



**TURUN
YLIOPISTO**

Matemaattis-luonnontieteellinen
tiedekunta

DNA-viivakooditietokannan ja varmistusnäytteiden luominen vaikeasti tunnistettaville hyönteisille

Fanny Koskela

LuK-tutkielma

Biologian laitos

Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta

Laajuus: 8 op

Turun yliopisto

30.01.2025

Turun yliopiston laatu järjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu
Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä

Pääaine: Biologia

Tekijä: Fanny Koskela

Otsikko: DNA-viivakooditietokannan ja varmistusnäytteiden luominen vaikeasti tunnistettaville hyönteisille

Ohjaajat: Eero Vesterinen ja Heidi Viitaniemi

Sivumäärä: 21 sivua

Päivämäärä: 30.01.2025

Hyönteislajeja on arvioitu olevan maailmassa noin kuusi miljoonaa. DNA-viivakoodauksen avulla on mahdollista tunnistaa lajeja ja erottaa morfologisesti samalta näyttävät lajit toisistaan. Siksi se on lisännyt lajientunnistuksen tarkkuutta ja kryptisten lajien dokumentointia merkittävästi. DNA-viivakoodauksen perustana käytetään eläimillä mitokondriaalisen DNA:n (mtDNA:n), *COI*-geenin emäsjärjestystä. Museonäytteiden DNA-viivakoodaus voi olla yksi keino lajimonimuotoisuuteen liittyvien kysymysten ratkaisemiseksi. Jopa 113 vuotta vanhoista näytteistä on onnistuttu eristämään DNA:ta, vaikka DNA hajoaa ajan kuluessa. Voucher-näytteet eli varmistusnäytteet ovat erityisesti lajinmäärittystä varten kerättyjä näytteitä, ja siksi olennainen osa biodiversiteetin tutkimusta ja lajien kuvausta. Varmistusnäytteiden teko mahdollistaa fenotyypin tiedon yhdistämisen genotyypistä saatuu tietoon. Näytteen voucher-status kuitenkin hankaloittaa DNA-menetelmiä, koska organismin tulee säilyä kokonaisuudessaan tulevaisuuden käyttöä varten. Tutkielmani tavoitteena oli luoda DNA-viivakooditietokanta pienille ja tunnistuksellisesti haastaville hyönteisille ja tehdä näistä varmistusnäytteitä käyttäen ei-tuhoavaa DNA:n eristysmenetelmää. Ei-tuhoava DNA:n eristys mahdollistaa perimäaineksen keräämisen näytteistä vahingoittamatta eliön rakenteita. Normaalisti DNA:n eristyksessä koko eliö tai sen osa murskataan, jotta DNA saadaan eristettyä soluista. Kun näytteitä liotetaan miedossa ja soluja hajottavassa liuoksessa, näytteet säilyvät ehjinä ja niitä voidaan käyttää esimerkiksi morfologisissa tutkimuksissa DNA-eristyksen jälkeenkin. Tutkielmassani käsittelemäni Malaise-pyydyksistä kerättyjä pistiäisiä, jotka on säilöetty alkoholiin 14 vuodeksi Turun yliopiston eläinmuseossa. Nämä pistiäiset ovat pienen kokonsa vuoksi vaikeasti tunnistettavia ja hankalia käsitellä. DNA eristettiin sattumanvaraisesti valikoiduista näytteistä ei-tuhoavalla DNA:n eristyksellä. Eristetty DNA monistettiin polymeerasiketjureaktiomenetelmällä ja onnistuneesti monistuneet näytteet sekvensoitiin. Vain yhdestä hyönteisyksilöstä saatiin laadukas sekvenssi. Tulokset osoittivat, että morfologisesti *Li-tupistiäisten* heimoon määritetty yksilö kuului geneettisesti *Hitupistiäisten* heimoon. Tämä korostaa morfologisen ja geneettisen lajinmäärittämisen yhdistämisen tärkeyttä. Menetelmien kehittäminen, hautusajan lisääminen ja lajispesifisten alukkeiden kehittäminen voisivat tehostaa prosessia. Tuloksia vaikeuttivat myös endosymbiontit, jotka häiritsevät mtDNA:n analyysijä ja hämärtävät geneettisiä rajoja. Myös loispistiäisten parasitismi voi johtaa harhaanjohtaviin tuloksiin ja vaikeuttaa geneettisten markkereiden kehittämistä. DNA-viivakoodaus voi tarjota tarkkaa tietoa lajintunnistukseen, mutta tietokantoja tulee laajentaa ja kehittää ja geneettisten sekä ekologisten tekijöiden vaikutuksia on ymmärrettävä paremmin. Tämä voi auttaa sekä biologisessa tutkimuksessa että käytännön sovelluksissa, kuten tuholaistorjunnassa.

Avainsanat: DNA-viivakoodaus, varmistusnäyte, kryptinen diversiteetti, geneettinen lajintunnistus

1 Johdanto

Eri eläinlajeja arvioidaan olevan alle 10 miljoonaa, joista hyönteislajeja on arveltu olevan alle kuusi miljoonaa. Tutkimus on keskittynyt monimuotoisiin hyönteisryhmiin, mutta esimerkiksi lajirunsaudeltaan suurimpien lahkojen, pistiäisten (Hymenoptera) ja kaksisiipisten (Diptera), sisällä on heimoja, joita on tutkittu taksonomian näkökulmasta vain hyvin vähän. Esimerkiksi Costa Ricassa tehty DNA-viivakoodaus *Astrartes fulgerator* -perhosnäytteistä osoittikin oletun lajin koostuvan kymmenestä eri lajista. Määrittämällä DNA-viivakoodit mahdollisimman monelle lajille, voidaan saada ratkaisu eläinten lajirunsauteen liittyvään epävarmuuteen (Hebert et al., 2016).

DNA-viivakoodaus on tuonut lajinmäärittäykseen uuden näkökulman ja mahdollistaa entistä tarkemman lajirunsauden arvioinnin. Sen avulla voidaan muun muassa erottaa toisistaan sellaiset todellisuudessa erilliset lajit, jotka aiemmin on luokiteltu yhdeksi lajiksi samankaltaisen ilmiön perusteella. DNA-viivakoodi on hyvä apu lajinmäärittäyksessä, sillä tarkasteltava sekvenssi eroaa vähemmän saman lajin yksilöiden sisällä, kuin se eroaa eri lajien välillä. Eläimillä DNA-viivakoodin tekemiseen käytetään mitokondriaalisen DNA:n (mtDNA:n) *cytochromi c-oxidaasigeenin* (COI eli *cox1*) emäsjärjestystä (Hebert et al., 2004 ja Finbol 2023). DNA-viivakoodaus on tärkeä apu lajintunnistuksessa, ja mahdollistaa kryptisen diversiteetin dokumentoinnin (Hebert et al., 2004).

Yksi keino hyönteisryhmien lajirunsauden selvittämiseen voi piillä museonäytteissä. Hebertin ja hänen tutkimusryhmänsä mukaan DNA-viivakoodin teko onnistuu menestyksekkäästi 23 vuotta vanhoista museonäytteistä (Hebert et al., 2004). Toisen tutkimuksen mukaan DNA:ta voidaan eristää menestyksekkäästi jopa 113 vuotta vanhoista museonäytteistä (Mullin et al., 2023). Säilytystavat voivat kuitenkin vahingoittaa DNA:ta. Museoiden hyönteisnäytteiden DNA koostuu lyhyistä, keskimäärin alle 100 emäsparin mittaisista palasista. DNA hajoaa nopeasti ja laajamittaisesti yksilön kuoltua. Tämän jälkeen hajoamisvauhti kuitenkin hidastuu. Arviolta DNA fragmenttien pituus lyhenee keskimäärin 1,9 emäsparia vuosikymmenen aikana (Mullin et al., 2023). Myös Hebertin ryhmän tutkimuksessa kävi ilmi, että vaikka vanhojen näytteiden monistaminen PCR-menetelmällä onnistuu, niistä saadut sekvenssit ovat lyhyempiä (Hebert et al., 2004). Esimerkiksi alkuperäisten DNA-juosteiden korjaaminen ennen polymeerasiketjureaktiota voi mahdollistaa kattavan viivakoodikirjaston tekemisen museonäytteistä DNA-tekniikoiden kehittyessä (Hebert et al., 2004).

Voucher-näytteet eli varmistusnäytteet (engl. voucher specimens)(Laji.fi, 2024) ovat erityisen tärkeitä työkaluja, kun tutkitaan maailman biodiversiteettiä. Varmistusnäytteet ovat kokonaisuina säilytettyjä organismeja. Ne ovat olennainen osa lajien kuvausta, koska niitä voidaan käyttää esimerkkeinä muiden yksiköiden lajinmäärittämisessä. Varmistusnäyte sisältää koko organismin lisäksi tarkat kuvat ja näytteen keräystiedot (Nachman et al., 2023). Voucher-status kuitenkin hankaloittaa näytteen käsittelyä, koska statukseen liittyy tiettyjä rajoitteita.

Voucher-järjestelmään kuuluvan näytteen kohdalla tutkijan tulee varmistaa, että kaikki näytteestä tuotettu data on liitetty sitä vastaavaan alkuperäiseen näytteeseen. Keräyspaikkaan- ja aikaan liittyvät tiedot, kuvat, julkaistut artikkelit ja mahdolliset sekvenssit tulee olla jäljitettävissä samaan näytteeseen, mistä tiedot on kerätty (Nachman et al., 2023b; Puillandre et al., 2012). Näytettä ei siis voi hävittää tai vahingoittaa esimerkiksi DNA-eristyksen aikana. Molekulaaristen analyysien nopea kehitys on mahdollistanut taksonomisen tiedon määrän nopean kasvamisen. Tämän varjopuolena yhteys näytekokoelmien, lajikäsitteiden, tutkijoiden työn ja tietokantojen välillä on hämärtynyt. GenBank kannustaakin liittämään sinne arkistoituihin sekvensseihin voucher-tunnisteen (Puillandre et al., 2012). Kun Barcode of Life -projektit alkoivat, tutkijat olivat yksimielisiä siitä, että taksonominen tietokanta, joka käyttää DNA-sekvenssitietoa hyväkseen, on arvoton, jos tietokanta ei ole yhdistettävissä näytekokoelmaan (Puillandre et al., 2012).

Tutkielman tavoitteena oli DNA-viivakooditietokannan ja varmistusnäytteiden luominen pienen kokonsa vuoksi hankalasti tunnistettaville hyönteisille (mm. Microhymenoptera) vanhoista Turun yliopiston eläinmuseon näytteistä. Tutkielmassani perehdyin yllä mainittuun lajibiodiversiteettikysymykseen määrittämällä surviaissääskilajien yhteisöjen köyhtymistä käsittelevään tutkimukseen (Lilley et al., 2012) kerättyä hyönteisaineistoa ja luomalla kerätyille näytteille voucher-statusen. Surviaissääskitutkimukseen kerätyt, heimotasolle määritetyt hyönteisnäytteet kuvattiin morfologisesti ja geneettisesti. Käsittelemiäni näytteitä on säilytetty Turun eläinmuseon varastossa 14 vuotta alkoholiin säilöttyinä. Pitkällä säilytysajalla voi olla vaikutusta näytteiden laatuun.

2 Aineisto ja menetelmät

2.1 Hyönteisten kerääminen

Hyönteiset oli kerätty Malaise-pyydyksillä vuoden 2010 surviaissääskitutkimuksen yhteydessä Turun Ruissalon Rauhalassa (N: 60.39371, E: 22.161716) 24.8. – 7.9.2010 (Lilley et al., 2012). Hyönteiset oli määritetty morfologisesti heimotasolle. Määritettyjä heimoja oli kolme; Litupistiäiset (Platygastridae), Hiukekiilupistiäiset (Mymaridae) ja Hitupistiäiset (Scelio-nidae).

2.2 Kerroskuvat

Kuvasin hyönteiset Quiqfotomicro 3.2 -ohjelmalla, ohCanon 7 D mark II kameralla. Hyönteisiä oli säilytetty alkoholiin upotetuissa lasiputkissa. Otin yksittäisen hyönteisen lasiputkesta pipetin avulla ja asetin sen lasialustalle kuvan ottamista varten. Lisäsin lasialustalle käsidesiä estääkseni hyönteisen liikkumisen, sillä haihtuva alkoholi liikutti hyönteisiä ja hankaloitti kuvaamista. Kun olin ottanut kuvan, siirsin hyönteisen 70 % etanolilla täytettyyn Eppendorf-putkeen DNA:n eristystä varten.

Hyönteisnäytteet nimettiin koodilla FLK2023 ja väliviivan jälkeen lisättiin juokseva numerointi välillä 0001–0012. Tämän koodin avulla voucher-näytteen tiedot, kerroskuvat ja DNA-viivakoodi voidaan yhdistää toisiinsa tietokannassa.

2.3 Ei-tuhoava DNA:n eristys

DNA eristettiin mahdollisimman hyvin hyönteisnäytettä ja hyönteisen rakennetta säilyttäen käyttäen ei-tuhoavaa DNA:n eristystä (engl. *non-destructive extraction of DNA*) (Sittenthaler et al., 2023). Yleisesti DNA:n eristyksessä solut hajotetaan murskaamalla näyte, jolloin DNA vapautuu soluista. Koko yksilön tuhoamisen sijaan näytteestä voidaan irrottaa esimerkiksi jalka, josta DNA eristetään. Hyvin pienikokoisia hyönteisiä käsitellessä raajan irrottaminen on lähes mahdotonta. Vaihtoehtoisesti hyönteistä voidaan liottaa miedossa, digestoivassa puskuriliuoksessa. Ei-tuhoavassa DNA:n eristyksessä näytteestä ei tarvitse irrottaa osia, jolloin näyte säilyy ehjänä ja sitä voidaan hyödyntää edelleen esimerkiksi morfologisissa tutkimuksissa (Marquina et al., 2022).

Tein ei-tuhoavan DNA:n eristyksen NucleoSpin®Tissue XS-kittiä, käyttäen *Protocol for human and animal tissue* -protokollaa (GmbH, 2014). Ei-tuhoavalla DNA:n eristyksellä voidaan eristää DNA:ta näytteestä, jolle aiotaan antaa voucher-status. Alkuperäinen hyönteisyksilö voidaan siten yhdistää siitä tehtyyn DNA-viivakoodiin.

Työvaiheet olivat pääpiirteittäin kuten seuraavaksi kuvattu: Pipetoin sentrifugiputkiin 80 µl T1-puskuria ja siirsin hyönteiset pipetin avulla niihin. Lisäsin kaikkiin putkiin 8 µl proteinaasi K-entsyymiä. Vorteksoinnin sijaan sekoitin näytteet naputtelemalla varovasti putkien reunoja. Asetin putket sentrifugiin ja annoin kierrosten nousta 4000 rfg:hen asti. Sen jälkeen haudutin näytteitä 56 °C:ssa noin 1,5 h. Lisäsin näyteputkiin 80 µl B3-puskuria ja sekoitin jälleen naputtelemalla putkien reunoja. Haudutin näytteitä 70 °C:ssa viiden minuutin ajan ja sekoitin näytteet naputellen. Annoin putkien viilentyä huoneenlämpöiseksi. Seuraavaksi pipetoin jokaiseen näyteputkeen 80 µl etanolia (96–100 %) ja sekoitin naputtelemalla. Asetin putket sentrifugiin ja nostin pyörimiskierroksia hieman, jotta kaikki neste valui näyteputkien pohjalle.

Asetin Nucleospin®tissue XS-kolumnit 2 ml keräysputkiin. Pipetoin näyteputkien sisällöt kokonaisuudessaan kolumneille. Sentrifugoin näytteitä minuutin ajan 11 000 x g:ssä. Kaadoin keräysputkiin valuneen nesteen pois. Kolumneissa oleva silikakalvo sitoi pistiäisistä irronneen DNA:n. Puhdistin kalvon pipetoimalla 50 µl B5-puskuria kolumneille ja sentrifugoin näytteitä 11 000 x g yhden minuutin ajan. Toistin pesun muuten samalla tavalla, mutta sentrifugoin näytteitä kahden minuutin ajan. Irrotin DNA:n silikakalvosta pipetoimalla kolumneille 10 µl BE-puskuria.

DNA-eristyksen jälkeen leikkasin kolumnit leveysuunnassa kahtia terävällä skalpellilla. Keräsin silikakalvon päälle jääneet pistiäiset pipetinkärjellä varovasti takaisin Eppendorf-putkiin, joissa oli 70 % alkoholia.

2.4 Polymeraasiketjureaktio (PCR)

Käytin yhteen PCR-reaktioon 10 µl 2X myTaq-entsyymiä, 0,8 µl etualuketta, 0,8 µl taka-aluketta, 3 µl eristettyä DNA:ta ja 5,4 µl Milli-Q vettä. Reaktioiden lopputilavuus oli 20 µl. Etualukkeena (engl. forward primer) käytin LCO1490-aluketta (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG -3') (Folmer O et al., 1994). Taka-alukkeena (engl. reverse primer) käytin HCO2198-aluketta (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') (Folmer O et al., 1994).

Käytin PCR-reaktioon 2720 Thermal Cycler -laitetta. Ajo alkoi näytteiden haudutuksella 95 °C:ssa 5 minuutin ajan. Sen jälkeen syklit menivät seuraavasti: 95 °C 30 sekuntia, 50 °C 30 sekuntia ja 72°C 1 minuutti. Syklejä toistettiin 40 kertaa. Viimeiseksi 72 °C 5 minuuttia ja sitten 4 °C, kunnes otin näytteet pois PCR-laitteesta.

2.5 Agarosigeelielektroforeesi

Onnistuneet PCR-reaktiot valikoitiin agarosigeelielektroforeesilla. Geelin agarosipitoisuus oli 1,5 %. Käytin geelin valmistukseen 500 ml huoneenlämpöistä 0,5 X TBE-puskuria ja 5 µl Midori Green Advance -väriainetta ”valmistajan ohjeen mukaan”. Pipetoin jokaista näytettä 3 µl geelille. Ajoin geeliä Mupid®-One -elektroforeesilaitteella 30 minuuttia 100 voltilla. Kuvasin valmiin geelin ChemiDoc MP -laitteella. Kuten kuvassa 1 näkyy, onnistuneita PCR-reaktioita oli yhteensä 11 kappaletta.

2.6 PCR-monistusten konsentraation mittaaminen

Onnistuneiden PCR-monistusten eli ampliconien (engl. amplicons) DNA-konsentraatio mitattiin NanoDrop™ 2000/2000c spektrofotometrillä. Tein NanoDrop:in kalibroinnin ja puhdistuksen mittauksen alussa ja lopussa valmistajan ohjeiden mukaisesti. Käytin taustakontrollina (engl. blank) DNA:n eluaatioon käytettyä BE-bufferia. BE-bufferi asetetaan mittauksen nollassa, jolloin eluutiopuskurin absorbanssin vaikutus poistetaan. Konsentraation mittaamiseen käytin 1,5 µl näytettä. Taulukosta 1 nähdään, että näytteiden konsentraatiot vaihtelivat suuresti.

Taulukko 1. Näytteiden DNA-konsentraatio mitattiin NanoDrop™ 2000/2000c spektrofotometrillä. Mittaamiseen käytettiin 1,5 µl näytettä. Näytteiden konsentraatio oli välillä 2,2 ng/µl – 10,0 ng/µl.

Sample ID	User name	Date and Time	Nucleic Acid Conc.	Unit	A260	A280	260/280	260/230	Sample Type	Factor
blank	Fanny Koskela	24.8.2023 16:35	0,6	ng/µl	0,012	0,007	1,77	0,88	DNA	50
LUK_0001	Fanny Koskela	24.8.2023 16:36	7	ng/µl	0,14	0,114	1,23	0,66	DNA	50
LUK_0002	Fanny Koskela	24.8.2023 16:37	5,2	ng/µl	0,104	0,083	1,25	0,63	DNA	50
LUK_0003	Fanny Koskela	24.8.2023 16:38	7,2	ng/µl	0,144	0,116	1,24	0,67	DNA	50
LUK_0004	Fanny Koskela	24.8.2023 16:39	3,6	ng/µl	0,072	0,051	1,43	0,55	DNA	50
LUK_0005	Fanny Koskela	24.8.2023 16:40	6,6	ng/µl	0,132	0,116	1,13	0,71	DNA	50
LUK_0006	Fanny Koskela	24.8.2023 16:40	10	ng/µl	0,199	0,167	1,19	0,69	DNA	50
LUK_0007	Fanny Koskela	24.8.2023 16:41	7,8	ng/µl	0,157	0,135	1,16	0,65	DNA	50
LUK_0008	Fanny Koskela	24.8.2023 16:42	6,1	ng/µl	0,122	0,108	1,13	0,28	DNA	50
LUK_0009	Fanny Koskela	24.8.2023 16:44	2,2	ng/µl	0,044	0,038	1,18	0,26	DNA	50
LUK_0010	Fanny Koskela	24.8.2023 16:45	6,2	ng/µl	0,125	0,106	1,18	0,63	DNA	50
LUK_0011	Fanny Koskela	24.8.2023 16:47	6,2	ng/µl	0,124	0,105	1,18	0,64	DNA	50
LUK_0012	Fanny Koskela	24.8.2023 16:47	2,6	ng/µl	0,053	0,033	1,61	0,36	DNA	50
h2o	Fanny Koskela	24.8.2023 16:54	-1,1	ng/µl	-0,022	-0,018	1,23	0,5	DNA	50

2.7 Alukkeiden poisto

Poistin alukkeet käyttämällä ArcticZymesin A'SAP PCR-puhdistuspakkausta. Lisäsin 5 µl valmista PCR-tuotetta muoviputkiin. Sen jälkeen lisäsin 1 µl fosfataasia ja 1 µl eksonukleaasia. Haudutin putkia 2720 Thermal Cycler -laitteella ensin 5 minuuttia 37 °C:ssa ja sen jälkeen 10 minuuttia 80 °C:ssa.

2.8 Sekvensointi

Lähetin näytteet sekvensoitavaksi Macrogenille Amsterdamiin. Sekvensoinnissa käytettiin universal T7 aluketta, jonka sekvenssi on AATACGACTCACTATAG (Macrogen, 2024).

2.9 Sekvenssien laadun tarkistus ja käsittely

Käsittelin sekvensoidut näytteet BioEdit sequence alignment -ohjelmalla. Poistin alukkeet käyttäen T7-alukkeen sekvenssiä (AATACGACTCACTATAG). Poistin sekvenssien huonolaatuiset alku- ja loppupäät kromatogramin laatuun perustuen. Laadukkaassa ja melko laadukkaassa kromatogrammissa emäkset olivat selkeästi erotettavissa toisistaan ja jokaista emästä vastasi selvästi yksi kuvaaja. Jos sekvenssin kromatogrammi ei vastannut tätä kuvausta, sekvenssialue tai koko sekvenssi hylättiin.

2.10 Tietokanta

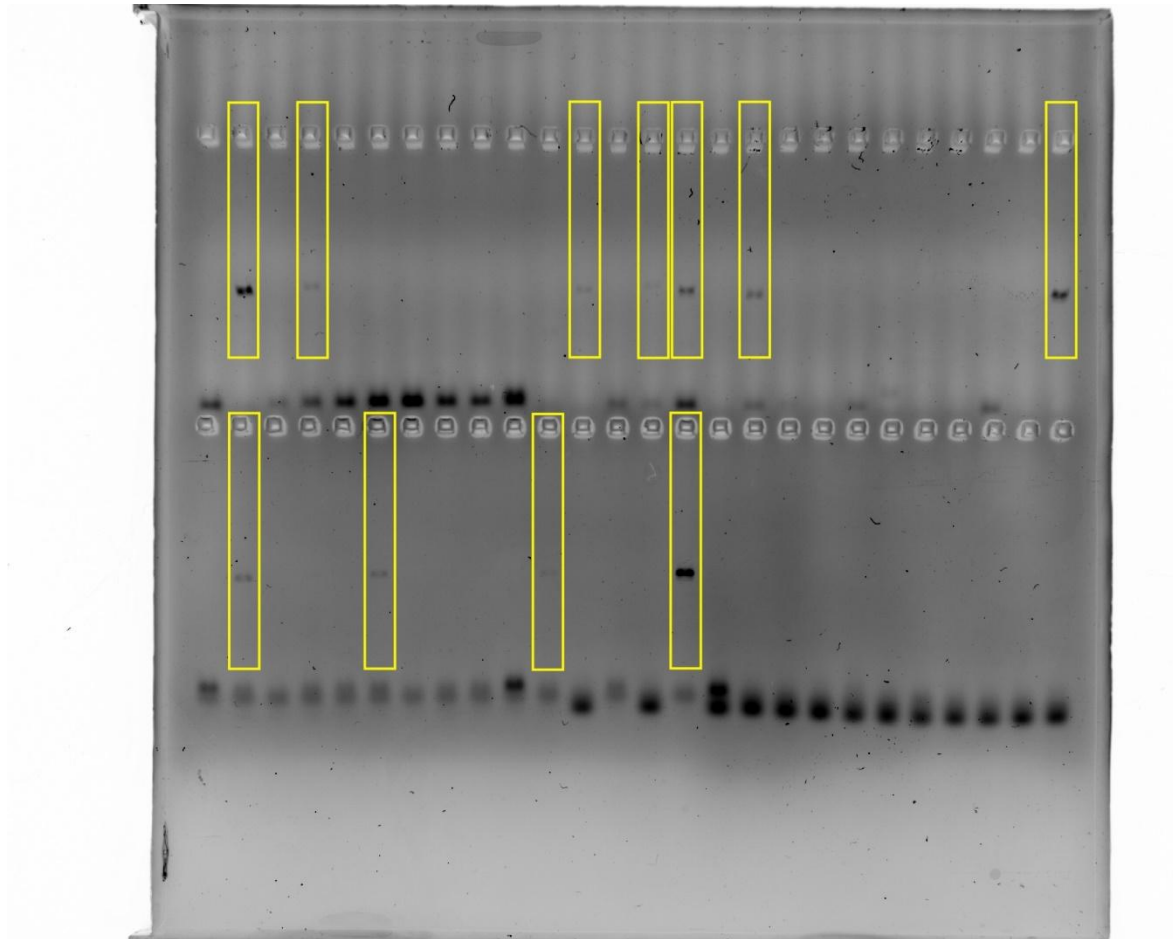
Onnistuneesti sekvensoidut näytteet lisäsin the Barcode of Life Data System eli BOLD Systems -tietokantaan (<https://v4.boldsystems.org/index.php>). The international barcode of life project eli iBOL-projekti aloitettiin lokakuussa 2010. Sen tarkoitus on laajentaa kansainvälisen viivakooditietokannan maantieteellistä ja taksonomista kattavuutta. DNA-viivakoodisekvenssit tallennetaan BOLD systems -tietokantaan (jatkossa BOLD-tietokanta) joka sisältää referenssikirjaston DNA-viivakoodeista. Näiden referenssien avulla voidaan tunnistaa sekvenssejä, joiden alkuperää ei tiedetä (Myburgh et al., 2021). Tammikuussa 2025 BOLD-tietokannassa on 12 542 132 hyönteisnäytettä, joilla on DNA-viivakoodi (BOLD SYSTEMS, 2025). Tutkielmaani kuuluvat sekvenssit lisättiin tietokantaan osana iBOL-projektia. Onnistuneet viivakoodit ovat yhdistettävissä alkuperäiseen näytteeseen, josta DNA eristettiin, eli näytteet ovat voucher- eli varmistusnäytteitä. Näytteitä säilytetään Turun yliopiston eläinmuseon tiloissa.

Macrogeniltä saadut sekvenssin syötettiin BOLD-tietokantaan FASTA-muodossa. Tietokanta käytti sinne syötettyjä valmiita referenssisekvenssejä mallinaan, kun se vertasi syöttämiäni *COI*-sekvenssejä referensseihin. Tietokanta tulosti taulukon, josta näkyi kuinka monta prosenttia lataamani sekvenssi vastasi muita samaan heimoon määritettyjä sekvenssejä. Tulokset tallennettiin tietokantaan BIFFI-projektiin.

3 Tulokset

PCR-reaktiossa monistuneet näytteet näkyivät agarosigeelillä kahtena viivana (kuva 1).

PCR-monistus onnistui seitsemästä eri hyönteisestä. Jokaisesta PCR-monistuksesta tehtiin useampi toisto, siksi geelillä näkyi 11 onnistunutta monistusta. Kuvassa 2 on esitetty kerroskuvat hyönteisistä, jotka valitsin sattumanvaraisesti ei-tuhoavaan DNA:n eristykseen.



Kuva 1. PCR-reaktiossa monistuneet näytteet näkyvät agarosigeelillä kahtena viivana. Nämä näytteet on rajattu keltaisilla suorakulmioilla. Geelin agarosipitoisuus oli 1,5 % ja käytin geeliin 0,5 X TBE-puskuria. Ajoin geeliä 30 minuuttia 100:lla voltilla. Kuva: Fanny Koskela


Vain yhdestä Macrogenille lähetetyistä PCR-näytteistä onnistuttiin saamaan laadultaan kellovillisia sekvenssejä kolme kappaletta. Nämä sekvenssit olivat peräisin yksilöstä, joka oli koodiltaan FLK2023-0009. Näyte oli määritetty morfologisin perustein kuuluvan litupistiäisten heimoon (Platygastridae). BOLD-tietokannan sekvenssidatan perusteella hyönteinen kuuluu Hitupistiäisten heimoon (Scelionidae). Näytteen FLK2023-0008 sekvenssi vastasi Wolbachian sekvenssiä, joka on Rickettsiales-lahkon bakteerisuku. Näytteen FLK2023-0010


sekvenssi vastasi BOLD-tietokannassa Oomycota-luokan sientä. Muista näytteistä ei saatu tarpeeksi laadukasta sekvenssiä.



Kuva 2. Kerroskuvat tutkielmaan valituista hyönteisistä. Hyönteiset ovat kokoluokaltaan välillä 0,4 mm - 1,65 mm. Hyönteisten pituus on määritetty päästä takaruumiiseen. Kuva: Fanny Koskela

Kuvasta 3 näkyy, että näytteen FLK2023-0009 kuva, tarkat tiedot ja morfologiset tunnistustiedot lisättiin tietokantaan. Myös näytteen keräyspaikan tarkka GPS-osoite lisättiin tietokantaan. Muista näytteistä lisättiin muuten samat tiedot, mutta sekvenssidataa ei lisätty. Kuvat, keräystiedot ja mahdollinen viivakoodi ovat yhdistettävissä alkuperäiseen näytteeseen, josta myös DNA eristettiin, eli näytteet ovat voucher-näytteitä. Näytteitä säilytetään Turun yliopiston eläinmuseon tiloissa.

FLK2023-0009 



Specimen Details

Sample ID: FLK2023-0009	Voucher Status: Stored in ethanol
Process ID: BIFFI068-23	Tissue Descriptor: Whole specimen
Project: BIFFI	Sex:
Institution Storing: University of Turku, Zoological Museum	Reproduction:
Field ID: FLK2023-0009	Life Stage: Adult
Museum ID:	Extra Info:
Collection Code:	Associated Taxa:
Reference Link:	Associated Specimens:
Note: Picked from Malaise trap material	

Taxonomy

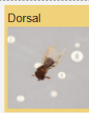
Kingdom: Animalia	Identification: Platygasteridae
Phylum: Arthropoda	Tax ID: 106636
Class: Insecta	Rank: family
Order: Hymenoptera	Identifier: Eero J. Vesterinen
Family: Platygasteridae	Identifier Email: ejvest@utu.fi
Subfamily:	Taxonomy Note:
Tribe:	Species Reference:
Genus:	BIN:
Species:	BIN Created Date:
Subspecies:	
Identification Method: Morphology	
Identifier Institution: University of Turku, Zoological Museum	

Object ID: caos-cloud.linode-us-ord-1.25_172.3491aeb0-c32c-46bb-a789-347800a2fb47.jpg

Original Name: BIFFI/Ruuhala_24.8.-7.9.2010_Platygasteridae_FLK2023-0009+1734598004.jpg

Sample ID: FLK2023-0009

Meta: Dorsal



Created: 2024-12-19T18:40:51.745238

Last Updated: 2024-12-19T18:40:51.745238

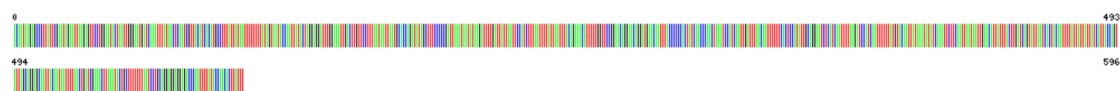
Catalognum:

Kuva 3. Näyte FLK2023-0009 lisättiin BOLD systems -tietokantaan. Kuvan lisäksi näytteen tarkemmat tiedot lisättiin "specimen details" tietoihin. Kohtaan "taxonomy" lisättiin tiedot morfologisesta lajinmäärittäyksestä. Sinne lisättiin myös keräyspaikan sijaintitiedot.

Lisäsin onnistuneen näytteen sekvenssit BOLD-tietokantaan, jolloin sain lajille spesifisen DNA-viivakoodin (kuva 4).

COI-5P

Illustrative Barcode



Nucleotide Sequence

```

ACAATAAGAGCCCTATTGGAATAGAATTAAAGAGTCTCGAATACTAATGGGAATGATCAAAATTAATACTCAATCGTTACATCACATGCTTTATTATAAATTTTTTATAGTAAT
ACCAATTTACTAGGAGGATTTGGAAATGGACTTGTCTCTTAAATAAATGACCAACAGATATAGCTTTCCCGGATTAAATAATAAAGATTGTTGATTAATAATCCATCTTTAAATTT
TATTAATTTACAGAAACATTTTGGTCCGGAACAGGAGGATGAAACAAATTTACCCCACTATCAACCAACTAAATCCATCAATTTGATTAACAATTTTTTCACTCCATATTGCA
GSAATCGATCAATTTAAGATCATCAATTTTTATGCAATATAAATAATATGAAATCTCGAATTAATAAGTGGACATTATTACTTGATCAGATTAATCACTACAGATTTTATT
ATTATATGATACCAGATATTAGCAGGAGCAATACAAATAATTTAACTGATCGAAACTTAATACTGCTTTTTTAATCTCGCAGGAGGAGGAGCCCAATTTATACCAACACTTAT
TT
  
```

Amino Acid Sequence

```

THSALTRHQLSVPGHMLIGNDQIVNISVTSFAFIMIFFMMPIMLGGFGNMLVPLMINAPOMAFPRLLNIMSFVLLPSSLILLYSNIFGSGTGTGHTIYVPLSTQLNPSIDLTFSLHIA
GISLSSINFLCTIIMNSISSINMILFTNSVLITILLLLSLPVLGAIITHLTDRLNLTAFNPNAGGGDPLVQHLF
  
```

Sequence Metadata

Genbank Accession: N/A

Translation Matrix: Invertebrate Mitochondrial

Last Updated: 2024-11-29T02:48:02.461208

Sequence Runsite: University of Turku

Modify Sequence:

[Clear Sequence](#) [Edit Sequence](#)

Identify Sequence:

[Full DB](#) [Species DB](#) [Published DB](#) [Full Length DB](#)

Kuva 4. Kun onnistuneesti sekvensoidut COI-alueen sekvenssit lisättiin BOLD-tietokantaan, saatiin luotua lajin yksilöllinen DNA-viivakoodi.

4 Pohdinta

4.1 Sekvenssit

Kuten kuvassa 1 näkyy, kaikki onnistuneet reaktiot valittiin sekvensoitaviksi. Jokaisesta hyönteisyksilöstä oli useampi toisto PCR-reaktiossa. Esimerkiksi hyönteisestä FLK2023-0003 onnistui kolme toistoa, kun taas hyönteisestä FLK2023-0001 onnistui vain yksi. Lähetin Sekvensoitavaksi ensin 11 näytettä. Koska näytteet eivät saapuneet perille odotetussa ajassa, näytteet piti lähettää uudelleen. Olin säilyttänyt PCR-tuotteita jääkaapissa, ja suurin osa nesteestä oli haihtunut. Kahdeksassa näytteessä oli jäljellä muutama mikrolitra materiaalia, ja lähetin ne hieman laimennettuina Macrogenille. Seitsemästä hyönteisestä lopulta vain yhdestä saatiin kelvollinen sekvenssi.

Sekvenssidatan perusteella ainakin yksi yksilö oli määritetty kuuluvaksi väärään heimoon. Alun perin Litupistiäisten heimoon morfologisesti määritetty näyte kuuluikin sekvenssidatan perusteella Hitupistiäisiin. Tämä ei vielä anna uutta tietoa surviaissääskitutkimusta varten kerättyjen hyönteisnäytteiden lajimääristä, koska otoskoko oli pieni ja DNA-viivakoodien teko epäonnistui suurelta osin. DNA-viivakoodin perusteella saatu tieto siitä, että näyte FLK2023-0009 kuuluu mahdollisesti Hitupistiäisiin, osoittaa kuinka tärkeää lajintunnistuksessa on käyttää sekä morfologista että geneettistä lajinmäärittystä. Ei-tuhoavalla DNA:n eristyksellä voi olla potentiaalia lajintunnistuksen apuna tulevaisuudessa, jos menetelmää saadaan parannettua.

Tulosten tulkinnan epävarmuutta lisää se, että sekvenssejä sisältävät kirjastot ovat keskeneräisiä ja ne saattavat sisältää väärinluokiteltuja näytteitä (Roslin ym. 2021). Tätä epävarmuutta voidaan vähentää laajentamalla sekvensoitujen näytteiden määrää ja näin ollen parantamalla tietokantojen laatua ja kattavuutta. Kehittämällä uusia lajispesifisiä molekyyli-markkereita ja käyttämällä COI-geenin lisäksi esimerkiksi sisäisesti transkriptoituja välikkeitä (engl. internal transcribed spacers) (ITS), voidaan parantaa menetelmien tarkkuutta. ITS-alueita on useita kopioita solussa, ja sekvenssit ovat suhteellisen erilaisia läheistä sukua olevien populaatioiden välillä (Ashfaq et al., 2005).

4.2 DNA-näytteiden laatu

Näytteiden konsentraatio ei vaikuttanut sekvensoinnin onnistumiseen. Taulukosta 1 nähdään, että näytteiden konsentraatio oli välillä 2,2 ng/μl – 10,0 ng/μl. Näytteen FLK2023-0009

DNA-konsentraatio oli noin 2,2 ng/ μ l. Se oli kaikista alhaisin konsentraatio, mutta näyte saatiin silti sekvensoitua onnistuneesti. Korkea konsentraatio ei siis takaa onnistunutta sekvensointia. Toisaalta taulukosta 1 nähdään myös, että näytteiden 260/280 absorbanssilukemat olivat hyvin alhaisia; näytteiden 260/280 absorbanssisuhteet olivat välillä 1,13–1,61. 260/280-suhdetta käytetään DNA-näytteiden puhtauden arvioinnissa. Puhtaan DNA:n 260/280-suhde on noin 1,8. DNA absorboi valoa aallonpituudella 260 nm, kun taas proteiinit absorboivat valoa aallonpituudella 280 nm. Matalat 260/280-lukemat ovat merkki proteiini-, fenoli- tai suolakontaminaatiosta. Myös matala 260/230-lukema merkitsee kontaminaatiota. Näytteiden 260/230-suhteet olivat välillä 0,26–0,67. Puhtaan DNA:n 260/230-suhde on 2,0–2,2. Matala 260/230-suhde kertoo proteiini-, lipidi-, suola- tai fenolikontaminaatiosta (Vermessen et al., 2024). Yleinen kontaminaation syy on guanidiinihydrokloridi, jota on kaupallisten nukleiinihappojen eristykseen tarkoitettujen pakkausten valmiissa puskuriliuoksissa. Eräässä DNA:n eristysmenetelmiä vertailevassa tutkimuksessa huomattiin, että guanidiinihydrokloridin käyttöön perustuvassa eristyksessä eristetyn DNA:n määrä ja laatu oli muita menetelmiä huonompi (Wang et al., 2012). Epäpuhtauksista johtuva näytteiden huono laatu voi selittää sen, miksi sekvenssit olivat huonolaatuisia. DNA-amplikonien epäpuhtaudet voivat toimia inhibiittoreina seuraavissa vaiheissa. Tulevaisuudessa varmistusnäytteiden DNA:ta eristettäessä DNA:n voisi irrottaa kolumneista kahdessa erässä. Sen on todettu parantavan näytteen laatua (Rohland & Hofreiter, 2007). Tulevaisuudessa voisi myös harkita toisen eristysmenetelmän käyttöä.

4.3 Ei-tuhoavan DNA-eristysmenetelmän arviointia

Toimivien alukkeiden löytäminen pistiäisille on hankalaa. Tässä tutkielmassa 11 pistiäisyksilöstä saatiin vain seitsemän yksilön *COI*-alue monistumaan. Onnistuneista monistuksista osa paljastui kontaminaatioiksi. Vain yhdestä pistiäisestä saatiin luotettava tulos. Menetelmää hankaloitti ei-tuhoava DNA:n eristys. On mahdollista, että menetelmä ei toiminut kaikilla yksilöillä eikä DNA:ta irronnut riittävästi haudutuksen aikana. Menetelmää voisi tehostaa lisäämällä haudutusaikaa hajotuksen aikana. Toisaalta olisi myös tärkeää kehittää tarkempia PCR-alukkeita pistiäisille.

BOLD-tietokannasta saatiin yhden näytteen kohdalla tulokseksi *Wolbachia*-bakteeri ja toisen kohdalla vastaavuudeksi *Oomycota*-sieni. Ei-tuhoavassa DNA:n eristyksessä ongelma oli se, että hyönteisen pinnalla mahdollisesti elävät micro-organismit tulivat mukaan PCR-monistukseen. Näiltä eliöiltä sattui löytymään valituilla alukkeilla monistuva sekvenssi, mikä

teki tuloksista epäluotettavia. Ei-tuhoavaa DNA:n eristysmenetelmää voitaisiin parantaa pesemällä näytteet esimerkiksi DNA AWAY® -dekontaminaatioliuoksella, joka valmistajan mukaan sopii PCR-tehtäviin ja estää virheelliset positiiviset PCR-tulokset (Avantor™, 2025).

4.4 Endosymbiontit

Yksi tutkielmani hyönteisestä saatu sekvenssi antoi tulokseksi Wolbachia-bakteerisuvun, joka on pistiäisissä yleisenä elävä endosymbionttibakteeri. Eräässä tutkimuksessa raportoitiin Wolbachian esiintyminen saksalaisissa mehiläis- ja pistiäislajeissa. Tutkituista lajeista 66 % mehiläislajeista ja 46 % pistiäislajeista testattiin PCR-menetelmän avulla olevan positiivisia Wolbachian suhteen. Tämä oli tutkimuksen mukaan linjassa aiempien arvioiden kanssa, joiden mukaan Wolbachia esiintyy 19–76 %:ssa niveljalkaisia maailmanlaajuisesti.

Wolbachia periytyy äidiltä jälkeläisille ja ne pystyvät tunnetusti manipuloimaan isäntäorganismien lisääntymistä parantaakseen omaa lisääntymismenestystään. Wolbachia-tartunnan saaneet naaraat saavat lisääntymisedun populaatiossa, sillä tartunnan saaneiden koiraiden ja terveiden naaraiden tuottamat jälkeläiset ovat fenotyypiltään letaaleja. Lisäksi Wolbachia voi vääristää isäntälajin sukupuolijakauman naarasvaltaiseksi aiheuttamalla partenogeneesiä (Miyata et al., 2017). Jos horisontaalisesti siirtynyt infektiio säilyy ja suosii infektoituneita äitilinjoihin eri isännissä, kummassakin lajissa tapahtuu mitokondriaalinen pyyhkäisy (engl. mitochondrial sweep), joka vähentää lajin sisäistä mtDNA:n vaihtelua. Tämä voi vähentää mtDNA:n vaihtelua kyseisessä lajissa, jakaa lajin äitilinjoihin sukupuut infektion perusteella ja mahdollistaa mtDNA haplotyyppien leviämisen eri lajien välillä. Endosymbiontit, kuten Wolbachia, ovat tunnetusti ”geneettisiä vapaamatkustajia” (engl. genetic hitchhikers), koska niiden geenit lisääntyvät populaatiossa infektiota suosivan valintaedun kustannuksella. Ne voivat siten vaikuttaa mtDNA:n evolutiiviseen dynamiikkaan (Ballard & Dean, 2001). Nämä tekijät voivat aiheuttaa ongelmia DNA-viivakoodauksessa, koska lajin sisäiset ja lajien väliset geneettiset rajat sekoittuvat (Stahlhut et al., 2012).

Alukkeiden toimivuutta voivat heikentää myös mitokondriaalisessa DNA:ssa tapahtuvat muutokset, kuten deleetiot. Fylogeneettisestä näkökulmasta tarkasteltaessa aina ei ole selvää, miten deleetioita pitäisi tulkita. Viivakoodattuja yksilöitä ei seulota rutiininomaisesti Wolbachia-infektioiden suhteen. Siksi BOLD-tietokannan käyttäjillä on harkintavastuu näytteen tunnistusprosessissa. BOLD myös tunnistaa Wolbachian infektoimat näytteet ja merkkää ne automaattisesti (Stahlhut et al., 2012).

4.5 Parasitismi

Sekvenssidatan ja morfologisen määritelmän perusteella yksi näytteistä määritettiin kuuluvaksi hitupistiäisten heimoon (Scelionidae). Hitupistiäiset ovat loispistiäisiä (Laji.fi). Pistiäisillä esiintyy yleisesti myös hyperparasitismia, jossa loispistiäinen käyttää toista loispistiäislajia isäntänään (Ashfaq et al., 2005). Hyperparasitoidit voivat hankaloittaa geneettistä lajintunnistusta ja antaa harhaanjohtavia tuloksia. Toisaalta loispistiäisten välisiä vuorovaikutuksia on syytä tutkia lisää. Näin saadaan parannettua DNA-viivakoodien luotettavuutta, mutta saadaan myös lisää tietoa loispistiäisten ekologiasta. Tällä voi olla myös positiivisia vaikutuksia biologisessa tuholaistentorjunnassa.

4.6 Johtopäätökset

Tutkielman tavoitteena oli luoda DNA-viivakooditietokanta kokonsa vuoksi tunnistuksellisesti haastavista hyönteistä ja tehdä niistä varmistusnäytteet. Tässä onnistuttiin osittain. Vain yhdestä varmistusnäytteestä saatiin luotua DNA-viivakoodi, joka tallennettiin tietokantaan. Tutkielmani kuitenkin vahvistaa, että DNA-viivakoodaus täydentää morfologista tunnistusta. Sekvensoinnin avulla paljastui, että yksi hyönteinen kuului toiseen heimoon kuin mihin se oli morfologisesti määritetty. Toisaalta näyte on voitu siirtää vahingossa väärin nimettyyn näyteputkeen. Inhimillisiltä virheiltä voidaan välttyä, kun käytetään näitä kahta määrittämissä yhdessä. Toisaalta käyttämällä myös hyönteisen tumasekvenssiä lajin tunnistuksessa voitaisiin välttyä esimerkiksi endosymbionttien haittavaikutuksilta. Valokuvat ja DNA-sekvenssit tarjoavat yhdessä alkuperäisen hyönteisnäytteen kanssa korkealaatuisen lopputuloksen, joka mahdollistaa genotyypin yhdistämisen fenotyyppiin.

Genomisen tiedon hyödyntäminen on tehnyt kryptisten lajien tunnistuksesta arkipäivää. Toisaalta kryptisten lajien tunnistamiseen tarvitaan myös morfologisia analyysejä, joihin tarvitaan varmistusnäytteitä. Tutkielmassani tuli ilmi, että kokonaisina säilytetyt voucher-näytteet voivat tarjota uutta tietoa eliön pinnalla ja sisällä elävistä mikro-organismeista, jos käytetään ei-tuhoavaa DNA:n eristystä. Voucher-näytteet mahdollistavat evolutiivisten prosessien tutkimisen, sillä näytesarjat dokumentoivat muun muassa maantieteellistä ja ajallista vaihtelua (Nachman et al., 2023).

Vaikka vain yhdestä hyönteisestä saatiin luotua kokonainen varmistusnäyte sekvensseineen, tehty työ ei ollut turhaa. Jokainen tietokantaan lisätty näyte on askel eteenpäin maailmanlaajuisen biodiversiteetin selvittämisessä. Vaikka BOLD-tietokannassa onkin yli 12 miljoonaa

hyönteisnäytettä, ne edustavat vain 284 053 hyönteislajia (BOLD SYSTEMS, 2025) Maailmassa on arviolta noin kuusi miljoonaa hyönteislajia, joten sekvensoitavaa riittää vielä. Voucher-näytteiden tekeminen ei ole nykyisillä menetelmillä kallista tai aikaa vievää, joten kannustamalla tiedeyhteisöä jakamaan BOLD-tietokantaan tallennettua dataa ja tutustuttamalla uusia tutkijoita ja opiskelijoita menetelmien pariin, voidaan maailman biodiversiteetin kartoittamista tehostaa.

Kiitokset

Kiitokset Luk-tutkielmani ohjaajalle Eero Vesteriselle avusta tutkimuksen suunnittelussa ja toteutuksessa. Kiitokset myös Heidi Viitaniemelle työni ohjaamisesta, neuvoista ja avusta BioEdit-ohjelman käytössä. Kiitokset Kari Kaunistolle avusta Quiqfotomicro 3.2 -ohjelman ja ohCanon 7 D mark II kameran käytössä. Kiitokset Helka Vennolle jatkuvasta kannustuksesta ja ideoinnista. Kiitokset Turun yliopiston eläinmuseolle tarvitsemani tilan ja laboratoriotarvikkeiden tarjoamisesta.

Lähteet

- Ashfaq, M., Erlandson, M., & Braun, L. (2005). Hyperparasitism by *Mesochorus* spp. (Hymenoptera: Ichneumonidae) in *Peristenus* sp. (Hymenoptera: Braconidae) and development of PCR primers for hyperparasitoid detection. *Biological Control*, 32(3), 371–377. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2004.11.007>
- Avantor™. (2025). *DNA AWAY® -dekontaminaatioliuos*. <https://fi.vwr.com/store/product/22143063/Dna-Away-Dekontaminaatioliuos>.
- Ballard, J. W., & Dean, M. (2001). The mitochondrial genome: mutation, selection and recombination. *Current Opinion in Genetics & Development*, 11(The mitochondrial genome: mutation, selection and recombination), 667–672.
- BOLD SYSTEMS. (2025). *Record List Public Data Portal*. https://v4.boldsystems.org/index.php/Public_BINSearch.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, & Vrijenhoek R. (1994). DNA Primers for Amplification of Mitochondrial Cytochrome c Oxidase Subunit I from Diverse Metazoan Invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5), 294–299.
- GmbH, M. (2014). *Genomic DNA from tissue User manual NucleoSpin® Tissue XS For ordering information For technical support*. www.clontech.com
- Hebert, P. D. N., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H., & Hallwachs, W. (2004). *Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator**. www.acguanacaste.ac.cr
- Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S., Zakharov, E. V., Telfer, A. C., Levesque-Beaudin, V., Milton, M. A., Pedersen, S., Jannetta, P., & Dewaard, J. R. (2016). Counting animal species with DNA barcodes: Canadian insects. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371(1702). <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0333>
- Laji.fi. (2024, March 11). *Muiden museoiden varmistusnäytteet*. <https://laji.fi/theme/dataset-metadata/hr.3151>.
- Lilley, T., Ruokolainen, L., Vesterinen, E., Paasivirta, L., & Norrdahl, K. (2012). Sediment organic tin contamination promotes impoverishment of non-biting midge species communities in the Archipelago Sea, S-W Finland. *Ecotoxicology*, 21(5), 1333–1344. <https://doi.org/10.1007/s10646-012-0887-2>
- Marquina, D., Roslin, T., Łukasik, P., & Ronquist, F. (2022). Evaluation of non-destructive DNA extraction protocols for insect metabarcoding: gentler and shorter is better [Article]. *Metabarcoding and Metagenomics*, 6, 187–201. <https://doi.org/10.3897/mbmg.6.78871>
- Miyata, M., Konagaya, T., Yukuhiro, K., Nomura, M., & Kageyama, D. (2017). Wolbachia-induced meiotic drive and feminization is associated with an independent occurrence of selective mitochondrial sweep in a butterfly. *Biology Letters*, 13(5). <https://doi.org/10.1098/rsbl.2017.0153>

- Mullin, V. E., Stephen, W., Arce, A. N., Nash, W., Raine, C., Notton, D. G., Whiffin, A., Blagderov, V., Gharbi, K., Hogan, J., Hunter, T., Irish, N., Jackson, S., Judd, S., Watkins, C., Haerty, W., Ollerton, J., Brace, S., Gill, R. J., & Barnes, I. (2023). First large-scale quantification study of DNA preservation in insects from natural history collections using genome-wide sequencing. *Methods in Ecology and Evolution*, *14*(2), 360–371. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.13945>
- Myburgh, M. M. M., Thabang Madisha, M., & Coetzer, W. G. (2021). South Africa’s contribution of insect records on the BOLD system. In *Molecular Biology Reports* (Vol. 48, Issue 12, pp. 8211–8220). Springer Science and Business Media B.V. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06822-y>
- Nachman, M. W., Beckman, E. J., Bowie, R. C. K., Cicero, C., Conroy, C. J., Dudley, R., Hayes, T. B., Koo, M. S., Lacey, E. A., Martin, C. H., McGuire, J. A., Patton, J. L., Spencer, C. L., Tarvin, R. D., Wake, M. H., Wang, I. J., Achmadi, A., Álvarez-Castañeda, S. T., Andersen, M. J., ... Zink, R. M. (2023a). Specimen collection is essential for modern science. In *PLoS Biology* (Vol. 21, Issue 11 November). Public Library of Science. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3002318>
- Nachman, M. W., Beckman, E. J., Bowie, R. C. K., Cicero, C., Conroy, C. J., Dudley, R., Hayes, T. B., Koo, M. S., Lacey, E. A., Martin, C. H., McGuire, J. A., Patton, J. L., Spencer, C. L., Tarvin, R. D., Wake, M. H., Wang, I. J., Achmadi, A., Álvarez-Castañeda, S. T., Andersen, M. J., ... Zink, R. M. (2023b). Specimen collection is essential for modern science. In *PLoS Biology* (Vol. 21, Issue 11 November). Public Library of Science. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3002318>
- Puillandre, N., Bouchet, P., Boisselier-Dubayle, M. C., Brisset, J., Buge, B., Castelin, M., Chagnoux, S., Christophe, T., Corbari, L., Lambourdière, J., Lozouet, P., Marani, G., Rivasseau, A., Silva, N., Terryn, Y., Tillier, S., Utge, J., & Samadi, S. (2012). New taxonomy and old collections: Integrating DNA barcoding into the collection curation process. *Molecular Ecology Resources*, *12*(3), 396–402. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03105.x>
- Rohland, N., & Hofreiter, M. (2007). Comparison and optimization of ancient DNA extraction. *Bio-Techniques*, *42*(3), 343–352. <https://doi.org/10.2144/000112383>
- Sittenthaler, M., Fischer, I., Chovanec, A., Koblmüller, S., Macek, O., Sattmann, H., Szucsich, N., Zangl, L., & Haring, E. (2023). DNA barcoding of exuviae for species identification of Central European damselflies and dragonflies (Insecta: Odonata). *Journal of Insect Conservation*, *27*(3), 435–450. <https://doi.org/10.1007/s10841-023-00467-x>
- Stahlhut, J. K., Gibbs, J., Sheffield, C. S., Smith, M. A., & Packer, L. (2012). Wolbachia (Rickettsiales) infections and bee (Apoidea) barcoding: A response to Gerth et al. In *Systematics and Biodiversity* (Vol. 10, Issue 4, pp. 395–401). <https://doi.org/10.1080/14772000.2012.753488>
- Versmessen, N., Van Simaey, L., Negash, A. A., Vandekerckhove, M., Hulpiau, P., Vanechoutte, M., & Cools, P. (2024). Comparison of DeNovix, NanoDrop and Qubit for DNA quantification and impurity detection of bacterial DNA extracts. *PLoS ONE*, *19*(6 6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0305650>

Wang, X., Teng, D., Tian, F., Guan, Q., & Wang, J. (2012). Comparison of three DNA extraction methods for feed products and four amplification methods for the 5'-junction fragment of roundup ready soybean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(18), 4586–4595. <https://doi.org/10.1021/jf300827q>