

10014

# Kartlegging av tredjegerasjons sekvensering sitt potensial i biodiversitetsforskning; ein litteraturstudie

Bacheloroppgåve i Bioteknologi  
Rettleiar: Ann-Kristin Tveten  
August 2023



10014

# **Kartlegging av tredjegerasjons sekvensering sitt potensial i biodiversitetsforskning; ein litteraturstudie**

Bacheloroppgåve i Bioteknologi  
Rettleiar: Ann-Kristin Tveten  
August 2023

Noregs teknisk-naturvitskaplege universitet  
Fakultet for naturvitskap  
Institutt for biologiske fag Ålesund



**NTNU**

Kunnskap for ei betre verd



## Forord

Dette litteraturstudiet tek føre seg ei bioteknologisk vinkling av temaet biodiversitetsforskning. Det har som hensikt å supplere eksisterande litteraturstudiar og gje ei oversikt på norsk over tredjegerasjons sekvensering (TGS) sitt potensiale for å generere data til bruk i biodiversitetskonservering. Gjennom tre år med bioteknologistudiar er forfattar blitt introdusert til genetikk og biodiversitet som retningar innan bioteknologi. Forfattar har også praktisk erfaring med TGS (Oxford Nanopore Sequencing (ONT) med MinION) i kontekst plantegenetikkforskning ved universitetet EPFL. Frå denne erfaringa har det spira fram eit ønske om å utføre eit studie på tvers av biodiversitet og genetikk, valet vart sekvenseringsteknologi. Innhaldet i denne oppgåva står for forfattarens rekning. Ann-Kristin Tveten fortentar stor takk for å ha vore veileiar under arbeidet med denne bacheloroppgåva.

## Samandrag

Denne bacheloroppgåva er eit litteraturstudium der tredjegerasjons sekvensering(TGS) sitt potensial i biodiversitetsforskning kartleggast. Litteraturstudiet er utført med hensikt å kartlegge potensialet til TGS som verktøy for å hente nødvendig data, kunnskap og modellar som dannar grunnlag for val ved utforming av biodiversitetsbevarande tiltak. Sia TGS både er relativt nytt og i rask vekst, er det både viktig og omfattande arbeid å avdekke og fylle kunnskapshol for å optimalisere bruk. Kartlegginga inneber moglegheiter, utfordringar, fordeler og ulemper ved bruk av TGS per våren 2023. Litteraturstudiet tek føre seg to typar TGS; Oxford Nanopore Technologies (ONT) og Single Molecule Real Time (SMRT) sekvensering, og sekundært nestegerasjonssekvensering(NGS) for samanlikning.

Utvalet av artiklar skal representere forsøkte tilnærmingar med TGS i kontekst biodiversitet. Bruk av TGS viste seg å innebere heilgenomsekvensering, transkriptomsekvensering, utvikling av genbankar, evolusjon- og miljøstudiar, sekvensering av strukturelle variantar og hypervariable regionar, artsidentifikasjon og mikrobiom- og populasjonsanalysar. TGS viste seg også som nyttig verktøy i forskning på artars effekt på miljø og rolle i økosystem. Dette er bruksområde relaterte til biodiversitet som TGS, både ONT og SMRT, har vist evne til å kunne fasilitere.

Resultatet etter litteratursøket stemmar overeins med teori; med TGS kan lengre DNA-sekvensar sekvenserast, samtidig. I tillegg gir resultatet ei meir omfattande skildring av TGS sine hindringar og moglegheiter; kva som har fungert i praksis, med ei variasjon av ulike formål og på forskjellige typar genetisk materiale frå ei rekke forskjellige taxa. Utfordringar ved TGS viste seg til ei viss grad å vere sekvensering av repeterande regionar, hypervariable regionar og ei høgare feilrate enn NGS. Dette kjem delvis av den molekylære mekanismen bak SMRT og Nanoporesekvensering.

Det konkluderast med at TGS har eit bredt potensial som vil vere interessant å utforske vidare for å generere nødvendig data til grunn for biodiversitetskonservering. Ved å kombinere TGS og NGS eller Sangersekvensering kan heile genom sekvenserast der TGS aleine ikkje strekker til. Dette er ei løysing som aukar TGS sitt potensial. Hybridiserte metodar vil vere meir kostbare, men utgjer ei mogleg løysing som kan dekke manglane TGS sin prestasjon har i dag. For vidare forskning foreslåast fleire samanliknande studiar for TGS og NGS, vidareutvikling av apparat for å kunne utføre feltanalysar av høg kvalitet og utvikling av softwares knytt til biodiversitetsforskning.

## Abstract

This bachelor thesis is a literature review where the potential of third generation sequencing in biodiversity research is mapped. The review is carried out with the purpose of mapping the potential of TGS as a tool in collecting essential data, knowledge and models that makes up a basis for decision-making in the creation of biodiversity conservation measures. Since TGS is relatively new and in rapid development, it is important to reveal and fill research gaps in order to optimize use. The mapping consists of possibilities, challenges, advantages and disadvantages when using TGS as of the spring of 2023. The literature review will focus on the two types of TGS; Oxford Nanopore Technologies (ONT) and Single Molecule Real Time (SMRT) sequencing, and second, Next gen sequencing(NGS) for comparison.

The selected articles represents tested approaches with TGS in the context of biodiversity. Use of TGS turned out to include whole genome sequencing, transcriptome sequencing, development of gene banks in evolution- and environmental studies, sequencing of structural variants and hypervariable regions, specie identification and microbiome- and community analyses. TGS seemed like a helpful tool in research on species effect on their environment and their ecosystem role. These are areas of use related to biodiversity that TGS, both ONT and SMRT, has shown ability to facilitate.

The result of the literature search agrees with theory; longer DNA sequences can be sequenced with TGS, simultaneously. The result provide an additional, more comprehensive, description of the challenges and possibilities of TGS; what worked in practice, with a variation of purposes and on different types of genetic material from several different taxa. Challenges in using TGS is shown to a certain degree to be sequencing of repeating regions, hypervariable regions and a higher error rate than NGS. The molecular mechanisms behind SMRT and Nanopore sequencing are partially responsible for this.

It is concluded that TGS has a broad potential that will be interesting to research further to generate essential data as basis in biodiversity conservation. By combining TGS and NGS or Sanger sequencing, whole genomes can be sequenced in cases where TGS is insufficient. This is a possible solution that increases the potential of TGS. Hybridized methods will be higher in cost but make for a possible solution that may cover the gaps in TGS performance today. Suggestions for further research include comparative studies on TGS and NGS, further development of instruments for high quality field analyses and development of biodiversity research softwares.

## Innhald

Samandrag.....	2
Abstract .....	3
Tabell- og figurliste .....	5
Terminologi og forkortingar.....	1
1 Innleiing.....	1
2 Bakgrunn .....	1
2.1 Biodiversitet .....	1
Økologisk balanse og verdi for mennesket .....	2
Døme på menneskeleg aktivitet.....	4
2.2 Bioteknologiske analysemetodar og kartleggingsverktøy .....	5
2.2.1 Sekvensering – frå Sanger til Third gen sequencing .....	7
3 Material og metode.....	10
3.1 Strategi for søk .....	10
3.2 Søk i databaser.....	13
4 Resultat .....	15
4.1 Inkluderte artiklar .....	16
5. Diskusjon.....	24
6. Konklusjon .....	28
6.1 Forslag til vidare forskning .....	28
7. Referanseliste .....	29



## Tabell- og figurliste

<b>Figur 1:</b> Oversikt over nivå av biodiversitet; økosystemdiversitet, artsdiversitet og genetisk diversitet. Laga av forfattar i Biorender.	2
<b>Figur 2:</b> Maslows behovspyramide, visualisering av menneskelege behov som bygger på kvarandre. Maslows behovspyramide, av Norheim, B. ( <a href="https://ndla.no/image/24723">https://ndla.no/image/24723</a> ). CC BY-SA 4.0.	3
<b>Figur 3:</b> Laga av forfattar i Biorender.com. Oversikt over nivå av genetiske analyser som bidreg til utvikling av tiltak for å bevare biodiversitet, og nokre In situ- og Ex situ former for tiltak (26)	6
<b>Figur 4:</b> Kort oversikt over bioteknologi i samanheng med vern av biodiversitet. Laga av forfattar i Biorender. Figuren viser korleis bioteknologi, både genomiske metodar, genredigering (27) og tradisjonell bioteknologi, samhandlar og gjev kvarandre informasjon. Resultatet av dette styrker den faglege bakgrunnen bak reguleringar og lovar, som igjen kan styrke tiltak som vernar biodiversitet. (28)	6
<b>Figur 5:</b> Oversikt over tre grupper sekvenseringsteknologi; Sangersekvensering, nestegenerasjonssekvensering og tredjegerasjons sekvensering. Ved sekvensering av hypervariable regionar vil TGS etter teorien vere det alternativet som gjer mest korrekt resultat mest effektivt i biodiversitetskontekst. Sangersekvensering og NGS vil også kunne utføre sekvenseringsanalysa, men på bekostning av effektivitet og oppløysing. Figur er laga av forfattar i Biorender.	8
<b>Figur 6:</b> Henta frå litteraturstudiet The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA (30). Figur a og b illustrerer korleis PacBio- og ONT- sekvensering fungerer, respektivt.	10
<b>Figur 7:</b> Flytskjemaet visualiserar stega i seleksjonsprosessen. n = tal artiklar. Toppen av flytskjemaet viser tal identifiserte søketreff. Midtdelen «Seleksjon» viser ledd med definerte årsakar for å filtrere vekk artiklar. Botnen av flytskjemaet visar tal a rtiklar prosessen resulterer i. Figuren er laga av forfattar i Biorender.	11
<b>Tabell 1:</b> Oversikt over informasjonskjelder som er nytta. Databasar, registrar, nettstadar, organisasjonar, referanselister og andre kjelder det har blitt søkt i eller har bidrege til å identifisere artiklar. Informasjonskjelder som er vurderte som meir avansert e og detaljerte skildrast som softistikerte under «sikkerheitsvurdering», medan enklare søkemotorar og nettstader skildrast som enkle.	12
<b>Tabell 2:</b> Skildring av kriteria satt i søkemotor, inkludert design av filtre. Avgrensing av publikasjonsdato, språk og fagfelleavurdering. Utilsikta avgrensingar inkluderer ei geografisk avgrensing til norsk- og engelskspråklege land(denne avgrensinga er ikkje ab solutt). Begge databasane har 25.07.2023 som siste besøksdato. norskspråklege. Søkeord var valt til engelsk språk. 13	
<b>Tabell 3:</b> Oversikt over resultat frå litteratursøk. Alle inkluderte artiklar og eigenskapane deira. Art. nr. for kvar artikkel svarar til nr. på søk i tabell Y., dvs. art. nr. 1 er resultat av seleksjonsprosessen frå søk nr.1 osv. ....	16

## Terminologi og forkortingar

**Biodiversitet** – biologisk mangfald, biologisk diversitet eller biologidiversitet. Variasjon i økosystem, artar og mellom individ(variasjon i DNA).

**Genetisk variasjon** – Variasjon/mangfald i organismars arvestoff, som følgje av bl.a. genetiske mutasjonar og nedarving av dei.

**Konservering** – Vern(her: av natur), ulike formar for ivaretaking av naturlege habitat.

**Invasive artar** – framandartar, artar som ikkje originalt tilhøyrar natur (her: norsk natur).

**TGS** – Third Generation Sequencing. Også omtala som Third Generation NGS.

Tredjegenasjons sekvensering på norsk.

**NGS** – Next Generation Sequencing. Også kalla Second generation sequencing.

Nestegenasjonssekvensering eller andregenasjonssekvensering på norsk. Også omtala som high-throughput sequencing.

**Bp** – Forkorting for basepar, par av nitrogenbasar i DNA.

**Transkriptom** – all transkriptert RNA i ei celle eller organisme,

**Fenotyp/fenotypar/fenotypisk** – synlege trekk hos individ

**Enkeltmolekylsekvensering** - Single molecule sequencing, forkorta til SMS

**PacBio** – Forkorting for Pacific Bioscience, bioteknologiseksap som leverer SMRT Third Gen Sequencing

**ONT** – Oxford Nanopore Technologies, bioteknologiseksap som bl.a. leverer MinION

**MinION** – Berbart sekvenseringsverktøy som nyttar nanoporetologi, av ONT

**Nanopore** – Brønnar, porar eller holrom i metallisk film over chip. Del av ONT MinION

# 1 Innleiing

Bevaring av biodiversitet er ei global utfordring som har fått auka merksemd etter Parisavtala i 2015 (1). Denne inspirerte gjennomføringsplanen for Naturavtala i 2022, vedteken av FNs konvensjon om biologisk mangfald (2). Naturavtala har som føremål å sikre og bevare biodiversitet globalt, minst 30% av land og hav innan år 2030 (3). Problemstillinga i litteraturstudiet er kartlegging av TGS sitt potensial i generering av data til grunnlag for biodiversitetsbevarande arbeid. Fokus for oppgåva er på å vurdere til kva grad bruk av TGS i eksperimentell metode kan generere nødvendig data, som hypervariable gensekvensar og heile genom hos artar. Nødvendig data for biodiversitetsanalysar kan laust definerast som taksonomisk data, delar av- og heile- genomsekvensar hos artar og softwares for biodiversitetsdata som gir grunnlag for nødvendige analysar innan biodiversitet (genetisk samanlikning, evolusjonsstudiar, analyse av artars miljøeffekt og artars slektskap osv.(4)). Innunder dette vil det fokuserast på breidda hos TGS; i bruk på tvers av biologiske klassifikasjonar og hybride forsøk der meir enn éin TGS-metode nyttast ilag. Metodar og tiltak for å bevare det biologiske mangfaldet har lenge vore retta mot *in situ* vern av utvalde habitat og artar, som t.d. planting av skog og vern av utsette naturområde, som skildra i kapittel 2.1. Henting av litteratur har vist at det eksisterer lite forskingslitteratur om dette temaet på norsk. Forfattar kommenterer utifrå dette at det er behov for eit norskspråkleg litteraturstudium som tek føre seg temaet og TGS sin teknologiske utvikling.

## 2 Bakgrunn

### 2.1 Biodiversitet

Alberta Biodiversity Monitoring Institute (ABMI) skildrar biodiversitet som «variasjonen av livsformer; alle artar av dyr, plantar, sopp, bakteriar og arkear» (5). Biodiversitet kan også i utvida betydning omfamne nettverket av økosystem og alle økologiske prosessar levande organismar inngår i (5). I denne utvida betydninga er biodiversitet nødvendig for heile planetens klima og evne til å oppretthalde liv (5). Biologisk mangfald kan skildrast på ulike nivå, som forsøkt skildra i figur 1. Biologisk mangfald kan delast inn i økosystem-, arts- og genetisk mangfald. Økosystemmangfald inneber variasjonen i habitat, deira økologiske prosessar og samliv mellom økosystemets artar (5). Artsmangfald kan skildrast i førekomst av dyre- plante- og mikroorganismeartar i eit bestemt område og/eller økosystem (5). På dette kompleksitetsnivået vurderast biodiversitet som høgare dess fleire artar som er til stades i

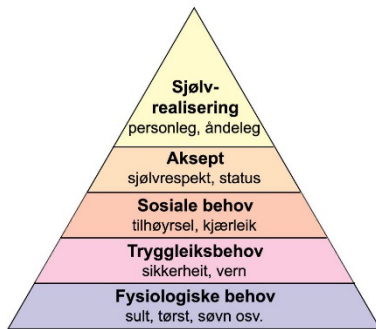
økosystemet. Genetisk mangfold inneber genotypiske og fenotypiske variasjonar mellom individ av same art. Høgt nivå av gendiversitet hos ein art vil seie at individa har eit breitt mangfald av fenotypar. Større variasjon av eigenskapar betyr hurtigare tilpassing til miljøet, og dermed større sjansar for overleving. Genetisk variasjon er dermed nødvendig for overleving hos artars og økosystem.



Figur 1: Oversikt over nivå av biodiversitet; økosystemdiversitet, artsdiversitet og genetisk diversitet. Laga av forfatter i Biorender.

#### Økologisk balanse og verdi for mennesket

Alle jordas livsformer er avhengige av biodiversitet (5). Mangfaldet bidreg til stabilitet og levedyktigheit i jordas økosystem, slik at prosessar som pollinering, vassreinsing og næringsstoffsyklusar kan oppretthaldast (5). Biodiversitet trengs også for at organismar skal ha tilgang på mat, medisinar og råmateriale (5)(6). Dømer på viktige produkt som originalt er utvinna frå levande organismar er mange; eit er antibiotikamedisin henta frå soppen *penicillin* (6). Utover fysiologiske behov og tryggleiksbehov har biodiversitet potensial til å skape livsrikande estetisk-, kulturell- og rekreasjonsverdi (5). Biologisk mangfald inspirerer også til kunst, litteratur og spirituell aktivitet, som vist i toppen av Maslows behovspyramide i figur 2.



Figur 2: Maslows behovspyramide, visualisering av menneskelege behov som bygger på kvarandre. Maslows behovspyramide, av Norheim, B. (<https://ndla.no/image/24723>). CC BY-SA 4.0.

Nytteområdet biodiversitet bidreg til er bredt. Ved ekstremvêr, toksiske industrielle utslipp eller anna potensielt farleg aktivitet bidreg artsdiversitet til raskare restaurering av økosystem (7)(8). Menneskje har i århundrar imitert og tatt inspirasjon frå levande organismar og natur. Biomimikk ligg t.d. bak både medisnutvikling (6) og er eit vanleg motiv for kunst (8). Eit av mange eksempel på biomimikk er borrelåsen, som er inspirert av planten *Arctium*, Borre (9). Større utval av gen blant matplanter aukar sjansane for eigenskapar som gjer dei meir attraktive som matkjelde, inkl. sjukdomsresistans som kan gje helsefordelar for menneska som et dei (8). I tillegg til å kunne inspirere til berekraftig teknologi og løysingar gjennom biomimikk, fører variasjon av gen til raskare miljøtilpassing hos artar. Eit døme på kvifor dette er viktig er pollinatorar; er bier og humler lite tilpassingsdyktige, kan vi risikere å miste denne pollineringa av blomstrar (5). Døme på rask miljøtilpassing er karbonfikserande fytoplankton i havet (10). Hurtigare utskifting av genetisk materiale og nye eigenskapar hos organismar kan dermed by på direkte løysingar på klimaproblem. Dette er nokre av årsakene til at biodiversitet er viktig å ivareta. (6, 7, 8)

Alle fordelane som følgjer med bevart biodiversitet vil også seie at tap av biodiversitet kan føre til betydelege konsekvensar for bl.a. økosystem og menneskjers helse (11). Ei rekke menneskelege aktivitetar utgjer ein trussel mot global biodiversitet og har ført til nedgang i biodiversitet (12). Dømer på menneskeleg aktivitet er industriell aktivitet (12).

Klimaendringar er ei indirekte form for menneskeleg aktivitet som utgjer ein trussel for biodiversitet (12). Biodiversitet kan målast med raudlisteindeksen (13), der tal artar med høg risiko for å døy ut avgjer grad av biodiversitet for eit land. FN's konvensjon om biologisk mangfald har innført pålegg som skal sørge for at FN-landa samarbeider for å ivareta biodiversitet internasjonalt (2). (11, 12, 13)

### Døme på menneskeleg aktivitet

Eit døme på menneskeleg aktivitet som i tillegg til klimaendringar som utgjer ein trussel mot spesielt trua naturtypar, og dermed biodiversitet, er invasive artar (14). Artar som normalt ikkje skal holde til i Noreg men som har blitt importert inn reknast som framande, invasive artar (15). Invasive artars introduksjon og spreining i økosystem er vurdert som ein risiko mot biologisk mangfald (14) i varierende grad, etter økologisk effekt og invasjonspotensial(16). Ved å tre inn i norske økosystem, bl.a. gjennom import på tvers av landegrensar, har invasive artar potensial til å forstyrre økosystem og sette dei i ubalanse (14). Invasive artar kan ha eigenskapar som tillét dei å trenge inn i økosystem ved å dominere sterkt over andre artar (17). Dette kan utgjere stor skade dersom artane dei utkonkurrerar spelar ei sentral rolle i økosystemet, t.d. om dei utgjer ei næringskjelde som økosystemet er avhengig av. Kompleksiteten til økosystema gjer dei sårbare for invasive artar (18). Fordi det er kjent at artar i eit økosystem kan ha ei rekke roller, bl.a. som næringskjelder, halde andre bestandar under kontroll og nedbryting, er det kjent at utkonkurrering av ein eller få artar kan vere av relativt stor betydning. (14, 15)

Eit eksempel på ein invasiv art er ertheblomen hagelupin, eller *Lupinus polyphyllus* (15). Hagelupinen vart frakta til Europa i 1826 som hageplante, og vart for første gong dokumentert som viltveksande i Noreg i år 1913(15). Planten er i dag eit vanleg syn langs norske vegar, jernbaner og andre stadar der jord ofte er næringsfattig (15). Vegvesenet i Noreg pleidde å plante hagelupin i i vegkantane av estetiske grunnar(hagelupin veks tett og har sterke fargar) og sin «stabiliserande» effekt på jordsmonnet; det vil seie at hagelupin lev i symbiose med nitrogenfikserande bakteriar (19). Likevel er den på Fremmedartslista(publisert 11.august 2023, også kalla svartelista)(20) vurdert som vært høg risiko(SE), basert på økologisk effekt, evne til invasjon, geografisk effekt og klimaeffekt (15). Dette kjem av at arten har høgt invasjonspotensiale; Hagelupin spreiar seg relativt fort, og har evne til å dominere over og konkurrere ut artar som tilhøyrar norsk natur (17)(19). Hagelupin er av denne grunn vurdert til å ha sterk økologisk påverknad, det er difor ikkje ønskeleg å ha denne arten i ukontrollert vekst (17). (15, 17, 19)

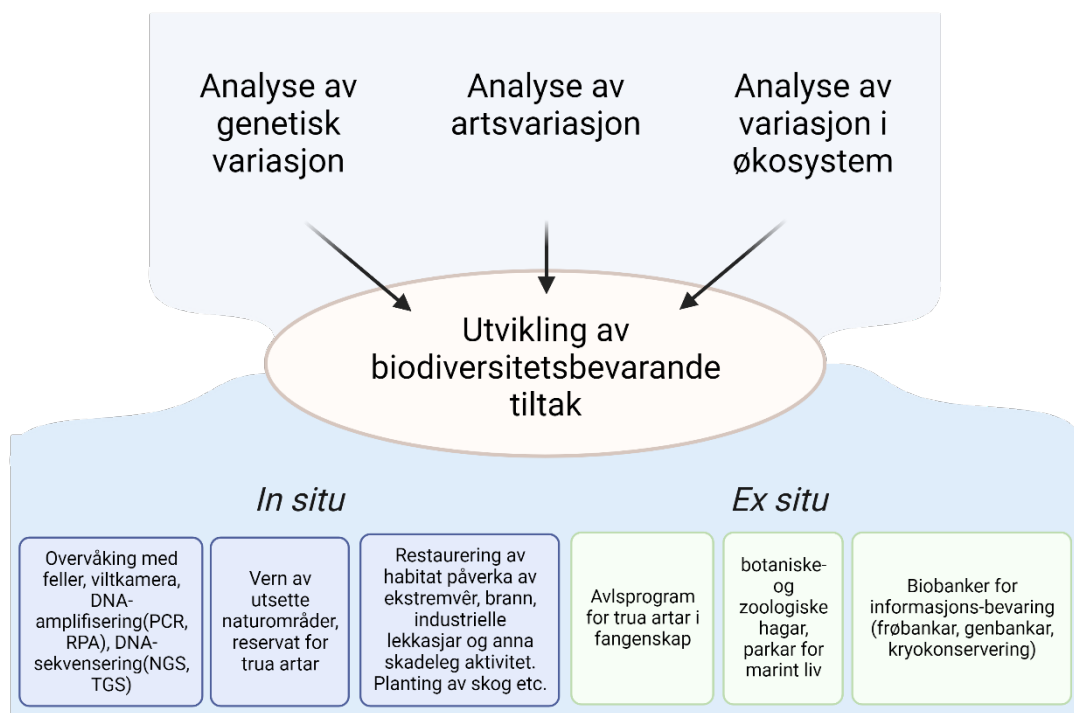
Det er einigheit i at konserveringstiltak kan seiast å vere avgjerande for å hindre tap av biologisk mangfald. Generelt kan tiltak kan ta form som etablering av freda naturområde, implementering av berekraftig forvaltingspraksis og habitatrestaurering (21). Det er i tillegg nødvendig med auka kunnskap og bevisstheit rundt biodiversitet, som bl.a. Artsdatabanken

arbeidar med. Dette er viktig for å auke forståing av biodiversitetens verdi både for enkeltpersonar, samfunn og politikarar for at kunnskapsbaserte forvaltingsval skal bli tekne. Redning og bevaring av biodiversitet er ikkje berre nødvendig for artars overleving, men også for langsiktig berekraft og planetens levedyktigheit (22). I følgje FNs biodiversitetskonvensjon krevst global innsats for å bevare jordas biodiversitet på alle nivå (2). Ei av hovudårsakane bak invasive artars introduksjon til Noreg er planteimport (23). Rapportane til Norsk Institutt for Naturforskning (NINA) sine planteimportprosjekt visar dagens situasjon og utvikling i planteimport og invasive artar i Noreg (23).

Som tiltak for å bevare biologisk mangfald utførast bevaring av genetisk materiell i bankar, som Svalbard Globale Frøhvelv (24) og digitale bibliotek for gensekvensar (25). Frøhvelvet i Svalbard oppbevarer frø frå matplanter frå heile verda, nettopp fordi genetisk diversitet er avgjerande for fôr- og matforsyning og dermed viktig å bevare (24). NCBI GenBank er døme på ei internasjonalt tilgjengeleg database med alle offentleg publiserte DNA-sekvensar (25).

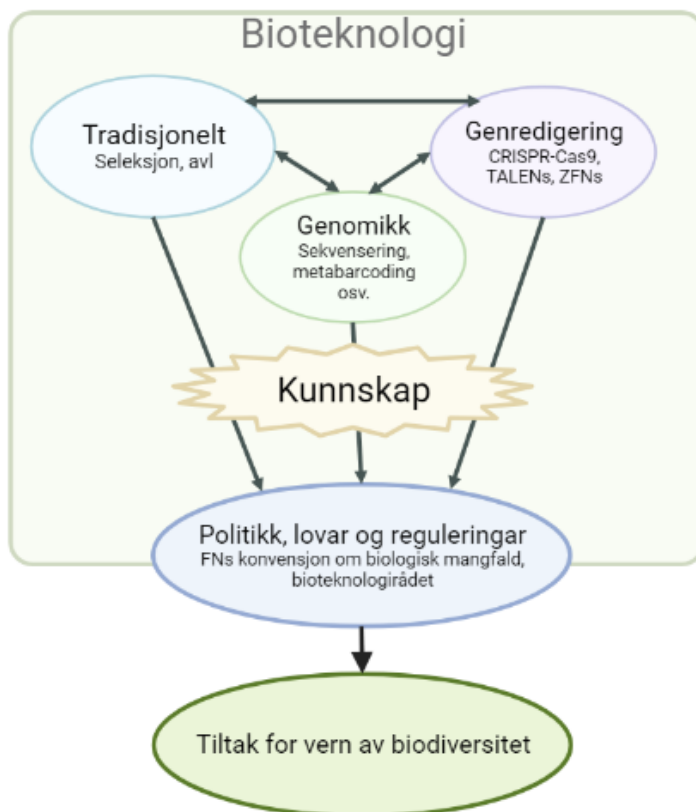
## 2.2 Bioteknologiske analysemetodar og kartleggingsverktøy

Ei rekke bioteknologiske løysingar har dokumentert potensial for å bidra, direkte eller indirekte, til ivaretaking av individ, artar, populasjonar og økosystem; Figur 3 er ei oversikt over dømer på bioteknologiske løysingar som har vorte nytta i biodiversitetskontekst (26).



Figur 3: Laga av forfattar i Biorender.com. Oversikt over nivå av genetiske analyser som bidreg til utvikling av tiltak for å bevare biodiversitet, og nokre In situ- og Ex situ former for tiltak (26)

Kombinasjonar av desse verktøya kan potensielt føre til meir effektive biodiversitetsanalysar med utarbeiding av mangfaldsbevarande tiltak som hensikt (26). Figur 4 visualiserar bioteknologiske løysingar til bruk i å utvikle konserveringstiltak.



Figur 4: Kort oversikt over bioteknologi i samanheng med vern av biodiversitet. Laga av forfattar i Biorender. Figuren viser korleis bioteknologi, både genomiske metodar, genredigering (27) og tradisjonell bioteknologi, samhandlar og gjev kvarandre informasjon. Resultatet av dette styrker den faglege bakgrunnen bak reguleringar og lovar, som igjen kan styrke tiltak som vernar biodiversitet. (28)

Sekvensering, metoden der rekkjefølga av basepar i ein eller fleire DNA-sekvensar blir identifisert (29), nyttast i stor skala i sekvenseringsprosjekt for å utvide gendatabasar. Sekvenseringsprosjekt kan t.d. ha som føremål å sekvensere heile genomet hos ein bestemt art og dermed få informasjon om fenotypar, historie og slektskap, eller det kan kartleggast eit



bestemt, ukjend mikrobiom. I tillegg til genom kan det også sekvenserast proteom, totalt protein, eller transkriptom, totalt mRNA hos ei celle (29). Dette vil gje ulik informasjon enn genomsekvensering da arvestoffet har blitt modifisert før og etter transkripsjon av DNA og translasjon til protein (29).

Dømer på sekvenseringsprosjektet er Human Genome Project (HGP) (30), Earth Biogenome Project (EBP) (30), Earth Microbiome Project (EMP) (30) og California Conservation Genomics Project (CCGP) (31). HGP, sekvenseringa av heile det menneskelege genomet, er no fullført etter 13 år med internasjonal samarbeidsinnsats (30). Utbyttet frå prosjektet er utvida kunnskapsbase for ei rekke genetisk overførbare eigenskapar, slektskap, sjukdom og andre helseaspekt (30). CCGP skriv på si heimeside at det har som målsetnad å lage den mest omfattande multi-art-genomiske datasettet nokon gong, samansett for å bidra til styring og beskyttelse av regional biodiversitet i møte med klimaendringane (30).

Ei tilnærming innan sekvenseringsprosjekt er å samle miljø-DNA-prøvar frå natur ein ønsker å undersøke (32). Organismar slepp frå seg fragment av DNA ettersom det rører på seg, dette kan analyserast for å identifisere artsmangfald i t.d. ein innsjø (32). Sekvensering av eDNA-prøver kan fungere som overvaking av habitatet der prøven er henta (32). Dette kan gi informasjon om artsmangfaldet i eit økosystem, og kan også fortelje om endringar i økosystem over tid (32). Etter sekvensering blir rådata (DNA-sekvensane) analysert ved hjelp av bioinformatiske verktøy og sett opp mot genbankar/databasar (32). Resultata frå sekvenseringsprosjekt kan deretter lagrast i databasar slik at forskarar globalt kan få tilgang på informasjonen. Dette kan lette vidare forskning på biodiversitet. Slik kan sekvenseringsprosjekt danne grunnlag for val av utvikling av biodiversitetsbevaringstiltak.

### 2.2.1 Sekvensering – frå Sanger til Third gen sequencing

TGS vart første gong skildra i 2009, Next Generation Sequencing(NGS) kom føre TGS (33). Før NGS var teken i bruk, hadde Sangersekvenseringa allereie revolusjonert biologisk forskning gjort det mogleg å sekvensere DNA-sekvensar (33). Arbeidet var tidkrevjande og dyrt, og berre mindre DNA-sekvensar kunne vellykka sekvenserast med Sangersekvensering (33). NGS gjorde det mogleg å sekvensere både litt fleire bp, på eit tidspunkt 400-500bp, og fleire DNA-sekvensar parallelt med kvarandre i same sekvenseringsanalyse; masseparallellsekvensering (33). (33, 34)

Teknologien utvikla seg raskt, og lenga på DNA-sekvensar som kunne sekvenserast aukte (33). Dette markerar overgangen til det som omtalast som TGS-teknologi. Med TGS kunne enda lengre dna-sekvensar sekvenserast (over 10kbp), også samstundes, som gjorde sekvensering av fulle genom betydeleg meir effektivt, både tid- og pengesparande (33). Fleire bp lengd på sekvensar som kan sekvenserast kan omtalast som høgare taksonomisk oppløysing. Ein mogleg definisjon på TGS er metodar for enkeltmolekylsekvensering (Single molecule sequencing, SMS). SMS skil seg frå tidlegare metodar ved at det ikkje krevst amplifisering av DNA-et før sekvenseringa (34). Individuelle DNA-sekvensar sekvenserast direkte slik at amplifisering ikkje er nødvendig, ved å fjerne dette leddet fjernar ein også potensielle feilkjelder (34). Hovudforskjellen mellom Sangersekvensering, NGS og TGS er forsøkt skildra i figur 5.

Type sekvensering	DNA-fragment som kan sekvenserast under 1 analyse	Forskjellar ved sekvensering av hypervariable regionar
Sanger-sekvensering	→ 1 DNA-fragment	Vil med høgt sannsyn lykkast, men vil vere den mest tidkrevjande alternativet.
Next gen sekvensering	→ >1 DNA-fragment	Vil mest sannsynleg lykkast. Har liten feilrate (~0,1%), men tidkrevjande på grunn av avgrensing av sekvenslengde
Third gen sekvensering	→ >1 DNA-fragment, fleire bp / lengre	Vil gje mest nøyaktig resultat på kortast tid. Har større feilrate (10-15%), må kanskje supplerast med andre typar sekvensering

*Figur 5: Oversikt over tre grupper sekvenseringsteknologi; Sangersekvensering, nestegenerasjonssekvensering og tredjegerasjons sekvensering. Ved sekvensering av hypervariable regionar vil TGS etter teorien vere det alternativet som gjer mest korrekt resultat mest effektivt i biodiversitetskontekst. Sangersekvensering og NGS vil også kunne utføre sekvenseringsanalysa, men på bekostning av effektivitet og oppløysing. Figur er laga av forfattar i Biorender.*

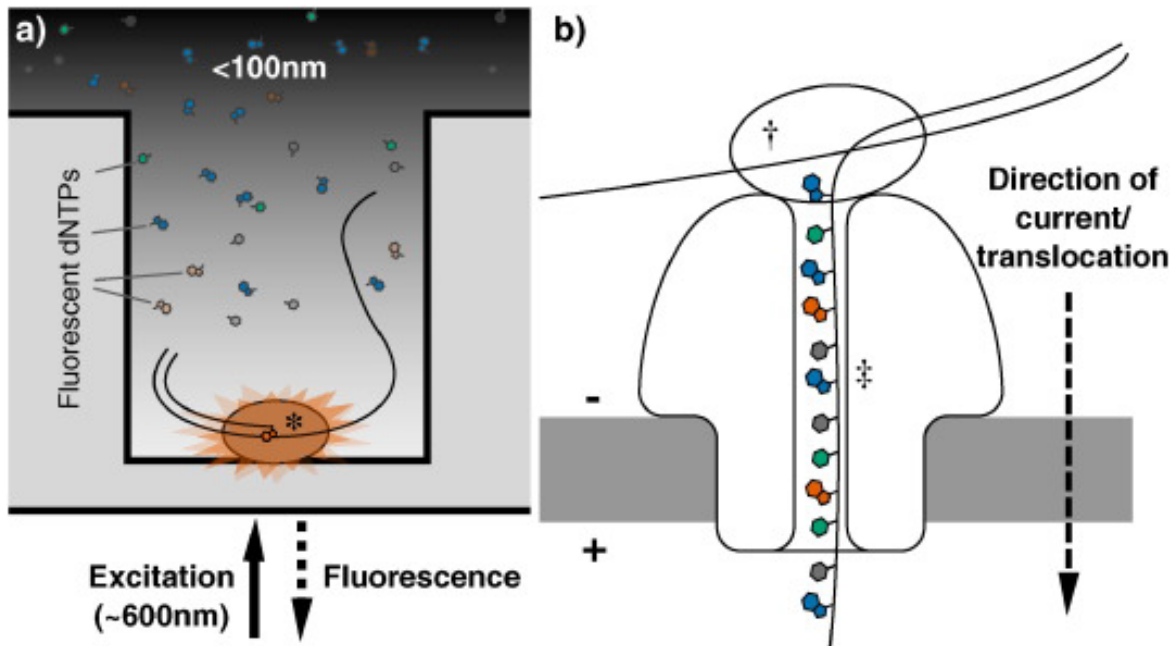
TGS kan sekvensere ulike formar for arvestoff, både genom og transkriptom (34). Medan genom refererer til alle genetiske sekvens i ei organisme, er transkriptom alt mRNAet transkribert i ei celle eller organisme (35). Det vil seie at fleire variasjonar mellom individ av same art er forventa, fordi det er gjort posttranskripsjonelle modifikasjonar frå den opprinnelege gensekvensen (36).

Dei to mest kjende metodane i skrivande stund som inngår under TGS er Single Molecule Real Time-sekvensering (SMRT-sequencing) frå Pacific Bioscience (PacBio) og Nanopore-sekvensering frå Oxford Nanopore Technologies (ONT) (33). SMRT-sekvensering er basert på deteksjon av fluorescente dNTP-er, som illustrert i figur 6a (33). SMRT-sekvensering skildrast i litteraturstudiet «The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA» som følger, parafrasert til norsk: Nanoporer er syntetiserte hulrom i ein membran, i form av ein metallfilm over ein chip (33). I desse nanoporene skjer polymerisering av DNA (33). I denne prosessen vil lys sleppast ut i nanoporene som lysar opp botnen av kvar nanopore/hulrom/brønn (33). Dette skjer ved at lyset som detekterast går gjennom optiske blenderåpningar(apertur) med mindre diameter enn lysets bølgelengd slik at lyset lysar opp botnen av brønnane (33). Slik bli enkelt-fluorofor-molekyl synleggjort nært botn av nanoporane, utan forstyrring frå nabo-nanoporane sia grunna lysets lave eksitering (33). Enkelt-DNA-molekyla festast til brønnane ved at dei «vaskast» over eit valt DNA-bibliotek med fluoriserande dNTP-er slik at DNA-molekyl som festar seg kan monitorerast i real-time (33). Signalet for posisjonen/brønnen stoppast ved at fargen/lyset blir kløyvd vekk (33). Nanoporestrukturane kallast også for zero-mode waveguides (ZMWs) (33).

Ei svak side ved SMRT-sekvensering er den høge feil-rata. I følgje Pacific Biosciences har deira SMRT ein feil-rate på om lag 11% (37), Rémi Allio Marie-Ka Tilak et al skriv at denne teknologien har ei feilrate på 10-15% (38). Likevel er TGS eit nyttig verktøy i forskning; Forsking av Hongxia, Ming et. al. viser at SMRT kan avdekke alle hypervariable regionar av 16S rRNA-gena, noko som kan mogleggjere høg grad av bakterieklassifisering (39). Feila som oppstår i bruk av SMRT visar seg å oppstå tilfeldig i følgje PacBio, slik at ein ved å sekvensere fleire gonger kan rette opp i feil og kartlegge gensekvensar fullstendig (37). «biological insight is gained through averaging the sequences from multiple reads that map to the same region in the reference, in other words, by building consensus» -Jonas Korlach, Pacific Bioscience (37)

ONT sitt sekvenseringsverktøy MinION er eit anna velkjent TGS-verktøy, som i tillegg har fordelen av å vere berbar, sjå fig.7 for illustrasjon. Litteraturstudiet «The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA» (33) skriv at før NGS var introdusert, hadde forskning vist at ssRNA eller ssDNA evna å vandre gjennom dobbel lipidmembran ved å bli transportert gjennom store  $\alpha$ -hemolysin-ionkanalar i elektroforese (33). Dette funnet danna grunnlaget for tanken om nanopore-sekvensering; Først er dsDNA denaturert av enzym utanfor ein membran (33). I syntetiske nano-porer på membranen kan den enkelttråda DNA-

en passere gjennom, noko som genererer straum, og dermed kan målast (33). Dette er skildra under i figur 6b. (33)

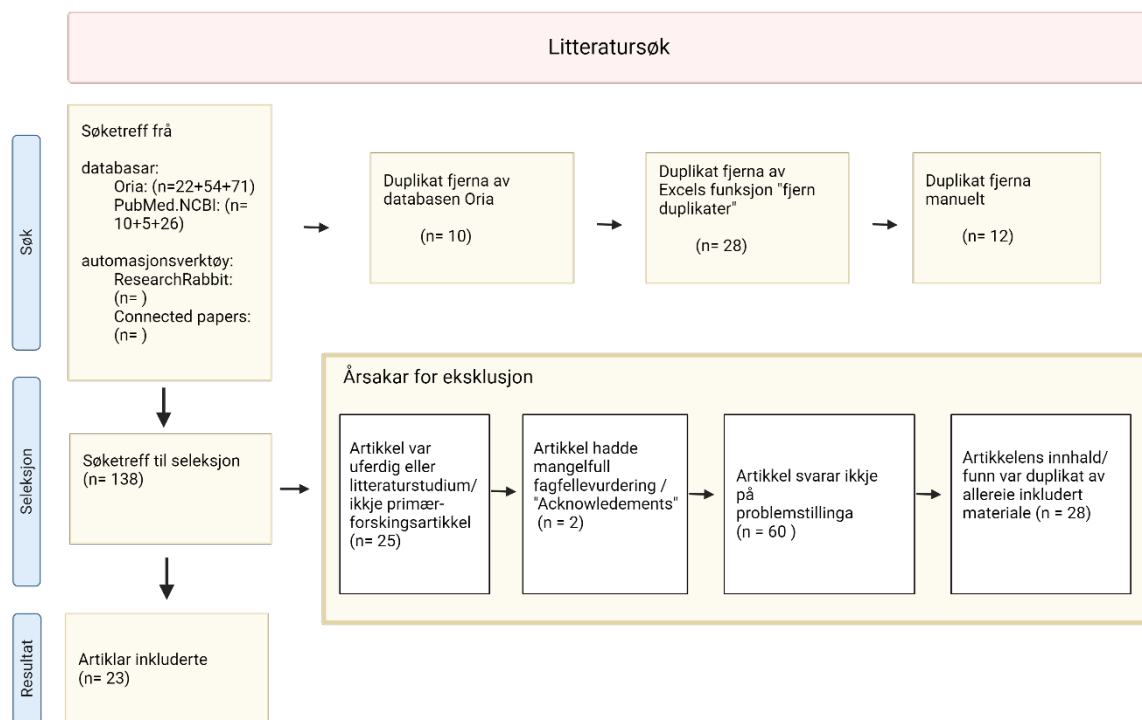


Figur 6: Henta frå litteraturstudiet *The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA* (30) (CC BY 4.0). Figur a og b illustrerer korleis PacBio- og ONT- sekvensering fungerer, respektivt.

### 3 Material og metode

#### 3.1 Strategi for søk

Litteraturstudium er valt som forskingsmetode for å svare på problemstillinga. Litteratursøket er utført i to databasar. Litteratursøket kan delast inn i databasesøk og seleksjon/screening. Figur 7 visar tal treff og tal ekskluderte artiklar for kvart steg i dei to delane. Seleksjon eller avgrensing som ikkje kan styrast er metadata kopla til søkeord og geografisk avgrensing som følgje av språkfilter.



Figur 7: Flytskjemaet visualiserar stega i seleksjonsprosessen.  $n$  = tal artiklar. Toppen av flytskjemaet viser tal identifiserte søketreff. Midtdelen «Seleksjon» viser ledd med definerte årsakar for å filtrere vekk artiklar. Botnen av flytskjemaet visar tal artiklar prosessen resulterer i. Figuren er laga av forfattar i Biorender.

Etter søk i databasane som skildra i tabell 1, blei alle treff eksportert til excel for seleksjon. Innleiingsvis blei duplikat identifiserte og fjerna; Av alle tre søka i databasen Oria var 10 duplikat detekterte. Ved å lagre treff frå alle søk i same liste, blei duplikatisk fjerna; dette utgjorde 10 artiklar. Etter fjerning av desse 10 duplikata gjenstod 137 ( $22 + 54 + 71 - 10$ ) unike artiklar frå Oria. Titlane på dei 137 treffa pluss 41 ( $10 + 5 + 26$ ) treff frå PubMed utgjør 178 artiklar. Titlane på dei 178 treffa blei overført til ei kolonne i Microsoft Excel(A1:A177). Modifikasjonar gjort i kolonne A1 for at Excel skal kunne identifisere alle duplikat var:

- Alle bokstavar formatert likt
- Fjerning av mellomrom først og sist i titlar
- Fjerning av punktum sist i titlar
- Alle bokstavar omgjort til minusklar

Deretter blei kolonne A1 markert, funksjonen "fjern duplikater" blei utført på markerte celler. 28 dupliserte verdiar vart funne og fjerna, som gir 150 (178 – 28) gjenstående treff. Under seleksjon av artiklar avdekkja forfattar manuelt 12 duplikat som følgje av punkt- og mellomromvariasjonar midt i artikkelens tittel på tvers av databasane. Duplikata blei fjerna. Dei 138 (150 – 12) unike treffa blei overført til kjeldeføringsprogrammet Zotero for seleksjon.

Vidare blei søketreffa selekterte i fire steg, visualisert i fig. 9. Treff blei ekskludert dersom 1)treffet var litteraturstudium, uferdig eller ikkje primærforskning, 2)fagfellevurdering / «acknowledgements» var mangelfull, 3)artikkelen var irrelevant/svarte ikkje på oppgåvas problemstilling eller 4)treffets innhald var duplikat, i denne rekkjefølga. Av dei 138 treffa var 25 artiklar fjerna av årsak nr.1, 2 av årsak nr.2, 60 av årsak nr.3 og 28 artiklar var ekskludert av årsak nr.4. Tilsaman var 115 (25 + 2 + 60 + 28) ekskluderte artiklar. Totalt tal inkluderte artiklar blei dermed 23 (138 – 115).

Med duplikat av innhald(årsak nr.4) meinast at tidlegare inkluderte artiklar allereie har dekkja det artikkelen skriv av relevans, slik at bidraget frå artikkelens funn ikkje er essensielt å inkludere. Dersom eksklusjon vurderast av denne årsaka, har artikkelens refereanseliste blitt analysert for å sjå om artiklar refererer til kvarandre. Det er valt å gruppere fagleg innhald for å unngå duplikat av innhald.

Referanselista hos kvart søketreff var analysert for kvalitetssikringshensyn; 4 artiklar hadde under 25 referansar, 11 artiklar hadde over 100 referansar. For få referansar kan tyde på uferdig eller utilstrekkeleg gjennomført artikkel, medan for mange kan tyde på liten grad av eige arbeid. Etter ei vurdering vil ikkje desse rammene fungere som eksklusjonsgrenser.

*Tabell 1: Oversikt over informasjonskjelder som er nytta. Databasar, registrar, nettstadar, organisasjonar, referanselister og andre kjelder det har blitt søkt i eller har bidrege til å identifisere artiklar. Informasjonskjelder som er vurderte som meir avansert e og detaljerte skildrast som softistikerte under «sikkerheitsvurdering», medan enklare søkemotorar og nettstader skildrast som enkle.*

Namn på kjelde	Type kjelde (Database, register, nettstad, organisasjon,	Skildring	Siste dato for søk

	referanseliste etc.)		
Oria	Database	NTNUs database med fagfelleverderte artiklar, aviser, bøker og tidsskrifter.	17.07.2023
PubMed.NCBI	Database	Internasjonalt anerkjent database med fagfelleverderte artiklar innan bioteknologi.	17.07.2023

### 3.2 Søk i databaser

Innleiande kriterium bak litteratursøk inkluderer filter for dato, språk og type tekst (artikkel, avis, bokkapittel, tidsskrift, litteraturstudium osv.). Med artikkel meinast artiklar der primærforskning/original forskning er utført. Artiklar der original forskning ikkje er utført, som gjengjer andre sin forskning, er forsøkt selektert ut. Manuell eksklusjon fjerna slike artiklar som gjekk forbi filteret. Fagfellevurdering er gjort basert på databasens egne fagfellevurdering, vurdering av «acknowledgements»-seksjon og i tilfelle der dette ikkje var tilstrekkeleg, sjekklista til Peer Review Electronic Search Strategies(PRESS).

*Tabell 2: Skildring av kriteria satt i søkemotor, inkludert design av filtre. Avgrensing av publikasjonsdato, språk og fagfellevurdering. Utilsikta avgrensingar inkluderer ei geografisk avgrensing til norsk- og engelskspråklege land(denne avgrensinga er ikkje absolutt). Begge databasane har 25.07.2023 som siste besøksdato. Språkfiler er gjort forskjellig mellom databasane fordi norsk språk ikkje var eit alternativ for søka hos databasen Oria, fordi inga av treffa var norskspråklege. Søkeord var valt til engelsk språk.*

Søk Nr.	Informasjon s-kjelde	Enkelt / avansert søk Søkeord	Filter			Tal treff
			Publiseringsdato	Språk	Andre	
1		Avansert søk → Alle felt inneheld «biodiversity» OG Alle felt inneheld «SMRT»	01.01.2020 – 25.07.2023	Engelsk	Materialtype: Artikkel + Fagfellevurdert: ja	22

					+ Ekskluder materiale ditt bibliotek ikkje har tilgang til	
2	Oria	Avansert søk →Alle felt inneheld «biodiversity» OG Alle felt inneheld «third gen sequencing» →ELLER Alle felt inneheld «third gen sequencing» OG Alle felt inneheld «biodiversity»	01.01. 2020 – 25.07. 2023	Engelsk	Materialtype: Artikkel + Fagfellevurdert: ja + Ekskluder materiale ditt bibliotek ikkje har tilgang til	54
3		Avansert søk →Alle felt inneheld «biodiversity» OG Alle felt inneheld «Oxford Nanopore»	01.01. 2020 – 25.07. 2023	Engelsk	Materialtype: Artikkel + Fagfellevurdert: ja + Ekskluder materiale ditt bibliotek ikkje har tilgang til	71
4		Avansert søk (biodiversity[Title/Abst ract]) AND (third generation sequencing[Title/Abstra ct]	2020- 2023	Engelsk og norsk	Materialtype: Ikkje review eller systematic review + Ekskluder materiale ditt	10



					bibliotek ikkje har tilgang til	
5	PubMed.N CBI	Avansert søk (biodiversity[Title/Abstract]) AND (SMRT[Title/Abstract])	2020- 2023	Engelsk og norsk	Materialtype: Ikkje review eller systematic review + Ekskluder materiale ditt bibliotek ikkje har tilgang til	5
6		Avansert søk (biodiversity[Title/Abstract]) AND (Nanopore[Title/Abstract])	2020- 2023	Engelsk og norsk	Materialtype: Ikkje review eller systematic review + Ekskluder materiale ditt bibliotek ikkje har tilgang til	26

I tillegg til databasane vart verktøy nytta for å danne siteringsbaserte kart over relaterte artiklar, til hjelp i gruppering av søketreff. Research Rabbit og Connected Papers omsette automatisk søkestrings frå ei database til ei anna. Ekstra hensyn tas sia verktøya kan ha bias i form av at artiklar som er sitert mange gonger dukkar opp oftare, og av denne grunn får fleire siteringar, ei effekt artiklar med færre siteringar ikkje vil oppleve.

## Resultat

Resultata frå litteratursøket er henta som forklart under «metode». Resultatet tek form i ein tabell over alle inkluderte artiklar, som nemnt nedst i figur 7. I tillegg til tittel og forfattarar, er fokus i tabellen på artiklanes relevans for litteraturstudiet. Det er trekt ut kva som gjer at kvar artikkel bidreg til å svare på litteraturstudiets problemstilling.

#### 4.1 Inkluderte artiklar

Tabell 3: Oversikt over resultat frå litteratursøk. Alle inkluderte artiklar og eigenskapane deira. Art. nr. for kvar artikkel svarar til nr. på søk i tabell Y., dvs. art. nr. 1 er resultat av seleksjonsprosessen frå søk nr.1 osv. Artikkel nr. 1.1 til 6.2 tilsvarar henholdsvis til artikkel nr. 40 til 62 i referanselista.

Art nr., tittel	Forfattarar. Tidsskrift for publikasjon, tidspunkt for publisering	Konklusjon og relevans
1.1, SMRT sequencing of the full-length transcriptome of the <i>Rhynchophorus ferrugineus</i> (Coleoptera: Curculionidae)	Hongjun Yang, Danping Xu, Zhihang Zhiu, Jiameng Hu & Baoqian Lu. PeerJ; Zoological science, 21.05.2020	Klarte å bruke SMRT sekvensering(PacBio) i kombinasjon med Illumina for å sekvensere heile transkriptomet hos rød palmesnutbille, som i liten grad er kartlagd tidlegare. Forsøket viser at avgrensingar ved bruk av SMRT kan overkommast ved å kombinere teknologiar(Illumina).
2.1, Identifying the ‘unidentified’ fungi: a global-scale long-read third-generation sequencing approach	Leho Tedersoo, Sten Anslan, Mohammad Bahram, Urmas Kõljalg & Kessy Abarenkov. Springer Link, 08.08.2020	Studiet utforska bruk av TGS for å artsbestemme soppar(gjennom sekvensering av rRNA-operon). Det blei konkludert med at forsøket var mislukka grunna begrensa «reading depht» på plattformen PacBio RS II(no utdatert). Forfattarane anbefalar å velje i bibliotek etter storleik(>1000bp) for å sikre tilstrekkeleg dekking av rRNA-operonet.

<p>2.2, Comparing the accuracy and efficiency of third generation sequencing technologies, Oxford Nanopore Technologies, and Pacific Biosciences, for DNA barcode sequencing applications</p>	<p>Piotr Cuber, Darren Chooneea, Clementine Geeves, Silvia Salatino, Thomas J Creedy, Claire Griffin, Laura Sivess, Ian Barnes, Ben Price &amp; Raju Misra. Ecological genetics and genomics, 01.09.2023</p>	<p>TGS, både ONT og PacBio, er samanlikna med sangersekvensering for sekvensering av lengre DNA-sekvensar for 200+ artar virvellause dyr. ONT og PacBio har eit stort potensial i biodiversitetsforskning og danning av grunnlag for å planlegge og budsjettere tiltak for å bevare biodiversitet.</p>
<p>2.3, Nanopore sequencing of microbial communities reveals the potential role of sea lice as a reservoir for fish pathogens</p>	<p>Ana Teresa Gonçalves, Rayen Collipal-Matama Valentina Valenzuela-Muñoz, Gustavo Nuñez-Acuña, Diego Valenzuela-Miranda, and Cristian Gallardo-Escárate. Scientific Reports (Nature Publisher Group), 19.02.2020</p>	<p>Første gong ONT MinION er nytta for å studere ein akvatisk invertebrat. Med ONT blei datasett om patogen generert. Forskarane opplevde feilraten til ONT som ei hindring, men ikkje ved mikrobielle analysar då lengda på DNA-sekvensar som kan sekvenserar kompenserar. Fordelar ved ONT MinION er berbarheita og relativt lav innkjøpspris.</p>
<p>2.4, Soil fungal diversity of birch plantations on former agricultural land resembles naturally regenerated birch stands on agricultural and forest land</p>	<p>Reimo Lutter, Taavi Riit, Ahto Agan, Elisabeth Rähn, Arvo Tullus, Reeno Sopp, Katri Ots, Marju Kaivapalu, Kristjan Täll, Tea Tullus, Leho Tedersoo, Rein Drenkhan &amp; Hardi Tullus. Forest Ecology and Management, 15.08.2023</p>	<p>Vellykka bruk av PacBio TGS for å undersøke biodiversitet hos bjørk i plantasjar kontra viltveksande bjørk, data som kan vere nyttig i val av framtidig planting av bjørk.</p>

<p>3.1, The assembled and annotated genome of the pigeon louse <i>Columbicola columbae</i>, a model ectoparasite</p>	<p>James G Baldwin-Brown, Scott M Villa, Anna I Vickrey, Kevin P Johnson, Sarah E Bush, Dale H Clayton &amp; Michael D Shapiro. G3 (Bethesda)., 23.01.2021</p>	<p>Parasitt-genom vellykka sekvensert av TGS.</p>
<p>3.2, MinION-based dna barcoding of preserved and non-invasively collected wildlife samples</p>	<p>Adeline Seah, Marisa C.W. Lim, Denise McAloose, Stefan Prost &amp; Tracie A. Seimon. Genes (Basel)., 18.04.2020</p>	<p>ONT MinION vurderast som den einaste felt-klare teknologien innen ikkje-invaderande prøvehenting frå viltveksande natur.</p>
<p>3.3, Testing the advantages and disadvantages of short- And long- read eukaryotic metagenomics using simulated reads</p>	<p>William S. Pearman, Nikki E. Freed &amp; Olin K. Silander. BMC Bioinformatics, 29.05.2020</p>	<p>Får fram fordelar og ulemper ved TGS saman med BLAST samanlikna med Kraken2. Med føremål å undersøke økologisk biodiversitet på populasjonsnivå. Prøvematerialet inkluderte akterier, dyr, plantar og fungi, BLAST presterte stort sett betre enn Kraken2 i å identifisere artar.</p>
<p>3.4, The promise and challenges of characterizing genome-wide structural variants: A case study in a critically endangered parrot</p>	<p>Jana R. Wold, Joseph G. Guhlin, Peter K. Dearden, Anna W. Santure &amp; Tammy E. Steeves. Molecular Ecology Resources, 14.03.2023</p>	<p>Nanopore MinION for å finne variantar som driv evolusjon, og dermed aukar biodiversitet. Undersøker biodiversitet. Ser på trua art. Dei seier at SV(structural variations) er viktig info for å bevare biodiversitet, og dei fekk tak i den vha TGS.</p>

<p>3.5, A Highly Contiguous Genome for the Golden-Fronted Woodpecker ( <i>Melanerpes aurifrons</i>) via Hybrid Oxford Nanopore and Short Read Assembly</p>	<p>Graham Wiley &amp; Matthew J. Miller. G3 (Bethesda), 21.04.2020</p>	<p>Vellykka bruk av Hybrid ONT til samansetning av genom hos hakkespett, med relativt lav kostnad.</p>
<p>3.6, A framework for in situ molecular characterization of coral holobionts using nanopore sequencing</p>	<p>Quentin Carradec, Julie Poulain, Emilie Boissin, Benjamin Hume, Christian Voolstra, Maren Ziegler, Stefan Engelen, Corinne Cruaud, Serge Planes &amp; Patrick Wincker. Sci Rep., 28.09.2020</p>	<p>Brukte ONT Nanopore sequencing på DNA-prøver frå 50 korallar frå fire lokasjonar. Artikkelen visar at denne typen sekvensering er tilstrekkeleg for å modellere artsnettverk som visar bakteriekoloniar relatert til kvar lokasjon.</p>
<p>3.7, A Genome for Edith's Checkerspot Butterfly: An Insect with Complex Host-Adaptive Suites and Rapid Evolutionary Responses to Environmental Change</p>	<p>Kalle Tunstrom, Christopher W Wheat, Camille Parmesan, Michael C Singer &amp; Alexander S Mikheyev. Genome Biology and Evolution, 03.08.2022</p>	<p>Ein sommerfuglart som har vist høg grad av fenotypisk tilpassingsevne er modellorganisme for å studere korleis artar tilpassast deira miljø. TGS er nytta for å supplere den genetiske ressursbanken med høgkvalitetsdata, for å lette framtidig forskning på fenotypar og effekta av rask tilpassing. Viser viktigheita i genetikressurser for å lære om biodiversitet og artars tilpassingsevne, og at TGS er eit viktig verktøy for å få dette til.</p>

<p>3.8, Re-examination of two diatom reference genomes using long-read sequencing.</p>	<p>Gina V. Filloramo, Bruce A. Curtis, Emma Blanche &amp; John M. Archibald. BMC Genomics, 24.05.2021</p>	<p>Bruk av ONT kan gi verdifull genetisk data som grunnlag for vidare forskning, men repetitive regionar i DNA utgjør ei hindring for metoden. I denne artikkelen var genomet som skulle sekvenserast relativt lite. Det blei konkludert med at det ikkje er sjølvstøtt at ONT i alle tilfelle er betre enn sangersekvensering og NGS til å kan skaffe nødvendig informasjon om eit genom (i alle fall om avgrensa ressursar ikkje tillet hybrid bruk av metodar).</p>
<p>3.9, Long-read only assembly of <i>Drechmeria coniospora</i> genomes reveals widespread chromosome plasticity and illustrates the limitations of current nanopore methods.</p>	<p>Damien Courtine, Jan Provaznik, Jerome Reboul, Guillaume Blanc, Vladimir Benes &amp; Jonathan J Ewbank. GigaScience, 18.09.2020</p>	<p>TGS frå ONT viser stort potensial som verktøy til å setje saman komplekse gensekvensar, også når brukbar data frå GenBank var avgrensa. Det kommenterast at metoden likevel ikkje klarte å levere kvalitetsnivået som var kravd for å offentliggjere det eukaryote genet. Det har blitt danna grunnlag for vidare genforskning av genet.</p>
<p>3.10, A genome resource for <i>Acacia</i>, Australia's largest plant genus</p>	<p>Todd G. B. McLay, Daniel J. Murphy, Gareth D. Holmes, Sarah Mathews, Gillian K. Brown, David J. Cantrill, Frank Udovicic, Theodore R. Allnut &amp;</p>	<p>Hybrid bruk av TGS fyller gap mellom DNA-sekvensar for å utfylle genom. Nanopore og to typar Illumina sequencing blei nytta.</p>

	Chris J. Jackson. PLOS ONE, 14.10.2022	
3.11, Highly accurate long reads are crucial for realizing the potential of biodiversity genomics	Scott Hotaling, Edward R. Wilcox, Jacqueline Heckenhauer, Russell J. Stewart and Paul B. Frandsen. BMC Genomics, 16.03.2023	ONT samanlikast med PacBio hifi(NGS) for å sekvensere og sette saman heile genom for artar, både planter og dyr. TGS var fordelaktig ovanfor NGS i dette tilfellet. Dette viser teknologiens breidde.
3.12, Metagenomic analysis of planktonic riverine microbial consortia using nanopore sequencing reveals insight into river microbe taxonomy and function	Kate Reddington, David Eccles, Justin O'Grady, Devin M Drown, Lars Hestbjerg Hansen, Tue Kjærgaard Nielsen, Anne-Lise Ducluzeau, Richard M Leggett, Darren Heavens, Ned Peel, Terrance P Snutch, Anthony Bayega, Spyridon Oikonomopoulos, Jiannis Ragoussis, Thomas Barry, Eric van der Helm, Dino Jolic, Hollian Richardson, Hans Jansen, John R Tyson, Miten Jain, & Bonnie L Brown. Gigascience, 10.06.2020	ONT MinION sine eigenskapar gjer teknologien eigna til å generere ein sensitiv dataplattform frå elver, som gir informasjon om mikroorganismar i elvesystem og kan nyttast i biodiversitetsvurderingar.

<p>4.1, Advancing biodiversity assessments with environmental DNA: Long-read technologies help reveal the drivers of Amazonian fungal diversity</p>	<p>Camila D Ritter, Micah Dunthorn, Sten Anslan, Vitor Xavier de Lima, Leho Tedersoo, Rolf Henrik Nilsson &amp; Alexandre Antonelli. <i>Ecol Evol.</i>, 23.06.2020</p>	<p>PacBio TGS viser seg å fungere godt til å finne operasjonelle taksonomiske einingar(OTU-er) hos fungi, men var ikkje den metoden som fann flest OTU-er totalt. Resultata tyder på at PacBio TGS ikkje kan sekvensere DNA som er delvis nedbrote, noko som er viktig i eDNA-analysar.</p>
<p>4.2, Evaluation of sample preservation approaches for better insect microbiome research according to next-generation and third-generation sequencing</p>	<p>Zi-Wen Yang, Yu Men, Jing Zhang, Zhi-Hui Liu, Jiu-Yang Luo, Yan-Hui Wang, Wen-Jun &amp; Qiang Xie. <i>Microb Ecol</i>, 11.2021</p>	<p>TGS og NGS samanliknast for å sekvensere mikrobiom som har blitt preservert på ulike måtar. Ved sekvensering av 16s rRNA gen gav TGS betre oppløysing enn NGS, og kan difor anbefalast for mikrobiomsekvensering.</p>
<p>5.1, Community Structure of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Soils of Switchgrass Harvested for Bioenergy</p>	<p>Alden C. Dirks &amp; Randall D. Jackson. <i>American Society for Microbiology; Applied and Environmental Microbiology Journals</i>, 17.09.2020</p>	<p>En av få som har klart å bruke SMRT til å sekvensere AMF fungi, i biodiversitetskontekst</p>
<p>5.2, Comparison of Bacterial Microbiota in Raw Mare's Milk and Koumiss Using PacBio Single Molecule Real-Time Sequencing Technology</p>	<p>Meng Zhang, Na Dang, Dongyan Ren, Feiyan Zhao, Ruirui Lv, Teng Ma, Qiuhua Bao, Bilige Menghe &amp; Wenjun Liu. <i>Front Microbiol.</i>, 27.10.2020</p>	<p>SMRT-sekvensering fra PacBio var sensitiv nok til å kartlegge mikrobiell biodiversitet i melkeprodukt. Metoden oppdaga store variasjonar i biodiversitet på tvers av prøver. Dette viser</p>



		SMRT sitt potensial i kontekst biodiversitet.
6.1, Highly accurate long reads are crucial for realizing the potential of biodiversity genomics	Hotaling S, Wilcox ER, Heckenhauer J, Stewart RJ & Frandsen PB. BMC Genomics, 16.02.2023	<p>Samanliknande forskingsartikkel der fire typar sekvenseringsmetode vart samanlikna i evne til å samansette gen hos vårflue, <i>Hesperophylax magnus</i>, og deretter oppskalert til 6750 dyr- og plantegenom.</p> <p>For å få sette saman relativt korte genom med høg nøyaktigheit, presterte HiFi(NGS) betre enn ONT på alle måtar det vart målt genomsamansetning på. Det anbefalast NGS når det berre er ressursar nok til éin type sekvensering, og fordelan av å kunne sekvensere lange sekvensar ikkje vege opp for feilrata ved TGS.</p> <p>Genomsamansetninga laga v.h.a. HiFi var meir samanhengande enn dei danna av dei andre sekvenseringsmetodane, både for planter(501% meir</p>

		<p>samanhengande) og dyr(226% meir samanhengande).</p> <p>Det kommenterast at forskning på sekvensering av lange sekvensar med høg nøyaktigheit er nødvendig for å kunne realisere potensialet TGS har innan biodiversitet.</p>
6.2 Analyzing the Dietary Diary of Bumble Bee	<p>Leidenfrost RM, Bänsch S, Prudnikow L, Brenig B, Westphal C &amp; Wünschiers R. Front Plant Sci., 25.03.2020</p>	<p>Samanliknar resultat frå NextGen og Third Gen sekvensering for å skape ei database. Vellykka forsøk, Bia sin diett var identifisert v.h.a. TGS-teknologi.</p>

## 5. Diskusjon

For å svare på problemstillinga «kartlegging av tredjegenasjons sekvensering sitt potensial i biodiversitetsforskning» diskuterast forskingsresultat, samanlikning av teknologiar og kommentarar om nødvendig vidare forskning frå dei inkluderte artiklane. For å svare på problemstillinga vil diskusjonen lede til ei oversikt over kor langt TGS-teknologien er kome i dag; kva som er moglegheiter, utfordringar, fordelar og ulemper ved TGS.

Ved å kartlegge forsøkte tilnærmingar og tilhøyrande resultat, utgjer dette studiet ein kunnskapsbase for val av sekvenseringsmetodar, innføring av TGS og optimalisering av eksisterande protokollar for TGS. Det var ingen lovar eller reguleringar som spesielt avgrensa bruk av TGS i skrivande stund til forfattars kjennskap. Litteraturstudiets resultat avdekka at TGS er ein lovande teknologi med høgt potensial for å generere data som biodiversitetsanalysar har avdekka behov for. Fordi TGS er relativt ny teknologi vart tal søketreff relativt lite (138 unike treff) i dette litteratursøket. Dette skildrar litteraturstudiets omfang og kjem av at både ONT og SMRT er relativt nye metodar og er dermed forska

mindre på enn sine forlauparar. Teknologien er også per 2023 i rask vekst, noko som betyr at arbeid med å avdekke kunnskapshol vil vere omfattande og krevjande. Basert på studiets resultat er dette likevel vurdert til lite problematisk, da resultatet i stor grad kommenterte framtidig bruk av TGS og vidare forskning. I kombinasjon med eksisterande teori utgjer dette grunnlag for å kommentere status på TGS og avdekke noverande potensial for framtida.

Artiklane som utgjorde resultatet hadde ulik grad av suksess i bruk av TGS for ulike føremål. Inkluderte artiklar har oppfylt alle krav skildra under «metode» for å sikre høg kvalitet på studiet og reproduserbarheit. I tillegg blei manuell eksklusjon utført i form av gruppering av like tilnærmingar for å sikre at alle tilnærmingar som oppfylte inklusjonskriteria var representerte i studiet. Dette gjer at resultatet er eit tilstrekkeleg grunnlag for å gi ein status på TGS si utvikling i kontekst biodiversitet, utifrå oppgåvas omfang.

Resultatet viser at ein ved å hente data gjennom TGS kan utføre eit breidt utval oppgåver som på ulike nivå bidreg til betre forståing av biodiversitet og utvikling av strategiar for å ivareta biologisk mangfald. Informasjon TGS har vist å kunne generere er artsspesifikke eigenskapar, heile genomsekvensar, heile transkriptomsekvensar, informasjon om spesifikke gen, evolusjonsanalysar, miljøanalysar, artsidentifikasjon, informasjon om artsmangfald i populasjonar og enkelartars rolle og effekt på sine økosystem. Artiklar inkludert i litteraturstudiet tek også føre seg samanlikning av sekvenseringsteknologiar for ulike føremål. For heilgenomsekvensering av artar var TGS tilstrekkeleg i forsøka til artikkel nr. 3.1, 3.5, 3.7 og 3.11, medan artikkel nr. 3.8, 3.10 og 6.1 anten kommenterer at hybride løysingar bør vurderast eller at NGS vil vere å føretrekke i likande tilfelle. Artikkel nr. 1.1 viste at eit fullstendig transkriptom for bille kunne sekvenserast ved hjelp av TGS utan store hindringar. Dette stemmer overeins med skildra teori i kapittel 2.2.1. Dette er ei betydeleg prestasjon av TGS å merke seg da variasjonar transkriptom kan gjere transkriptom meir utfordrande å sekvensere enn genom.

Genressursar for enkeltartar var generert ved hjelp av TGS i artikkel nr. 2.2, 2.3 og 6.2 (sekvensen ITS2). Artikkel 6.2 og tre andre (3.3, 3.11, 6.1 og 6.2) inkluderte samanlikning av- og vidareutvikling av verktøy som kan leie til biodiversitetsrelatert forskning. Art. nr. 4.2 viste også TGS konkurrerte ut NGS i sekvensering av mikrobielle populasjonar, på tvers av preservingmetodar. Fleire artiklar enn dette bidrog til å kartlegge slike verktøy og metodar indirekte. Evolusjonsstudium (saman med heilgenomsekvensering) var vellykka utført med TGS som metode i art. nr. 3.7. Miljøanalyse var føremål i bruk av ONT MinION i art. nr.3.1, der TGS til bruk i felt viste seg å kunne vere mogleg. Undersøking av artars eigenskapar,

miljøeffekt og roller i økosystem var bl.a. gjennomført ved bruk av TGS i artikkel 2.3. TGS viste også å kunne utforske strukturelle variantar hos sterkt trua artar i art. nr. 3.4, som også viser at TGS kan bygge nyttige informasjonsdatabasar og informere om artars rollar og eigenskapar.

Ein annan type analyse som resultatet visar at TGS kan utføre er artsidentifikasjon og analysar av populasjonar. Art. nr. 2.1, 2.4, 3.3, 3.6, 3.12, 4.1, 5.1 og 5.2 visar at TGS er eit eigna val til identifisering av artar og heile populasjonar, t.d. i elver (art. nr. 3.12), og for å studere biologisk mangfald hos populasjonar eller bestemte taxon i eit område (t.d. fungi i Amazonas, art.nr. 3.3). Art. nr. 4.1 sekvenserte eDNA med TGS, noko som opnar for mange moglegheiter dersom feilrata kan reduserast frå der den er i dag, t.d. dersom protokollen kan optimaliserast for å sekvensere delvis nedbrote DNA. TGS kan sekvensere sensitivt nok til å sekvensere biodiversitet av mikroorganismar i mjølk (art. nr. 5.2) som utgjør ein fordel ovanfor første- og andregenerasjonssekvensering. I tillegg til desse moglegheitane og fordelane ved TGS kan analysar gjort med TGS gje grunnlag for å modellere komplekse artsnettverk (art. nr. 3.6), noko som ikkje er spesielt for TGS men kan fasiliterast av TGS på grunn av SMRT sin sensitivitet og effektivitet. Modellar av populasjonar, artar og økosystem er viktig data som framstiller informasjon til bakgrunn for val i biodiversitetsbevarande arbeid.

TGS har potensial til å utvide noverande forståing av biodiversitet og bidra i ei rekke fagfelt. 4 artiklar (art. nr. 3.8, 3.9, 3.10 og 6.1) viste derimot at TGS enda har avgrensingar av betydning som kan hindre den i å inngå i standardiserte protokollar for biodiversitetsanalysar. Døme på forsøk der TGS ikkje kunne brukast aleine til å nå målet for forsøket var eDNA-sekvensering der nedbryting av DNA utgjorde ei hindring.

Den hovudsaklege fordelten med TGS utifrå litteratur er at lengda på DNA-sekvensane sjeldan er ei hindring, i tillegg til at mange sekvensar kan analyserast samtidig. Dette stemmer overeins med resultatet. Ulemper ser ut til å inkludere vanskar med å sekvensere repeterande DNA-regionar og DNA av låg kvalitet. Relativt lite utval forskingsstudiar til samanlikning utgjør også ei ulempe. Kostnad er ikkje nemnt som ei ulempe, heller ein fordel sia fleire artiklar opplyser om relativt låge oppstartskostnadar fro TGS. Den høge feilrata til TGS-teknologi er også nemnt i fleire av artiklane som ei ulempe og som årsak til at det er valt å kombinere ONT og SMRT TGS med andre sekvenseringsmetodar som NGS. Hybrid bruk av sekvenseringsmetodar er meir ressurskrevjande, men ingen hindring utover dette er kommentert ved hybridisert sekvenseringsanalyse.

Blant dei inkluderte artiklane var TGS nytta med varierende biologisk prøvemateriale frå ei rekke taksonomiske grupper; dyr (art. nr.: 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.11, 6.1 og 6.2) inkludert fuglar (3.4 og 3.5) og virvellause dyr (art. nr. 2.2 og 2.3), plantar (4 art.: nr.3.3, 3.10, 3.11 og 6.1), mikrobielle populasjonar (6 art.: 2.3, 3.3, 3.6, 3.12, 4.2 og 5.2) inkl. korallrev frå ulike habitat (3.6), insekt (6 art.: nr. 2.2, 3.1, 3.7, 5.1, 6.1 og 6.2), fungi (5 art.: nr. 2.1, 2.4, 3.3, 3.9 og 4.1), biller (art. nr.1.1), algar (2. art.: nr.3,8 og 3.12) og parasittar (art. nr. 3.1). Individua blei anten sekvensert genomet til eller utført mikrobiomsekvensering på for å danne taksonomiske profilar. Sjølv om ikkje alle forsøk var vellykka, trekkast det ikkje fram problematikk rundt noko spesifikt domene, rike eller anna taksonomisk klassifikasjonar. Artikkel nr. 4.1. viste at PacBio SMRT-sekvensering identifiserte fungi betre enn NGS, men NGS identifiserte fleire artar totalt enn PacBio. Dette er ikkje tilstrekkeleg bevis for å seie noko om kva taxon TGS føretrekker, men det viser breidda av teknologiens nytte. Det kjem fram i desse resultatane at det er utfordringar i bruk av TGS og kvifor det kan vere nødvendig å kombinere sekvenseringsmetodar.

Ved å analysere resultatet med omsyn til publiseringsdatoane til artiklane, kan ein til ein viss grad seie at litteratursøket visar ein veksande trend i forskning som undersøker nytten og avgrensingane denne teknologien har. Nylege innføringar av prosjekter, lovverk og internasjonale avtalar viser at det er stor einigheit i at biodiversitet er viktig å forske ytterlegare på, og det er også stor einigheit i at det er nødvendig med ytterlegare kartlegging av genetisk informasjon på tvers av artar for å kunne bevare biodiversitet globalt. TGS som verktøy for sekvensering av artars genetiske materiale blir da direkte eit av fleire verktøy som kan nyttast for å nå målsetnadane om genetisk sekvensering. Bruk av TGS viser potensial til å kunne bidra til å utvikle ein kraftig plattform for å studere biodiversitet.

I litteraturstudiets seleksjonsprosess føregjekk gruppering av søketreff etter duplikat i innhald. Under denne prosessen merka forfattar seg at eit høgt tal artiklar vart ekskluderte fordi dei sekvenserte genomet til ein art av ein taksonomisk klassifisering som allereie var representert blant dei inkluderte artiklane. Dette påpeikast for å vise at forsøka der vellykka heilgenomsekvensering utgjer ein større andel av TGS-bruken enn spegla i resultatet. TGS er ikkje lenger ein uvanleg metode å nytte for slike føremål. Genomutforsking på den skalaen ein ser i dag kan seiast å vere mogleggjort og fasilisert av TGS. Avdekking av samansetninga til genomet for artar som kan vere interessante i forskning, visar seg å vere i stort fokus. Dette er direkte hjelpesamt i utvikling av tiltak for konservering av biodiversitet.

Til tross for kartlagde moglegheitar, fungerer ikkje TGS feilfritt i alle tilfelle; i artikkel nr. 4.1 vart TGS hindra av at prøve-DNA var delvis nedbrote. Sjølv om artiklane oppnådde varierende grad av suksess i bruk av TGS, er det konsensus om at TGS har eit stort potensial for biodiversitet som er interessant å utforske vidare; TGS bidreg til å utvikle kunnskapen som biologisk mangfald sjølv om det i nokre tilfelle må supplerast med andre metodar.

## 6. Konklusjon

Basert på funna frå litteraturstudiet og med hensyn til studiets omfang, visar det seg at TGS på kort tid har vist eit svært breitt potensial. Potensialets breidde kan definerast på fleire måtar; i sekvensering av både korte og lange DNA-sekvensar, både aleine og i kombinasjon med andre sekvenseringsteknologiar og sekvensering av ulike typar DNA-prøver frå ei rekke ulike artar, habitat og ulike materialkvalitetar inkludert eDNA (art. nr. 4.1). TGS kan sekvensere for eit utval føremål som heng saman med biodiversitet, som miljøanalysar og evolusjonsanalysar, og under ei rekke ulike forhold; både inne på laben og ute i felt med ONT MinION. Sekvensering med ONT og PacBio SMRT er vist å fungere på tvers av taksonomiske klassifikasjonar. Også hybrid bruk av TGS og NGS saman kan vere effektivt; Å kombinere ulike TGS-metodar med andre TGS-metodar, NGS-metodar eller sangersekvensering visar seg å kunne lette dei utfordringane som kan oppstå og usikkerheit/dårleg presisjon hos ein type TGS aleine. Summen av dette skildrar TGS sitt potensial som svært breitt til tross for utfordringar i dagens bruk. Alt i alt visar TGS, representert av ONT og PacBio sine metodar, eit allereie breidt og veksande potensial for å kunne bidra til bevarande biodiversitetstiltak.

### 6.1 Forslag til vidare forskning

Basert på både suksessfulle og mislukka eksperiment i litteraturstudiets resultat, trekkast tre retningar for vidare forskning fram som interessante; 1)hybridisering av metodar, 2)berbarheit og brukarvennlegheit i felt og 3)bioinformatiske softwares saman med TGS.

Samanliknande forskning mellom TGS- og NGS-metodar og framtidige nye metodar for å avdekke avgrensingar kan danne informasjonsgrunnlag for å setje saman metodar til hybride løysingar. Forskinga bør inkludere sekvensering av same biologisk prøvemateriale som er behandla likt under standard forhold. DNA-ets kvalitet, inkl. grad av nedbryting, bør

kommenterast. Slik kan prestasjon for kvar metode målast og sterke og svake sider avdekkast. Resultata av dette vil kunne bidra til meir optimal hybridisering av metodar til bruk i forskning som skal bygge kunnskapsdatabasar for biodiversitetsforskning.

Sia MinION i artikkel nr. 3.2. viste seg å vere nyttig for TGS i feltarbeid i biodiversitetskontekst, trekkast dette fram som ei interessant retning for framtidig forskning. Føreslått forskning vil vere optimalisering av berbarheit og brukarvennlegheit i felt hos MinION, compatible metodar for prøveinnsamling og utvikling av nye, feltklare apparat for TGS.

Ei tredje interessant retning er vidare utforsking av potensialet hos forskjellige bioinformatiske softwares i kombinasjon med ONT eller PacBio sine TGS-metodar. Artikkel 3.3. som samanlikna to typar software saman med TGS frå ONT og PacBio viste viktige val av riktig software for bl.a. nøyaktig artsidentifisering, og at meir forskning trengs. Det trengs ytterlegare forskning både på samanlikning av softwares, kompatibilitetsmåling for eksisterande typar software og TGS-metodar og utvikling av ny software i takt med den raske utviklinga til TGS.

Bruk av standardiserte sekvenseringsprotokollar eldre enn TGS utvikla for å bli brukte med tidlegare generasjonar sekvenseringsverktøy, kan utgjere ei eksperimentell utfordring. Som forklart i under «bakgrunn» (kapittel 2.2.1), Heng den høge feilrata til TGS saman med nanopore-mekanismen, og må difor til ei viss grad akseptert som den er i dag. Protokolloptimalisering, forsøk for optimalisering av bl.a. forhold før sekvensering, som DNA-purifikasjon, kan likevel vere interessant å undersøke. Dette vil også bidra mot å avdekke kunnskapshol hos TGS og forbetre presisjon hos TGS. Arbeidet vil vere med på å drive teknologisk utvikling av sekvensering, som i framtida potensielt kan spire ut i ein ny generasjon sekvensering. Det bør alltid takast omsyn til potensielle økologiske og samfunnsmessige risikoar knytt til teknologien som nyttast i forskning.

## 7. Referanseliste

1. FNs naturavtale [Internett]. Om-FN. 2023 [sitert 7. juli 2023]. Tilgjengeleg på: <https://www.fn.no/om-fn/avtaler/miljoe-og-klime/fns-naturavtale>

2. Konvensjon om biologisk mangfold [Internett]. 2023 [sitert 20. juli 2023]. Tilgjengeleg på: <https://www.fn.no/om-fn/avtaler/miljoe-og-klima/konvensjon-om-biologisk-mangfold>
3. Verdens land samlet om en naturavtale [Internett]. Nyheter. 2022 [sitert 20. juli 2023]. Tilgjengeleg på: <https://www.regjeringen.no/no/aktuelt/verdens-land-samlet-om-en-naturavtale/id2952178/>
4. Spear D, van Wilgen NJ, Rebelo AG, Botha JM. Collating biodiversity occurrence data for conservation. *Frontiers in Ecology and Evolution* [Internett]. 2023;11. Tilgjengeleg på: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fevo.2023.1037282>
5. Alberta Biodiversity Monitoring Institute (ABMI). What is Biodiversity [Internett]. Biodiversity? It's about more than we know. [sitert 12. juni 2023]. Tilgjengeleg på: <https://www.abmi.ca/home/biodiversity/what-is-biodiversity.html>
6. Mahajan G, Balachandran L. Biodiversity in Production of Antibiotics and Other Bioactive Compounds. I: Mukherjee J, redaktør. *Biotechnological Applications of Biodiversity* [Internett]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2015. s. 37–58. Tilgjengeleg på: [https://doi.org/10.1007/10\\_2014\\_268](https://doi.org/10.1007/10_2014_268)
7. Aerts R, Honnay O. Forest restoration, biodiversity and ecosystem functioning. *BMC Ecology*. 24. november 2011;11(1):29.
8. Conservation on Biological Diversity. Genetic diversity; The hidden secret of life [Internett]. [sitert 7. juli 2023]. Tilgjengeleg på: <https://www.cbd.int/article/genetic-diversity-the-hidden-secret-of-life>
9. Språkrådet. Borrelås [Internett]. [sitert 7. juli 2023]. Tilgjengeleg på: <https://www.sprakradet.no/Vi-og-vart/hva-skjer/Aktuelt-ord/Borrelas/>
10. Xu P, Li J, Qian J, Wang B, Liu J, Xu R, mfl. Recent advances in CO<sub>2</sub> fixation by microalgae and its potential contribution to carbon neutrality. *Chemosphere*. 1. april 2023;319:137987.
11. World Health Organization. Biodiversity and Health [Internett]. 2015 [sitert 21. juni 2023]. Tilgjengeleg på: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/biodiversity-and-health>
12. Cepic M, Bechtold U, Wilfing H. Modelling human influences on biodiversity at a global scale—A human ecology perspective. *Ecological Modelling*. 1. mars 2022;465:109854.
13. Red List Index [Internett]. [sitert 7. juli 2023]. Tilgjengeleg på: <https://www.iucnredlist.org/assessment/red-list-index>



14. Artsdatabanken. Trua naturtyper vert negativt påverka av framande artar [Internett]. Fremmede arter i Norge - med økologisk risiko 2023. 2023 [sitert 8. august 2023]. Tilgjengeleg på:  
[https://artsdatabanken.no/Pages/343221/Trua\\_naturtyper\\_vert\\_negativt\\_paaverka](https://artsdatabanken.no/Pages/343221/Trua_naturtyper_vert_negativt_paaverka)
15. Artsdatabanken. Hva er en fremmed art? [Internett]. Fremmede arter i Norge - med økologisk risiko 2023. 2021 [sitert 7. august 2023]. Tilgjengeleg på:  
<https://artsdatabanken.no/Pages/339553>
16. Artsdatabanken. Risikokategorier og kriterier [Internett]. Fremmede arter i Norge - med økologisk risiko 2023. 2023 [sitert 8. november 2023]. Tilgjengeleg på:  
<https://artsdatabanken.no/Pages/342811>
17. Solstad H, Hegre H, Alm T, Fløistad IS, Pedersen O, Schei FH, Vandvik V, Vollerling J, Westergaard KB og Skarpaas O. Karplanter: Vurdering av hagelupin *Lupinus polyphyllus* for Fastlands-Norge med havområder. [Internett]. Fremmedartslista 2023. Artsdatabanken. Tilgjengeleg på:  
<https://artsdatabanken.no/lister/fremmedartslista/2023/458>
18. Lurgi M, Galiana N, López BC, Joppa LN, Montoya JM. Network complexity and species traits mediate the effects of biological invasions on dynamic food webs. *Frontiers in Ecology and Evolution* [Internett]. 2014;2. Tilgjengeleg på:  
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fevo.2014.00036>
19. Artsdatabanken. Hagelupin *Lupinus polyphyllus* Lindl. [Internett]. Fremmedartslista 2023. Artsdatabanken. [sitert 8. august 2023]. Tilgjengeleg på:  
<https://artsdatabanken.no/Pages/334792/Hagelupin>
20. Artsdatabanken. Fremmedartslista 2023 [Internett]. Fremmede arter i Norge - med økologisk risiko 2023. 2023 [sitert 7. august 2023]. Tilgjengeleg på:  
<https://artsdatabanken.no/lister/fremmedartslista/2023?TaxonRank=tv>
21. miljolare.no. Mangfoldet skal sikres gjennom vern og bærekraftig bruk [Internett]. [sitert 7. juli 2023]. Tilgjengeleg på:  
<https://www.miljolare.no/tema/planterogdyr/artikler/baerekraftig-bruk.php>
22. FN-sambandet. Naturmangfold [Internett]. Klima og miljø. 2022 [sitert 7. juli 2023]. Tilgjengeleg på: <https://www.fn.no/tema/klima-og-miljoe/naturmangfold>
23. Norsk Institutt for Naturforskning. Planteimport og spredning av fremmede arter [Internett]. Tilgjengeleg på: <https://www.nina.no/Naturmangfold/Fremmede-arter/Planteimport-og-fremmede-arter>

24. Regjeringen. Svalbard Globale frøhvelv [Internett]. [sitert 14. juli 2023]. Tilgjengeleg på: [https://www.regjeringen.no/no/tema/mat-fiske-og-landbruk/svalbard\\_global\\_frohvelv/id462220/](https://www.regjeringen.no/no/tema/mat-fiske-og-landbruk/svalbard_global_frohvelv/id462220/)
25. NCBI. GenBank Overview [Internett]. [sitert 18. juli 2023]. Tilgjengeleg på: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
26. Dumroese RK, Williams MI, Stanturf JA, Clair JBSt. Considerations for restoring temperate forests of tomorrow: forest restoration, assisted migration, and bioengineering. *New Forests*. 1. november 2015;46(5):947–64.
27. Gaj T, Sirk SJ, Shui SL, Liu J. Genome-Editing Technologies: Principles and Applications. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 1. desember 2016;8(12):a023754.
28. Becky Mackelprang. CAN THE GENE EDITING TECHNOLOGY KNOWN AS CRISPR HELP REDUCE BIODIVERSITY LOSS WORLDWIDE? [Internett]. *Ensia*. [sitert 19. juli 2023]. Tilgjengeleg på: <https://ensia.com/features/crispr-biodiversity-coral-food-agriculture-invasive-species/>
29. Sekvensering. I: Botanisk -og plantefysiologisk leksikon [Internett]. UiO; 2020 [sitert 24. juni 2023]. Tilgjengeleg på: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/s/sekvensering.html>
30. I GENialt: Vil kartlegge verdens biodiversitet for fremtiden [Internett]. *GENialt*. 2018 [sitert 26. juli 2023]. Tilgjengeleg på: <https://www.bioteknologiradet.no/2018/11/i-genialt-vil-kartlegge-verdens-biodiversitet-for-fremtiden/>
31. CCCP. Building the most comprehensive genomic dataset ever assembled for conservation science [Internett]. [sitert 6. desember 2023]. Tilgjengeleg på: <https://www.ccgproject.org/>
32. Illumina. A powerful tool for studying ecosystem biodiversity [Internett]. *Environmental DNA Sequencing*. [sitert 28. juli 2023]. Tilgjengeleg på: <https://www.illumina.com/techniques/sequencing/dna-sequencing/targeted-resequencing/environmental-dna.html>
33. Heather JM, Chain B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*. januar 2016;107(1):1–8.
34. Schadt EE, Turner S, Kasarskis A. A window into third-generation sequencing. *Human Molecular Genetics*. 15. oktober 2010;19(R2):R227–40.
35. Illumina. RNA Sequencing. [sitert 18. juli 2023]. A comprehensive picture of the transcriptome. Tilgjengeleg på: <https://www.illumina.com/techniques/sequencing/rna-sequencing/total-rna-seq.html>

36. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet.* januar 2009;10(1):57–63.
37. Jonas Korlach. Understanding Accuracy in SMRT® Sequencing [Internett]. Pacific Biosciences; [sitert 28. august 2023]. Tilgjengeleg på: [chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.pacb.com/wp-content/uploads/2015/09/Perspective\\_UnderstandingAccuracySMRTSequencing1.pdf](chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.pacb.com/wp-content/uploads/2015/09/Perspective_UnderstandingAccuracySMRTSequencing1.pdf)
38. Allio R, Tilak MK, Scornavacca C, Avenant NL, Kitchener AC, Corre E, mfl. High-quality carnivoran genomes from roadkill samples enable comparative species delineation in aardwolf and bat-eared fox. Perry GH, Perry GH, redaktørar. *eLife.* 18. februar 2021;10:e63167.
39. Hongxia M, Jingfeng F, Jiwen L, Su Jie null, Zhiyi W, Yantao W, mfl. Full-length 16S rRNA gene sequencing reveals spatiotemporal dynamics of bacterial community in a heavily polluted estuary, China. *Environ Pollut.* 15. april 2021;275:116567.
40. Yang H, Xu D, Zhuo Z, Hu J, Lu B. SMRT sequencing of the full-length transcriptome of the *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae). *PeerJ.* 2020;8:e9133.
41. Tedersoo L, Anslan S, Bahram M, Kõljalg U, Abarenkov K. Identifying the ‘unidentified’ fungi: a global-scale long-read third-generation sequencing approach. *Fungal Diversity.* 1. juli 2020;103(1):273–93.
42. Cuber P, Chooneea D, Geeves C, Salatino S, Creedy TJ, Griffin C, mfl. Comparing the accuracy and efficiency of third generation sequencing technologies, Oxford Nanopore Technologies, and Pacific Biosciences, for DNA barcode sequencing applications. *Ecological Genetics and Genomics.* 1. september 2023;28:100181.
43. Gonçalves AT, Collipal-Matamal R, Valenzuela-Muñoz V, Nuñez-Acuña G, Valenzuela-Miranda D, Gallardo-Escárate C. Nanopore sequencing of microbial communities reveals the potential role of sea lice as a reservoir for fish pathogens. *Sci Rep.* 19. februar 2020;10(1):2895.
44. Lutter R, Riit T, Agan A, Rähn E, Tullus A, Sopp R, mfl. Soil fungal diversity of birch plantations on former agricultural land resembles naturally regenerated birch stands on agricultural and forest land. *Forest Ecology and Management.* 15. august 2023;542:121100.

45. Baldwin-Brown JG, Villa SM, Vickrey AI, Johnson KP, Bush SE, Clayton DH, mfl. The assembled and annotated genome of the pigeon louse *Columbicola columbae*, a model ectoparasite. *G3 (Bethesda)*. 9. februar 2021;11(2):jkab009.
46. Seah A, Lim MCW, McAlouse D, Prost S, Seimon TA. MinION-Based DNA Barcoding of Preserved and Non-Invasively Collected Wildlife Samples. *Genes (Basel)*. 18. april 2020;11(4):445.
47. Pearman WS, Freed NE, Silander OK. Testing the advantages and disadvantages of short- and long- read eukaryotic metagenomics using simulated reads. *BMC Bioinformatics*. 29. mai 2020;21(1):220.
48. Wold JR, Guhlin JG, Dearden PK, Santure AW, Steeves TE. The promise and challenges of characterizing genome-wide structural variants: A case study in a critically endangered parrot. *Mol Ecol Resour*. 2023;
49. Wiley G, Miller MJ. A Highly Contiguous Genome for the Golden-Fronted Woodpecker (*Melanerpes aurifrons*) via Hybrid Oxford Nanopore and Short Read Assembly. *G3 (Bethesda)*. 1. juni 2020;10(6):1829–36.
50. Carradec Q, Poulain J, Boissin E, Hume BCC, Voolstra CR, Ziegler M, mfl. A framework for in situ molecular characterization of coral holobionts using nanopore sequencing. *Sci Rep*. 28. september 2020;10(1):15893.
51. Tunstrom K, Wheat CW, Parmesan C, Singer MC, Mikheyev AS. A Genome for Edith's Checkerspot Butterfly: An Insect with Complex Host-Adaptive Suites and Rapid Evolutionary Responses to Environmental Changes. *Genome Biol Evol*. 3. august 2022;14(8):evac113.
52. Filloramo GV, Curtis BA, Blanche E, Archibald JM. Re-examination of two diatom reference genomes using long-read sequencing. *BMC Genomics*. 24. mai 2021;22(1):379.
53. Courtine D, Provaznik J, Reboul J, Blanc G, Benes V, Ewbank JJ. Long-read only assembly of *Drechmeria coniospora* genomes reveals widespread chromosome plasticity and illustrates the limitations of current nanopore methods. *Gigascience*. 18. september 2020;9(9):giaa099.
54. McLay TGB, Murphy DJ, Holmes GD, Mathews S, Brown GK, Cantrill DJ, mfl. A genome resource for *Acacia*, Australia's largest plant genus. *PLOS ONE*. 14. oktober 2022;17(10):e0274267.

55. Hotaling S, Wilcox ER, Heckenhauer J, Stewart RJ, Frandsen PB. Highly accurate long reads are crucial for realizing the potential of biodiversity genomics. *BMC Genomics*. 16. mars 2023;24(1):117.
56. Reddington K, Eccles D, O’Grady J, Drown DM, Hansen LH, Nielsen TK, mfl. Metagenomic analysis of planktonic riverine microbial consortia using nanopore sequencing reveals insight into river microbe taxonomy and function. *GigaScience*. 1. juni 2020;9(6):giaa053.
57. Ritter CD, Dunthorn M, Anslan S, de Lima VX, Tedersoo L, Nilsson RH, mfl. Advancing biodiversity assessments with environmental DNA: Long-read technologies help reveal the drivers of Amazonian fungal diversity. *Ecol Evol*. juli 2020;10(14):7509–24.
58. Zi-Wen Y, Yu M, Zhang J, Zhi-Hui L, Jiu-Yang L, Yan-Hui W, mfl. Evaluation of Sample Preservation Approaches for Better Insect Microbiome Research According to Next-Generation and Third-Generation Sequencing. *Microbial Ecology*. november 2021;82(4):971–80.
59. Dirks AC, Jackson RD. Community Structure of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Soils of Switchgrass Harvested for Bioenergy. *Appl Environ Microbiol*. 17. september 2020;86(19):e00880-20.
60. Zhang M, Dang N, Ren D, Zhao F, Lv R, Ma T, mfl. Comparison of Bacterial Microbiota in Raw Mare’s Milk and Koumiss Using PacBio Single Molecule Real-Time Sequencing Technology. *Front Microbiol*. 2020;11:581610.
61. Hotaling S, Wilcox ER, Heckenhauer J, Stewart RJ, Frandsen PB. Highly accurate long reads are crucial for realizing the potential of biodiversity genomics. *BMC Genomics*. 16. mars 2023;24(1):117.
62. Leidenfrost RM, Bänsch S, Prudnikow L, Brenig B, Westphal C, Wünschiers R. Analyzing the Dietary Diary of Bumble Bee. *Front Plant Sci*. 2020;11:287.

