
3.3 Morfologisk identifisering av kopepoder	26
3.4 DNA-isolering.....	27
3.5 Identifisering med metabarcoding	28
3.5.1 PCR av håvtrekkprøver.....	28
3.5.2 Sekvensering og analyse med bioinformatikk.....	31
3.6 Måling av DNA-konsentrasjon og renhet etter DNA-isolering og PCR.....	33
3.7 Artsspesifikk deteksjon av <i>Acartia tonsa</i>	33
4 Resultater	36
4.1 Morfologisk identifisering	36
4.2 DNA-isolering.....	37
4.3 Identifisering med metabarcoding	38
4.4 Artsspesifikk deteksjon av <i>Acartia tonsa</i>	47
5 Diskusjon	52
5.1 Morfologisk identifisering av kopepoder	52
5.2 DNA-isolering.....	52
5.3 Identifisering med metabarcoding	53
5.4 Artsspesifikk deteksjon av <i>A. tonsa</i>	56
5.5 Forslag til videre undersøkelser	57

6 Konklusjon	59
Referanser/litteraturliste	60
Oversikt over tabeller og figurer	64
Vedlegg	67

Forord

Med denne oppgaven avslutter jeg mastergradstudiet mitt i marin biologi, og det har vært en lang, spennende og lærerik reise. Jeg har skrevet om bittesmå dyr som mange aldri har hørt om, og brukt metoder enda færre har hørt om, og det har vært vanskelig å forklare til familie og venner hva jeg har brukt all fritida mi på det siste året. Så denne oppgaven er ikke enkel å lese dersom man ikke kjenner til morfologiske trekk ved kopepoder eller molekylærgenetiske teknikker.

Jeg har ikke kunnet ta med alle resultatene inn i selve oppgaven. Derfor har denne oppgaven flere vedlegg med detaljer som det henvises til i teksten.

Tusen takk til Audun Slettan for fantastisk veiledning i de molekylærgenetiske teknikkene, at du alltid har hatt tid til å svare på spørsmål når jeg plutselig har stått på kontordøra di, og god hjelp på molekylærlaben på UiA. Jeg har lært utrolig mye av deg.

Tusen takk til Tone Falkenhaus for fantastisk veiledning på alt med kopepoder, og for god hjelp på zooplanktonlaben for å vise meg hva som egentlig var forskjellen på små dyr som ved første øyekast så fullstendig like ut. Jeg har lært utrolig mye av deg også.

Tusen takk til Morten Mattingsdal som utførte analysen av sekvenseringsdataene, og som gav meg innblikk i bioinformatikkens mystiske verden.

Takk til Havforskningsinstituttet, Flødevigen, for at jeg fikk bruke deres lokaler og utstyr, og for at jeg kunne bruke deres prøver i min oppgave. Takk til Florian Eggers for hjelp med innsamlinger i Landvikvannet. Takk til Lena Omdal for all hjelp til morfologisk identifisering på lab. Og takk til Heidi Fiskaa for hjelp med tilgang til bygg og kontorplass når det trengtes.

Takk til Anne og Hanne i klassen for støtte, hjelp, te, kaffe og oppmuntring på masterrommet i de siste dagene før levering – mi æ goe. Takk til Forum for natur og friluftsliv, jobben min, som har vært fleksible slik at jeg har kunnet følge undervisning og som har gitt meg flere korte permisjoner for å gjennomføre studiet. Takk til familie og venner som jeg ikke har sett på altfor lenge, gleder meg til å være sammen med dere igjen. Og spesielt takk til André som har tatt seg av alt hjemme og vært supertålmodig - dette hadde ikke gått hvis ikke du hadde vært så raus og fantastisk!

Kristiansand 14.05.18

Camilla Strandskogen Moseid

1 Innledning

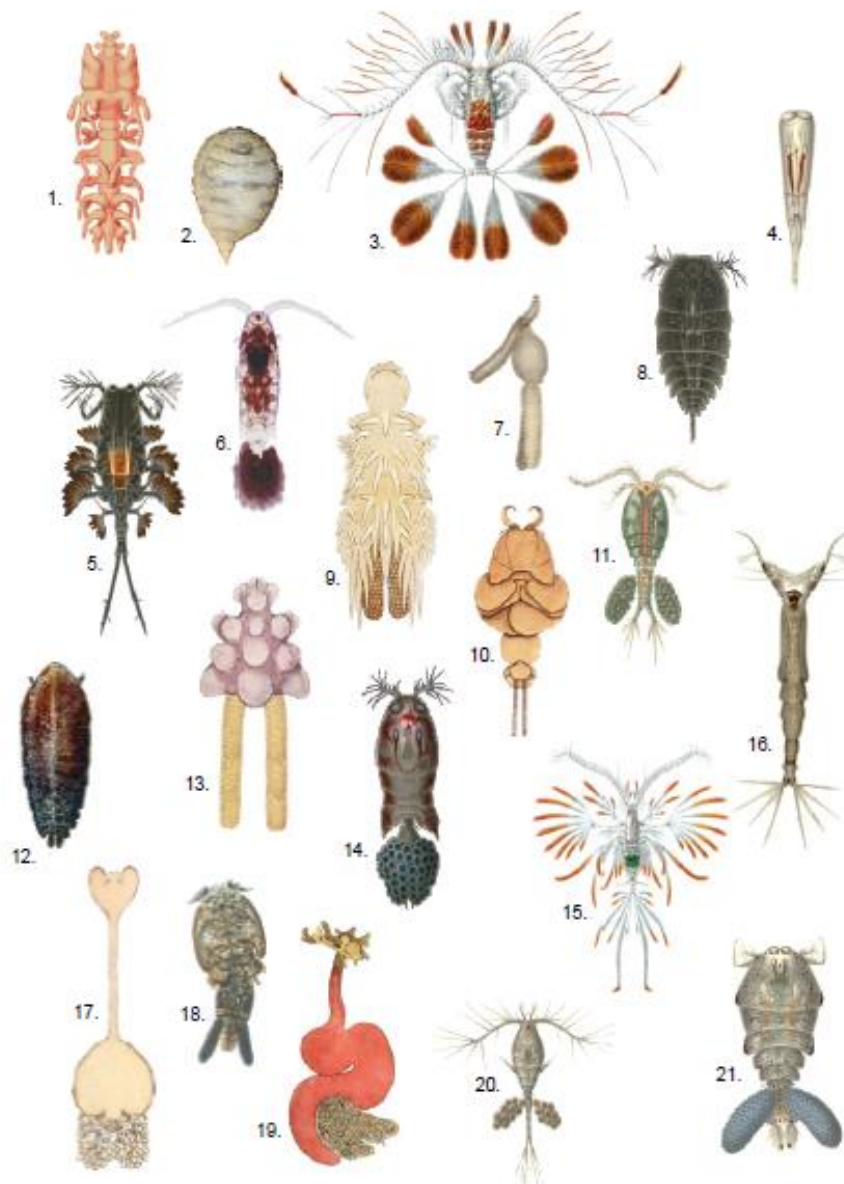
1.1 Bakgrunn

Dyreplankton (zooplankton) er en betegnelse som brukes på en rekke forskjellige taksonomiske grupper dyr som flyter fritt i vannmassene. De har mindre grad av forflytningsevne og driver rundt med havstrømmene. Noen lever hele livet som plankton, mens andre har ett eller flere av livsstadiene sine som plankton. De spiser planteplankton, eller andre dyreplankton, og er derfor svært viktig i de marine næringskjedene (Ottersen, Postmyr & Irgens, (red.) 2010).

Kopepoder er en viktig del av dyreplanktonet, og er en svært artsrik dyregruppe med over 11 000 arter (Humes, 1994). Av marine arter er det registrert over 2600 forskjellige arter (Razouls, Bovée, Kouwenberg & Desreumaux, 2005-2018). I den biologiske systematikken er kopepoder en underklasse av underrekken krepsdyr (Crustacea), som hører inn under rekken leddyr (Arthropoda). Morfologisk er det stort mangfold, noe figur 1 viser eksempel på. Likevel kan det være vanskelig å skille arter fra hverandre, og jeg vil komme tilbake til det litt senere i oppgaven.

I Nordsjøen er kopepodene den dominerende planktongruppen (Beaugrand, Ibañez, Lindley & Reid, 2002). Ved Havforskningsinstituttets overvåking i Nordlige Nordsjøen ble det registrert 23 ulike arter av kopepoder. *Calanus* utgjorde store deler av biomassen, med *Calanus finmarchicus* som den dominerende arten på våren, og *Calanus helgolandicus* senere på året (Bakketeig, Hauge & Kvamme, (red) 2017). Dette er en viktig slekt, da disse kopepodene er store og næringsrike, og viktig føde for fiskelarver. Den mest tallrike slekten av kopepoder er antageligvis *Oithona* (Gallienne & Robins, 2001). Andre vanlige kopepode-slekter er *Pseudocalanus*, *Acartia*, *Temora* og *Centropages*. Artssammensetningen varierer i ulike deler av Nordsjøen, og det er også sesongmessige variasjoner (Ottersen et al., (red.) 2010).

Kopepoder er den dominerende sekundærprodusenten i havet, det vil si at de spiser planteplankton og dermed overfører energien fra fotosyntesen videre opp i næringskjeden. Dermed er de også svært viktig for tidlige livsstadier av kommersielle fiskearter, slik som torsk. En studie på rekruttering hos torsk i Nordsjøen viste at år med lav biomasse av dyreplankton også var år med dårlig rekruttering (Nicolas, Rochette, Llope & Licandro, 2014). I disse årene var vårtemperaturen høy, noe som gjør at sammensetningen av dyreplankton blir annerledes (Richardson, 2008). I Nordsjøen har man sett at i varme vårperioder er tettheten av *Calanus Finmarchicus* mindre, og at fiskelarver må spise mindre kopepoder som gir mindre næring per individ. Disse årene har korrespondert med lav rekruttering av torsk (Olsen et al., 2010).



Figur 1 Illustrasjon som viser mangfoldigheten i formen på kopepoder (Bron et al., 2011)

Kopepoder spiller også en viktig rolle i karbonets kretsløp i havet. De vandrer daglig mellom øvre lag i vannsøylen der de spiser planteplankton, til dypere lag i vannsøylen, og bidrar med å frakte karbon fra overflaten ned til dypet gjennom ekskresjon og respirasjon (Frangoulis, Christou & Hecq, 2004). Denne transporten av karbon gjennom vannsøylen med dyr kalles den biologiske pumpen.

Flere studier viser at kopepoder er følsomme for miljøforandringer, og endring i havtemperatur og hydrografi kan føre til endringer i utbredelse, migrasjoner og gyting. Derfor kan kopepoder brukes som indikatorer for miljøforandringer i havet (Richardson, 2008). I Nordsjøen så man på 1980-tallet et regime-skifte i utbredelse og mangfold for plankton, og man har funnet at

synkroniteten mellom overflatetemperaturen i vannet og planktonet ble forandret (Defriez, Sheppard, Reid & Reuman, 2016).

En annen endring man har observert i Nordsjøen, er den sesongmessige variasjonen i tetthet mellom *C. finmarchicus* og *Calanus helgolandicus*. Denne variasjonen har skiftet til en større tetthet av *C. helgolandicus*, en art som gyter senere på året (Reid, Edwards, Beaugrand, Skogen & Stevens, 2003). Dette skiftet ser ut til å ha sammenheng med den atlantiske havstrømmen som kommer inn i Nordsjøen fra Norskehavet. De to artene har ulike miljøpreferanse og ulike økologi, og forholdet mellom de to artene kan brukes som en indikator på temperaturendringer i miljøet.

Menneskelig aktivitet bidrar til å endre økosystemene og artssammensetningen, også når det gjelder dyreplankton. *A. tonsa* er en art som antageligvis ble introdusert til Europa på begynnelsen av 1900-tallet med skipsfarten (Brylinski, 1981). *A. tonsa* er også påvist i Reddalsvannet i Grimstad, som har forbindelse ut til Skagerrak gjennom Landvikvannet (Haraldstad, Hindar, Hobæk, Håvardstun & Skjelbred, 2013). For å hindre videre spredning av fremmede organismer med skipstrafikk, så ble det i 2004 vedtatt en internasjonal konvensjon for kontroll og styring av ballastvann (IMO, 2004). Til tross for dette oppdages stadig nye fremmede arter der det er stor skipstrafikk. I elvemunningen ved Bilbao ble den asiatiske kopepoden *Pseudodiaptomus marinus* påvist for første gang ved den iberiske halvøy sommeren 2013 (Albaina et al., 2016). En undersøkelse av ballastvann som losset fra skip på Svalbard, viste at alle prøver inneholdt store mengder dyreplankton, og alle unntatt en prøve inneholdt fremmede kystarter til tross for at ballastvannet var blitt byttet ut underveis til Svalbard eller behandlet etter retningslinjer fra IMO (Ware et al., 2016). Det er en utfordring å dokumentere forekomst av fremmede arter. Artsbestemmelse er vanskelig, og ofte oppdages ikke fremmede arter før sent. Fremmede arter kan ha negativ effekt på økosystemet, og det er derfor viktig med sikker artsbestemmelse på et tidlig tidspunkt

I Norge er kunnskapen om artsmangfold og distribusjon av kopepoder fremdeles utilstrekkelig og ufullstendig. G.O. Sars tidlige arbeider (1903-1918) beskriver godt de mest kjente artene av kopepoder. Men nye molekylære metoder viser at det finnes arter som er vanskelig å skille fra andre med morfologiske metoder. Molekylære analyser har vist at arter med stor utbredelse faktisk ikke er av samme art, men grupper av kryptiske arter, det vil si grupper det er umulig å skille fra hverandre morfologisk (Burton, 2009).

Tettheten av kopepoder har minnet ved prøvestasjonen ved Arendal, og her har man tatt prøver av dyreplankton hver 14.dag siden 1994. Nedgangen har vært størst i gruppene «*Oithona spp.*», og «*Paracalanus/Pseudocalanus*» (Ottersen et al., (red.) 2010), men disse gruppene omfatter 6-7 ulike arter, med ulik økologi og produksjon. For å forstå årsaker og konsekvenser av slike endringer, må vi ha kjennskap til hvilke arter det dreier seg om.

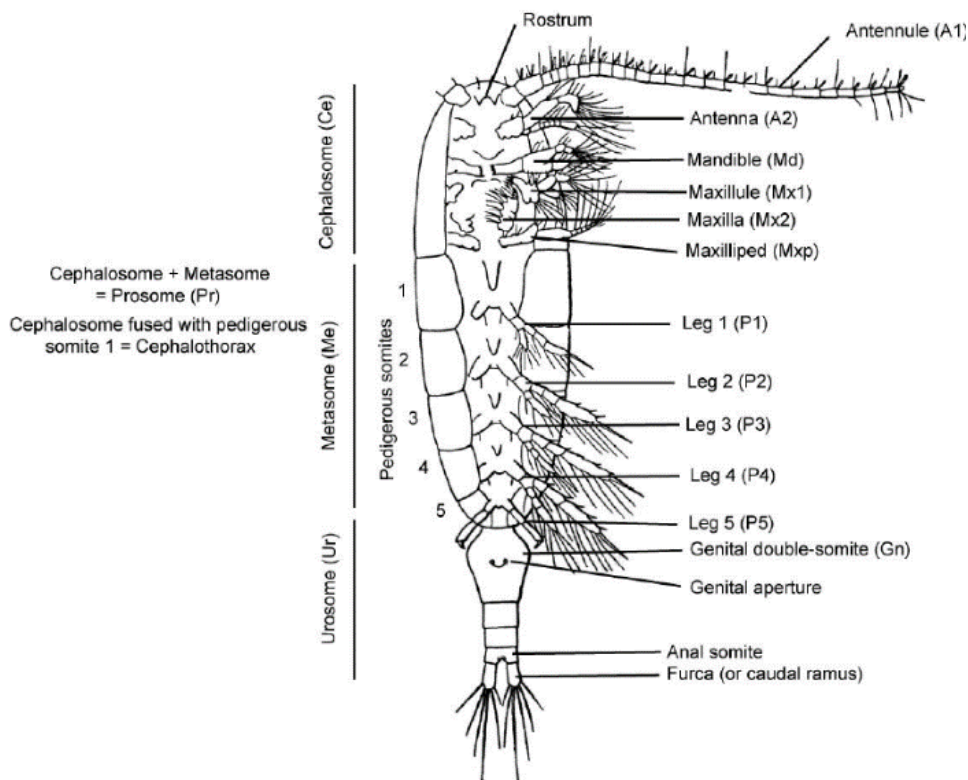
Kopepodene er utfordrende å identifisere da det finnes mange søskenarter som er svært like morfologisk, det er mange kryptiske arter (Bucklin, Lindeque, Rodriguez-Ezpeleta, Albaina & Lehtiniemi, 2016). Det er tidkrevende å skulle gi en sikker artsbestemmelse, og det krever lang erfaring for å bli en ekspert på å skille arter fra hverandre ved morfologiske trekk. Selv om det de siste årene er utviklet metoder for å identifisere arter ved hjelp av DNA, så mangler mange arter i referansebibliotekene. Her har det heller ikke vært kvalitetssikring av DNA-sekvensene som legges inn.

I denne oppgaven skal jeg undersøke om molekylærgenetiske metoder identifiserer kopepoder bedre enn morfologisk metode ved å sammenligne resultatene. Jeg vil også bruke en molekylærgenetisk metode for å identifisere en enkelt art i en samlet prøve. Derfor vil jeg forklare nærmere hva de forskjellige metodene innebærer.

1.2 Morfologisk identifisering av kopepoder

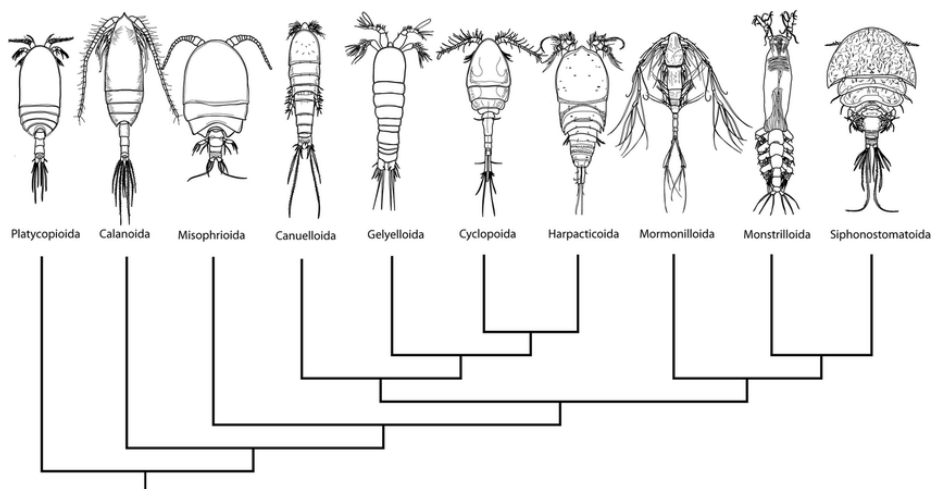
Kopepoder gjenkjennes på form, lengde på antenner, antall segmenter på hode, rygg og urosom, og figur 2 viser morfologiske trekk hos en kopepode som kan brukes for å skille arter fra hverandre. Kopepodene er små, vanligvis mellom 1-2 mm (Walter & Boxshall, 2018a), og man må derfor bruke lupe eller mikroskop for å kunne gjenkjenne trekk.

Kopepoder utvikler seg fra egg til voksen gjennom seks naupliusstadier, (nauplius I-VI) og fem copepodittstadier (I-V) og videre til voksen (stadium VI). I tidlige livsstadier er det svært vanskelig å skille mellom forskjellige arter, derfor blir disse ofte bare bestemt til slekt, familie eller orden.

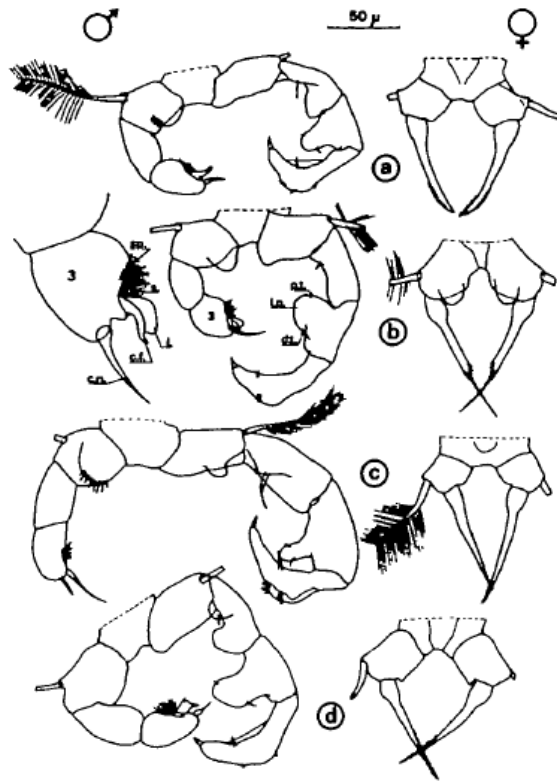


Figur 2 Morfologiske trekk hos en kopepode (Conway, 2012b)

Mellom ordener er forskjellene store og lett å identifisere (figur 3), men innen en slekt kan det være mer vanskelig å skille mellom artene og på enkelte må man bruke mikroskop for å finne forskjellene. Innen slekten *Acartia* må man se på det 5. benparet for å finne forskjellen slik figur 4 viser eksempel på.



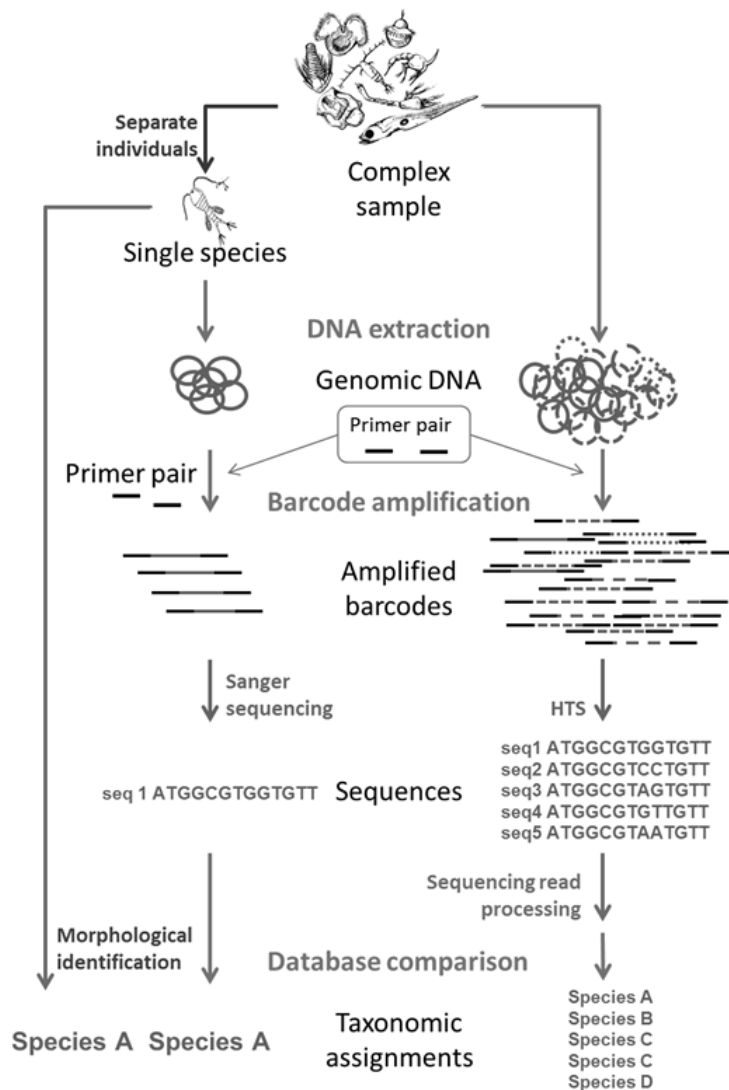
Figur 3 Forskjellige ordener av kopepoder, basert på gensekvenser fra GenBank (Khodami, McArthur, Blanco-Bercial & Martinez Arbizu, 2017).



Figur 4 Strukturen på femte benpar hos forskjellige arter *Acartia*. a) *A. clausi*, b) *A. tonsa*, c) *A. discaudata*, d) *A. bifilosa*. Hanner til venstre og hunner til høyre. (Brylinski, 1981)

1.3 Molekylærgenetisk identifisering

Molekylærgenetisk identifisering av kopepoder går ut på at man ser på DNA-sekvensen til et individ. Som regel ser man på sekvensen i en eller flere mindre deler av genomet, som et gen eller en del av et gen. Sekvensen sammenligner man med et referansebibliotek hvor DNA-sekvenser fra kjente arter er lagret. Figur 5 er en oversikt over hvordan man kan gå frem for molekylærgenetisk identifisering, og viser samtidig at det er mange flere trinn enn ved morfologisk identifisering. Aller først må man isolere, eller hente ut, DNA fra individene. Deretter oppformerer man den DNA-sekvensen man er interessert i slik at man har mange kopier av denne. Så sekvenserer man alle disse kopiene, det vil si at man leser av baserekkefølgen i DNA-sekvensene. Til slutt sammenligner man resultatet med en referansedatabase. Jeg vil beskrive de forskjellige trinnene nærmere i egne delkapitler.



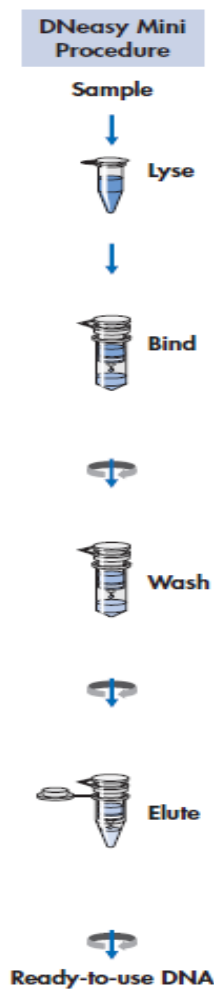
Figur 5 Taksonomiske analyser ved hjelp av DNA-sekvensering av dyreplankton (Bucklin et al., 2016)

Molekylærgenetisk identifisering ved hjelp av Quantitative PCR (qPCR) kan brukes til å bestemme om en bestemt art er tilstede i en prøve (artsspesifikk deteksjon). Dette kan brukes i overvåking av en art for å se på utbredelse, slik en studie på lakseparasitter viste (McBeath et al., 2006).

Ved å bruke molekylærgenetiske metoder til identifisering kan man påvise flere arter enn når man bruker morfologiske metoder. Etter at man begynte å bruke molekylærgenetiske teknikker, har man fått ny kunnskap om biodiversiteten i dyreplanktonsamfunn, taksonomi og opphav (Bucklin et al., 2016).

1.3.1 Isolering av DNA

For å isolere DNA fra en prøve, må man først lysere (bryte ned) cellene i prøven slik at DNA blir tilgjengelig. Dette gjøres kjemisk med enzymet proteinase K som bryter ned proteiner og dermed bidrar til at cellene løses opp. Dette kan gjerne kombineres med mekaniske metoder, som å riste prøven sammen med buffer og silicakuler i lyseringsmaskin, og tilsette proteinase K etterpå. Dette inkuberes ved en temperatur som passer proteinasen i flere timer. For å fange opp DNA brukes en spinnkolonne med et filter som binder DNA. Filteret vaskes flere ganger med kjemikalier slik at rester fra cellene, som ikke er bundet til filteret, fjernes. Til slutt løsner man DNA fra filteret med et siste kjemikalie, og nå har man et eluat (løsning) som inneholder rent DNA fra prøven. Figur 6 er en enkel fremstilling av prosessen. DNA oppbevares gjerne i fryser frem til man skal bruke det for å hindre at det blir ødelagt.

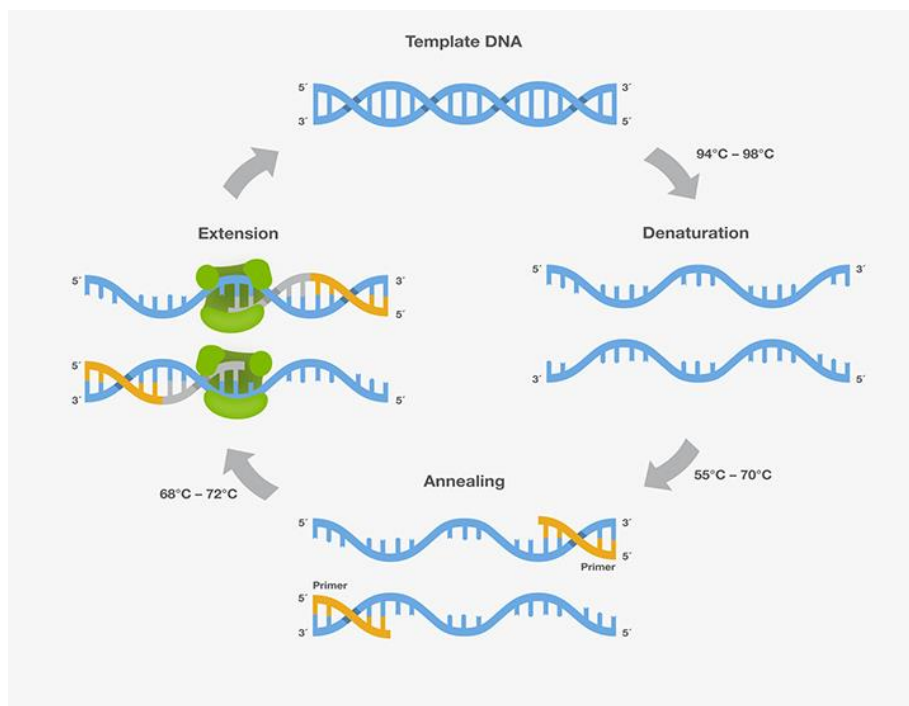


Figur 6 Isolering av DNA med spinnkolonne. (Qiagen)

1.3.2 Metabarcoding

Metabarcoding, også kalt multiartsdeteksjon, gjør det mulig å identifisere arter direkte fra sekvenser uten å måtte dele prøven opp i enkeltindivider først. Man bruker PCR (Polymerase Chain Reaction) til å kopiere opp en bestemt sekvens (barcode) av DNA til individene i prøven. For å få til dette må man velge primere som hybridiserer til områdene rundt sekvensen, slik at kopiering blir mulig. I metabarcoding bruker man universalprimere som fester seg til sekvensen fra (helst) alle arter.

DNA fra prøven tilsettes primere, nukleotider og en DNA-polymerase til syntese av nye sekvenser, og en buffer som inneholder det polymerasen trenger for å virke optimalt. Så settes prøven inn i en PCR-maskin. Figur 7 viser hva som skjer i PCR-reaksjonens tre trinn. I det første trinnet bruker man høy temperatur, rundt 94°C , for å løse bindingene mellom de to DNA-trådene slik at man får to enkelttråder (denaturering). I andre trinn senkes temperaturen til mellom $50\text{--}65^{\circ}\text{C}$ slik at primerne kan hybridisere til DNA-et. Så heves temperaturen igjen i det tredje trinnet til omtrent 70°C , og ved hjelp av DNA-polymerasen blir en ny sekvens satt sammen fra der primeren har festet seg. De tre trinnene gjentas 30-40 ganger og mengde PCR-produkt øker eksponentielt for hver runde.



Figur 7 Illustrasjon av en PCR-syklus og dens tre trinn. (ThermoFisher)

Til metabarcoding er det viktig å studere en DNA-sekvens som viser variasjon mellom alle artene i prøven, samtidig som at sekvensområdene hvor primerne skal hybridisere er bevart

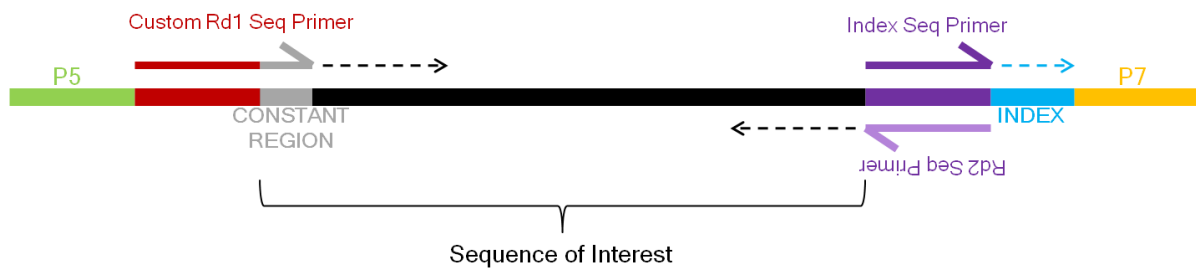
gjennom evolusjonen og er like hos alle slik at man kan bruke universalprimere. Man har prøvd seg frem på forskjellige sekvenser/barcodes, og de som er mest brukt på dyreplankton er genene for 18S, 28S, COI og 16S (Bucklin et al., 2016). Tabell 1 viser mer informasjon om disse sekvensene.

Tabell 1 Oversikt over de mest brukte sekvenser/barcodes på dyreplankton i metabarcoding (Bucklin et al., 2016).

Gen	Forkortes	Bruk
Nuclear small-subunit ribosomal RNA	18S	Har historisk vært mest brukt. Kan brukes både på vertebrater og invertebrater. Skiller orden, familier og høyere taksonomiske grupper. Kan også skille mellom noen arter.
Nuclear large-subunit ribosomal RNA	28S	Noe brukt, men er mer konservert og kan derfor underestimere artsrikdom.
Mitochondrial cytochrome oxidase I	COI	Brukes oftest for å skille mellom marine arter, egner seg godt på grunn av høy diversitet.
Mitochondrial ribosomal RNA	16S	Brukes også ofte til å skille mellom arter, og har vist seg å være svært pålitelig, spesielt hos nesledyr (Cnidaria).

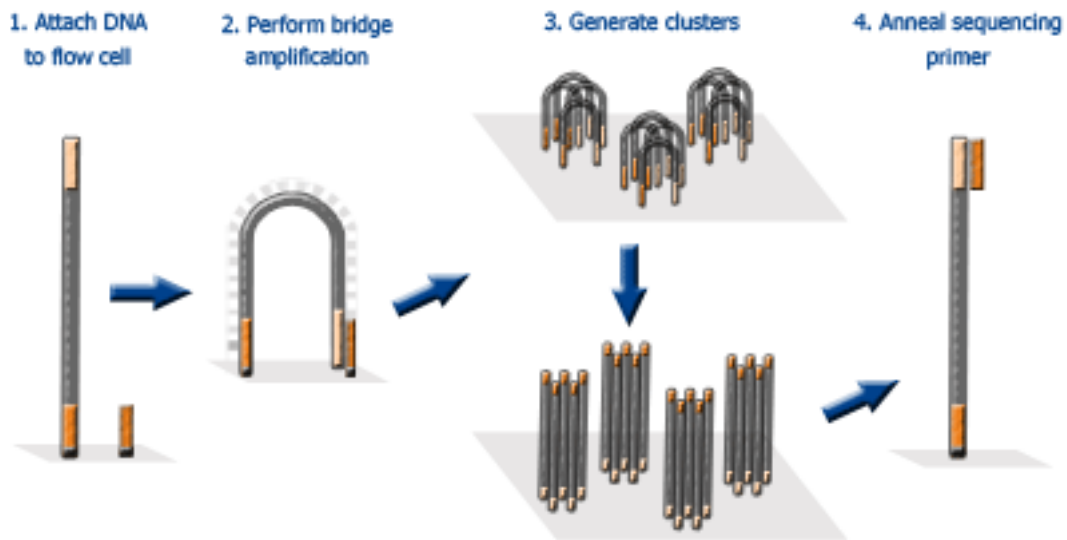
Etter amplifiseringen med PCR, sitter man igjen med et produkt fullt av kopier av ønsket sekvens fra alle artene som universalprimerne passet til. Men det kan også være uønskede produkter til stede, som produkter fra uspesifikk hybridisering av primerne, overskudd av primere og primerdimere, som er primere som har hybridisert med hverandre. Dette kontrollerer man gjerne ved gel-elektroforese. PCR-produktet tilsettes en brønn i en agarose-gel tilsatt etidiumbromid. Så setter man gelen i en strømkrets, og siden DNA er negativt ladet, vil fragmentene i PCR-produktet vandre mot den positive elektroden. Jo større fragmentene er, jo lenger tid tar vandringen gjennom gelen. Etter elektroforese legger man gelen på en UV-lysplate, da etidiumbromid gjør at produktet vil bli synlig i UV-lys, og man kan sammenligne med en størrelsesstandard for å kontrollere om man har fått det forventede PCR-produktet og om man har andre produkter også til stede (Freeland, Kirk & Petersen, 2016a). Etterpå kan man ekstrahere PCR-produktet fra gelen og rense det ved hjelp av kjemikalier, og man bruker gjerne et kit som inneholder utstyr og kjemikalier man trenger. Rensing foregår i spinnkolonner med filter etter samme prinsipp som forklart over og som vist i figur 1-x. Renset produkt blir så gjort klar til sekvensering. Konsentrasjonen og renheten til produktene måles på spektrofotometer og/eller fluorescens-detektorinstrument.

For å lese av hvilken baserekkefølge DNA-et i PCR-produktet har, bruker man en sekvenserings-teknikk. Til metabarcoding-sekvensering av PCR-produkter som jeg har beskrevet her, brukes nestegenerasjons DNA-sekvensering. Det finnes forskjellige metoder for slik sekvensering, i denne oppgaven ble det brukt Illumina MiSeq. Denne metoden krever at PCR-produktet har en bestemt struktur før det kan sekvenseres, for de skal kunne hybridisere til oligonukleotider på en plate (Kircher & Kelso, 2010). Figur 8 viser hvordan produktet ser ut før sekvensering. P5 og P7 er områder som fester PCR-produktet til platen. I tillegg til disse områdene det satt på startsekvens for Rd1 og Rd 2 sekvenserings primer. Index settes på for å merke hvilken prøve sekvensen er hentet fra.



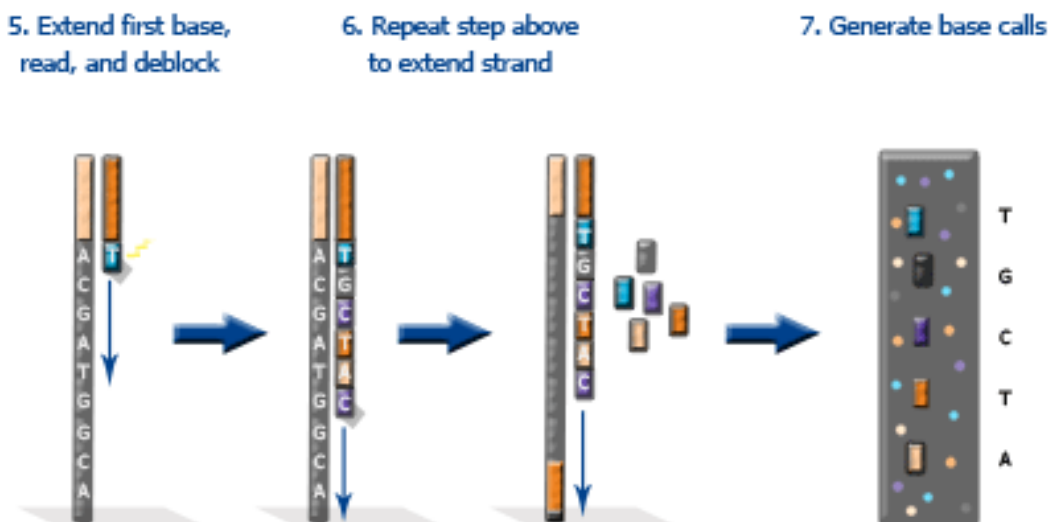
Figur 8 viser strukturen til PCR-produktet som skal sekvenseres ved Illumina MiSeq. (Nextgen)

Fremgangsmåten i Illumina vises i figur 9 og 10. DNA-fragmentene gjøres om til enkelttrådet DNA, skylles over platen, og hybridiserer seg til oligonukleotidene ved hjelp av P5- eller P7-adapteret. Så starter syntesen av en ny tråd ved hjelp av DNA-polymerase og nukleotider. Dersom den nye tråden bøyer seg og fester seg til et nytt oligonukleotid, kan det brukes til syntese av en ny tråd. Dette kalles «bridge amplification» og etter gjentatte runder med syntese av nye tråder får man klustere med flere tusen kopier av den originale sekvensen. Så settes sekvenseringsprimeren til og hybridiserer til enkelttrådet DNA, og alt er klart for sekvensering.



Figur 9 Oppformering av sekvenser ved PCR på plate i Illumina MiSeq. (Eurofins)

Sekvenseringen skjer ved at nukleotider som er merket med fluorescerende farge og som inneholder en blokkering settes til. På grunn av blokkeringen, stopper sekvenseringen for hvert nukleotid som blir inkorporert. Alt som ikke har hybridisert, skylles vekk, og med laser aktiviseres fluorescens. Det blir tatt bilde gjennom fire forskjellige filtre, ett for hver type nukleotid, og det registreres og lagres hvilket nukleotid som har hybridisert. Deretter fjernes den fluorescerende og hemmende delen, og sekvenseringen fortsetter med at det tilsettes nye nukleotider og DNA-polymerase.



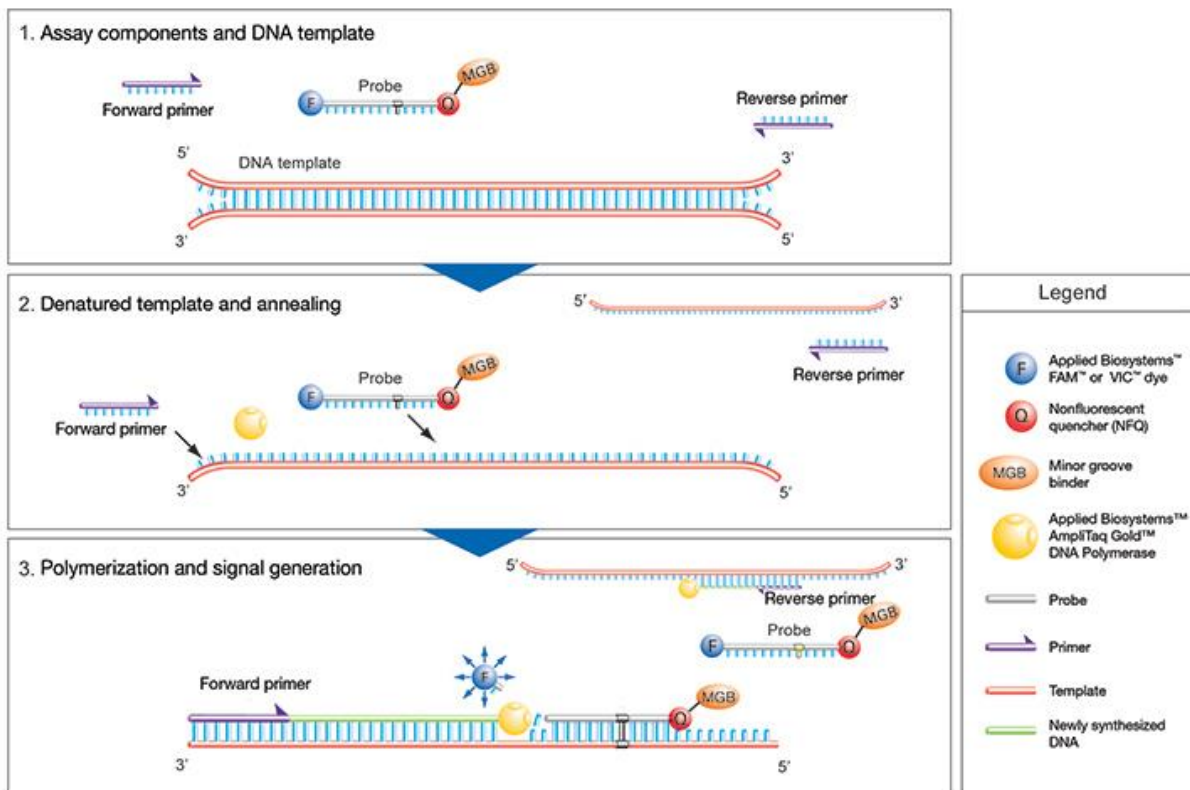
Figur 10 Registrering av baserekkefølge i en sekvens ved Illumina MiSeq. (Eurofins)

Illumina-sekvensering genererer flere millioner sekvenser, og for å analysere dem bruker man software-pakker (USEARCH, QUIIME, VSEARCH) med flere trinn av kommandoer som fjerner, analyserer og bearbeider alt slik at man sitter igjen med noen 100-1000 sekvenser man kaller Operational Taxonomic Unit (OTU) (Mysara, Njima, Leys, Raes & Monsieurs, 2017). OTU-ene blir så sammenlignet med kjente sekvenser i et referansebibliotek som GenBank, SILVA eller BOLD, og til slutt har man en liste over hvilke arter OTU-ene har likhet med. I software-pakkene ligger det også kommandoer for å fremstille dette grafisk (Leray & Knowlton, 2016).

1.4 Artsspesifikk deteksjon ved qPCR

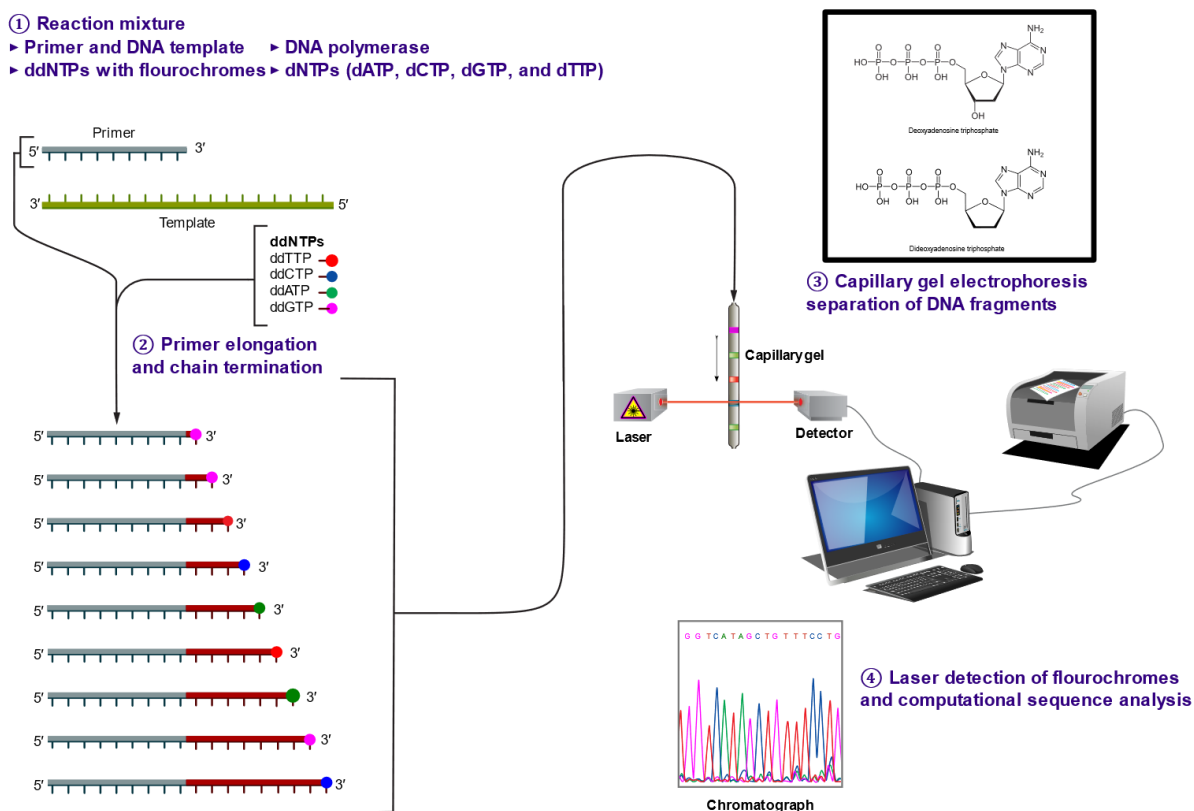
Til molekylærgenetisk identifisering av en bestemt art i en samlet prøve, bruker man gjerne kvantitativ PCR (qPCR/RealTime PCR) til oppformering av sekvensene i stedet for vanlig PCR. I qPCR trenger man ikke vente til alle syklusene i PCR er ferdig for å se om man får produkt eller ikke, for sekvensene som blir oppformert blir merket med en fluorescerende probe eller tilsvarende, og signalet leses av ved hver syklus (Bustin, 2005). Det gjør det også mulig å se hvor mye produkt man har fått, og det er en sammenheng mellom hvordan mengden produkt øker og hvor mye DNA det var opprinnelig i prøven. Men i denne oppgaven vil jeg bruke qPCR som kvalitativ analyse. Til forskjell fra metabarcoding, bruker man her PCR-primere som er artsspesifikke, det vil si at de passer bare til den arten man er ute etter å påvise. For å finne slike spesifikke primere, kan man bruke sekvenser for et gen som allerede er kjent for arten, og sammenligne med tilsvarende gen for alle andre arter, finne de delene av sekvensen som er unik, og så designe primere og probe til disse (Ye et al., 2012).

Fremgangsmåten for qPCR er ganske lik fremgangsmåten for PCR, med denaturering av DNA, hybridisering av primere og forlenging til nytt produkt. Det finnes forskjellige metoder og forskjellige DNA-polymeraser man kan bruke. Figur 11 viser metoden TaqMan som har fått navn etter DNA-polymerasen AmpliTaq som brukes til DNA-syntesen. I denne metoden brukes en probe merket med fluorescens i den ene enden, og en hemmende komponent i den andre enden. Proben er komplementær til DNA-sekvensen og hybridiserer samtidig med at primerne hybridiserer. «Hemmeren» sørger for at fluorescensen ikke løses ut før forlengingen av ny sekvens degraderer den fluoriserende enden av proben. Når denne slipper fri fra forbindelsen med «hemmeren», blir fluorescens synlig og kan leses av optisk (Walker, 2002).



Figur 11 qPCR med TaqMan-metoden. (ThermoFisher)

For å verifisere at det er den arten man ønsket å finne som er til stede i produktet som har blitt positivt i qPCR, kan man sekvensere produktet, for eksempel ved Sanger DNA-sekvensering. I denne sekvenseringen bruker man en primer, og syntese av ny sekvens skjer langs templatet i kun en retning ved hjelp av DNA-polymerase. Noen av nukleotidene (ddNTP) som brukes har et annet sukkermolekyl (dideoxyribose) i seg enn de andre nukleotidene (dNTP). Sukkermolekylet mangler en hydroksyl-gruppe i 3'-enden som hindrer neste nukleotid i å binde seg, og uten denne stopper syntesen opp. I en automatisert sekvensering vil ddNTP-ene være merket med fluorescerende farge (forskjellig for hver type). Man kjører syntese i flere runder, slik som i PCR, og for hver runde, vil ddNTP-er ha hybridisert. Fluorescens aktiveres av en laser og leses av med en fotocelle, og resultatet sees som fargede topper i en graf. Ved å bytte ut farge med tilsvarende base, vil gensekvensen kunne leses av (Freeland, Kirk & Petersen, 2016b). Figur 12 er en grafisk fremstilling av trinnene i slik automatisert sekvensering.



Figur 12 Sanger sekvensering. (By Estevezj [CC BY-SA 3.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/>)])

Etter sekvensering sammenligner man sekvensene man har fått med sekvenser fra kjente arter i et referansebibliotek slik som GenBank eller BOLD. I denne oppgaven har jeg brukt BLAST (the Basic Local Alignment Search Tool) til sammenligningen. Dette programmet sammenligner nukleotidsekvenser med de som er registrert i databasen, finner regioner som er like mellom sekvensene, og regner ut statistisk signifikans. Et søk kan gi flere titalls eller hundrevis av lignende sekvenser, og informasjon om hvor like de er den sekvensen vi søker med oppgis med forskjellige verdier. E-verdien forteller noe om en funnet sekvenslikhet skyldes en tilfeldighet. Jo lavere E-verdi, jo mindre sannsynlighet er det for at likheten mellom sekvensene er en tilfeldighet. En E-verdi som er lavere enn 0,1 eller 0.05 regnes som biologisk signifikant, og det er vanlig praksis å bruke E-verdien som et mål på statistisk signifikans (Pertsemlidis & Fondon, 2001).

2 Problemstilling

Det er behov for å få bedre kunnskap om hvilke kopepoder vi har i de kystnære områdene i Skagerrak. Både artssammensetning og mengde biomasse av kopepoder i Skagerrak vil påvirke andre arter, også de som er kommersielt utnyttet. Derfor trenger man gode metoder for å overvåke kopepoder. I denne oppgaven vil jeg prøve å finne ut om identifisering ved metabarcoding er en bedre metode for å artsbestemme kopepoder enn morfologisk identifisering. Gir identifisering ved metabarcoding og morfologisk identifisering sammenlignbare artslistene? Vil man ved metabarcoding klare å påvise fremmede eller kryptiske arter i den analyserte prøven? Og kan man finne en god metode for å påvise den fremmede arten *A. tonsa* i en håvtrekkprøve?

Målsetning med denne oppgaven er:

- Identifisere kopepoder både ved morfologisk og molekylærgenetisk metode
- Sammenligne resultater og se om de samme taxa blir identifisert med begge metoder
- Finne en metode for å kunne påvise *A. tonsa* i en håvtrekkprøve

3 Metoder

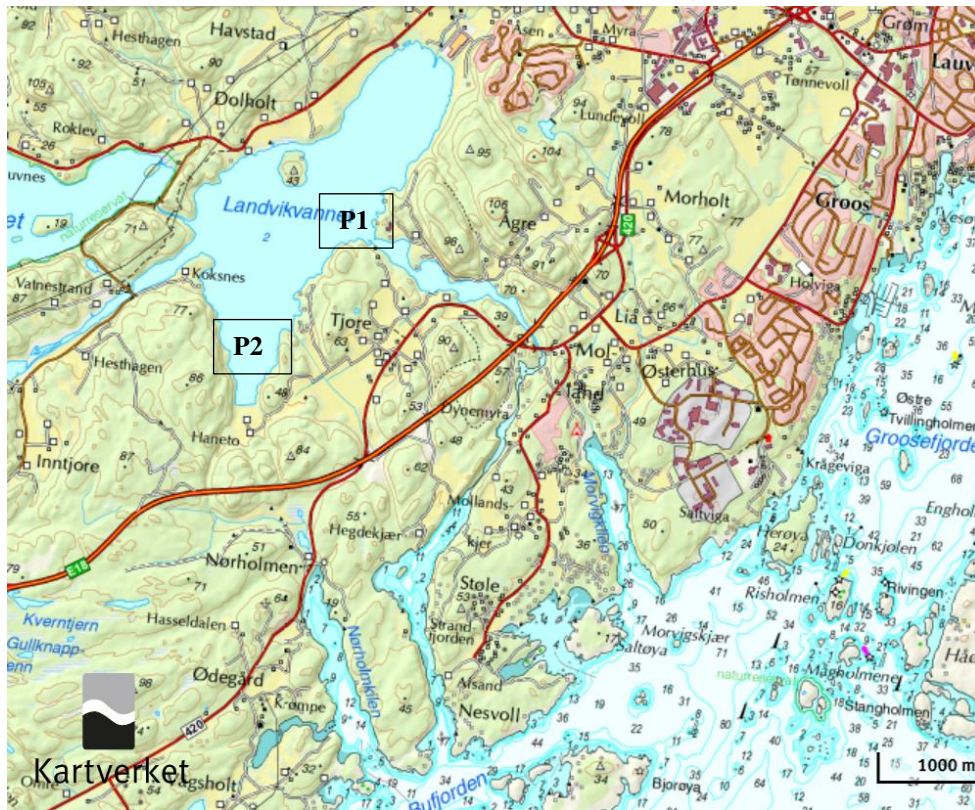
3.1 Beskrivelse av prøvestasjonene

Prøvematerialet ble hentet fra syv forskjellige stasjoner (tabell 2). To av stasjonene hentet jeg inn prøver fra selv, begge i Landvikvannet ved Grimstad. Resten av prøvene var samlet av Havforskningsinstituttet under deres overvåkingstokt.

Tabell 2 Oversikt over prøvene, hvor, fra hvilket dyp, og hvilken dato de ble samlet inn

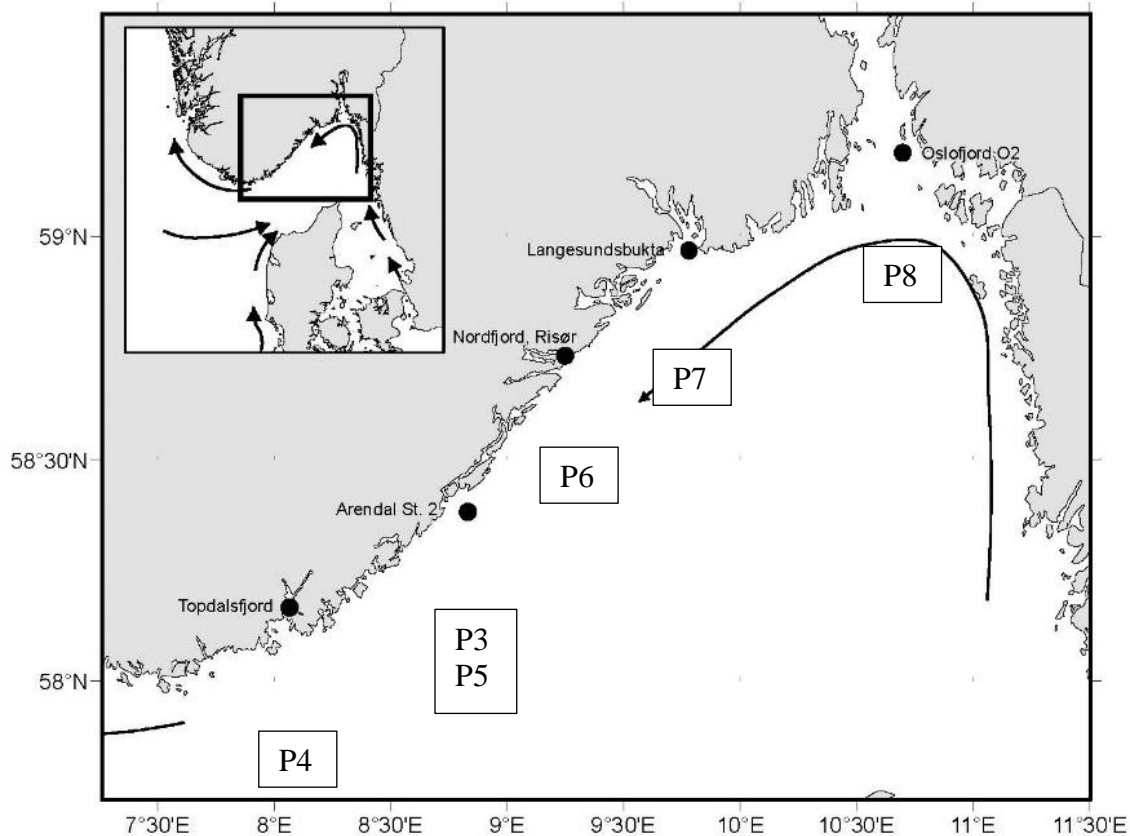
Prøve nr	Navn på stasjon	Posisjon UTM-32 N/Ø	Dyp	Dato
P1	Landvikvannet 1	6464437.88/471881.29	4-0 m	06.06.2017
P2	Landvikvannet 2	6464446.41/470709.69	4-0 m	06.06.2017
P3	Arendal stasjon 2	6471035.39/488303.67	50-0 m	18.09.2016
P4	Topdalsfjorden	6448014.29/445290.27	60-0 m	01.07.2016
P5	Arendal stasjon 2	6471035.39/488303.67	50-0 m	02.07.2016
P6	Nordfjord Risør	6510014.99/514475.34	160-0 m	07.07.2016
P7	Langesundsbukta	6536973.12/544851.13	200-0 m	04.07.2016
P8	Oslofjord O2	6561333.28/597151.92	350-0 m	06.07.2016

Landvikvannet (se figur 13) er en innsjø i Grimstad kommune som er forbundet med sjøen gjennom en 3 km lang kanal fra 1877. Saltvann kommer inn i innsjøen gjennom kanalen og legger seg nær bunnen, mens ferskvann fra elver og bekker legger seg over og det gir en lagdeling i vannsøylen (Eggers, Slotte, Olsen & Johannessen, 2013).



Figur 13 Kartutsnitt som viser stasjonene i Landvikvannet der prøvene P1 og P2 ble tatt. (Kartverket)

De øvrige stasjonene fremgår av figur 14, som viser plassering, navn, og hvilke prøver som er hentet hvor. Prøvene 3 og 5 er begge fra stasjonen Arendal 2, men fra forskjellig tid på året.



Figur 14 Kartutsnitt som viser stasjonene som inngår i Havforskningsinstituttets overvåking i Skagerrak, og hvilke håvtrekkprøve som er hentet der. Kilde: Havforskningsinstituttet.

3.2 Innsamling av zooplankton

Prøvene ble samlet fra båt med en WP2 planktonhåv med maskevidde 180 μm og en åpning på 0,25 m^2 (figur 15). Håven ble senket til bunn ved hjelp av et lodd, og deretter trukket vertikalt opp igjen med en fart på 0,5 m/s og tatt om bord. Der ble utsiden av håven spylt med saltvann for å få zooplankton fra duken ned i oppsamlingskoppen i bunnen av håven. Deretter ble oppsamlingskoppen koblet fra håven til videre behandling. Dette er standard metode hos Havforskningsinstituttet, og er beskrevet i deres manual for planktoninnsamling (Hassel, Endresen, Martinussen, Knutsen & Johannessen, 2013).

Prøven ble splittet med en Motoda vippsplitter: Halvparten gikk til tørrstoffanalyse. Den andre halvparten ble igjen splittet hvorav en fjerdedel ble fiksert i 4% borax-bufret formaldehyd og analysert morfologisk, mens den andre fjerdedelen ble fiksert i 96% ren etanol og brukt til molekylærgenetisk analyse.

De to prøvene fra Landvikvannet som jeg samlet inn selv, ble fiksert i 96% ren etanol. Flaskene ble merket med stasjon, dato, type håv og maskevidde. Tilbake på laboratoriet ble de satt i fryser frem til de skulle analyseres. Etter 24 timer ble etanolen skiftet ut.

Før analyse ble de splittet i to halvdeler med en Motoda vippesplitter. Den ene halvdelen ble satt i fryser på Flødevigen og oppbevares for senere studier. Den andre halvdelen ble igjen splittet. En fjerdedel ble analysert morfologisk, mens den andre fjerdedelen ble brukt til molekylærgenetisk analyse.



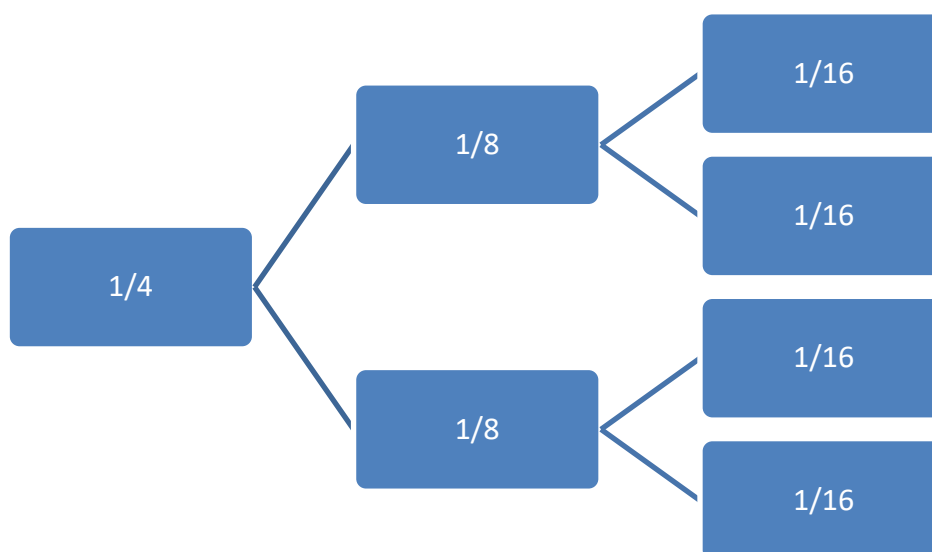
Figur 15 Utstyr brukt til innsamling i Landvikvannet. Til venstre planktonhåv og øvrig utstyr, til høyre plastflasker med prøver oppbevart på etanol. Foto: Camilla Moseid.

3.3 Morfologisk identifisering av kopepoder

Til morfologisk identifisering av kopepoder ble det brukt stereolupe av type Leica MZ6 (40 x forstørrelse) og LeicaMZ16A (115 x forstørrelse) med kamera. En delprøve ble tatt ut om gangen og lagt i et tellekammer. For å skille individer i prøven ble det brukt pinsett og tellenål. Til morfologisk bestemmelse brukte jeg bestemmelsesnøkler som Marine zooplankton of Southern Britain (Conway, 2012a) og Crustacea of Norway (Sars, 1895-1928). I tillegg brukte jeg nettstedene Diversity and Geographic Distribution of Marine Planktonic Copepods (Razouls et al., 2005-2018) og World Register of Marine Species (<http://www.marinespecies.org/>).

Prøver innsamlet av Havforskningsinstituttet ble analysert etter standard kvantitative metoder (Hassel et al., 2013). Dette omfattet bestemmelse av art, antall og livsstadier hos både kopepoder og annet zooplankton. Calanoide kopepoder ble bestemt til lavest mulig taksonomisk nivå (art eller slekt). Opparbeidingen ble gjort på 1/4 - 1/32 av prøven, og ble gjennomført av Lena Omli ved Havforskningsinstituttet.

Det ble gjennomført en kvalitativ opparbeiding av prøvene fra Landvikvannet, der målet var å få en så fullstendig artsliste av kopepoder som mulig. For å undersøke feilkildene ved å opparbeide kun 1/4 av prøven, ble fire delprøver á 1/16 av prøven gjennomgått (figur 16). Hver sekstenedel ble overført til tellekammer og kopepoder ble bestemt til lavest mulig taksonomisk nivå. Antall individer og livsstadier ble ikke registrert.



Figur 16 Splitting av delprøve (1/4) til sekstenedelsprøver for morfologisk analyse. Gjelder prøvene fra Landvikvannet (P1 og P2).

Noen av individene som ble artsbestemt, mellom 1-10 stykker av hver, ble tatt ut av prøvene og oppbevart i etanol i hvert sitt eppendorfrør for å brukes til positiv kontroll ved molekylærgenetisk identifisering. Rørene ble oppbevart i fryser frem til analyse. For å ha flest mulig arter til positiv kontroll, tok jeg også artsbestemte individer fra andre prøver enn de jeg skulle bruke i min oppgave.

3.4 DNA-isolering

Jeg isolerte DNA både fra håvtrekkprøvene og fra de artsbestemte individene. Til isoleringen brukte jeg DNeasy® Blood and Tissue Kit (Qiagen). Prosedyren for isolering fra de forskjellige prøvene var stort sett lik, men for håvtrekkprøvene ble det flere trinn. Derfor vil jeg beskrive prosedyrene hver for seg.

De artsbestemte individene lå fiksert i etanol i eppendorfrør. Etanolen ble pipettert ut uten at kopepodene fulgte med. Så ble det fylt på med destillert vann for å vaske bort etanolrester og deretter ble prøvene sentrifugert i noen sekunder. Destillert vann ble pipettert ut. Prosedyren ble gjentatt en gang til for å være sikker på at all etanol var fjernet. Deretter ble det tilsatt 180 µl ATL buffer til hver prøve.

Prøvene ble overført til skrukorkrør (1,5 ml) med silikakuler (Zirkona/Silica beads, 0,5 mm Ø, BioSpec) i bunnen. Skrukorkrørene ble satt i en maskin for homogenisering og knusing av vev (MAGNA Lyser, Rôche) ved 2800 rpm i 45 sekunder. Denne maskinen ristet rørene kraftig, ved hjelp av silikakulene ble innholdet i rørene knust. Så ble rørene sentrifugert i noen sekunder før de ble satt til inkubering ved 56 ° C i varmeblokk i 30 min. Rørene ble på nytt satt i homogenisatoren ved 2800 rpm i 45 sekunder før ny sentrifugering i noen sekunder.

Rørene ble så tilsatt 100 µl proteinase K som sammen med ATL-bufferen bidro til at cellene i prøven lyserte. Innholdet ble så blandet godt ved vortexing og satt til inkubering i varmeblokk ved 56 ° C over natten.

Dagen etter ble innholdet i rørene igjen blandet godt ved vortexing i 15 sekunder og deretter sentrifugert ved 8000 rpm i 1 minutt. Supernatant fra hver prøve ble pipettert ut, uten kuler eller uoppløst vev, og overført til hvert sitt eppendorfrør. Hvert eppendorfrør ble tilsatt 200 µl AL buffer og blandet ved vortexing i noen sekunder. 200 µl etanol ble tilsatt hvert eppendorfrør og blandet ved vortexing i noen sekunder. Så ble innholdet i hvert eppendorfrør overført til hver sin spinnkolonne i oppsamlingsrør, og sentrifugert ved 8000 rpm i 1 min. Spinnkolonnene ble overført til nye oppsamlingsrør, og tilsatt 500 µl AW1 buffer for å vaske bort materiale fra cellene som ikke var bundet til filteret i kolonnen, og deretter sentrifugert ved 8000 rpm i 1

minutt. Så ble spinnkolonnene overført til nye oppsamlingsrør, og tilsatt 500 µl AW2 vaskebuffer. Etter ny sentrifugering ved 8000 rpm i 1 minutt ble væsken helt ut før en ny sentrifugering på 13 400 rpm i 3 min. Spinnkolonnene ble tatt forsiktig ut av oppsamlingsrørene, og overført til eppendorfrør uten lokk. 100 µl AE buffer ble tilsatt i midten av filteret i spinnkolonnen for å løse DNA-et fra filteret, og inkubert i romtemperatur i 1 minutt. Så ble rørene sentrifugert ved 8000 rpm i 1 minutt, før jeg tok ut eluatet og lot det gå gjennom spinnkolonnene en gang til ved samme prosedyre. Til slutt ble eluatet med DNA overført til nye eppendorfrør og oppbevart i fryser.

Håvtrekkprøvene ble overført fra flaskene til 50 ml rør med pipette. Rørene ble så sentrifugert i Eppendorf Centrifuge 5810 R ved 3214 rpm i to minutter. Etanolen ble pipettert ut fra rørene uten at planktonet fulgte med. For å vaske bort etanolen fra planktonet, fylte jeg på med dobbeldestillert vann og pirket i bunnen med en plastpipette slik at pellet med plankton løste seg. Rørene ble igjen sentrifugert ved 3214 rpm i to minutter. Dobbeldestillert vann ble pipettert ut fra rørene uten at planktonet følger med, og prosedyren ble gjentatt med nytt dobbeldestillert vann. Vannet ble pipettert bort, og rørene veid. Så ble det tilsatt 1000 µl ATL buffer per 200 mg plankton.

Prøvene ble overført til skrukorkrør (1,5 ml) med silikakuler i bunnen, med 1000 µl vasket prøve til hvert rør. Fra hver prøve ble det flere rør, da de inneholdt stort volum. Skrukorkrørene ble satt i homogenisatoren (MagNA Lyser, Rôche) og innholdet ble ristet, homogenisert og knust som beskrevet i kap.3.4.1, og inkubert på samme måte over natten.

Dagen etter ble innholdet i rørene igjen blandet godt ved vortexing i 15 sekunder og deretter sentrifugert ved 8000 rpm i 1 minutt. Supernatant fra hver prøve ble pipettert ut, uten kuler eller uoppløst vev, og overført til hvert 10 ml-rør, ett for hver prøvestasjon. Innholdet ble blandet ved vortexing i noen sekunder, før det ble tatt ut 200 µl tre ganger til hvert sitt eppendorfrør. Det vil si at fra hver prøve hadde jeg tre paralleller som jeg isolerte DNA fra. Videre prosedyre var lik som beskrevet kap.3.4.1.

3.5 Identifisering med metabarcoding

3.5.1 PCR av håvtrekkprøver

Jeg valgte primere ut fra hva som har vært brukt tidligere og som har vist seg å gi gode resultater på kopepoder (Harvey, Johnson, Fisher, Peterson & Vrijenhoek, 2017) (Haenel, Holovachov,

Jondelius, Sundberg & Bourlat, 2017). PCR-produktet kunne heller ikke være lenger enn 600 nukleotider på grunn av sekvenseringsmetoden (Illumina MiSeq) som har maks lest sekvenseringslengde på 2x300 nukleotider (<https://emea.illumina.com/systems/sequencing-platforms.html>). Tabell 3 viser primerne jeg valgte inkludert adapter for Illuminasekvensering (Haenel et al., 2017).

Tabell 3 Primer sekvensene som ble brukt til PCR på kontroller. Sekvens med sort farge er komplementær med mål-DNA, mens sekvens med rød farge er adapter for Illuminasekvensering.

Markør	Primer navn	Primer sekvens (5' - 3')
COI Leray	mlCOIintF	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGGWACWGG WTGAACWGTWTAYCCYCC
	DgHCO2198	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTAAACTTC AGGGTGACCAAARAAAYCA
18S	SSU_FO4	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGCTTGTCTCA AAGATTA AGCC
	SSU_R22	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGCCTGCTG CCTTCCTT GGA

Primerne i tabell 3 ble testet ut på både kontroller og håvtrekkprøver med PCR.

For å kunne sende PCR-produktet fra håvtrekkprøvene til Illumina MiSeq-sekvensering, måtte vi sette til flere adaptere til produktet, slik det er beskrevet i innledningen. Det ble designet og bestilt nye primere basert på de jeg hadde testet, men med andre adaptere som kreves for Illumina MiSeq (se innledning). Primerne jeg brukte er fremstilt i vedlegg 3.

Til oppformering av gensekvensene fra 18S- og COI-genene i prøvene brukte jeg Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific). Jeg brukte Platinum SuperFi Master Mix (Invitrogen). DNA-polymerasen i denne miksen er en «high fidelity»-polymerase. High fidelity-polymeraser har vist seg å gi færre «mismatch» under syntese enn for eksempel Taq-polymerase (Dolgova & Stukolova, 2017). Miksen inneholder også en teknologi som gjør at DNA-polymerasen starter syntesen først ved høy temperatur, slik at det blir mulig å sette opp reaksjonen i romtemperatur.

I hver kontrollprøve hadde jeg 12,5 µl Platinum SuperFi mastermix, 5 µl 5xSuperFi enhancer, 1,25 µl forward primer, 1,25 µl reverse primer og 5 µl templat. I blank ble det tilsatt 5 µl nukleasefritt H₂O i stedet for templat. PCR temperaturprofil er vist i tabell 4.

Tabell 4 Temperaturprofil for PCR med Platinum SuperFi High fidelity enzym (Invitrogen)

Runde	Trinn	Temp.	Tid	Repetisjoner
1	1	95 °C	2 min	1
2	1	95 °C	1 min	35
	2	55 °C	45 s	
	3	72 °C	2 min	
3	1	72 °C	10 min	1
4	1	4 °C	∞	1

I hver håvtrekkprøve hadde jeg 25 µl Platinum SuperFi mastermix, 10 µl 5xSuperFi enhancer, 9 µl nukleasefritt vann, 2,5 µl forward primer, 2,5 µl reverse primer og 1 µl templat. I negativ kontroll (blank) ble det tilsatt 5 µl nukleasefritt H₂O i stedet for templat. PCR temperaturprofil var den samme som for kontrollprøvene, og er vist i tabell 4.

PCR-produktene ble kontrollert ved elektroforese på 1,5% agarosegel tilsatt 5 µl etidiumbromid. 5 µl loading dye (oppskrift i vedlegg 1) ble tilsatt prøvene i PCR-rørene. I elektroforesekaret hadde jeg 1 x TAE-buffer (oppskrift i vedlegg 2). 4 µl størrelsesstandard GelPilot 1 kb Plus Ladder (Qiagen) ble satt i første og siste brønn, og 25 µl PCR-produkt til de øvrige brønnene. Elektroforese ble kjørt ved 100 V på Bio-Rad Power Pac 300 i 30 minutter, og deretter ble gelen fotografert i GeneFlash (Syngene Bio Imaging).

PCR-produktene fra håvtrekkprøvene ble kuttet ut fra gelen med skalpell og lagt i hvert sitt eppendorfrør. Eppendorfrøret ble veid, og vekt av gel-bit beregnet. Så ble produktet ekstrahert og rensert med PureLink[®] Quick Gel Extraction and PCR Purification Combi Kit (Thermo Fisher Scientific). Til hvert eppendorfrør ble det tilsatt 3 µl Gel Solubilization Buffer (L3) for hver mg gel. Så ble eppendorfrørene satt til inkubering i vannbad som holdt 50°C i ca. 10 minutter. Rørene ble snudd opp ned hvert 3.minutt underveis i inkuberingen. Etter at gelen var løst, ble rørene inkubert i ytterligere 5 minutter for å sikre at all gelen virkelig var oppløst. Deretter ble det tilsatt 1 µl isopropanol for hvert mg gel for å sikre optimalt utbytte av DNA, og innholdet i røret ble blandet ved vortexing i noen sekunder.

De oppløste gel-bitene ble så overført til spinnkolonner i oppsamlingsrør for rensing. Etter sentrifugering på 10 000 x g i 1 minutt, ble innholdet i oppsamlingsrørene kastet. Til spinnkolonnen ble det så tilsatt 700 µl Wash Buffer (W1). Etter sentrifugering på 10 000 x g i 1 minutt, ble innholdet i oppsamlingsrørene kastet, før en ny sentrifugering på maks fart i 3 minutter for å fjerne alle rester av W1. Oppsamlingsrørene ble kastet, og spinnkolonnene ble plassert i eppendorfrør uten lokk. 50 µl Elution Buffer (E1) ble tilsatt i midten av filteret i spinnkolonnene og inkubert i 1 minutt i romtemperatur. Etter sentrifugering på 10 000 x g i 1 minutt, ble spinnkolonnene kastet, og eluatet ble overført til nytt eppendorfrør. Renset PCR-produkt ble målt både for renhet på NanoDrop One (Thermo Scientific), og for konsentrasjon på Qubit 2.0 (Invitrogen). Dette beskrives nærmere i kap.3.6.

3.5.2 Sekvensering og analyse med bioinformatikk

PCR-produktene ble sekvensert ved Illumina teknologi på MiSeq system av Oslo Sequencing Center etter standard prosedyre.

Analysen av sekvenseringsdata fra Illumina MiSeq ble utført av Morten Mattingsdal ved UiA ved å bruke software-pakken VSEARCH, og er oppsummert kort i figur 17. VSEARCH består av en rekke kommandoer for å prosessere datamengden slik at det blir lettere og mindre tidkrevende å analysere. VSEARCH er designet for å være et åpent tilgjengelig alternativ til USEARCH, og bruker mer eller mindre den samme oppbyggingen som USEARCH (Rognes, Flouri, Nichols, Quince & Mahé, 2016). Kommandokodene er listet opp i vedlegg 5.

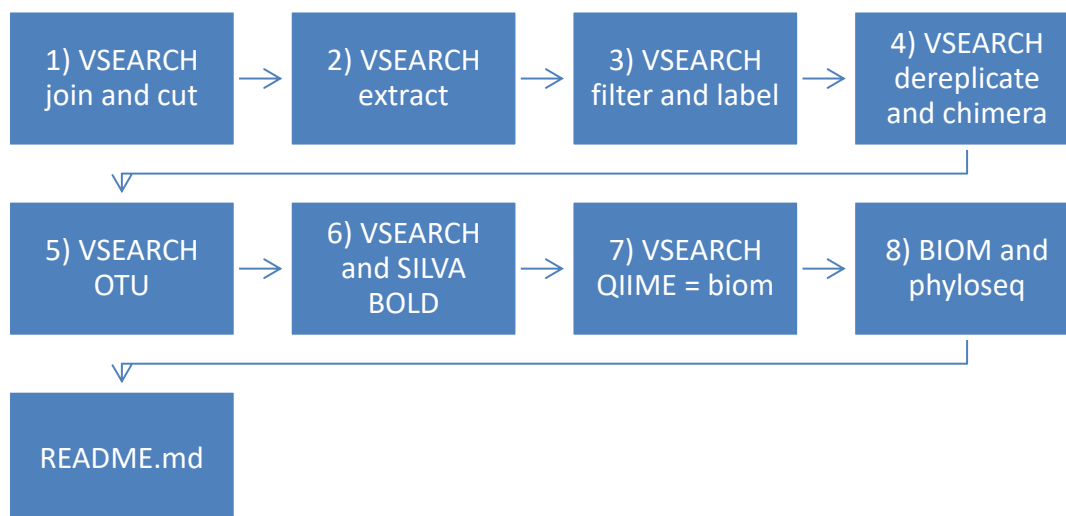
Sekvenseringsdataene inneholdt «Paired Reads», det vil si to sekvenser lest fra hver sin ende fra samme PCR-produkt. Første trinn var å sette disse sammen. Minimum overlapp ble satt til 40 nukleotider og en maks forskjell til 10 nukleotider. 12 nukleotider i enden av sekvensene ble fjernet, da disse var del av adaptersekvensen til Illumina MiSeq. Et histogram over distribusjonen av lengden på sekvensene avslørte to markerte topper som korresponderte med oppformeringen av COI (364-366 nukleotider) og 18S (402-408 nukleotider). Disse sekvensene ble trukket ut og delt i hver sin gruppe for videre analyse, en gruppe for COI og en for 18S, og sekvenser med et forventet avvik på 10% ble fjernet. Sekvensene fra alle de åtte prøvene i hver gruppe ble kombinert. Identiske sekvenser ble dereplikert, det vil si at identiske sekvenser ble samlet i clusterer, og at dette klusteret behandles som en representativ sekvens i den videre prosessen. Sekvenser som ikke var identiske med andre etter dereplikasjon, ble fjernet. Chimera-sekvenser, som er sekvenser satt sammen av to eller flere deler fra forskjellige

sekvenser, ble identifisert og fjernet. De sekvensene som var igjen etter dette ble så brukt til å konstruere Operational Taxonomical Units (OTUs) som sammenlignes med et referansebibliotek. Minimum sekvenslikhet ble satt til 97%.

OTU-sekvensene fra 18S ble delt inn i taxa ved å bruke en modifisert utgave av SILVA, som er satt sammen av eukaryote sekvenser som er gjort compatible med VSEARCH via SINTAX-algoritmen, og som omfatter 77 541 sekvenser. Resultatene ble satt som BIOM-tabeller, som er formatet man presenterer OTU-sekvensene på. BIOM står for the Biological Matrix format.

Basert på resultatene fra 18S, ble COI-sekvensene hentet fra referansebiblioteket BOLD. Sekvenser fra følgende taxa ble hentet: Actinopterygii, Branchiopoda, Cephalocarida, Chilopoda, Cnidaria, Collembola, Diplopoda, Diplura, Echinodermata, Gastropoda, Hexanauplia, Malacostraca, Maxillopoda, Merostomata, Ostracoda, Protura, Pycnogonida, Remipedia, Symphyla. De fleste av disse er taksonomiske nivåer under Arthropoda, og omfatter 718 022 sekvenser.

BIOM-tabellene ble lest inn i R og visualisert, og dette ble også utført av Morten Mattingsdal.



Figur 17 Oversikt over trinnene i analysen av sekvenser fra Illumina MiSeq (detaljert beskrivelse i vedlegg 5).

3.6 Måling av DNA-konsentrasjon og renhet etter DNA-isolering og PCR

DNA-konsentrasjonen og renhet i alle prøvene fra DNA-isolering og PCR ble målt på NanoDrop One (Thermo Scientific), og jeg fulgte produsentens prosedyre. Som blank brukte jeg AE-buffer, som var den samme bufferen som i prøvene. Mengde blank og prøver: 1,5 µl.

Renhet ble målt med absorpsjon, og ble registrert på alle bølgelengder fra 190 til 850 nm.

DNA-konsentrasjonen etter PCR på håvtrekkprøvene ble også målt på Qubit 2.0 (Invitrogen) etter produsentens prosedyre.

3.7 Artsspesifikk deteksjon av *Acartia tonsa*

For å påvise *Acartia tonsa* i prøvene brukte jeg qPCR med artsspesifikk primerpar og TaqMan probe, og den ble utført på StepOne Plus Real-Time PCR (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific). Først kjørte jeg qPCR på det genomiske DNAet som ble isolert fra de ulike kopepodene, inkludert *A. tonsa*, deretter på håvtrekkprøvene.

For å finne artsspesifikke primere og probe til *A. tonsa*, søkte jeg først opp kjente nukleotid-sekvenser på COI fra Genbank-databasen hos National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Sekvensene ble kopiert inn i et word-dokument før alle ble lastet inn Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) for justering og sammenligning. Den lengste sekvensen som var lik hos alle ble så lastet inn i Primer-BLAST (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome).

Primer-BLAST er et program knyttet til Genbank databasen hos NCBI, og kombinerer BLAST med en algoritme for sammenligning av sekvenser som gjør det mulig å finne artsspesifikke primere i ett trinn (Ye et al., 2012). Forslagene til primere og probe ble gjennomgått, og jeg valgte de som gav produkt på kjente *A. tonsa* sekvenser, og som ikke var homologe med sekvenser fra andre arter. Lengden til proben ble justert med softwaren Primer Express 3.0.1 (Applied Biosystems) for å endre smeltepunktet (T_m), da proben kunne være kortere på grunn av minor groove binder (MGB) i den ene enden. Primerne og proben ble produsert hos Eurofins Genomics (Tyskland), og detaljer er satt opp i tabell 5. Beregnet produktlengde med disse primerne ville være 297 baser.

Tabell 5 Oversikt over primere og probe som ble brukt til qPCR. Proben er merket i 5' enden med det fluoriserende molekylet FAM.

Oligo	Navn	Sekvens (5' ->3')
Forward	AtonsCO1-F	AATGTGGTCAGGAATGGTTGG
Reverse	AtonsCO1-RT	CGCCCCTCTTTCTACTAGCGA
Probe	AtonsCO1-probe	FAM*TAGTCACCGCCCACGCT[MGBEQ]

Først ble primere og probe testet på det genomiske DNAet som ble isolert fra de ulike kopepodene, inkludert *A. tonsa*. Jeg brukte strips med 8 brønner på hver strips. Til hver brønn ble det tilsatt 10 µl TaqMan Environmental Master Mix 2.0 (Thermo Fisher Scientific), 0,5 µl 10 µM probe, 1,8 µl 10 µM forward primer, 1,8 µl 10 µM reverse primer, 4,9 µl nukleasefritt H₂O, og 1 µl templat. Temperaturprofil for qPCR er vist i tabell 6.

Tabell 6 Temperaturprofil for qPCR med TaqMan Environmental Master Mix 2.0

Runde	Trinn	Temp.	Tid	Repetisjoner
1	1	50 °C	2 min	1
2	1	95 °C	10 min	1
3	1	95 °C	15 sek	60
	2	60 °C	1 min	

Etter at primere og probe var testet på DNA fra de forskjellige kopepodene, ble det utført qPCR på håvtrekkprøvene P1-P8. Fremgangsmåten var lik som beskrevet over, med samme blandingsforhold bortsett fra at jeg brukte 5 µl templat og 0,9 µl nukleasefritt H₂O.

For å kontrollere om det var *Acartia tonsa* som var påvist i de samlede prøvene, ble PCR-produktet sekvensert. Først ble qPCR-produktene som gav resultat rensert for å fjerne overskudd av dNTP og primere. Jeg brukte ExoSAP-IT (GE/USB), og fulgte produsentens prosedyre. 5 µl PCR-produkt ble blandet i mikrorør med 2 µl ExoSAP-IT ved å pipettere opp og ned. Deretter ble blandingen inkubert i PCR-maskin, først ved 37 °C i 15 minutter, så ved 80 °C i 15 minutter for å inaktivere enzymene i ExoSAP-IT.

Etter rensing ble qPCR-produktene sekvensert med BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing kit (Applied BioSystems, Thermo Fisher Scientific). 2 µl rensert PCR-produkt ble blandet i mikrorør med 4 µl sekvenseringsmix (Ready Reaction Premix), 2 µl fortynningsbuffer

(BigDye Sequencing Buffer), 0,64 µl 10 µM sekvenseringsprimer (både med AtonsCO1-F og AtonsCO1-RT) og 11,36 µl nukleasefritt H₂O. Sekvensering ble kjørt med temperaturprofil vist i tabell 7.

Tabell 7 Temperaturprofil på sekvensering med BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing kit.

Runde	Trinn	Temp.	Tid	Repetisjoner
1	1	96°C	1 min	1
2	1	96°C	10 s	25
	2	50°C	5 s	
	1	60°C	4 min	
3	1	4°C	∞	1

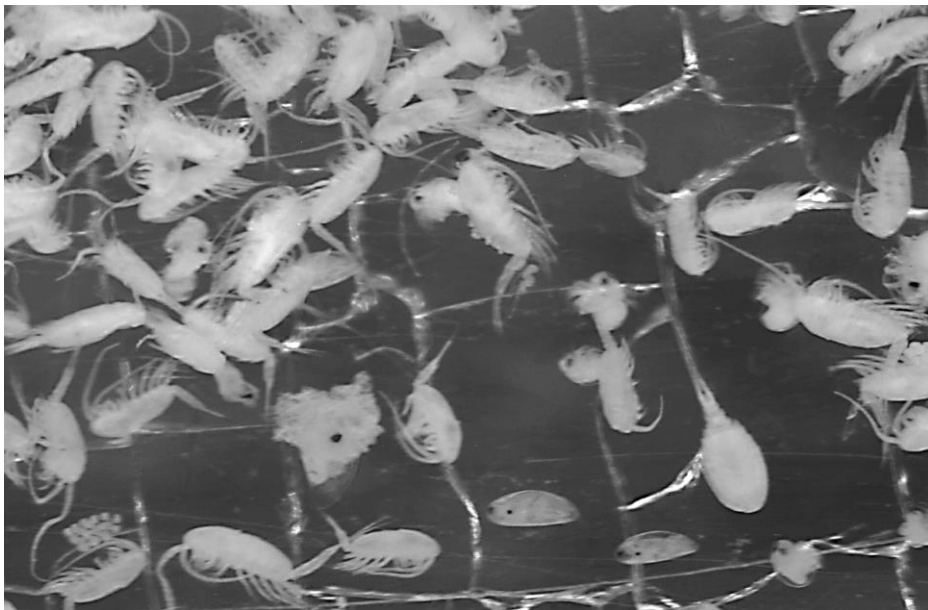
Etter sekvensering ble prøvene overført til en 96-brønns reaksjonsplate. For å fjerne uinkorporerte fluorescerende nukleotider og salter fra bufferne, ble det i hver brønn tilsatt 5 µl 125 mM EDTA og 60 µl 96 % etanol. Innholdet ble blandet ved å pipettere opp og ned noen ganger. Brønnene ble dekket med lokk og inkubert i romtemperatur i 15 min. Deretter ble platen sentrifugert i Eppendorf Centrifuge 5810 R ved 2500 x g i 45 minutter. Lokket ble fjernet og brettet ble satt opp ned på et papirtørkle, og sentrifugert ved 180 x g i 1 minutt. 60 µl 70% etanol ble så tilsatt hver brønn før nytt lokk ble satt på. Brettet ble sentrifugert ved 1650 x g og 4°C i 15 minutter, før lokket igjen ble fjernet og brettet ble satt opp ned på et papirtørkle og sentrifugert ved 180 x g i 1 minutt. Til de nå tørre brønnene ble det tilsatt 20 µl formamid i avtrekk. Dette ble inkubert i 5 minutter ved 95°C og deretter avkjølt.

Selve sekvenseringen ble utført i SeqStudio Genetic Analyzer (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific), etter produsentens prosedyre.

4 Resultater

4.1 Morfologisk identifisering

Figur 18 viser en typisk delprøve fra P1 sett gjennom lupe. Individuer som ble plukket ut av prøvene til kontroll fremgår av tabell 8. Disse ble hentet også fra andre prøver enn de som er tatt med i denne oppgaven. Dette ble gjort for at vi skulle ha positiv kontroll på så mange arter som mulig. En sammenstilling av hvilke arter som ble påvist i håvtrekkprøvene finnes i vedlegg x. Noen individer kunne identifiseres til art, mens andre ble identifisert til familie, slekt eller orden. Størst mangfold var det i prøve P6 og P8. Lavest mangfold var det i P1 og P2. Dette var også de eneste prøvene der det ble identifisert *Cyclops abyssorum* og *Eurytemora affinis*. Harpacticoida ble kun identifisert i P1. *Candacia armata* ble kun identifisert i P3. *Paraeuchaeta norvegica* og *Scolecithricella minor* ble kun identifisert i P8.



Figur 18 Typisk delprøve fra Landvikvannet sett gjennom lupe. På bildet sees copepodene *Eurytemora affinis* og *Cyclops abyssorum*. Her sees også flere individer av cladocera og cyprider av cirripedia. Foto: Camilla Moseid.

4.2 DNA-isolering

Etter at DNA var isolert fra individer og håvtrekkprøver, målte jeg konsentrasjonen og renhet med NanoDrop. Tabell 8 og 9 viser resultatene fra målingene.

Tabell 8 Oversikt over konsentrasjon og absorpsjon av DNA fra individer til kontroll.

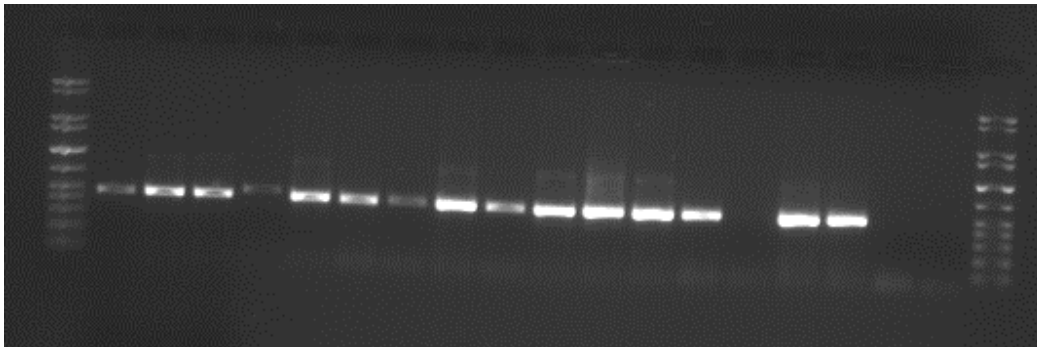
Prøve	Innhold	Ant. individer	DNA kons.ng/µl	A260/A280	A260/A230
1	<i>Calanus hyperboreus</i>	2	24,4	1,82	1,49
2	<i>Centropagus typicus</i>	4-6	16,1	1,76	0,93
3	<i>Calanus finmarchicus/helgolandicus</i>	2	47,9	2,01	1,67
4	<i>Acartia sp.</i>	6-8	17,1	1,95	1,38
5	<i>Metridia lucens</i>	6	30,7	2,00	1,61
6	Harpacticoida	1-2	2,0	1,37	0,33
7	<i>Pseudocalanus sp</i>	1-2	5,6	1,56	0,62
8	<i>Cyclops abyssorum</i>	2-3	24,6	1,94	1,51
9	<i>Metridia longa</i>	1	4,2	1,65	0,48
10	<i>Eurytemora affinis</i>	10	19,0	1,97	1,38
11	<i>Temora longicornis</i>	3-4	14,2	1,85	0,72
12	<i>Paracalanus sp</i>	2	10,7	1,85	0,72
13	<i>Oncaea sp</i>	1	2,6	2,13	0,69
14	<i>Acartia clausi</i>	1	2,6	1,65	0,51
15	<i>Candacia norvegica</i>	2	15,0	1,93	1,22
16	<i>Oithona atlantica</i>	2	5,3	1,74	0,52
17	<i>Acartia tonsa</i>	6-8	2,7	1,43	0,59

Tabell 9 Oversikt over konsentrasjon og absorpsjon av DNA fra håvtrekkprøvene. Det var tre paralleller fra hver prøve, i tabellen viser jeg gjennomsnittsverdi av parallellene med standardavvik.

Prøve	DNA kons.ng/µl	A260/A280	A260/A230
P1	213,5 ± 43,9	2,12 ± 0,02	2,30 ± 0,06
P2	336,6 ± 58,4	2,11 ± 0,02	2,38 ± 0,11
P3	160,9 ± 42,4	2,05 ± 0,01	2,27 ± 0,05
P4	156,7 ± 40,3	2,05 ± 0,02	2,33 ± 0,08
P5	184,9 ± 13,9	2,05 ± 0,00	2,20 ± 0,16
P6	161,2 ± 36,7	2,06 ± 0,02	2,10 ± 0,19
P7	133,4 ± 5,5	2,04 ± 0,01	2,06 ± 0,12
P8	145,3 ± 28,1	2,03 ± 0,03	2,28 ± 0,03

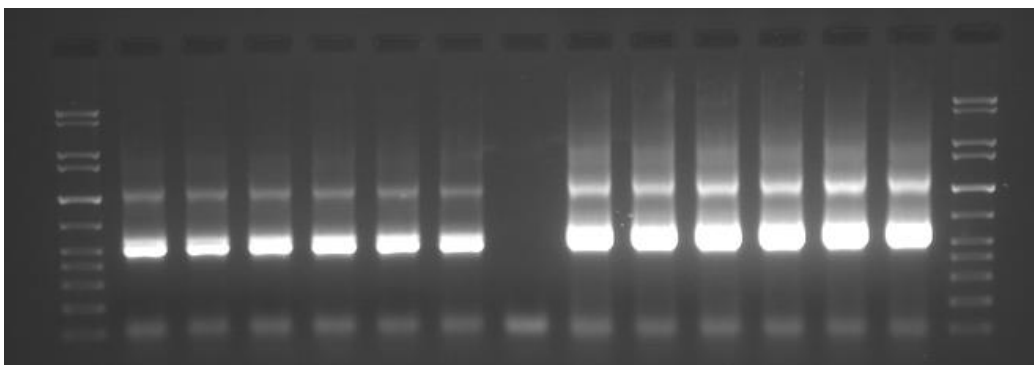
4.3 Identifisering med metabarcoding

Primerne ble testet på alle individene med PCR og kontrollert med gel-elektroforese. Figur 19 er et eksempel på resultat av PCR-produkt fra 18S-genet i gel etter elektroforese. Dette er fra første test av primerne, og i denne PCR-kjøringen ble det ikke produkt fra prøve 14 *Acartia Clausi* og prøve 17 *Acartia tonsa* (brønn 15 og 18). Det ble utført ny PCR på disse, og etterfølgende elektroforese viste et positivt resultat. For COI-genet, var det flere prøver som det måtte utføres ny PCR på. Det ble ikke produkt på prøve 6 Harpacticoida.



Figur 19 Gel-bilde av PCR-produkt fra 18S-genet. Brønn 1 og 20 er størrelsesstandard. Brønn 2-18 er prøvene fra individene i tabell 3-x. Brønn 19 er blank (negativ kontroll).

Figur 20 viser et eksempel av PCR-produkt fra håvtrekkprøvene på gel etter elektroforese. Størrelsesstandarden i brønn 1 og 15 markerer lengder på hver. 100.base. PCR-produktets lengde var på ca 500 baser, og sees her som tydelige bånd. Det var disse båndene som ble kuttet ut av gelen, produktet ble ekstrahert fra gelen og renset.



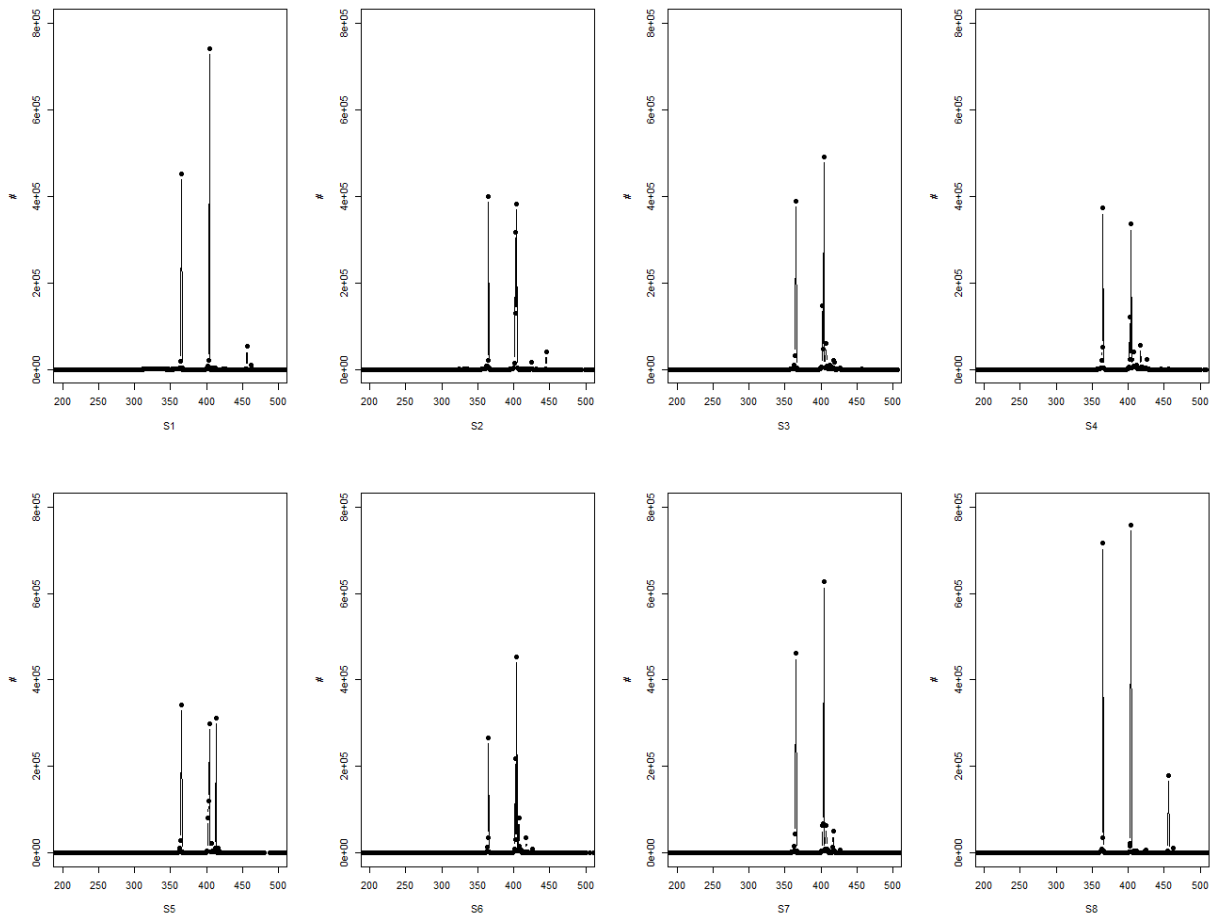
Figur 20 Gel-bilde av PCR-produkt fra P1 med seks paralleller fra hver prøve på hvert gen. Brønn 1 og 15 er størrelsesstandard. Brønn 2-7 er COI, mens brønn 9-14 er 18S. Brønn 8 er blank (negativ kontroll).

Renset PCR-produkt ble målt både for renhet og konsentrasjon. Tabell 10 viser resultatene fra målingene. Renhet målt ut fra absorpsjon 260/230 var svært lave på alle prøvene.

Tabell 10 Oversikt over resultatene fra måling av konsentrasjon og renhet av PCR-produktene etter gel-ekstraksjon og rensing.

Prøve	Gen	Måling med Qubit		Måling med NanoDrop		
		QF-verdi	Konsentrasjon (µg/mL)	Konsentrasjon (µg/mL)	Renhet 260/280	Renhet 260/230
P1	18S	0,184	36,8	40,3	1,86	0,16
P2	18S	0,211	42,2	49,9	1,90	0,13
P3	18S	0,160	32,0	40,1	1,90	0,15
P4	18S	0,188	37,6	46,7	1,91	0,42
P5	18S	0,214	42,8	46,1	1,88	0,36
P6	18S	0,254	50,8	53,7	1,88	0,50
P7	18S	0,160	32,0	39,6	1,94	0,48
P8	18S	0,203	40,6	40,9	1,86	0,46
P1	COI	0,079	15,7	24,6	1,87	0,36
P2	COI	0,056	11,2	19,9	1,79	0,31
P3	COI	0,056	11,1	15,6	1,81	0,11
P4	COI	0,062	12,4	23,1	1,83	0,32
P5	COI	0,055	11,0	22,5	1,87	0,25
P6	COI	0,071	14,2	15,8	1,75	0,28
P7	COI	0,071	14,2	21,1	1,78	0,94
P8	COI	0,058	11,7	15,1	1,72	0,20

Etter Illumina MiSeq utført, kom det mellom 1 400 000 og 2 000 000 leste sekvenser («paired reads») for hver stasjon. Dette var sekvenser fra begge gen. Etter sammenslåing ble antallet redusert med ca.100 000 sekvenser for hver stasjon. Sekvensene for 18S og COI ble identifisert og tatt ut til hver sin gruppe (figur 21), mens resten ble fjernet.



Figur 21 Distribusjon av lengden på sekvenser etter at «paired reads» var slått sammen fra alle de åtte prøvene. Disse ble brukt til å identifisere og ta ut sekvenser fra COI (364-366 b) og 18S (402-408 b). (Utarbeidet av Morten Mattingdal)

Sekvensene i hver gruppe ble ytterligere redusert etter at man tok bort sekvenser med forventet avvik på 0,1. Tabell 11 viser hvor mange sekvenser man satt igjen med etter hvert trinn. Etter dette ble alle sekvensene i hver gruppe kombinert på tvers av stasjoner for ytterligere prosessering.

Tabell 11 Oppsummering av sammenslåing og kvalitetskontroll av oppformerte sekvenser ved bruk av VSEARCH. (Utarbeidet av Morten Mattingsdal)

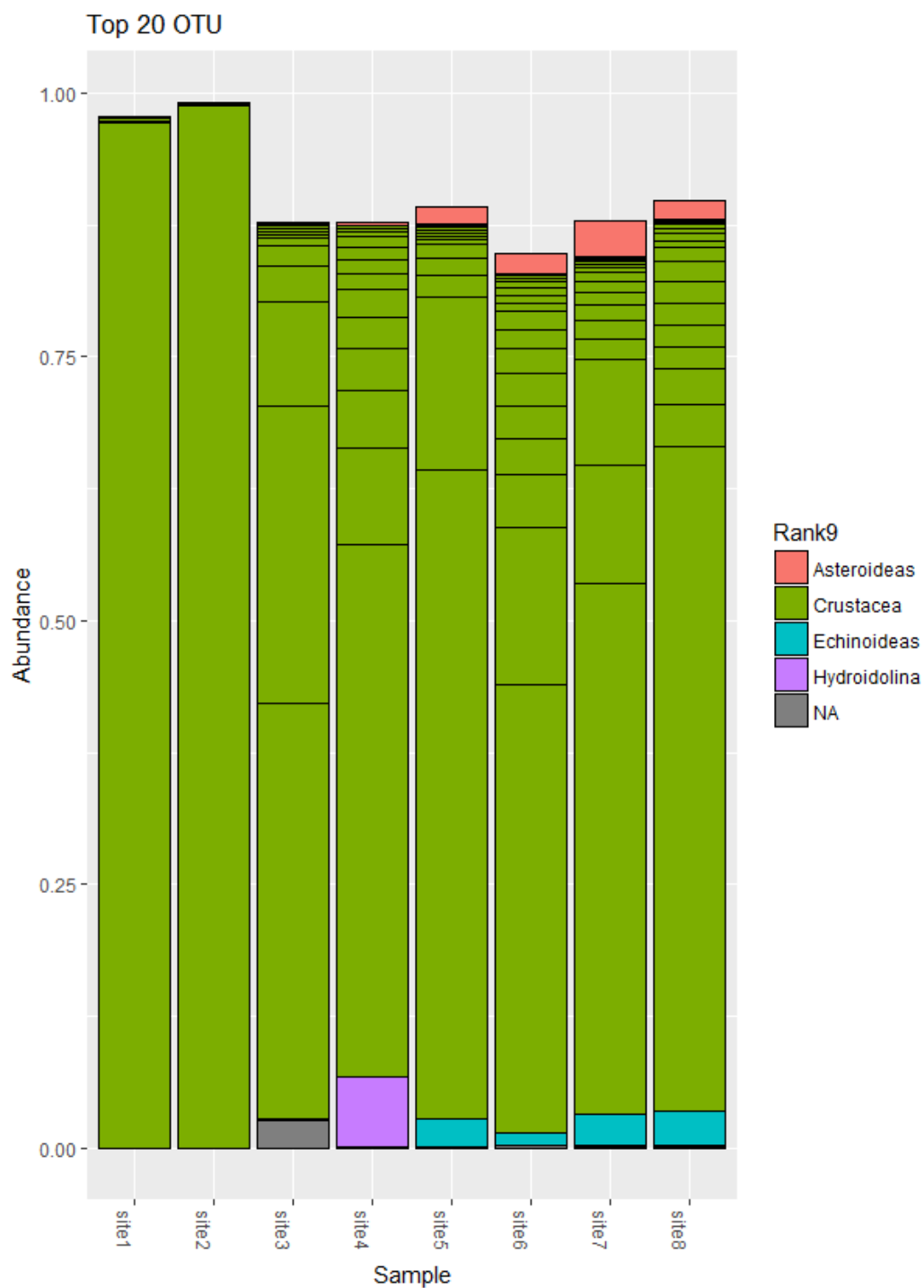
Prøve	Antall "paired reads"	Antall etter sammenslåing	Grupper	Antall sekvenser i hver gruppe	Antall etter filter for forventet avvik på 0,1
P1	1 479 091	1 375 732	COI 18S	474 655	311 378
				777 846	544 819
P2	1 535 995	1 406 732	COI 18S	423 475	270 609
				836 899	580 510
P3	1 562 750	1 335 752	COI 18S	426 226	266 983
				762 008	515 409
P4	1 568 881	1 168 243	COI 18S	428 742	241 822
				536 766	344 869
P5	1 581 369	1 324 260	COI 18S	373 639	232 364
				534 368	372 203
P6	1 506 067	1 254 323	COI 18S	305 367	183 296
				811 545	550 455
P7	1 901 593	1 535 425	COI 18S	509 633	303 807
				844 046	569 005
P8	1 987 569	1 843 459	COI 18S	756 358	495 383
				804 635	557 637

I den videre prosesseringen ble antallet sekvenser ytterligere redusert helt frem til man satt igjen med unike Operational Taxonomic Units (OTUs) for hvert gen som kunne sammenlignes med kjente sekvenser i databaser. Antall sekvenser etter hvert trinn går frem av tabell 12.

Tabell 12 Oppsummering av kvalitetskontroll og prosessering av sekvenser ved bruk av VSEARCH, etter sammenslåing fra alle stasjoner *Abundance information taken into account (Utarbeidet av Morten Mattingsdal).

Step	COI	18S
Total sequences	2 305 642	4 034 907
Unique	657 481	413 523
Unique > 2	121 462	79 638
Not de novo chimera	120 476 (99.2%)*	58 175 (89.5%)*
Not ref chimera	107 088 (88.2%)*	47 073 (95.7%)*
OTU (0.97)	327	229

De aller fleste OTU-ene ble identifisert til å være fra rekken Arthropoda, som er den rekken som kopepoder tilhører. Figur 22 viser de 20 mest tallrike rekker i hver prøve, og i alle er det OTU-er kjent fra Arthropoda som dominerer. Det at det er flere grupper innenfor en og samme rekke av forskjellig størrelse, betyr at det er flere OTU-er innenfor denne rekken som er blant de 20 mest tallrike. Tallrike betyr her hvor mange sekvenser OTU-en består av.



Figur 22 De 20 mest tallrike OTU-ene fra 18S i prøvene, og hvilken rekke de ble identifisert til. Site 1 tilsvarer P1, site 2 tilsvarer P2 osv. (Utarbeidet av Morten Mattingsdal)

Ikke alle OTU ble identifisert til art, noen ble identifisert til slekt, familie eller orden. Tabell 13 viser hvor mange OTU som ble identifisert til de forskjellige taksonomiske nivå. For 18S var det en OTU som ikke ble identifisert i det hele tatt. For COI var det hele 56 OTU-er som ikke ble identifisert.

Tabell 13 Oversikt over antall OTU som ble identifisert til de forskjellige taksonomiske nivå for 18S og COI i prøvene.

	Klasse	Underklasse	Orden	Familie	Slekt	Art
18S	2		46	1	7	172
COI	5	1	62	11	15	176

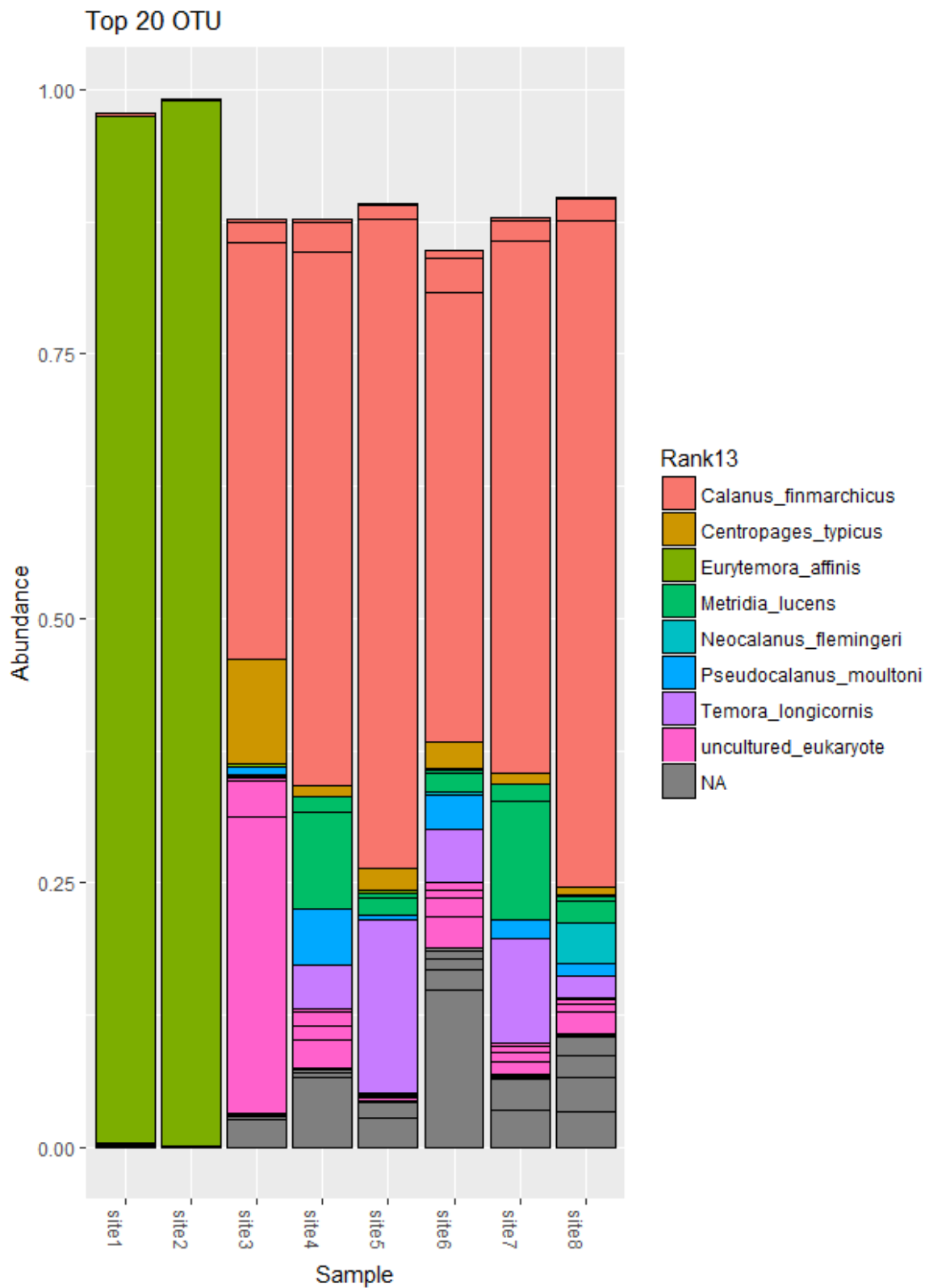
Det var 121 av de 229 OTU-sekvensen for 18S som ble identifisert som kopepoder. For COI var tallet 81 av de 327 OTU-sekvensene. Heller ikke her ble alle identifisert til art, og tabell 14 viser hvor mange OTU som ble identifisert til de forskjellige taksonomiske nivå.

Tabell 14 Oversikt over antall OTU fra kopepoder som ble identifisert til forskjellige taksonomiske nivå for 18S og COI i prøvene.

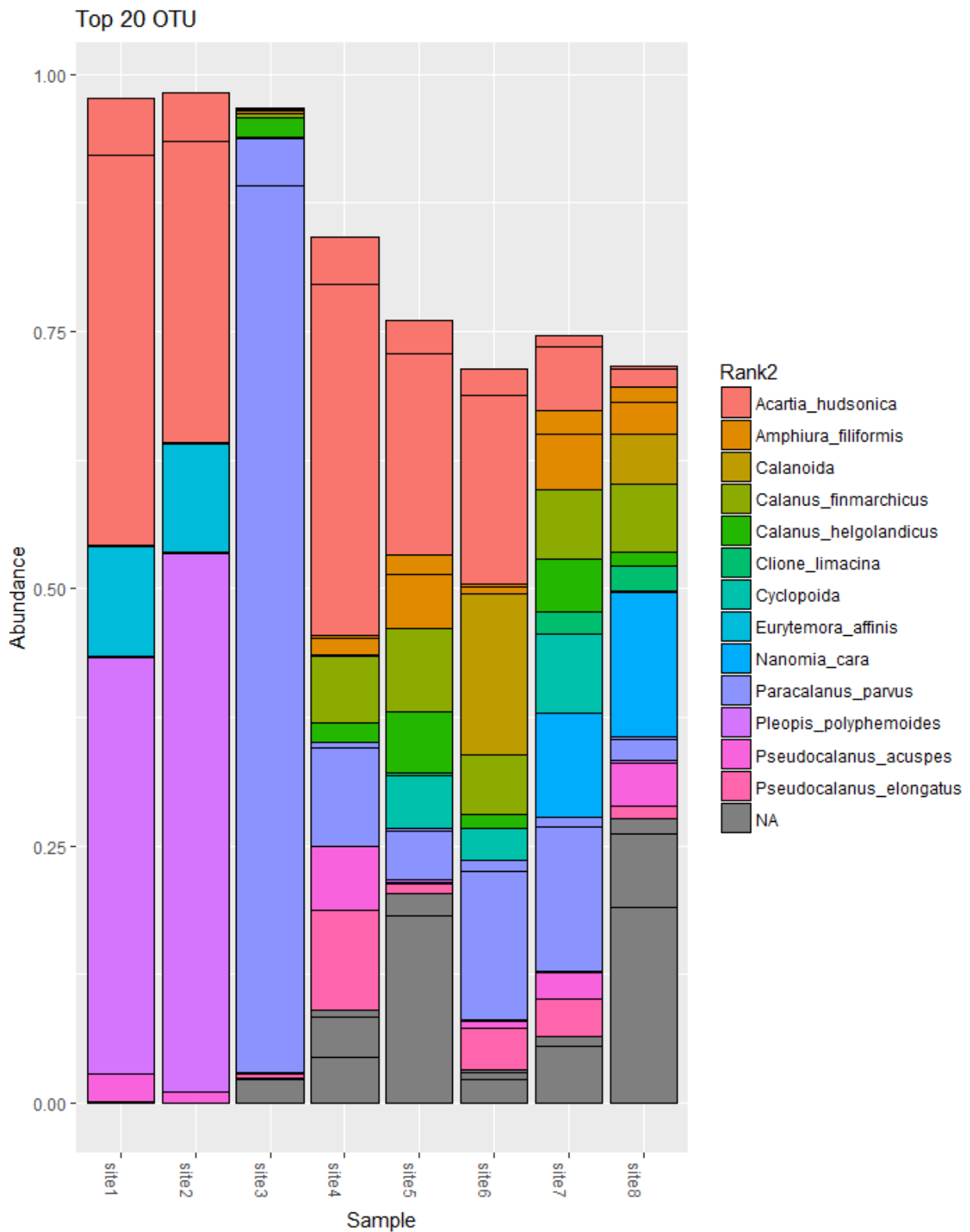
	Orden	Underorden	Familie	Slekt	Art
18S	43	0	0	0	78
COI	26	1	2	4	48

Figur 23 viser de 20 mest tallrike OTU-ene fra 18S på artsnivå. De aller fleste er blitt identifisert som kopepoder, også de som er merket som «uncultured eukaryote». Slik jeg har forstått begrepet, er dette sekvenser som er registrert i referansebiblioteket. Man vet at de er fra et individ under et høyere og kjent taksonomisk nivå. OTU-ene merket som NA er ukjente sekvenser som ikke er blitt karakterisert og registrert i referansebiblioteket enda. Figur 24 viser det samme for OTU-ene fra COI. Den store, ukjente OTU-en i P5 og P8 tilhører en ukarakterisert gastropod som etter et BLAST-søk viste seg å ha 88 % sekvens-likhet med *Bulinus cernicus*.

Lister over OTU-ene som ble identifisert som kopepoder finnes i vedlegg 6 for 18S og vedlegg 7 for COI. En sammenstilling av hvilke taxa som ble identifisert i de forskjellige prøvene finnes i vedlegg 4. Enkelte kopepoder ble identifisert med begge gen. Men det er også en rekke forskjeller. Med COI ble det identifisert flere *Acartia*-arter. Med 18S ble det ikke identifisert *Acartia*. Med 18S ble det identifisert en *Harpacticus*-art, noe som ikke ble identifisert med COI.



Figur 23 De 20 mest tallrike OTU-ene fra 18S som var tilstede i prøvene, og hvilken art de ble identifisert til. Site 1 tilsvarer P1, site 2 tilsvarer P2 osv. (Utarbeidet av Morten Mattingdal)



Figur 24 De 20 mest tallrike OTU-ene fra COI som var tilstede i prøvene, og hvilken art de tilhører. Site 1 tilsvarer P1, site 2 tilsvarer P2 osv. (Utarbeidet av Morten Mattingdal)

Sammenstilling av resultatene er som tidligere nevnt i vedlegg 4. Ved å bruke COI som markør, fikk jeg påvist 28 forskjellige taxa av kopepoder i prøvene. Med 18S fikk jeg påvist 19 forskjellige taxa, mens med morfologisk identifisering ble det påvist 21 forskjellige taxa. 5 taxa ble påvist med alle metoder/markører, mens 37 taxa ble bare påvist med en av metodene/markørene. Totalt ble det påvist 50 forskjellige taxa med metodene/markørene. I tillegg ble det identifisert 8 taxa med 18S/COI hvor sannsynligheten for at dette er signifikante funn er svært liten (SINTAX-verdi < 0,2).

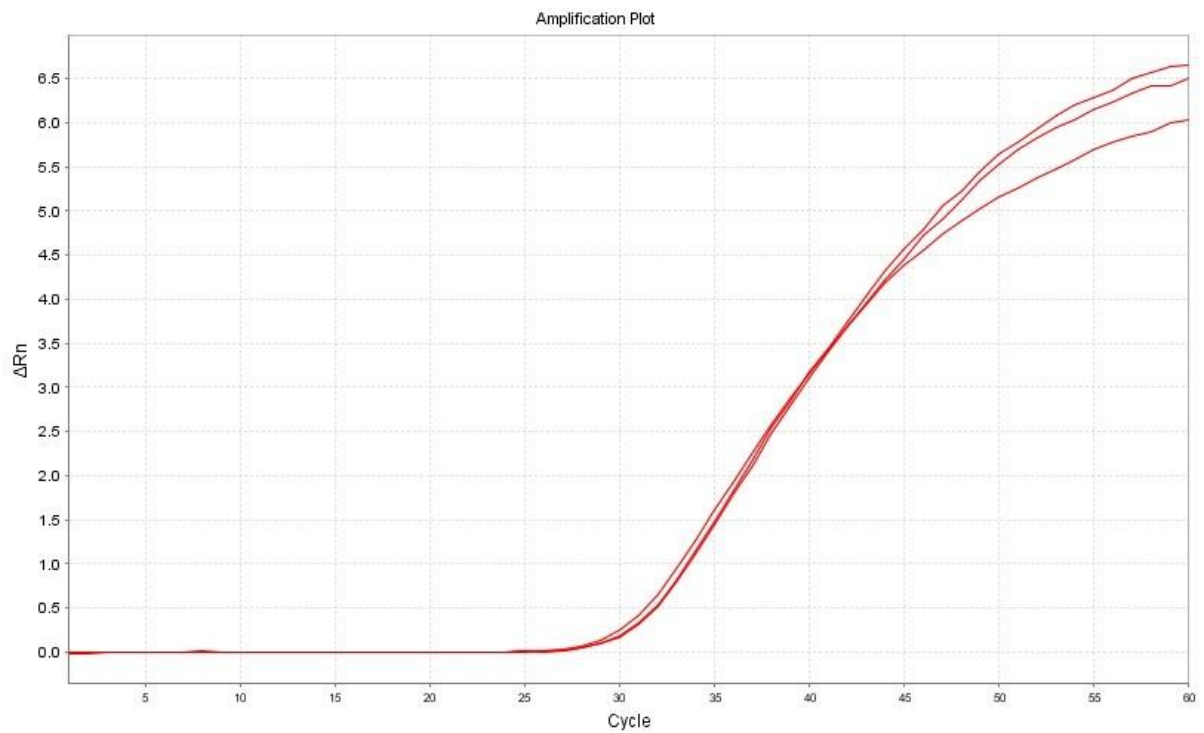
4.4 Artsspesifikk deteksjon av *Acartia tonsa*

Ingen av prøvene med genomisk DNA som ble isolert fra de ulike kopepodene, inkludert *A. tonsa*, var positive. Tabell 15 viser hvilke håvtrekkprøver som var positive, det er de prøvene der det er oppgitt C_T-verdi. Det ble utført qPCR på alle tre paralleller for hver prøve. For prøvene P1, P2 og P3 var alle parallellene positive. Det var også den ene parallellen for P6. Det ble utført ny qPCR på de tre parallellene fra P6 som kontroll, da ble ingen positive.

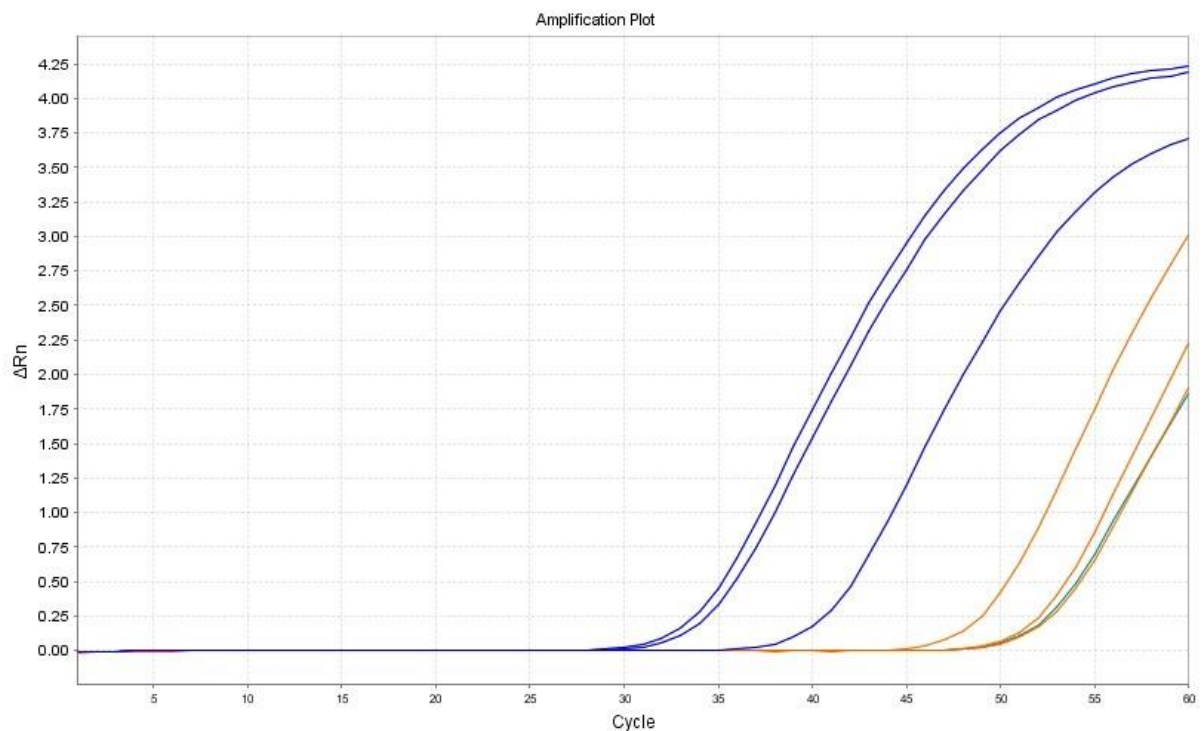
Tabell 15 Resultater fra qPCR av P1-P8. Positive er gitt ved CT-verdi (threshold cycle).

Prøve	Paralleller		
	A	B	C
P1	31,43	31,98	31,91
P2	41,63	35,37	34,72
P3	53,70	52,97	49,89
P4	-	-	-
P5	-	-	-
P6	-	-	53,51
P7	-	-	-
P8	-	-	-

Figur 25 og 26 viser amplifiseringskurvene for de positive prøvene. Kurven begynner å stige ved den syklus som fluorescens ble synlig (C_T-verdien).

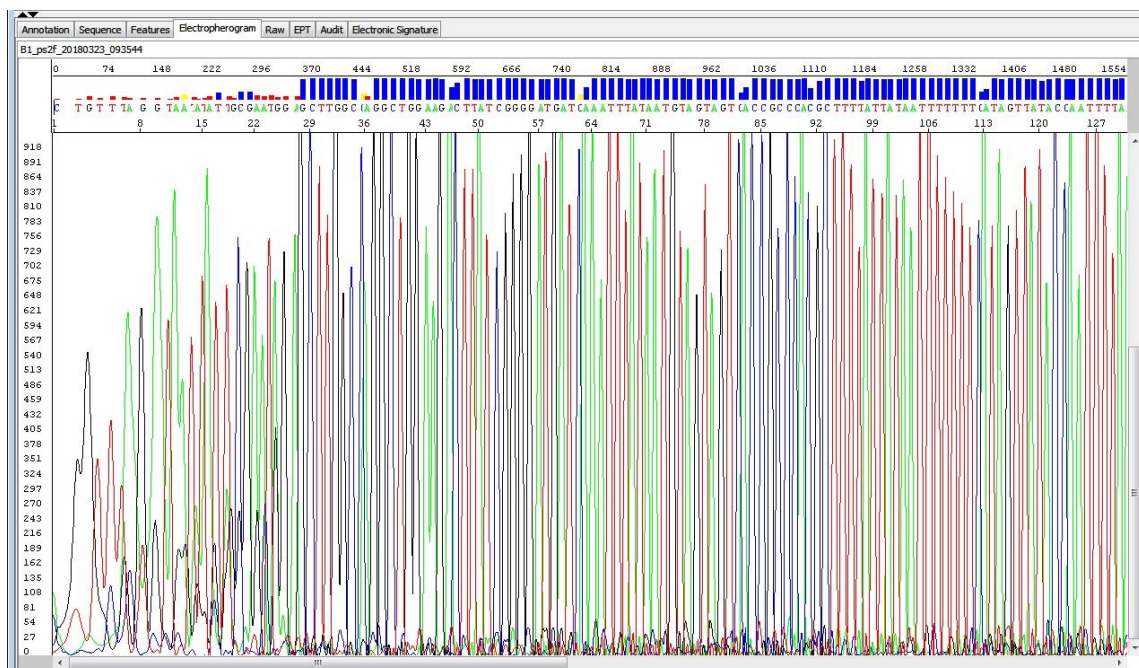


Figur 25 Amplifiseringsplot fra qPCR for tre paralleller fra håvtrekk P1. Kun positive er tatt med.



Figur 26 Amplifiseringsplot fra qPCR for tre paralleller fra håvtrekk P2-P8. Kun positive er tatt med. Blå kurver er paralleller fra P2, oransje kurver er paralleller fra P3 og grønn kurve er parallell fra P6.

Figur 27 viser eksempel på elektroferogram fra sekvensering av produktene fra qPCR. Fargene på grafene representerer avlest fluorescens for de forskjellige basene, og høyden på toppene sier noe om hvor mange sekvenser som hadde denne basen på dette stedet. I begynnelsen av sekvensen sees flere topper med flere forskjellige farger på samme sted. Dette gjør denne sekvensen mer usikker enn de stedene der det er en tydelig topp. Jeg brukte denne informasjonen til å velge sekvens for produktet. Etter en gjennomgang av alle elektroferogram, endte jeg opp med sekvensene i tabell 16.



Figur 27 Eksempel på elektroferogram etter sekvensering fra artsspesifikk deteksjon med qPCR.

Tabell 16 Endelige sekvenser etter gjennomgang av elektroferogram fra Sanger-sekvensering.

Prøve	Sekvens
P1	CCCTCTTTCTACTAGCGATCTAGATAACAGTATAATTAATGCGGGTAATAAC AGTCAAATCTTATGTTATTTATTCGAGGAAAAGCTATATCTGCAGCCCCTA GTATTAAGGTACTAGTCAATTTCCAAATCCTCCAATTAATTAATGGTATAAC TATGAAAAAATTATAATAAAAGCGTGGGCGGTGACTACTACATTATAAATT TGATCATCCCCGATAAGTCTTCCAGCCTGGCCAAGCTCTATTTCGAATAATTAT TCTTAAACCGGTTCCAACCATTCCTGACCACA
P2	CTCTTTCTACTAGCGATCTAGATAACAGTATAATTAATGCGGGTAATAACAG TCAAATCTTATGTTATTTATTCGAGGAAAAGCTATATCTGCAGCCCCTAGTA TTAAAGGTACTAGTCAATTTCCAAATCCTCCAATTAATTAATGGTATAACTATG AAAAAATTATAATAAAAGCGTGGGCGGTGACTACTACATTATAAATTTGAT CATCCCCGATAAGTCTTCCAGCCTGGCCAAGCTCTATTTCGAATAATTATTCT AAACCGGTTCCAACCATTCCTGACCACA
P3	CCTCTTTCTACTAGCGATCTAGATAACAGTATAATTAATGCGGGTAATAACA GTCAAATCTTATGTTATTTATTCGAGGAAAAGCTATATCTGCAGCCCCTAGT ATTAAGGTACTAGTCAATTTCCAAATCCTCCAATTAATTAATGGTATAACTAT GAAAAAATTATAATAAAAGCGTGGGCGGTGACTACTACATTATAAATTTGA TCATCCCCGATAAGTCTTCCAGCCTGGCCAAGCTCTATTTCGAATAATTATTCT TAAACCGGTTCCAACCATTCCTGACCACA

Sekvensene ble søkt opp mot referansebiblioteket GenBank med BLAST. Av 100 sekvenser som hadde likhet, var det likhet med åtte arter for prøvene som var sekvensert med forward primer, og tre arter for prøvene sekvensert med reverse primer. Tabell 17 viser en oversikt over resultatet. Fra hver art er det kun tatt med en sekvens ID fra GenBank, og det er den som hadde

lavest e-verdi. E-verdier som er lavere enn 0,05 er merket med grønt. I prøvene P1 og P2 var det bare likhet med *A.tonsa* som hadde E-verdi < 0,5. I P3 var det likhet med flere arter som hadde E-verdi < 0,5.

Tabell 17 Resultat etter BLAST av sekvenser fra artsspesifikk deteksjon med qPCR. Sekvens ID med lavest e-verdi innen hver art med likhet er tatt med. E-verdi < 0,5 er merket grønt.

Prøve	Sekvens ID	Art	E-value
P1	JF304049	<i>Acartia tonsa</i>	8 e-91
	AY529026	<i>Mesopodopsis slabberi</i>	1 e-148
	KC287251	<i>Acartia hudsonica</i>	3 e-145
P2	KC287288	<i>Acartia tonsa</i>	8 e-141
	AY529026	<i>Mesopodopsis slabberi</i>	2 e-147
	KC287251	<i>Acartia hudsonica</i>	4 e-144
P3	JF304031	<i>Acartia tonsa</i>	8 e-136
	AY529026	<i>Mesopodopsis slabberi</i>	5 e-148
	KC287251	<i>Acartia hudsonica</i>	1 e-144

5 Diskusjon

5.1 Morfologisk identifisering av kopepoder

Det var stor variasjon i hvilke taxa av kopepoder som ble identifisert i de forskjellige håvtrekkprøvene. En studie forklarer dette med at hydrografi og havinnstrømning varierer mellom stasjonene prøvene ble hentet fra (Vistnes, 2014).

Cyclops abyssorum og *Eurytemora affinis* ble bare identifisert i P1 og P2 som var fra Landvikvannet. *C. abyssorum* er en ferskvannsart (Walter & Boxshall, 2018b), og det er naturlig at den kun ble funnet i disse prøvene. *E. affinis* er en brakkvannsart som også trives i ferskvann (Lee, 1999). Det at den ikke ble identifisert i de andre prøvene, trenger ikke bety at den ikke var der. Siden prøvene blir splittet og bare ¼ blir identifisert morfologisk, er det en mulighet for at arter som ikke er tallrike i håvtrekket kan bli utelatt fra den delprøven som gjennomgås.

Håvtrekkprøvene P1 og P2 ble identifisert morfologisk av meg. Jeg hadde ingen tidligere erfaring fra morfologisk bestemmelse av kopepoder. Jeg ble godt kjent med enkelte arter, som *E. affinis* og *C. abyssorum* og mener at jeg har identifisert disse rett. Andre kopepoder var jeg mer usikker på og bestemte dem bare til slekt. *Paracalanus* og *Pseudocalanus* er små og ikke så lett å skille fra hverandre i lupe, så disse ble slått sammen og registrert som ett taxa. Et mer trent øye kunne nok ha identifisert flere arter i disse to prøvene. De andre håvtrekkprøvene var allerede gjennomgått og identifisert av Havforskningsinstituttets personell, og derfor diskuterer jeg ikke funnene her. Men som tidligere nevnt så kan det være vanskelig å skille arter innen en slekt eller familie fra hverandre. Derfor er det flere taxa som ikke bestemmes til art, og det er en forklaring på at antall arter er lavere med morfologisk metode i forhold til resultatet fra metabarcoding. I en studie på kopepoder i Nordsjøen fra 2012 ble det påvist en *Pseudocalanus*-art morfologisk, mens den genetiske metoden kunne påvise to (Laakmann et al., 2013). Større artsrikdom er også funnet i andre studier ved å bruke molekylærgenetiske metoder (Lindeque, Parry, Harmer, Somerfield & Atkinson, 2013).

5.2 DNA-isolering

Da jeg skulle isolere DNA fra håvtrekkene, måtte hver prøve fordeles på flere rør før homogenisering og lysing på grunn av maskinens kapasitet. Dette er en mulig feilkilde, da

sjansen for å ikke få med alle individene er til stede. Det ble også mer tidkrevende enn om man hadde hatt utstyr til å ta hele håvtrekkprøven på en gang.

Etter lysering, ble alle rørene fra en håvtrekkprøvene slått sammen igjen til ett rør og det ble blandet godt. Til DNA-isolering ble det tatt ut tre paralleller fra dette røret. Målingen av konsentrasjon og renhet på DNA etter isolering viser at konsentrasjonen og renheten varierte i de tre parallellene. Man regner et forhold på 1,8-2,0 mellom A260/280, og et forhold på 2,0-2,2 mellom A260/230 for rent DNA. Håvtrekkprøvene P1-P8 hadde målinger litt over dette. Dette kan ifølge leverandør av NanoDrop skyldes basesammensetningen i DNA-et, da de forskjellige basene varierer mye i forholdet mellom bølgelengdene. RNA i prøvene vil også gi høyere verdi av A260/280-forholdet.

Renheten som ble målt for DNA-et fra individene til kontroll hadde litt for lave verdier på A260/230. Det kan ifølge produsenten skyldes at prøvene inneholdt kontaminering av stoffer som absorberer på bølgelengde rundt 230. Dette kan være EDTA, karbohydrater eller phenol. Jeg undersøkte ikke årsaken nærmere da dette var kontrollprøver og ikke håvtrekkprøvene som var målet med oppgaven.

5.3 Identifisering med metabarcoding

Jeg valgte 18S og COI som målgen for metabarcoding. Jeg kunne også brukt andre målgen, som 16S, men i en studie viste 18S og COI seg som de markørene som gav best taksonomisk dekning for dyreplankton (Clarke, Beard, Swadling & Deagle, 2017). I denne studien sammenlignet de også identifisering ved metabarcoding med morfologisk identifisering over tid. Resultatet var større artsrikdom med metabarcoding enn med morfologisk identifisering.

Da jeg testet primerne på individene jeg hadde til kontroll i forkant, ble det klart at jeg ikke fikk oppformert COI hos Harpacticoida. Jeg valgte likevel å fortsette med primersettet for COI, da jeg fikk produkt hos alle de andre individene, og fordi jeg fikk oppformert 18S hos Harpacticoida.

Ved gel-kjøring av PCR-produkt fra håvtrekkprøvene (P1-P8) avslørte det seg et bånd på rundt 700 bp. Dette er antageligvis en sekundærstruktur av PCR-produktet, da det dukket opp igjen ved gel-elektroforese av rensset produkt fra båndet på rundt 500 bp. Men dette ble ikke undersøkt nærmere. Båndene på rundt 100 bp er rester av primere og primerdimere.

Måling av konsentrasjon og renhet på ferdig rensset produkt fra håvtrekkprøvene, viste lave verdier for A260/230. Dette ble sjekket opp med produsenten, som forklarte at årsaken nok

var overskudd av guanidin fra løsningsbufferen. Dette står også i manualen til kitet jeg brukte. Oslo Sequencing Centre mente at dette ikke ville påvirke sekvenseringen av produktet, derfor gjorde jeg ikke noe mer med det.

Det finnes en rekke forskjellige «pipelines» til å behandle sekvenseringsdata etter Illumina MiSeq med. I denne oppgaven ble analysen utført av Morten Mattingsdal ved å bruke VSEARCH, som er utviklet for å være et åpent tilgjengelig alternativ til det mye brukte USEARCH, og som er på høyde med eller mer presis i prosesseringstrinnene i forhold til USEARCH (Rognes et al., 2016).

Figurene og tabellene i resultatene for prosesseringstrinnene viser at for hvert trinn ble det filtrert bort en rekke sekvenser. Det er en avveining for hvert trinn når kriteriene settes. Man vil ikke fjerne for mye, men man vil heller ikke ha med seg feilsekvenser som chimera og adaptore fra Illumina. Forskjellige «pipelines» filtrerer forskjellige (Mysara et al., 2017), men jeg vil ikke diskutere valg av VSEARCH fremfor andre her, da dette er utenfor det jeg skulle gjøre i oppgaven.

For å se på sekvenslikhet mellom OTU-ene og referansebiblioteket, ble det i denne oppgaven brukt SINTAX-algoritmen. Sekvenser med SINTAX-verdier fra 0,2 og opp er regnet som signifikante (pers.utt. Morten Mattingsdal), altså at det er sannsynlig at det ikke er en tilfeldighet at referansesekvensen og OTU er like. Men man kan ikke uten videre gå ut fra at det er riktig. En studie der SINTAX ble brukt for å sammenligne 16S-OTUer opp mot referansebiblioteket SILVA, viste at for velkjente taxa med mange sekvenser i databasen, kunne likheten mellom referanseart og OTU brukes til å si hvilken art det var. Men dersom likheten var mindre enn 97%, var det stor sjanse for at likheten ikke stemte overens med art (R. C. Edgar, 2018). I denne oppgaven ble 97% likhet satt som minimum.

Det er også funnet at sekvenser fra ukjente arter får likhet med feil art i referansebibliotek (R. Edgar, 2016). Selv om jeg ikke har brukt sekvenser fra 16S, er dette noe å tenke på når en analyserer resultatene. I mine prøver var det kopepoder som ble bestemt til art, men der alle OTU hadde verdi under 0,2 for følgende:

- 18S: *Calocalanus plumulosus*, *Candacia pachydactyla*, *Canthocalanus pauper*, *Neocalanus cristatus*, *Neocalanus flemingeri*, *Rhincalanus nasutus*
- COI: *Calocalanus styliremis*

Det kan bety at denne likheten kan være feil, og jeg regner dem derfor som usikre.

Metabarcodingen viste sekvenslikhet med *Eurytemora affinis* i P4-P8, men den ble ikke identifisert morfologisk i disse prøvene. Den er i familie med *Temora*, har omtrent samme

størrelse og mange av de samme kjennetegn. Det er mulig å forveksle dem med hverandre. I prøvene P4-P8 ble det ved morfologisk bestemmelse funnet flere individer som ble identifisert til å være *Temora sp.* Det er mulig at man kan ha identifisert individer av *E.affinis* som *Temora sp.*

Interessante funn etter metabarcodingen er treff på *A.hudsonica* og *C. euxinus* med COI-OTU, og med *E. concinna* med 18S-OTU. Dette er ikke kopepoder man regner med å finne her i Skagerrak (Razouls et al., 2005-2018). Når en ser nærmere på resultatene i tabellen i vedlegget, ser man at for de to første så er SINTAX-verdien høy, og OTU-ene inneholder mange sekvenser. For den siste er SINTAX-verdien 0,41, med flere sekvenser i OTU, spesielt i en av prøvene. Siden OTU-sekvensene som sagt er over 97% lik med de nevnte arter, at man finner mange av disse sekvensene og SINTAX verdien er høy/akseptable, indikerer dette sterkt at disse ukjente artene befinner seg på alle stasjonene P4 – P8.

Referansebibliotekene man søker opp OTU-ene opp mot, kan inneholde feil. Dersom et individ ble feilidentifisert morfologisk før barcoding, kan en sekvens stå oppført på feil art (Collins & H Cruickshank, 2012). Og det er mange arter hvor gensekvenser ikke er oppført enda. Det var en 18S-OTU som ikke fikk treff i referansebiblioteket. For COI var tallet 56. Dette betyr nok ikke at det er påvist nye arter, men at disse sekvensene mangler i referansebiblioteket. Derfor er det viktig med omfattende taksonomiske analyser, og ikke bare støtte seg til metabarcoding (Hajibabaei, Singer, Hebert & Hickey, 2007). Dette for å kunne legge sekvenser fra morfologisk identifiserte individer til i referansebiblioteker. I en studie fra Bilbao, så man på om metabarcoding kunne brukes til planktonovervåking av elvemunningen. Etter at de la til DNA-sekvenser for lokale arter inn i referansebiblioteket, fikk man bedre resultater etter analysen av sekvenseringsdataene (Abad et al., 2016).

Årsaken til at noen OTU fikk treff kun med 18S, og andre kun med COI, kan også være mangler i referansebiblioteket. Etter et søk i GenBank ble det klart at dette var tilfellet for flere arter. Det manglet gensekvens for 18S på artene *Acartia hudsonica*, *Calanus euxinus*, *Ditrichocorycaeus anglicus*, *Microcalanus pusillus*, *Pseudocalanus mimus*, *Pseudocalanus newmani* og *Scolithricella minor*. For COI manglet det sekvenser for artene *Candacia armata* og *Microcalanus pusillus*. Genet 18S har ikke like stor diversitet mellom arter som COI, så det kan være en del av forklaringen. Ellers kan det også være at primerne jeg brukte, ikke var kompatible til gensekvensene for alle arter.

Det er flere studier som sammenligner morfologisk metode med metabarcoding, og hvor man konkluderer med at ingen av metodene klarer å oppdage alle artene i en prøve. Et eksempel er

en studie der man analyserte hvordan mangfold av mikroalger på en biofilm endret seg etter beiting (Groendahl, Kahlert & Fink, 2017). Metabarcoding ble utført med 454 (Roche) pyrosekvensering av 18S, altså en annen metode enn det jeg brukte, og de analyserte sekvenseringsdataene med noen andre kommandoer enn meg. Men i likhet med dette studiet, så var det forskjeller i hvilke taxa som ble oppdaget med de to metodene.

I en studie der man sammenlignet de to metodene, ble det påvist flere arter av kopepoder ved metabarcoding av 18S enn med morfologisk identifisering (Lindeque et al., 2013).

En studie der 800 nye COI-sekvenser fra 63 kopepoder ble sammenlignet med et referansebibliotek med 1381 sekvenser fra 195 arter, konkluderte med at den mest begrensende faktor for å kunne bestemme kopepodearter ut fra COI-sekvenser, er at man til nå ikke har et komplett referansebibliotek. Dermed blir det også vanskelig å identifisere sjeldne eller geografisk avgrensede arter (Blanco-Bercial, Cornils, Copley & Bucklin, 2014).

I studien fra Bilbao, der de så på om metabarcoding kunne egne seg som metode for planktonovervåking av elvemunningen, sammenlignet de metabarcoding med morfologisk bestemmelse via mikroskop (Abad et al., 2016). Det ble avslørt to fremmede arter med lavt mangfold ved metabarcoding, men ikke ved mikroskopering.

I denne oppgaven ble det også påvist flere arter med metabarcoding som ikke ble påvist morfologisk.

5.4 Artsspesifikk deteksjon av *A. tonsa*

Som positiv kontroll i qPCR brukte jeg DNA fra individer identifisert som *A. tonsa* av en spesialist. Resultatet var negativt. Da jeg fikk positive resultater i noen av håvtrekkprøvene valgte jeg likevel å fortsette til sekvensering for å undersøke hva dette var. BLAST av sekvensene gav lav e-verdi på *A. tonsa*. Man regner en E-verdi på mindre enn 0,1 eller 0,05 til å representere biologisk signifikans, og brukes derfor også som et mål på statistisk signifikans. (Pertsemlidis & Fondon, 2001). E-verdiene lå langt under dette, derfor regner jeg det som sannsynlig at det var *A. tonsa* i prøvene som var positive etter qPCR. I P3 var verdien lav også for *Mesopodopsis slabberi*, men ikke så lav som for *A. tonsa*.

Årsakene til at resultatet etter qPCR av kontrollen med *A. tonsa* var negativ, tolker jeg ikke til å være feil primersett og probe, i og med at sekvenseringsresultatene viste at det var *A. tonsa* i noen av håvtrekkprøvene. En annen årsak kan være at individene var feilidentifisert. For å sjekke dette kunne jeg ha sekvensert PCR-produktet fra *A. tonsa* og sammenlignet med

referansebibliotek. Dette fikk jeg ikke gjort, og kan være en oppgave å se nærmere på ved en annen anledning. Jeg regner det som lite sannsynlig at det var tilstedeværelse av PCR-hemmere som var årsaken da ingen av de andre prøvene jeg har isolert og analysert har vist tegn til PCR-hemming.

P1- og P2-parallellene ble sikre positive. P3-parallellene hadde høy C_T -verdi, og det er vanligvis et tegn på at resultatene er usikre. Man forventer ofte en C_T -verdi på rundt 35-40. Men årsaken til høy C_T -verdi kan også forklares med at det er svært lite templat fra *A. tonsa* i prøvene (Bustin, 2005). Når man sammenligner dette med resultatene fra metabarcodingen (se tabell i vedlegg x) ser man at var få sekvenser i OTU med treff på *A. tonsa* i P3. Den ene parallellen fra P6 fikk positivt resultat for en av parallellene på første qPCR, men med høy C_T -verdi. Da det ikke på positivt resultat på noen av parallellene ved ny qPCR av P6, har jeg tolket det første positive resultatet til å være en feil.

Ved qPCR har jeg fått sikker påvisning av *A. tonsa* i P1, P2 og P3. P6 er usikker ved kun å se på qPCR-resultatet. Med metabarcoding ble *A. tonsa* identifisert i alle lokalitetene unntatt P4, og denne metoden kan altså være enda mer følsom enn qPCR. Men det var et lavt antall sekvenser i OTU-et i P3 og P5-8. Det at det ved metabarcoding ble påvist *A. tonsa* i P6 kan jo være en indikasjon på at qPCR fra P6 faktisk var positiv. Men som nevnt, det var et lavt antall sekvenser som ble funnet, og det bør undersøkes videre over tid hvorvidt dette var sannsynlig. qPCR er langt rimeligere og raskere enn metabarcoding og er nyttig dersom mange prøver skal analyseres som rutine over lang tid. *A. tonsa* er eksempel på en art som ikke ble påvist morfologisk i det hele tatt, men som kan overvåkes med qPCR.

qPCR kan brukes til å bestemme mengde DNA-templat i prøven. Da jeg fikk forskjellig C_T -verdi for de tre prøvene, var det ikke mulig å bestemme mengde. Dette var heller ikke ment som en kvantitativ analyse.

Den samme diskusjonen om referansebibliotek som jeg hadde for metabarcoding i forrige delkapittel, er like aktuell for artsspesifikk deteksjon med qPCR.

5.5 Forslag til videre undersøkelser

Det kan arbeides videre med å finne universalprimere til metabarcoding som passer til alle kopepoder. Man kan også kombinere flere universalprimere for å avdekke flest mulig kopepoder.

Man kan også arbeide videre for enda bedre sensitivitet på qPCR for *A.tonsa*. Man kan kjøre dobbel PCR, først vanlig PCR med universalprimer for å øke mengden templat, så artsspesifikk qPCR etter denne metoden.

Det trengs flere sekvenser fra sikre individer i referansebibliotekene. For å få til dette, må man analysere DNA-sekvensen for genmarkører fra individer som er morfologisk identifisert.

Dette skjer allerede, men innsatsen kan økes for å få dette til.

6 Konklusjon

Det ble identifisert 50 taxa av kopepoder til sammen ved morfologisk identifisering og identifisering med metabarcoding. Ingen av metodene klarte å identifisere alle taxa. Dette viser at for å få en god oversikt over hvilke kopepoder som er langs Skagerrakkysten, vil en kombinasjon av metodene være det beste.

Resultatene fra metabarcoding viste funn av tre arter som man ikke regnet med å finne her (*A.hudsonica*, *C.euxinus* og *E.concinna*).

Med artsspesifikk deteksjon med qPCR, ble det positivt resultat i tre av prøvene, og resultatet fra sekvenseringen viser at dette med stor sannsynlighet var *A.tonsa*.

Ved å bruke COI som markør, fikk jeg påvist 28 forskjellige taxa av kopepoder i prøvene. Med 18S fikk jeg påvist 19 forskjellige taxa, mens med morfologisk identifisering ble det påvist 21 forskjellige taxa.

Referanser/litteraturliste

- Abad, D., Albaina, A., Aguirre, M., Laza-Martínez, A., Uriarte, I., Iriarte, A., . . . Estonba, A. (2016). Is metabarcoding suitable for estuarine plankton monitoring? A comparative study with microscopy. *Marine Biology*, 163(7), 149. doi: 10.1007/s00227-016-2920-0
- Albaina, A., Uriarte, I., Aguirre, M., Abad, D., Iriarte, A., Villate, F. & Estonba, A. (2016). Insights on the origin of invasive copepods colonizing Basque estuaries; a DNA barcoding approach. *Marine Biodiversity Records*, 9(1), 51. doi: 10.1186/s41200-016-0045-2
- Bakketeig, I. E., Hauge, M. & Kvamme, C. ((red) 2017). Havforskningsrapporten 2017, Fisken og havet, særnummer 1-2017.
- Beaugrand, G., Ibañez, F., Lindley, J. A. & Reid, P. C. (2002). Diversity of calanoid copepods in the North Atlantic and adjacent seas: species associations and biogeography. *Marine Ecology Progress Series*, 232, 179-195.
- Blanco-Bercial, L., Cornils, A., Copley, N. & Bucklin, A. (2014). DNA Barcoding of Marine Copepods: Assessment of Analytical Approaches to Species Identification. *PLoS Currents*, 6, ecurrents.tol.cdf8b74881f74887e74883b74801d74856b43791626d43791622. doi: 10.1371/currents.tol.cdf8b74881f87e3b01d56b43791626d2
- Bron, J. E., Frisch, D., Goetze, E., Johnson, S. C., Lee, C. E. & Wyngaard, G. A. (2011). Observing copepods through a genomic lens. *Frontiers in Zoology*, 8, 22-22. doi: 10.1186/1742-9994-8-22
- Brylinski, J. M. (1981). Report on the presence of *Acartia tonsa* Dana (Copepoda) in the harbour of Dunkirk (France) and its geographical distribution in Europe. *Journal of Plankton Research*, 3(2), 255-260. doi: 10.1093/plankt/3.2.255
- Bucklin, A., Lindeque, P. K., Rodriguez-Ezpeleta, N., Albaina, A. & Lehtiniemi, M. (2016). Metabarcoding of marine zooplankton: prospects, progress and pitfalls. *Journal of Plankton Research*, 38(3), 393-400. doi: 10.1093/plankt/fbw023
- Burton, R. S. (2009). Molecular Markers, Natural History, and Conservation of Marine Animals. *BioScience*, 59(10), 831-840. doi: 10.1525/bio.2009.59.10.5
- Bustin, S. A. (2005). Real-Time PCR. *Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics*. doi: 10.1081/E-EDGP 120020684
- By Estevezj [CC BY-SA 3.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0>)], f. W. C. Sanger sequencing. Hentet 15.05.18 fra <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/b2/Sanger-sequencing.svg>
- Clarke, L. J., Beard, J. M., Swadling, K. M. & Deagle, B. E. (2017). Effect of marker choice and thermal cycling protocol on zooplankton DNA metabarcoding studies. *Ecology and Evolution*, 7(3), 873-883. doi: 10.1002/ece3.2667
- Collins, R. A. & H Cruickshank, R. (2012). *The seven deadly sins of DNA barcoding* (Vol. 13).
- Conway, D. (2012a). Conway, D.V.P. (2012). *Marine zooplankton of southern Britain. Part 2: Arachnida, Pycnogonida, Cladocera, Facetotecta, Cirripedia and Copepoda* (ed. A.W.G. John). *Occasional Publications. Marine Biological Association of the United Kingdom, No 26 Plymouth, United Kingdom 163 pp.*
- Conway, D. (2012b). *Identification of the copepodite developmental stages of twenty-six North Atlantic copepods. Occasional Publications. Marine Biological Association of the United Kingdom, No. 21 (revised edition), Plymouth, United Kingdom, 35 pp.*

- Defriez, E. J., Sheppard, L. W., Reid, P. C. & Reuman, D. C. (2016). Climate change-related regime shifts have altered spatial synchrony of plankton dynamics in the North Sea. *Global Change Biology*, 22(6), 2069-2080. doi: 10.1111/gcb.13229
- Dolgova, A. S. & Stukolova, O. A. (2017). High-fidelity PCR enzyme with DNA-binding domain facilitates de novo gene synthesis. *3 Biotech*, 7(2), 128. doi: 10.1007/s13205-017-0745-2
- Edgar, R. (2016). SINTAX: a simple non-Bayesian taxonomy classifier for 16S and ITS sequences. *bioRxiv*. doi: 10.1101/074161
- Edgar, R. C. (2018). Accuracy of taxonomy prediction for 16S rRNA and fungal ITS sequences. *PeerJ*, 6, e4652. doi: 10.7717/peerj.4652
- Eggers, F., Slotte, A., Olsen, E. M. & Johannessen, A. (2013). Metapopulation dynamics in Atlantic herring (*Clupea harengus* L.) along the coast of southern Norway and in the local area of Landvikvannet.
- Eurofins. *Next generation sequencing*. Hentet 15.05.18 fra <https://www.eurofinsgenomics.eu/media/112021/faq9.1.gif>
- Frangoulis, C., Christou, E. D. & Hecq, J. H. (2004). Comparison of Marine Copepod Outfluxes: Nature, Rate, Fate and Role in the Carbon and Nitrogen Cycles *Advances in Marine Biology* (Vol. 47, s. 253-309): Academic Press.
- Freeland, J. R., Kirk, H. & Petersen, S. (2016a). DNA sequencing. I J. Freeland (Red.), *Molecular Ecology, Second Edition* (s. 24-27): John Wiley & Sons, Ltd.
- Freeland, J. R., Kirk, H. & Petersen, S. (2016b). Getting data from PCR. I J. Freeland (Red.), *Molecular Ecology, Second Edition* (s. 23-29): John Wiley & Sons, Ltd.
- Gallienne, C. P. & Robins, D. B. (2001). Is Oithona the most important copepod in the world's oceans? *Journal of Plankton Research*, 23(12), 1421-1432. doi: 10.1093/plankt/23.12.1421
- Groendahl, S., Kahlert, M. & Fink, P. (2017). The best of both worlds: A combined approach for analyzing microalgal diversity via metabarcoding and morphology-based methods. *PLOS ONE*, 12(2), e0172808. doi: 10.1371/journal.pone.0172808
- Haanel, Q., Holovachov, O., Jondelius, U., Sundberg, P. & Bourlat, S. J. (2017). NGS-based biodiversity and community structure analysis of meiofaunal eukaryotes in shell sand from Hällö island, Smögen, and soft mud from Gullmarn Fjord, Sweden. *Biodiversity Data Journal*(5), e12731. doi: 10.3897/BDJ.5.e12731
- Hajibabaei, M., Singer, G. A. C., Hebert, P. D. N. & Hickey, D. A. (2007). DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends in Genetics*, 23(4), 167-172. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tig.2007.02.001>
- Haraldstad, T., Hindar, A., Hobæk, A., Håvardstun, J. & Skjelbred, B. (2013). Resipientundersøkelse av Reddalsvann, Grimstad: NIVA.
- Harvey, J. B. J., Johnson, S. B., Fisher, J. L., Peterson, W. T. & Vrijenhoek, R. C. (2017). Comparison of morphological and next generation DNA sequencing methods for assessing zooplankton assemblages. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 487(Supplement C), 113-126. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2016.12.002>
- Hassel, A., Endresen, B., Martinussen, M., Knutsen, T. & Johannessen, M. E. (2013). HÅNDBOK FOR PRØVETAKING OG PRE-ANALYSE AV PLANKTON.
- Humes, A. G. (1994). How many copepods? *Hydrobiologia*, 292(1), 1-7. doi: 10.1007/bf00229916
- IMO. (2004). International Convention for the Control and Management of Ships' Ballast Water and Sediments.
- Kartverket (Karttegner). Landvikvannet. Hentet fra <http://www.norgeskart.no/#!?project=seeiendom&layers=1004,1015&zoom=11&lat=6482179.04&lon=124763.37&sok=landvikvannet>

- Khodami, S., McArthur, J. V., Blanco-Bercial, L. & Martínez Arbizu, P. (2017). Molecular Phylogeny and Revision of Copepod Orders (Crustacea: Copepoda). *Scientific Reports*, 7(1), 9164. doi: 10.1038/s41598-017-06656-4
- Kircher, M. & Kelso, J. (2010). High-throughput DNA sequencing – concepts and limitations. *BioEssays*, 32(6), 524-536. doi: 10.1002/bies.200900181
- Laakmann, S., Gerdts, G., Erler, R., Knebelsberger, T., Martínez Arbizu, P. & Raupach, M. J. (2013). Comparison of molecular species identification for North Sea calanoid copepods (Crustacea) using proteome fingerprints and DNA sequences. *Molecular Ecology Resources*, 13(5), 862-876. doi: 10.1111/1755-0998.12139
- Lee, C. E. (1999). Rapid and Repeated Invasions of Fresh Water by the Copepod *Eurytemora affinis*. *Evolution*, 53(5), 1423-1434. doi: 10.2307/2640889
- Leray, M. & Knowlton, N. (2016). Visualizing Patterns of Marine Eukaryotic Diversity from Metabarcoding Data Using QIIME. I S. J. Bourlat (Red.), *Marine genomics: Methods and Protocols* (Vol. 1452, s. 219-235). New York: Springer Science + Business Media.
- Lindeque, P. K., Parry, H. E., Harmer, R. A., Somerfield, P. J. & Atkinson, A. (2013). Next Generation Sequencing Reveals the Hidden Diversity of Zooplankton Assemblages. *PLoS ONE*, 8(11), e81327. doi: 10.1371/journal.pone.0081327
- McBeath, A. J. A., Penston, M. J., Snow, M., Cook, P. F., Bricknell, I. R. & Cunningham, C. O. (2006). Development and application of real-time PCR for specific detection of *Lepeophtheirus salmonis* and *Caligus elongatus* larvae in Scottish plankton samples. *Diseases of Aquatic Organisms*, 73(2), 141-150.
- Mysara, M., Njima, M., Leys, N., Raes, J. & Monsieus, P. (2017). From reads to operational taxonomic units: an ensemble processing pipeline for MiSeq amplicon sequencing data. *GigaScience*, 6(2), 1-10. doi: 10.1093/gigascience/giw017
- Nextgen. *Custom Primer*. Hentet 15.05.18 fra <http://nextgen.mgh.harvard.edu/CustomPrimer.html>
- Nicolas, D., Rochette, S., Llope, M. & Licandro, P. (2014). Spatio-Temporal Variability of the North Sea Cod Recruitment in Relation to Temperature and Zooplankton. *PLOS ONE*, 9(2), e88447. doi: 10.1371/journal.pone.0088447
- Olsen, E. M., Ottersen, G., Llope, M., Chan, K.-S., Beaugrand, G. & Stenseth, N. C. (2010). Spawning stock and recruitment in North Sea cod shaped by food and climate. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. doi: 10.1098/rspb.2010.1465
- Ottersen, G., Postmyr, E. & Irgens, M. ((red.) 2010). Faglig grunnlag for en forvaltningsplan for Nordsjøen og Skagerrak: Arealrapport. *Fisken og havet*(6/2010), 190.
- Pertsemlidis, A. & Fondon, J. W. (2001). Having a BLAST with bioinformatics (and avoiding BLASTphemy). *Genome Biology*, 2(10), reviews2002.2001-reviews2002.2010.
- Qiagen. *DNeasy Blood & Tissue Handbook*. Hentet 15.05.18 fra file:///C:/Users/eier/Downloads/EN-DNeasy-Blood--Tissue-Handbook%20(3).pdf
- Razouls, C., Bovée, F. d., Kouwenberg, J. & Desreumaux, N. (2005-2018). Diversity and Geographic Distribution of Marine Planktonic Copepods. [webpage]. Hentet 08.05. fra <http://copepodes.obs-banyuls.fr/en>
- Reid, P. C., Edwards, M., Beaugrand, G., Skogen, M. & Stevens, D. (2003). Periodic changes in the zooplankton of the North Sea during the twentieth century linked to oceanic inflow. *Fisheries Oceanography*, 12(4-5), 260-269. doi: 10.1046/j.1365-2419.2003.00252.x
- Richardson, A. J. (2008). In hot water: zooplankton and climate change. *ICES Journal of Marine Science*, 65(3), 279-295. doi: 10.1093/icesjms/fsn028
- Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C. & Mahé, F. (2016). VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, 4, e2584. doi: 10.7717/peerj.2584

- Sars, G. O. (1895-1928). An account of the Crustacea of Norway, with short descriptions and figures of all the species (Crustacea of Norway). doi: <https://doi.org/10.5962/bhl.title.1164>
- ThermoFisher. Hentet 15.05.18 fra <https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-cycling-considerations.html>
- ThermoFisher. *How TaqMan assays work*. Hentet 15.05.18 fra <http://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/how-taqman-assays-work.html>
- Vistnes, E. (2014). *Geografisk og sesongmessig variasjon av dyreplanktonsamfunn i fjorder langs Skagerrak*. Bacheloroppgave. Universitetet i Agder.
- Walker, N. J. (2002). A Technique Whose Time Has Come. *Science*, 296(5567), 557-559. doi: 10.1126/science.296.5567.557
- Walter, T. C. & Boxshall, G. (2018a). World of Copepods database. Hentet 15.05.18 fra <http://www.marinespecies.org/copepoda/>
- Walter, T. C. & Boxshall, G. (2018b). World of Copepods database. Cyclops abyssorum abyssorum Sars G.O. Hentet 14.05.18 fra <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=723070>
- Ware, C., Berge, J., Jelmert, A., Olsen, S. M., Pellissier, L., Wisz, M., . . . Bennett, J. (2016). Biological introduction risks from shipping in a warming Arctic. *Journal of Applied Ecology*, 53(2), 340-349. doi: doi:10.1111/1365-2664.12566
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S. & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13(1), 134. doi: 10.1186/1471-2105-13-134

Oversikt over tabeller og figurer

Tabell 1 Oversikt over de mest brukte sekvenser/barcodes på dyreplankton i metabarcoding	15
Tabell 2 Oversikt over prøvene, hvor, fra hvilket dyp, og hvilken dato de ble samlet inn	22
Tabell 3 Primer sekvensene som ble brukt til PCR på kontroller. Sekvens med sort farge er komplementær med mål-DNA, mens sekvens med rød farge er adapter for Illuminasekvensering.	29
Tabell 4 Temperaturprofil for PCR med Platinum SuperFi High fidelity enzym (Invitrogen)	30
Tabell 5 Oversikt over primere og probe som ble brukt til qPCR. Proben er merket i 5' enden med det fluoriserende molekylet FAM.	34
Tabell 6 Temperaturprofil for qPCR med TaqMan Environmental Master Mix 2.0	34
Tabell 7 Temperaturprofil på sekvensering med BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing kit.	35
Tabell 8 Oversikt over konsentrasjon og absorpsjon av DNA fra individer til kontroll.	37
Tabell 9 Oversikt over konsentrasjon og absorpsjon av DNA fra håvtrekkprøvene. Det var tre paralleller fra hver prøve, i tabellen viser jeg gjennomsnittsverdi av parallellene med standardavvik.	37
Tabell 10 Oversikt over resultatene fra måling av konsentrasjon og renhet av PCR-produktene etter gel-ekstraksjon og rensing.	39
Tabell 11 Oppsummering av sammenslåing og kvalitetskontroll av oppformerte sekvenser ved bruk av VSEARCH. (Utarbeidet av Morten Mattingdal)	41
Tabell 12 Oppsummering av kvalitetskontroll og prosessering av sekvenser ved bruk av VSEARCH, etter sammenslåing fra alle stasjoner *Abundance information taken into account (Utarbeidet av Morten Mattingdal).	41
Tabell 13 Oversikt over antall OTU som ble identifisert til de forskjellige taksonomiske nivå for 18S og COI i prøvene.	44
Tabell 14 Oversikt over antall OTU fra kopepoder som ble identifisert til forskjellige taksonomiske nivå for 18S og COI i prøvene.	44
Tabell 15 Resultater fra qPCR av P1-P8. Positive er gitt ved CT-verdi (threshold cycle).	47
Tabell 16 Endelige sekvenser etter gjennomgang av elektroferogram fra Sanger-sekvensering.	50

Tabell 17 Resultat etter BLAST av sekvenser fra artsspesifikk deteksjon med qPCR. Sekvens ID med lavest e-verdi innen hver art med likhet er tatt med. E-verdi < 0,5 er merket grønt... 51	51
Figur 1 Illustrasjon som viser mangfoldigheten i formen på kopepoder (Bron et al., 2011)..... 7	7
Figur 2 Morfologiske trekk hos en kopepode (Conway, 2012b) 10	10
Figur 3 Forskjellige ordener av kopepoder, basert på gensekvenser fra GenBank (Khodami, McArthur, Blanco-Bercial & Martinez Arbizu, 2017)..... 10	10
Figur 4 Strukturen på femte benpar hos forskjellige arter <i>Acartia</i> . a) <i>A. clausi</i> , b) <i>A. tonsa</i> , c) <i>A. discaudata</i> , d) <i>A. bifilosa</i> . Hanner til venstre og hunner til høyre. (Brylinski, 1981) 11	11
Figur 5 Taksonomiske analyser ved hjelp av DNA-sekvensering av dyreplankton (Bucklin et al., 2016)..... 12	12
Figur 6 Isolering av DNA med spinnkolonne. (Qiagen)..... 13	13
Figur 7 Illustrasjon av en PCR-syklus og dens tre trinn. (ThermoFisher) 14	14
Figur 8 viser strukturen til PCR-produktet som skal sekvenseres ved Illumina MiSeq. (Nextgen)..... 16	16
Figur 9 Oppformering av sekvenser ved PCR på plate i Illumina MiSeq. (Eurofins) 17	17
Figur 10 Registrering av baserekkefølge i en sekvens ved Illumina MiSeq. (Eurofins) 17	17
Figur 11 qPCR med TaqMan-metoden. (ThermoFisher)..... 19	19
Figur 12 Sanger sekvensering. (By Estevezj [CC BY-SA 3.0 (https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/)]) 20	20
Figur 13 Kartutsnitt som viser stasjonene i Landvikvannet der prøvene P1 og P2 ble tatt. (Kartverket) 23	23
Figur 14 Kartutsnitt som viser stasjonene som inngår i Havforskningsinstituttets overvåking i Skagerrak, og hvilke håvtrekkprøve som er hentet der. Kilde: Havforskningsinstituttet. 24	24
Figur 15 Utstyr brukt til innsamling i Landvikvannet. Til venstre planktonhåv og øvrig utstyr, til høyre plastflasker med prøver oppbevart på etanol. Foto: Camilla Moseid. 25	25
Figur 16 Splitting av delprøve (1/4) til sekstendelsprøver for morfologisk analyse. Gjelder prøvene fra Landvikvannet (P1 og P2). 26	26

Figur 17 Oversikt over trinnene i analysen av sekvenser fra Illumina MiSeq (detaljert beskrivelse i vedlegg 5).....	32
Figur 18 Typisk delprøve fra Landvikvannet sett gjennom lupe. På bildet sees copepodene <i>Eurythemora affinis</i> og <i>Cyclops abyssorum</i> . Her sees også flere individer av cladocera og cyprider av cirripedia. Foto: Camilla Moseid.	36
Figur 19 Gel-bilde av PCR-produkt fra 18S-genet. Brønn 1 og 20 er størrelsesstandard. Brønn 2-18 er prøvene fra individene i tabell 3-x. Brønn 19 er blank (negativ kontroll).....	38
Figur 20 Gel-bilde av PCR-produkt fra P1 med seks paralleller fra hver prøve på hvert gen. Brønn 1 og 15 er størrelsesstandard. Brønn 2-7 er COI, mens brønn 9-14 er 18S. Brønn 8 er blank (negativ kontroll).....	38
Figur 21 Distribusjon av lengden på sekvenser etter at «paired reads» var slått sammen fra alle de åtte prøvene. Disse ble brukt til å identifisere og ta ut sekvenser fra COI (364-366 b) og 18S (402-408 b). (Utarbeidet av Morten Mattingdal)	40
Figur 22 De 20 mest tallrike OTU-ene fra 18S i prøvene, og hvilken rekke de ble identifisert til. Site 1 tilsvarer P1, site 2 tilsvarer P2 osv. (Utarbeidet av Morten Mattingdal)	43
Figur 23 De 20 mest tallrike OTU-ene fra 18S som var tilstede i prøvene, og hvilken art de ble identifisert til. Site 1 tilsvarer P1, site 2 tilsvarer P2 osv. (Utarbeidet av Morten Mattingdal)	45
Figur 24 De 20 mest tallrike OTU-ene fra COI som var tilstede i prøvene, og hvilken art de tilhører. Site 1 tilsvarer P1, site 2 tilsvarer P2 osv. (Utarbeidet av Morten Mattingdal)	46
Figur 25 Amplifiseringsplot fra qPCR for tre paralleller fra håvtrekk P1. Kun positive er tatt med.....	48
Figur 26 Amplifiseringsplot fra qPCR for tre paralleller fra håvtrekk P2-P8. Kun positive er tatt med. Blå kurver er paralleller fra P2, oransje kurver er paralleller fra P3 og grønn kurve er parallell fra P6.	48
Figur 27 Eksempel på elektroferogram etter sekvensering fra artsspesifikk deteksjon med qPCR.	50

Vedlegg

Vedlegg 1 Oppskrift på 1 liter 1 x TAE elektroforesebuffer

- 1) 20 ml 50 x TAE
- 2) 980 ml dobbeldestillert H₂O

1 liter 50 x TAE blandes slik:

- 1) 242 g Tris base
- 2) 57,1 ml Acetate (100% acetic acid)
- 3) 100 ml 0,5M sodium EDTA
- 4) Fyll på dobbeldestillert H₂O til en liter totalt

Vedlegg 2 Oppskrift på 10 ml Gel elektroforese Loading Dye

- 1) 6 ml 50% glyserol
- 2) 4 ml destillert H₂O
- 3) 0,2 g bromphenol-blått (BPB)

Vedlegg 3 Oversikt over primere brukt til PCR før Illumina MiSeq. Grønn sekvens er P5, rød sekvens er Read 1 primer sekvens, grått er konstant region, sort er den opprinnelige primer sekvensen som skal sørge for sekvensering av barcode, gult er for P7, blått er index for hvilken prøve sekvensen kommer fra, og lilla er Read 2 primer sekvens.

Prøve	Forward Primer	Reverse Primer
1 18S	5' AATGATACGGCGACCACC GAGATCTACACTCTTTCCCT ACACGACGCTCTTCCGATC	5' CAAGCAGAAGACGGCATA CGAGAT ATTGGCGTGACTGGAGTTCAGACGTGTG CTCTTCCGATCTNNNNNNNNNNNGCCTGCTGCCTTCCTTGGGA 3'
2 18S	TNNNNNNNNNNNGCCTGT CTCAAAGATTAAGCC -3'	5' CAAGCAGAAGACGGCATA CGAGAT TACAAGGTGACTGGAGTTCAGACGTGTG CTCTTCCGATCTNNNNNNNNNNNGCCTGCTGCCTTCCTTGGGA 3'
3 18S		5' CAAGCAGAAGACGGCATA CGAGAT CGTGATGTGACTGGAGTTCAGACGTGTG CTCTTCCGATCTNNNNNNNNNNNGCCTGCTGCCTTCCTTGGGA 3'
4 18S		5' CAAGCAGAAGACGGCATA CGAGAT ACATCGGTGACTGGAGTTCAGACGTGTG CTCTTCCGATCTNNNNNNNNNNNGCCTGCTGCCTTCCTTGGGA 3'
5 18S		5' CAAGCAGAAGACGGCATA CGAGAT GCCTAAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTG CTCTTCCGATCTNNNNNNNNNNNGCCTGCTGCCTTCCTTGGGA 3'
6 18S		5' CAAGCAGAAGACGGCATA CGAGAT TGGTCAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTG CTCTTCCGATCTNNNNNNNNNNNGCCTGCTGCCTTCCTTGGGA 3'
7 18S		5' CAAGCAGAAGACGGCATA CGAGAT CACTGTGTGACTGGAGTTCAGACGTGTG CTCTTCCGATCTNNNNNNNNNNNGCCTGCTGCCTTCCTTGGGA 3'
8 18S		5' CAAGCAGAAGACGGCATA CGAGAT GATCTGGTGACTGGAGTTCAGACGTGTG CTCTTCCGATCTNNNNNNNNNNNGCCTGCTGCCTTCCTTGGGA 3'
1 COI		5' AATGATACGGCGACCACC GAGATCTACACTCTTTCCCT ACACGACGCTCTTCCGATC
2 COI	TNNNNNNNNNNNGGWAC WGGWTGAACWGTWTAYCC YCC -3'	5' CAAGCAGAAGACGGCATA CGAGAT TACAAGGTGACTGGAGTTCAGACGTGTG CTCTTCCGATCTNNNNNNNNNNNTAAACTTCAGGGTGACCAAARAAYCA 3'
3 COI		5' CAAGCAGAAGACGGCATA CGAGAT CGTGATGTGACTGGAGTTCAGACGTGTG CTCTTCCGATCTNNNNNNNNNNNTAAACTTCAGGGTGACCAAARAAYCA 3'
4 COI		5' CAAGCAGAAGACGGCATA CGAGAT ACATCGGTGACTGGAGTTCAGACGTGTG CTCTTCCGATCTNNNNNNNNNNNTAAACTTCAGGGTGACCAAARAAYCA 3'
5 COI		5' CAAGCAGAAGACGGCATA CGAGAT GCCTAAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTG CTCTTCCGATCTNNNNNNNNNNNTAAACTTCAGGGTGACCAAARAAYCA 3'
6 COI		5' CAAGCAGAAGACGGCATA CGAGAT TGGTCAGTGACTGGAGTTCAGACGTGTG CTCTTCCGATCTNNNNNNNNNNNTAAACTTCAGGGTGACCAAARAAYCA 3'
7 COI		5' CAAGCAGAAGACGGCATA CGAGAT CACTGTGTGACTGGAGTTCAGACGTGTG CTCTTCCGATCTNNNNNNNNNNNTAAACTTCAGGGTGACCAAARAAYCA 3'
8 COI		5' CAAGCAGAAGACGGCATA CGAGAT GATCTGGTGACTGGAGTTCAGACGTGTG CTCTTCCGATCTNNNNNNNNNNNTAAACTTCAGGGTGACCAAARAAYCA 3'

Vedlegg 4 Samlet oversikt over hvilke arter som ble påvist i hvilke prøver

Vedlegg 5 Programmeringskode for VSEARCH

Vedlegg 6 OTU 18S

Vedlegg 7 OTU COI

Vedlegg 4 Samlet oversikt over hvilke taxa som ble påvist i prøvene (P1-P8). Grønn farge betyr at arten ble påvist ved morfologisk metode, blå betyr at den ble påvist molekylærgenetisk for 18S, og rosa betyr at den ble påvist molekylærgenetisk for COI. De med * har SINTAX-verdi under 0,2.

Taxa	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
<i>Acartia sp.</i>	Green	Orange	Green	Orange	Green	Orange	Green	Orange
<i>Acartia clausi</i>				Orange		Orange		Orange
<i>Acartia hudsonica</i>		Orange		Orange		Orange		Orange
<i>Acartia tonsa</i>		Orange		Orange		Orange		Orange
<i>Anchimolgidae sp.*</i>					Blue		Blue	
<i>Anomalocera patersoni</i>	Blue		Blue		Blue		Blue	
Calanoida	Blue	Orange	Blue	Orange	Blue	Orange	Blue	Orange
<i>Calanus euxinus</i>		Orange		Orange		Orange		Orange
<i>C.finmarchicus/helgolandicus</i>	Blue	Orange	Blue	Orange	Green	Blue	Orange	Green
<i>Calanus finmarchicus</i>	Blue		Blue		Blue		Blue	
<i>Calanus helgolandicus</i>		Orange		Orange		Orange		Orange
<i>Calanus hyperboreus</i>		Orange		Orange		Orange		Orange
<i>Calocalanus plumulosus*</i>	Blue			Blue		Blue		Blue
<i>Calocalanus styliremis*</i>								Orange
<i>Candacia armata</i>			Green					
<i>Candacia pachyactyla*</i>			Blue		Blue			
<i>Canthocalanus pauper*</i>	Blue		Blue		Blue		Blue	
<i>Centropages sp.</i>						Green		
<i>Centropages hamatus</i>	Blue		Blue		Blue		Blue	
<i>Centropages typicus</i>	Blue	Orange	Blue	Orange	Blue	Orange	Blue	Orange
Clausocalanidae		Orange		Orange		Orange		Orange
Cyclopoida	Blue	Orange	Blue	Orange	Blue	Orange	Blue	Orange
<i>Cyclops abyssorum</i>	Green		Green					
<i>Cyclops kolensis</i>	Blue		Blue		Blue		Blue	
<i>Ditrichocorycaeus anglicus</i>				Orange			Orange	
<i>Euchaeta concinna</i>				Blue		Blue		Blue
<i>Eurytemora affinis</i>	Green	Blue	Orange	Green	Blue	Orange	Green	Blue
<i>Haloptilus longicornis</i>								Blue
Harpacticoida	Green	Blue		Blue				

Vedlegg x Kode for analyse av amplicons fra Illumina DNA-sekvensering (<https://github.com/mattingsdal/Amplicon-analysis>).

```
#####
#### JOIN and CUT
#### https://github.com/pnnl/bernstein-2017-productivity-and-diversity-
2/blob/a335610f7223d5b700a664a2aacf6afe221e94a9/analysis/18S_scripts/1_join.sh
#####

# Setting up folders

THREADS=10

cd $input
for f in *_R1_*.fastq; do

    r=$(sed -e "s/_R1/_R2/" <<< "$f")
    s=$(cut -d_ -f1 <<< "$f")

    echo
    echo =====
    echo Processing sample $s
    echo =====

    vsearch --threads $THREADS \
        --fastq_mergepairs $f \
        --reverse $r \
        --fastq_allowmergestagger \
        --fastq_minovlen 40 \
        --fastq_maxdiffs 10 \
        --fastqout $output/$s.merged.fastq \
        # Commands to demultiplex and remove tags and primers
        # using e.g. cutadapt may be added here.

    vsearch --fastx_filter $output/$s.merged.fastq --fastq_stripleft 12 --fastq_stripright
12 --fastqout $output/$s.merged.filter.fastq

done

### count read lengths, make histogram

for f in `seq 1 8`;
do
awk 'NR%4 == 2 {lengths[length($0)]++} END {for (l in lengths) {print l, lengths[l]}}'
$f.merged.filter.fastq | sort -V >$f.length
done

#####
#### extract COI and 18S using sequence lengths
#### COI = 364 and 366
#### 18S 402-408
#####

mkdir 18S
mkdir COI
```

```

for f in `seq 1 8`;
do

$VSEARCH --threads $THREADS --fastq_filter $f.merged.filter.fastq --fastq_minlen 364 --
fastq_maxlen 366 --fastqout COI/$f.COI.merged.filter.fastq
$VSEARCH --threads $THREADS --fastq_filter $f.merged.filter.fastq --fastq_minlen 402 --
fastq_maxlen 408 --fastqout 18S/$f.18S.merged.filter.fastq

done

#####
#### FILTER AND LABEL. replicate this for each COI and 18S
#####

# Setting up folders

for f in `seq 1 8`;
do

# The relabel command is used here to add qiime labels to the fasta headers.
vsearch --fastq_filter $f.18S.merged.filter.fastq \
--fastaout ${f}_filtered.fasta \
--fastq_maxee 0.1 \
--relabel site${f}_18S_

echo Copying and compressing
cat ${f}_filtered.fasta | pigz -c > ${f}_filtered.fasta.gz

done

rm *fastq
cat 1_filtered.fasta.gz 2_filtered.fasta.gz 3_filtered.fasta.gz 4_filtered.fasta.gz
5_filtered.fasta.gz 6_filtered.fasta.gz 7_filtered.fasta.gz 8_filtered.fasta.gz
>all_filtered.fasta.gz

#####
#### DEREPLICATE AND CHECK FOR CHIMERAS
#####

vsearch --threads 10 \
--derep_fulllength all_filtered.fasta.gz \
--minuniquesize 2 \
--sizein \
--sizeout \

```

```

--fasta_width 0 \
--uc all.derep.uc \
--output seqs.derep.mc2.fna --relabel_sha1 --relabel_keep

### denovo chimeras
vsearch --uchime_denovo seqs.derep.mc2.fna \
--threads 10 --strand plus --sizein --sizeout --fasta_width 0 \
--nonchimeras seqs.checked_denovo.fna \
--log seqs.checked_denovo.log

## check denovo removed sequences against ref chimeras
vsearch --threads 10 \
--uchime_ref seqs.checked_denovo.fna \
--db ~/projects/slettan2/180406_M01132.Project_Slettan-amplicon1-2018-02-
2/BOLD_Calanoida/calanoida2.fasta \
--sizein \
--sizeout \
--fasta_width 0 \
--nonchimeras seqs.checked_denovo_db.fna

### find OTU sequences
vsearch --cluster_smallmem seqs.checked_denovo.fna --id 0.97 --consout rep_set.fasta -
usersort
awk 'BEGIN{OFS="";ORS="";count=0}{if ($0~/>/){if (NR>1) {print "\n"} print ">" count "\n";
count+=1;} else {print $0;}}' rep_set.fasta > rep_set_relabel.fasta

#####
##### SILVA
#####

### Preparing SILVA databases for vsearch/QIIME
wget https://www.arb-
silva.de/fileadmin/silva_databases/release_132/Exports/SILVA_132_SSURef_tax_silva_full_alig
n_trunc.fasta.gzgunzip SILVA_132_SSURef_tax_silva_full_align_trunc.fasta.gz

# extract Eukaryotes
/usit/abel/u1/mortema/software/grepfasta/grepfasta.pl -p="Eukaryota"
SILVA_132_SSURef_Nr99_tax_silva.fasta>SILVA_132_SSURef_tax_silva_trunc_Eukaryota.fasta
/usit/abel/u1/mortema/software/grepfasta/grepfasta.pl -p="Metazoa"
SILVA_132_SSURef_tax_silva_trunc_Eukaryota.fasta
>SILVA_132_SSURef_tax_silva_trunc_Metazoa.fasta

# SILVA_132_SSURef_tax_silva_trunc_Metazoa.fasta

# replace U with T
sed '/^[^>]/ y/uU/tT/' SILVA_132_SSURef_tax_silva_trunc_Eukaryota.fasta > thymine.fasta
sed 's/;/:/g' thymine.fasta >tmp
#sed 's/Eukaryota:Opisthokonta:Holozoa://g' tmp >tmp2
sed 's/ Eukaryota;/tax=d:Eukaryota/g' tmp >tmp3

```

```
sed 's/\(.*\):/\1,s:/' tmp3>tmp4
sed 's/ /_/g' tmp4>tmp5
sed 's/:/,p:/4' tmp5>tmp6
sed 's/:/,c:/5' tmp6>tmp7
```

```
sed 's/:/,c:/5' tmp4>tmp5
sed 's/:/,o:/6' tmp5>tmp6
sed 's/:/,f:/7' tmp6>tmp7
```

```
vsearch --sintax rep_set_relabel.fasta --db
/usit/abel/u1/mortema/projects/slettan2/180406_M01132.Project_Slettan-amplicon1-2018-02-
22/SILVA/tmp7 --tabbedout test
```

```
#####
##### BOLD
##### wget -O Gastropoda.fa
http://www.boldsystems.org/index.php/API_Public/sequence?taxon=Gastropoda&marker=COI
```

```
sed 's/-//g' fasta_Hexanaupli.fas >tmp
sed 's/|COI.*// ' tmp >tmp2
sed 's/|/;tax=s:/' tmp2 >tmp3
sed 's/ /_/g' tmp3>tmp4
```

```
vsearch --sintax rep_set_relabel.fasta --db
/usit/abel/u1/mortema/projects/slettan2/180406_M01132.Project_Slettan-amplicon1-2018-02-
22/BOLD/tmp4 --tabbedout test --sintax_cutoff 0.8awk '{print $1"\t"$4}' test >test2
```

```
sed 's/:/;/g' test2 | sed 's/,//g'>test3
## make otu and tax biom
make_otu_table.py -i seq_otus.txt -t test3 -o otu_table.biom
single_rarefaction.py -i otu_table.biom -d 150000 -o COI_rare_otu_table.biom
```

```
#### see file for formating vsearch and SILVA
vsearch --sintax rep_set_relabel.fasta --db
/usit/abel/u1/mortema/projects/slettan2/180406_M01132.Project_Slettan-amplicon1-2018-02-
22/SILVA/tmp7 --tabbedout test --sintax_cutoff 0.1
awk '{print $1"\t"$4}' test>test2
```

```
### hack test to be qiime compatible
sed 's/:/;/g' test2 | sed 's/,//g'>test3
```

```
## make otu and tax biom
make_otu_table.py -i seq_otus.txt -t test3 -o otu_table.biom
```

```
# summarize table
biom summarize-table -i otu_table.biom
```

```
# weight each samples
single_rarefaction.py -i otu_table.biom -d 300000 -o rare_otu_table.biom
```

```
# make text file
```

```
biom convert -i rare_otu_table.biom -o rare_otu_table.txt --to-tsv
```

R

```
library(phyloseq)
```

```
res=import_biom("COI_rare_otu_table.biom")
```

```
rank_names(res)
```

```
plot_bar(res,fill="Rank6",title="all taxa")
```

```
top20 <- names(sort(taxa_sums(res), decreasing=TRUE))[1:20]
```

```
ps.top20 <- transform_sample_counts(res, function(OTU) OTU/sum(OTU))
```

```
ps.top20 <- prune_taxa(top20, ps.top20)
```

```
plot_bar(ps.top20,fill="Rank2",title="Top 20 OTU")
```


Vedlegg 2: OTU-sekvenser av kopepoder for 18S i prøvene

#OTU ID	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	Taxa	Taxon level
0	291368.0	296606.0	634.0	139.0	782.0	458.0	358.0	399.0	Calanoida(1.00),s:Eurytemora_affinis(1.00)	species
1	760.0	336.0	118216.0	151343.0	184485.0	127351.0	150787.0	188912.0	Calanoida(1.00),s:Calanus_finmarchicus(0.58)	species
2	111.0	48.0	84140.0	3791.0	701.0	8966.0	3363.0	1322.0	Calanoida(1.00),s:uncultured_eukaryote(1.00)	order
3	89.0	33.0	353.0	12394.0	49391.0	15456.0	29877.0	6073.0	Calanoida(1.00),s:Temora_longicornis(1.00)	species
4	73.0	44.0	193.0	27365.0	5182.0	5224.0	33821.0	6065.0	Calanoida(1.00),s:Metridia_lucens(0.92)	species
5	126.0	25.0	29545.0	2854.0	6006.0	7468.0	3057.0	1841.0	Calanoida(1.00),s:Centropages_typicus(0.82)	species
8	684.0	163.0	2363.0	16126.0	1016.0	9555.0	5258.0	3522.0	Calanoida(0.99),s:Pseudocalanus_moultoni(0.54)	species
11	53.0	13.0	56.0	133.0	63.0	44727.0	129.0	10200.0	Calanoida(1.00),s:uncultured_eukaryote(0.98)	order
14	1804.0	502.0	5.0	0.0	6.0	5.0	0.0	1.0	Cyclopoida(1.00),s:Daphnia_pulex_(common_water_flea)(0.36)*	species
20	34.0	16.0	1131.0	8559.0	3991.0	9877.0	5936.0	6352.0	Calanoida(0.99),s:Calanus_finmarchicus(0.96)	species
23	3.0	2.0	11.0	932.0	330.0	510.0	943.0	643.0	Calanoida(1.00),s:Calanus_finmarchicus(0.73)	species
24	6.0	0.0	1605.0	222.0	454.0	536.0	250.0	212.0	Calanoida(1.00),s:Centropages_typicus(0.55)	species
26	8.0	2.0	439.0	441.0	225.0	231.0	211.0	195.0	Cyclopoida(0.36),s:uncultured_marine_eukaryote(0.29)	order
27	0.0	0.0	2.0	27.0	6.0	18.0	4.0	352.0	Calanoida(1.00),s:Euchaeta_concinna(0.41)	species
32	1.0	1.0	7.0	95.0	239.0	83.0	132.0	98.0	Calanoida(1.00),s:Calanus_finmarchicus(0.79)	species
35	89.0	45.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	Calanoida(1.00),s:Eurytemora_affinis(1.00)	species
36	306.0	177.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	Calanoida(0.99),s:Eurytemora_affinis(0.96)	species
38	332.0	115.0	0.0	1.0	0.0	1.0	0.0	2.0	Cyclopoida(0.49),s:Daphnia_pulex_(common_water_flea)(0.26)*	species
39	12.0	2.0	25.0	4459.0	1256.0	1075.0	4531.0	1756.0	Calanoida(1.00),s:uncultured_eukaryote(0.13)	order
40	1.0	0.0	11.0	617.0	20.0	273.0	314.0	208.0	Calanoida(1.00),s:uncultured_eukaryote(0.36)	order
45	0.0	0.0	0.0	0.0	35.0	7.0	15.0	19.0	Cyclopoida(0.02),s:Anchimolgidae_sp._New_Caledonia-RJH-2004(0.01)	species
49	2.0	1.0	1668.0	322.0	383.0	380.0	224.0	288.0	Calanoida(1.00),s:Centropages_hamatus(0.79)	species
51	3.0	0.0	163.0	186.0	93.0	78.0	120.0	86.0	Calanoida(0.75),s:Calanus_finmarchicus(0.40)	species
56	6.0	2.0	479.0	124.0	66.0	233.0	144.0	74.0	Calanoida(0.99),s:Calanus_finmarchicus(0.86)	species
57	8.0	1.0	2199.0	574.0	929.0	942.0	424.0	596.0	Calanoida(1.00),s:Calanus_finmarchicus(0.45)	species
58	9.0	3.0	14.0	46.0	8.0	4164.0	33.0	1717.0	Calanoida(0.97),s:Calanus_finmarchicus(0.31)	species

#OTU ID	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	Taxa	Taxon level
63	1244.0	324.0	2.0	1.0	1.0	3.0	1.0	2.0	Cyclopoida(0.91),s:Cyclops_kolensis(0.26)	species
64	15.0	7.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	Harpacticoida(0.54),s:uncultured_eukaryote(0.26)	order
68	54.0	10.0	716.0	988.0	2056.0	1336.0	1478.0	751.0	Calanoida(0.97),s:Calanus_finmarchicus(0.95)	species
70	345.0	200.0	1.0	0.0	3.0	2.0	0.0	0.0	Calanoida(0.93),s:Anomalocera_patersoni(0.08)	species
71	206.0	103.0	0.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	Calanoida(0.57),s:Eurytemora_affinis(0.36)	species
72	0.0	0.0	1.0	8.0	46.0	1.0	19.0	8.0	Calanoida(0.83),s:uncultured_eukaryote(0.27)	order
73	0.0	0.0	1.0	16.0	48.0	0.0	17.0	21.0	Calanoida(0.77),s:uncultured_eukaryote(0.51)	order
74	0.0	1.0	265.0	361.0	182.0	149.0	178.0	166.0	Calanoida(0.90),s:uncultured_eukaryote(0.14)	order
75	0.0	0.0	0.0	0.0	23.0	1.0	8.0	0.0	Calanoida(0.99),s:Temora_longicornis(0.97)	species
79	0.0	0.0	2.0	22.0	19.0	6.0	36.0	25.0	Calanoida(0.99),s:Neocalanus_flemingeri(0.02)	species
81	1.0	1.0	3.0	254.0	7.0	1136.0	88.0	383.0	Calanoida(0.99),s:uncultured_eukaryote(0.93)	order
82	0.0	0.0	0.0	23.0	1.0	17.0	0.0	25.0	Cyclopoida(0.91),s:uncultured_eukaryote(1.00)	order
86	12.0	2.0	46.0	6.0	13.0	863.0	20.0	11692.0	Calanoida(0.99),s:Canthocalanus_pauper(0.01)	species
88	120.0	43.0	0.0	2.0	1.0	1.0	0.0	0.0	Calanoida(0.99),s:Eurytemora_affinis(0.95)	species
89	8.0	2.0	1605.0	53.0	18.0	185.0	64.0	18.0	Calanoida(0.93),s:Centropages_hamatus(0.42)	species
91	0.0	0.0	0.0	12.0	20.0	4.0	6.0	5.0	Calanoida(0.68),s:uncultured_eukaryote(0.44)	order
93	10.0	3.0	389.0	4016.0	445.0	2362.0	1443.0	2204.0	Calanoida(1.00),s:Calanus_finmarchicus(0.22)	species
96	0.0	0.0	496.0	170.0	227.0	201.0	118.0	178.0	Calanoida(1.00),s:Centropages_typicus(0.39)	species
100	76.0	34.0	81.0	509.0	2289.0	474.0	1213.0	343.0	Calanoida(1.00),s:Calanus_finmarchicus(0.48)	species
102	1.0	0.0	31.0	1.0	5.0	0.0	4.0	12.0	Calanoida(0.99),s:Calanus_finmarchicus(0.59)	species
103	10.0	2.0	4049.0	434.0	78.0	701.0	370.0	188.0	Calanoida(1.00),s:uncultured_eukaryote(0.88)	order
105	20.0	6.0	10214.0	982.0	209.0	2062.0	945.0	487.0	Calanoida(0.95),s:uncultured_eukaryote(0.83)	order
107	71.0	12.0	1472.0	1439.0	538.0	595.0	691.0	418.0	Cyclopoida(0.09),s:uncultured_eukaryote(0.87)	order
108	1.0	0.0	1.0	108.0	334.0	94.0	180.0	65.0	Calanoida(0.99),s:Temora_longicornis(0.60)	species
110	18.0	4.0	25.0	36.0	8.0	6618.0	35.0	2409.0	Calanoida(0.99),s:uncultured_eukaryote(0.92)	order
111	12.0	1.0	17.0	2278.0	697.0	2326.0	2571.0	1471.0	Calanoida(0.99),s:uncultured_eukaryote(0.53)	order
112	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	7.0	Calanoida(1.00),s:Haloptilus_longicornis(0.75)	species
113	2.0	0.0	660.0	221.0	104.0	186.0	125.0	104.0	Calanoida(0.80),s:Calocalanus_plumulosus(0.08)	species

#OTU ID	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	Taxa	Taxon level
115	10.0	0.0	32.0	188.0	435.0	317.0	188.0	137.0	Calanoida(0.99),s:Anomalocera_patersoni(0.42)	species
116	6.0	0.0	11.0	796.0	1734.0	664.0	1392.0	582.0	Calanoida(1.00),s:Temora_longicornis(0.83)	species
117	68.0	23.0	13.0	745.0	974.0	891.0	808.0	686.0	Calanoida(1.00),s:Calanus_finmarchicus(0.92)	species
118	1.0	2.0	509.0	149.0	235.0	269.0	95.0	175.0	Calanoida(1.00),s:uncultured_eukaryote(0.58)	order
119	0.0	0.0	0.0	14.0	3.0	1.0	7.0	5.0	Calanoida(0.79),s:Calanus_finmarchicus(0.65)	species
120	1.0	1.0	10.0	282.0	149.0	26.0	151.0	66.0	Cyclopoida(0.64),s:uncultured_eukaryote(0.81)	order
123	342.0	98.0	120.0	553.0	1445.0	796.0	1131.0	419.0	Calanoida(0.98),s:Anomalocera_patersoni(0.31)	species
125	5.0	1.0	362.0	434.0	1242.0	543.0	831.0	399.0	Calanoida(0.92),s:uncultured_eukaryote(0.53)	order
126	1.0	0.0	123.0	33.0	13.0	107.0	34.0	16.0	Calanoida(0.94),s:uncultured_eukaryote(0.94)	order
128	15.0	5.0	5634.0	705.0	126.0	1921.0	710.0	341.0	Calanoida(0.96),s:uncultured_eukaryote(0.76)	order
129	0.0	0.0	0.0	2.0	1.0	1.0	0.0	0.0	Cyclopoida(1.00),s:uncultured_eukaryote(1.00)	order
130	4.0	3.0	7961.0	526.0	92.0	907.0	416.0	263.0	Calanoida(0.93),s:Calanus_finmarchicus(0.24)	species
131	0.0	0.0	0.0	20.0	1.0	14.0	0.0	30.0	Calanoida(0.91),s:Calanus_finmarchicus(0.49)	species
132	8.0	7.0	464.0	3093.0	222.0	2117.0	1124.0	696.0	Calanoida(0.98),s:uncultured_eukaryote(0.61)	order
133	3.0	2.0	5.0	271.0	62.0	91.0	270.0	126.0	Calanoida(0.95),s:Metridia_lucens(0.48)	species
134	0.0	0.0	59.0	166.0	353.0	168.0	214.0	124.0	Calanoida(0.96),s:uncultured_eukaryote(0.60)	order
135	0.0	0.0	0.0	1.0	2.0	0.0	0.0	3.0	Monstrilloida(0.89),s:uncultured_eukaryote(0.90)	order
137	6.0	4.0	32.0	2340.0	680.0	608.0	2496.0	878.0	Calanoida(0.98),s:Calanus_finmarchicus(0.68)	species
141	3.0	4.0	23.0	1483.0	306.0	325.0	1600.0	400.0	Calanoida(1.00),s:Metridia_lucens(0.64)	species
142	2.0	2.0	35.0	543.0	1560.0	661.0	1044.0	306.0	Calanoida(1.00),s:Temora_longicornis(0.77)	species
146	21.0	13.0	859.0	7991.0	807.0	5055.0	2968.0	6216.0	Calanoida(1.00),s:Calanus_finmarchicus(0.65)	species
148	0.0	0.0	0.0	4.0	1.0	1.0	3.0	28.0	Calanoida(0.89),s:Calanus_finmarchicus(0.79)	species
150	6.0	5.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	Calanoida(1.00),s:Eurytemora_affinis(0.99)	species
151	0.0	0.0	541.0	23.0	1.0	105.0	21.0	9.0	Calanoida(0.97),s:uncultured_eukaryote(0.90)	order
152	4.0	3.0	1458.0	40.0	16.0	118.0	39.0	15.0	Calanoida(0.94),s:Rhincalanus_nasutus(0.03)	species
153	1.0	0.0	1342.0	278.0	32.0	590.0	179.0	218.0	Calanoida(0.95),s:uncultured_eukaryote(0.73)	order
154	13.0	6.0	3035.0	262.0	90.0	475.0	281.0	174.0	Calanoida(0.99),s:uncultured_eukaryote(0.95)	order
156	0.0	0.0	938.0	33.0	12.0	86.0	34.0	19.0	Calanoida(0.94),s:uncultured_eukaryote(0.89)	order

#OTU ID	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	Taxa	Taxon level
158	5.0	0.0	2342.0	371.0	73.0	804.0	358.0	225.0	Calanoida(0.94),s:uncultured_eukaryote(0.80)	order
159	0.0	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	Calanoida(0.99),s:Centropages_typicus(0.62)	species
161	0.0	0.0	247.0	142.0	98.0	94.0	83.0	80.0	Calanoida(0.97),s:uncultured_eukaryote(0.70)	order
163	0.0	1.0	10.0	301.0	12.0	161.0	291.0	37.0	Calanoida(0.93),s:uncultured_eukaryote(0.66)	order
164	0.0	1.0	27.0	228.0	6.0	747.0	29.0	45.0	Calanoida(0.98),s:Calanus_finmarchicus(0.27)	species
165	0.0	0.0	2.0	14.0	13.0	7.0	5.0	3.0	Calanoida(0.79),s:Calanus_finmarchicus(0.06)	species
170	0.0	1.0	4.0	71.0	135.0	23.0	39.0	80.0	Calanoida(0.96),s:Calanus_finmarchicus(0.93)	species
171	0.0	0.0	0.0	7.0	1.0	6.0	0.0	12.0	Calanoida(0.88),s:Calanus_finmarchicus(0.47)	species
173	0.0	0.0	0.0	10.0	10.0	2.0	8.0	16.0	Calanoida(0.95),s:Calanus_finmarchicus(0.90)	species
174	0.0	0.0	0.0	2.0	2.0	0.0	0.0	1.0	Calanoida(0.99),s:Calanus_finmarchicus(0.89)	species
176	0.0	0.0	3.0	10.0	8.0	0.0	1.0	4.0	Calanoida(0.98),s:Pseudocalanus_moultoni(0.08)	species
178	19.0	6.0	880.0	1379.0	182.0	2165.0	651.0	6264.0	Calanoida(0.97),s:uncultured_eukaryote(0.21)	order
179	0.0	0.0	0.0	33.0	10.0	4.0	44.0	5.0	Calanoida(0.99),s:Metridia_lucens(0.79)	species
181	1.0	0.0	1.0	6.0	11.0	6.0	3.0	4.0	Calanoida(0.90),s:Calanus_finmarchicus(0.57)	species
182	0.0	0.0	1.0	8.0	5.0	131.0	5.0	1.0	Calanoida(1.00),s:Temora_longicornis(0.94)	species
183	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	1.0	0.0	4.0	Harpacticoida(0.98),s:Harpacticus_sp._France_RJH_2007(0.98)	species
184	0.0	0.0	209.0	171.0	62.0	94.0	95.0	48.0	Calanoida(0.72),s:uncultured_eukaryote(0.74)	order
186	0.0	0.0	49.0	0.0	36.0	0.0	0.0	0.0	Calanoida(1.00),s:Candacia_pachydactyla(0.07)	species
189	4.0	1.0	12.0	587.0	1480.0	424.0	852.0	416.0	Calanoida(0.99),s:Calanus_finmarchicus(0.42)	species
191	0.0	0.0	14.0	34.0	103.0	81.0	55.0	21.0	Calanoida(1.00),s:Centropages_hamatus(0.17)	species
194	0.0	0.0	0.0	0.0	37.0	1.0	6.0	19.0	Calanoida(0.70),s:uncultured_eukaryote(0.45)	order
195	1.0	0.0	1.0	33.0	412.0	15.0	111.0	39.0	Calanoida(1.00),s:Temora_longicornis(0.99)	species
198	0.0	0.0	17.0	93.0	3.0	817.0	122.0	41.0	Calanoida(0.86),s:uncultured_eukaryote(0.88)	order
200	0.0	0.0	0.0	5.0	1.0	211.0	3.0	44.0	Calanoida(0.98),s:uncultured_eukaryote(0.88)	order
203	0.0	0.0	0.0	80.0	7.0	200.0	128.0	33.0	Calanoida(0.97),s:uncultured_eukaryote(0.20)	order
204	1.0	0.0	35.0	61.0	1.0	116.0	33.0	346.0	Calanoida(1.00),s:Neocalanus_cristatus(0.19)	species
205	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	2.0	0.0	1.0	Calanoida(0.95),s:uncultured_eukaryote(0.61)	order
206	5.0	1.0	78.0	103.0	18.0	400.0	59.0	314.0	Calanoida(0.99),s:Calanus_finmarchicus(0.34)	species

#OTU ID	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	Taxa	Taxon level
207	3.0	3.0	3616.0	191.0	365.0	483.0	226.0	136.0	Calanoida(1.00),s:Centropages_typicus(0.71)	species
208	0.0	0.0	0.0	5.0	33.0	11.0	52.0	55.0	Calanoida(0.95),s:Calanus_finmarchicus(0.82)	species
214	0.0	0.0	4.0	91.0	151.0	40.0	114.0	223.0	Calanoida(0.88),s:uncultured_eukaryote(0.62)	order
219	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.0	Calanoida(0.99),s:Calanus_finmarchicus(0.74)	species
221	0.0	0.0	1.0	40.0	10.0	17.0	6.0	590.0	Calanoida(1.00),s:uncultured_eukaryote(0.23)	order
222	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	7.0	Calanoida(1.00),s:Heterostylites_major(0.21)	species
224	0.0	0.0	32.0	31.0	49.0	5.0	24.0	43.0	Calanoida(1.00),s:Calanus_finmarchicus(0.44)	species
225	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	Calanoida(0.81),s:uncultured_eukaryote(0.51)	order
226	6.0	0.0	3.0	31.0	8.0	4769.0	14.0	1872.0	Calanoida(0.99),s:Calanus_finmarchicus(0.36)	species
227	0.0	0.0	4.0	10.0	4.0	97.0	6.0	91.0	Calanoida(1.00),s:Calanus_finmarchicus(0.85)	species
228	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	Cyclopoida(0.68),s:Scambicornus_sp._New_Caledonia-RJH-2004(0.36)	species

Vedlegg x: OTU-sekvenser av kopepoder for COI i prøvene

#OTU ID	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	Taxa	taxon level
0	56768.0	44080.0	208.0	51237.0	29412.0	27484.0	9384.0	2628.0	s:Acartia_hudsonica(1.00)	species
2	122.0	66.0	129311.0	14231.0	7213.0	21693.0	21143.0	3222.0	s:Paracalanus_parvus(1.00)	species
3	16026.0	15938.0	46.0	15.0	77.0	35.0	32.0	76.0	s:Eurytemora_affinis(1.00)	species
4	4118.0	1620.0	25.0	9287.0	161.0	993.0	3811.0	6246.0	s:Pseudocalanus_acuspes(0.92)	species
5	45.0	24.0	592.0	9786.0	12105.0	8802.0	10131.0	9913.0	s:Calanus_finmarchicus(1.00)	species
7	14.0	6.0	2971.0	2791.0	8861.0	1856.0	7660.0	2124.0	s:Calanus_helgolandicus(0.76)	species
8	17.0	5.0	28.0	47.0	7525.0	4681.0	11432.0	128.0	s:Cyclopoida(1.00)	order
9	21.0	11.0	716.0	14605.0	1394.0	6109.0	5474.0	1805.0	s:Pseudocalanus_elongatus(1.00)	species
10	31.0	5.0	27.0	49.0	41.0	23501.0	111.0	7252.0	s:Calanoida(1.00)	order
11	47.0	19.0	43.0	14.0	95.0	1064.0	33.0	28531.0	s:Calanus_hyperboreus(0.35)	species
15	7.0	5.0	16.0	968.0	369.0	279.0	141.0	4973.0	s:Calanoida(1.00)	order
20	8301.0	6989.0	32.0	6826.0	4903.0	3780.0	1498.0	388.0	s:Acartia_hudsonica(0.89)	species
29	3.0	3.0	25.0	346.0	1602.0	966.0	956.0	463.0	s:Temora_longicornis(1.00)	species
48	11.0	0.0	9.0	2.0	10.0	185.0	7.0	4531.0	s:Calanoida(0.57)	order
51	257.0	126.0	1.0	0.0	1.0	1.0	1.0	1.0	s:Acartia_tonsa(1.00)	species
67	119.0	44.0	2.0	331.0	4.0	61.0	226.0	1001.0	s:Pseudocalanus(0.57)	genus
68	1.0	0.0	0.0	266.0	14.0	116.0	37.0	86.0	s:Calanoida(1.00)	order
72	0.0	1.0	9.0	126.0	120.0	23.0	133.0	64.0	s:Cyclopoida(1.00)	order
73	1.0	0.0	168.0	0.0	384.0	8.0	207.0	4.0	s:Centropages_typicus(1.00)	species
82	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	277.0	0.0	20.0	s:Calanoida(0.66)	order
85	302.0	335.0	0.0	406.0	84.0	93.0	129.0	8.0	s:Acartia_hudsonica(1.00)	species
92	2.0	0.0	0.0	1.0	2.0	32.0	1.0	904.0	s:Calanoida(0.62)	order
93	129.0	63.0	1.0	325.0	3.0	257.0	208.0	817.0	s:Calanoida(0.43)	order
99	9.0	5.0	10.0	3.0	87.0	126.0	5.0	5989.0	s:Calanoida(0.44)	order
104	6.0	1.0	1.0	7.0	0.0	3.0	13.0	56.0	s:Pseudocalanus_mimus(1.00)	species
105	34.0	10.0	0.0	58.0	0.0	19.0	46.0	335.0	s:Calanoida(0.25)	order
106	0.0	0.0	90.0	8.0	1.0	25.0	28.0	2.0	s:Paracalanus_parvus(0.91)	species

#OTU ID	site1	site2	site3	site4	site5	site6	site7	site8	Taxa	taxon level
114	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	68.0	s:Calanoida(0.44)	order
118	0.0	0.0	67.0	2.0	4.0	8.0	19.0	31.0	s:Calanus_helgolandicus(1.00)	species
121	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	82.0	0.0	0.0	s:Paracalanus_parvus(0.76)	species
125	0.0	0.0	0.0	0.0	7.0	0.0	0.0	84.0	s:Paraeuchaeta_norvegica(0.40)	species
126	21.0	24.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	s:Eurytemora_affinis(1.00)	species
127	2.0	0.0	0.0	12.0	0.0	0.0	1.0	24.0	s:Calanoida(0.35)	order
128	1.0	27.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	1.0	s:Mesocyclops_leuckarti(0.75)	species
129	0.0	0.0	60.0	19.0	0.0	16.0	27.0	0.0	s:Paracalanus_parvus(1.00)	species
131	0.0	0.0	10.0	3.0	7.0	13.0	0.0	6.0	s:Acartia_clausi(1.00)	species
134	7.0	5.0	0.0	25.0	0.0	7.0	10.0	56.0	s:Pseudocalanus_acuspes(0.23)	species
139	3.0	3.0	0.0	7.0	0.0	8.0	12.0	54.0	s:Pseudocalanus_mimus(0.98)	species
145	0.0	1.0	0.0	7.0	0.0	4.0	3.0	16.0	s:Pseudocalanus_newmani(0.81)	species
147	1.0	0.0	0.0	1.0	0.0	5.0	2.0	8.0	s:Pseudocalanus_newmani(0.54)	species
151	6.0	2.0	6761.0	855.0	277.0	1563.0	1437.0	218.0	s:Paracalanus_parvus(1.00)	species
169	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	28.0	0.0	43.0	s:Calanoida(1.00)	order
170	0.0	0.0	0.0	30.0	1.0	21.0	47.0	42.0	s:Pseudocalanus_moultoni(0.79)	species
177	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	0.0	38.0	s:Calanoida(0.54)	order
179	1.0	0.0	0.0	7.0	0.0	32.0	0.0	32.0	s:Poecilostomatoida(1.00)	suborder
181	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	1.0	31.0	s:Calanoida(0.45)	order
183	0.0	0.0	12.0	1.0	6.0	0.0	2.0	74.0	s:Centropages_typicus(1.00)	species
184	1.0	0.0	1.0	1.0	0.0	9.0	1.0	242.0	s:Calanoida(0.61)	order
185	0.0	0.0	1.0	0.0	2.0	5.0	0.0	196.0	s:Calanus_hyperboreus(0.32)	species
195	0.0	0.0	0.0	3.0	1.0	0.0	12.0	2.0	s:Metridia_lucens(1.00)	species
217	1.0	0.0	30.0	765.0	61.0	382.0	336.0	180.0	s:Pseudocalanus_elongatus(1.00)	species
225	7.0	3.0	0.0	18.0	0.0	5.0	13.0	70.0	s:Calanoida(0.19)	order
226	1.0	0.0	6.0	12.0	7.0	7.0	7.0	1.0	s:Oithona_similis(1.00)	species
233	60.0	6.0	2.0	162.0	2.0	22.0	73.0	345.0	s:Pseudocalanus(0.24)	genus
245	5.0	0.0	4.0	0.0	3.0	25.0	2.0	1337.0	s:Calanus_hyperboreus(0.53)	species
248	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	63.0	s:Calanoida(0.55)	order

#OTU ID	site1	site2	site3	site4	site5	site6	site7	site8	Taxa	taxon level
250	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	20.0	s:Calanus_hyperboreus(0.30)	species
253	0.0	0.0	1.0	1.0	1.0	0.0	0.0	211.0	s:Calanus_hyperboreus(0.41)	species
254	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	1.0	1.0	s:Pseudocalanus_sp.(0.27)	species
255	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	6.0	s:Calanus_hyperboreus(0.42)	species
256	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	0.0	0.0	36.0	s:Calanoida(0.58)	order
257	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	58.0	s:Calanoida(0.64)	order
258	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	1.0	286.0	s:Calanoida(0.51)	order
262	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	2.0	0.0	13.0	s:Calanoida(0.49)	order
264	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	s:Calocalanus_styhiremis(0.03)	species
266	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	50.0	s:Calanoida(0.57)	order
270	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	0.0	25.0	s:Calanoida(0.44)	order
272	0.0	0.0	1.0	0.0	1.0	4.0	0.0	35.0	s:Calanoida(0.51)	order
281	1.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	2.0	4.0	s:Pseudocalanus_mimus(1.00)	species
285	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	3.0	s:Pseudocalanus_newmani(0.50)	species
290	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	s:Pseudocalanus_acuspes(0.15)	species
300	0.0	0.0	23.0	0.0	0.0	6.0	3.0	3.0	s:Ditrichocorycaeus_anglicus(1.00)	species
301	0.0	0.0	13.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	s:Paracalanus_parvus(0.96)	species
304	0.0	0.0	0.0	4.0	0.0	0.0	1.0	0.0	s:Pseudocalanus(0.21)	genus
305	1533.0	1094.0	9.0	1282.0	763.0	734.0	255.0	67.0	s:Acartia_hudsonica(1.00)	species
307	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	11.0	s:Clausocalanidae(0.68)	family
309	3.0	6.0	426.0	566.0	734.0	301.0	766.0	473.0	s:Calanus_euxinus(0.95)	species
312	0.0	0.0	0.0	2.0	0.0	1.0	4.0	6.0	s:Pseudocalanus(0.64)	genus
314	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	7.0	2.0	15.0	s:Clausocalanidae(0.67)	family
316	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	s:Pseudocalanus_elongatus(1.00)	species
321	0.0	0.0	9.0	267.0	29.0	150.0	132.0	84.0	s:Pseudocalanus_elongatus(1.00)	species