

# FRESHBAR

## – Streckkodning av sötvattenorganismer för förbättrade bedömningar av biodiversitet

Barcoding of freshwater taxa for  
improved assessment of biodiversity

---

Maria Kahlert, Richard K. Johnson,  
Willem Goedkoop, Yngve Brodin,  
Thomas Lyrholm, Jonas Zimmermann

RAPPORT 7130 | JUNI 2024



FRESHBAR  
– Streckkodning av  
sötvattenorganismer för  
förbättrade bedömningar  
av biodiversitet

Barcoding of freshwater taxa for  
improved assessment of biodiversity

av Maria Kahlert, Richard K. Johnson, Willem Goedkoop, Yngve Brodin,  
Thomas Lyrholm och Jonas Zimmermann

**Beställningar**

Ordertel: 08-505 933 40

E-post: natur@cm.se

Postadress: Arkitektkopia AB, Box 110 93, 161 11 Bromma

Internet: [www.naturvardsverket.se/publikationer](http://www.naturvardsverket.se/publikationer)

**Naturvårdsverket**

Tel: 010-698 10 00

E-post: [registrator@naturvardsverket.se](mailto:registrator@naturvardsverket.se)

Postadress: Naturvårdsverket, SE-106 48 Stockholm

Internet: [www.naturvardsverket.se](http://www.naturvardsverket.se)

ISBN 978-91-620-7130-1

ISSN 0282-7298

© Naturvårdsverket 2024

Tryck: Arkitektkopia AB, Bromma 2024

Omslagsfoto: Levande kultur med kolonier av kiselalgen *Eunotia flexuosa/pseudoflexuosa/latitaenia*-grupp från Björnbackån, framtagen i FRESHBAR.

Bild tagen i ljusmikroskop med 400x förstoring, av Maria Kahlert



# Förord

Här presenteras resultaten från forskningsprojektet ”Streckkodning av sötvattenorganismer för förbättrade biodiversitetsbedömningar (FRESHBAR)”. Projektet är ett av åtta projekt som genomförts inom forskningsansatsningen DNA-metoder inom miljöövervakning.

Med forskningsområdet ville Naturvårdsverket och Havs- och vattenmyndigheten stödja forskning som kan bidra till en bättre och effektivare miljöövervakning genom införande av DNA-baserad analysteknologi.

Projektet har finansierats med medel från Naturvårdsverkets miljöforskningsanslag.

Rapporten har skrivits av Maria Kahlert (Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för vatten och miljö), Richard Johnson (Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för vatten och miljö), Willem Goedkoop (Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för vatten och miljö), Yngve Brodin (Naturhistoriska riksmuseet, Enheten för Zoologi), Thomas Lyrholm (Naturhistoriska riksmuseet) och Jonas Zimmermann (Botanischer Garten und Botanisches Museum Berlin, Freie Universität Berlin, Tyskland).

Rapporten har granskats för vetenskaplig kvalitet av Micaela Hellström (Mix Research Sweden) och för praktisk relevans av Michael Haldin (Miljöövervakningsenheten, Havs- och vattenmyndigheten).

Författarna svarar för rapportens innehåll.

Naturvårdsverket i maj 2024

Marie Uhrwing  
Avdelningschef, Hållbarhetsavdelningen

# Innehåll

<b>Sammanfattning</b>	5
<b>Summary</b>	7
<b>Förkortning och termer</b>	9
<b>1. Inledning</b>	11
1.1 Projektets syfte	11
1.2 Huvudsakliga frågeställningar	11
1.3 Forskning på området	12
1.4 FRESHBARs delprojekt	13
<b>2. FRESHBAR delprojekt 1 – kiselalger</b>	14
2.1 Mål	14
2.2 Metoder	14
2.3 Resultat	22
2.4 Diskussion och slutsatser i delprojektet fokuserat på kiselalger	29
<b>3. FRESHBAR delprojekt 2 – bottenfauna</b>	33
3.1 Mål	33
3.2 Metoder	33
3.3 Resultat och diskussion	35
3.4 Slutsatser och förslag: Bottenfauna	42
<b>4. Slutsatser och förslag</b>	44
<b>5. Tack</b>	45
<b>6. Källförteckning</b>	46
<b>7. Publikationer och data</b>	49
7.1 Publikationer och data del 1: kiselalger	49
7.2 Publikationer och data del 2: Bottenfauna	50

# Sammanfattning

Inom forskning och miljöövervakning blir det allt vanligare att använda molekylära DNA-baserade metoder för att identifiera arter. Fördelarna är flera, t.ex. en mer kostnadseffektiv miljöövervakning och säkrare identifiering av arter. Men för att kunna använda DNA-baserade metoder behöver det finnas välutvecklade referensbibliotek över DNA-sekvenser, index som är anpassade för den nya metoden, infrastruktur m.m. Där har utvecklingen kommit olika långt för olika vattenlevande organismgrupper.

Forskningsprojektet FRESHBAR har mött dessa behov och genom ett sötvattenfokus undersökt om organismer som fastsittande kiselalger och bottenfauna kan analyseras med DNA-metoder och användas som indikatorer för miljö kvalitet (indikatororganismer). Projektet har jämfört DNA-metoder med metoder baserat på traditionell artbestämning.

FRESHBAR delades in i två delprojekt som vardera fokuserade på sina organismgrupper. Delprojektet om fastsittande kiselalger hade fokus på att ta fram nya sekvenser till DNA-referensbiblioteket som hittills varit ganska ofullständigt. Delprojektet med fokus på bottenfauna arbetade med utvecklingen av själva DNA-metoden och test av molekylära index, förutom att även komplettera referensbibliotek.

Varje DNA-sekvens som är identifierad till art och tillfogas DNA-referensbiblioteken underlättar identifieringen av arter när man använder DNA-metoder. Detta gäller självklart arter som inte finns i biblioteken ännu, men att utöka antalet referenser ökar kvalitén på artidentifiering.

I kiselalgsprojektet togs 301 kiselalgssekvenser fram för markörerna *rbcL* och *18SV4*. Sekvenserna grupperades till 17 släkten och 48 olika taxonkluster, som kan tolkas som olika arter. Hälften av dessa arter fattades helt i referensdatabasen. Flera är typiska för Sverige, men minst 14 av dem har hittills inte beskrivits i den taxonomiska litteraturen. Troligtvis är det nya arter. Delprojektet kunde tillföra flera sekvenser inom kiselalgssläkten *Eunotia* och *Brachysira*. Båda släkten är typiska för nordiska vatten, men har varit dåligt representerade i referensdatabaserna trots sin vikt för svensk miljöbedömning och forskning.

Mycket taxonomiskt arbete återstår. Tack vare projektets alla resultat och att allt material offentliggörs i databaser och samlingar är det möjligt att gå vidare med den taxonomiska forskningen. För flera levande kulturer har även långtidsförvarning arrangerats som därmed också blir tillgängliga för framtida analyser. FRESHBARs resultat kommer nu att ingå i vidareutvecklingen av DNA-kiselalgsmetoden för rutinmässig analys.

Även i delprojektet med fokus på bottenfauna hittade vi nya arter för Sverige, dessutom nya för vetenskapen. En jämförelse mellan morfologiska och DNA-baserade metoder visade att de senare identifierar betydligt fler arter. Exempelvis gav metastreckkodning av fjädermyggor 78 arter jämfört med 20 vid morfologisk analys från samma provtagning. Den främsta orsaken till skillnaden är att det ofta inte går att bestämma organismerna till arter med morfologiska identifieringar. Detta pekar på en utmaning om DNA-analyser ska införas inom miljöövervakningen, då det påverkar beräkningar av de index som används för

miljökvalitetsbedömningar. Analysresultat inom FRESHBAR har till exempel visat att ASPT-indexvärden kan bli signifikant högre när de beräknas med data från DNA-streckkodning än med data från morfologiska identifieringar ( $6,2 \pm 0,56$  respektive  $5,8 \pm 0,52$ ). Även för kvantifiering av den biologiska mångfalden är DNA-baserade metoder överlägsna.

Även för vattendrag resulterade DNA-streckkodning i en högre artrikedom. Det var ingen skillnad i indexberäkningar (ASPT och DJ) baserade på DNA och morfologiska data. En nackdel med DNA-metoder är att man i nuläget inte får information om antalet djur i ett prov, vilket behövs för beräkningar av vissa index.

Vi undersökte även om åldern på bottenfaunaprover påverkade analys med DNA-metoder (metastreckkodning). Profundalprov från olika sjötyper som lagrats i över 12 år visade inte systematiska skillnader från nyligen konserverade prov.

Med projektet FRESHBAR har vi sammanlagt kommit en bra bit på vägen för att kunna använda nya DNA-tekniker inom svensk miljöövervakning. Institutionen för vatten och miljö vid SLU har redan en kompetens och infrastruktur som passar för att tillämpa metoderna. Mera arbete återstår dock för att vidareutveckla och validera DNA-streckkodningstekniker för rutin användning. För både kiselalger och bottenfauna behövs ett fortsatt arbete att förbättra DNA-referensbiblioteken. För att sedan kunna använda tekniken med metastreckkodning som beslutsstöd krävs att kunskap finns om referenssamhällen och statusklassning, t.ex. den viktiga tröskeln mellan god och måttlig status. Detta kräver att miljöindex utvecklas som baseras på genetiska data.

FRESHBAR är ett av åtta forskningsprojekt med fokus på utveckling av DNA-metoder för den nationella miljöövervakningen. Projektet finansierades av Naturvårdsverkets miljöforskningsanslag i samarbete med Havs- och vattenmyndigheten.

# Summary

In research and environmental monitoring, the use of molecular DNA-based methods to identify species is increasing, due to several advantages such as molecular methods often being cost-effective and providing higher taxonomic resolution. To increase the use DNA-based methods in environmental assessments, reference databases or libraries of DNA sequences need to be developed further, biological indices may need to be recalibrated, and infrastructure, such as storage of large amounts of DNA information, is needed. Much of this work is ongoing but the rate of progress differs among different taxonomic groups.

The FRESHBAR project has contributed to this growing knowledge base by focusing on two groups of freshwater organisms commonly used in bioassessment, benthic diatoms and benthic macroinvertebrates, with two main foci: addressing the efficacy of using DNA methods in species identifications (e.g. comparing DNA and morphological identifications) and how DNA identifications will affect biological indices and status classifications currently used in national assessments. FRESHBAR was divided into two sub-projects due to the need to fill information gaps that differed between the two groups. For benthic diatoms focus was on producing new sequences for the DNA reference libraries, whilst for benthic macroinvertebrates focus was on developing methods for implementing DNA identifications in routine monitoring. Each DNA sequence identified to species and added to the DNA reference libraries facilitates future identifications: both for new species not currently in the reference library as well as by adding new references for individual species already in the library which increases the accuracy of identifications.

For benthic diatoms, 301 sequences were obtained using the *rbcL* and 18SV4 markers. Sequences were grouped into 17 genera and 48 different taxon clusters/different species. Half of these species were not found in the reference databases. Although several are typical for Sweden, at least 14 have not been described in the taxonomic literature and therefore are likely new species. This work contributed to the development of the reference libraries by adding several sequences within the genus *Eunotia* and *Brachysira*. Both genera commonly occur in Nordic waters but are poorly represented in the reference databases, despite their importance for Swedish environmental assessment, research and freshwater ecology.

Although work on benthic diatoms has provide much new data, considerable taxonomic work remains. DNA sequences have been published in reference databases and future work will focus on curating the collections and taxonomic research. For several species long-term cultures are now accessible for future research. FRESHBAR's results will contribute to the development of a DNA diatom method for routine monitoring.

A new previously undescribed species was also identified in the benthic macroinvertebrate work. Comparisons between morphological and DNA methods showed that DNA resulted in significantly more species. For example, metabarcoding of chironomid midges resulted in 78 species compared to 20 when using morphological identifications. The main reason being that for many taxa it is not possible to identify larval stages to species using morphology, while the DNA



usually results in species. Before DNA methods can be used in biomonitoring, many indices will need to be recalibrated, with consideration to the sensitivities and tolerances, and approaches, such as reference conditions, will need to be refined. Results from FRESHBAR have shown, for example, that ASPT index values can be significantly higher when using DNA versus morphological identifications. Not surprisingly, quantification of biological diversity using DNA-based methods are superior to morphology.

For watercourses, DNA barcoding resulted in a higher species richness. Results showed no differences in index calculations of ASPT and DJ when using DNA data. Many biological indices are calibrated using abundance data. Although current research is focused on using the number of reads as a proxy measure of relative abundances, only presence/absence but not absolute abundance data are available for calculating metrics. Whether the length of storage of a macroinvertebrate sample affects DNA results was also studied in FRESHBAR. Profundal samples from different lake types stored for over 12 years did not show any consistent differences when compared with recently preserved samples.

The FRESHBAR project developed methods that hopefully will contribute to the future use of DNA techniques in Swedish environmental monitoring and assessment. The Department of Aquatic Sciences and Assessment at SLU as well as Swedish Museum of Natural History (NRM) have the scientific and technical expertise and infrastructure to develop and apply DNA-based methods. However, work remains concerning the development and validation of DNA barcoding techniques for routine use. For both benthic diatoms and benthic macroinvertebrates, continued work is needed to improve the DNA reference libraries. Furthermore, to be able to use DNA-based identifications in ecological status assessment, further development of indices, ecological thresholds and reference conditions is required.

FRESHBAR is one of eight research projects focusing on the development of DNA methods for national environmental monitoring. The project was financed by the Environmental Protection Agency's environmental research grant in collaboration with the Swedish Agency for Marine and Water Management.

# Förkortning och termer

- **eDNA** = environmental DNA, d.v.s.. miljö-DNA. Miljö-DNA eller eDNA beskriver det genetiska material som finns i miljöprover från till exempel sediment, vatten eller luft, inklusive hela celler, extracellulärt DNA och potentiellt hela organismer
- **DNA-streckkodning** (också kallat barcoding) är en metod för artbestämning med hjälp av ett kort DNA avsnitt (**sekvens**) från en eller flera specifika gener. Utgångspunkten för DNA-streckkodning är att genom jämförelse med ett referensbibliotek med sådana DNA-sekvenser från kända arter (även kallad ”streckkod”) kan en enskild sekvens användas för att identifiera en organism till art (eller ibland släkte) baserat på likhet till referensen.
- **metastreckkodning** (metabarcoding) definieras som streckkodning av DNA från flera taxa samtidigt i en blandning, t.ex. från eDNA (miljö-DNA). Metoden möjliggör samtidig identifiering av många taxa från samma (miljö-) prov, ofta inom samma organismgrupp. Metastreckkodning syftar till att bestämma hela artsammansättningen inom ett urval, inte bara en enda art.
- **markör**. En molekylär/genetisk markör är en gen eller kortare DNA-sekvens, med en känd plats på en kromosom, som till exempel kan användas för att identifiera individer (kräver flera markörer) eller arter. Markörer som används för DNA-streckkodning kallas **streckkoder**.
- **primer**. En kort, enkel DNA-sträng som är komplementär till en specifik DNA-sekvens (vanligtvis precis innan eller efter en målsekvens man vill sekvensera). Primers används för att initiera DNA-replikationen i PCR för att amplifiera (mångfaldiga) en specifik region av DNA.
- **PCR (polymerase chain reaction, polymeraskedjereaktion)** är en molekylärbiologisk och biokemisk metod som används för att amplifiera ett exemplar eller ett fåtal kopior av en viss DNA-sekvens, vilket genererar upp till miljontals exemplar av en enskild DNA-sekvens.
- **Amplikon**. De mångfaldigade DNA-kopiorna från PCR.
- **Sangersekvensering** använder en särskild noggrann metod att bestämma en DNA sekvens. Den har på senare tid ersatts med snabbare metoder som används i meta-streckkodningen, men behövs fortfarande t.ex. för att ta fram referenssekvenser eftersom den kan analysera längre sekvenser och har en väldigt liten felmarginal.
- **Referenssekvens** – ett DNA-avsnitt/streckkod i en referensdatabas/bibliotek som är typisk för en viss art och som används för att jämföra mot okända DNA-sekvenser för att identifiera arter med DNA-streckkodning.
- **Kryokonsivering** är en process där genetiskt material (celler eller hela vävnader) konserveras genom nedfrysning, vanligtvis -196 °C.
- **Artkomplex** kallas en grupp med närbesläktade organismer som är så pass lika varandra att gränsen mellan dem är svår att dra. Ett artkomplex kan innefatta flera **kryptiska arter**, d.v.s. fler arter som döljs inom ett artnamn.

- **Abundans** är det totala antalet individer från en viss art inom ett visst område.
- **Relativ abundans** av en art är antalet individer av arten i förhållande till totala antalet individer för alla arter i provet.
- **Biomassa** används som begrepp inom ekologin om den materia som levande organismer utgör (t.ex. i ett område eller en vattenvolym).

# 1. Inledning

## 1.1 Projektets syfte

FRESHBAR är ett av åtta forskningsprojekt med fokus på utveckling av DNA-metoder för den nationella miljöövervakningen, finansierad av Naturvårdsverkets miljöforskningsanslag i samarbete med Havs- och vattenmyndigheten. FRESHBAR syftade till att

1. bidra till vidareutveckling av DNA-referensbibliotek av viktiga grupper av sötvattensorganismer
2. integrera och etablera DNA-streckkodningstekniker med pågående nationell övervakning av sjöar och vattendrag i Sverige.

FRESHBAR hade ett sötvattenfokus och var indelat i två delar som arbetade med olika utmaningar för kiselalger och bottenfauna, båda viktiga för ekosystemet och som bioindikatorer. Kiselalgsdelen hade fokus på att ta fram nya referenssekvenser till DNA-referensbiblioteket som är ganska ofullständigt för denna organismgrupp. Bottenfaunadelen utvecklade själva DNA-metoden, testade effekten av konservering, jämförde olika miljöbedömningsindex mellan DNA-metoden och traditionell artbestämning, samt kompletterade referensbibliotek.

## 1.2 Huvudsakliga frågeställningar

Genom att ta fram nya streckkoder med känd taxonomisk identifiering ökade FRESHBAR den taxonomiska upplösningen av viktiga indikatororganismer bland fastsittande kiselalger och bottenfauna i sjöar och vattendrag. Med hjälp av streckkodning som övervakningsmetod förväntas bedömning av biologisk mångfald bli bättre och förbättra av de nuvarande bedömningskriterierna för mänsklig påverkan på sötvatten.

FRESHBAR är både en teknisk och en vetenskaplig språngbräda för att utveckla och integrera DNA-metastreckkodning i nationell miljöövervakning av sjöar och vattendrag och ett alternativ till traditionell, morfologiskt baserad taxonomi.

För att uppnå målet att kunna använda DNA-metastreckkodning i svensk miljöövervakning arbetade vi i FRESHBAR med att

- tillhandahålla nya referenssekvenser för fastsittande kiselalgsarter och bottenlevande evertebrater (bottenfauna) som är viktiga för statusbedömning av sjöar och vattendrag
- garantera den taxonomiska korrektheten av de nya sekvensidentifieringarna genom molekyllär och morfologisk taxonomisk kvalitetskontroll
- identifiera befintliga och eventuellt nya indikatorarter bland bottenfaunan,
- bidra till utvecklingen av metastreckkodning för att uppnå en bättre taxonomisk upplösning av komplexa grupper genom att testa nya markörsekvenser
- jämföra morfologiska och DNA-baserade identifieringar av ryggradslösa djur över olika miljögradients

- underlätta framtida forskning genom att deponera resultat och prover i offentliga databaser och samlingar med Open Access

FRESHBAR planerade att uppnå dessa mål genom att

- använda befintliga, lagrade prover från nationell miljöövervakning
- samla in nya prover vid behov med hjälp av vårt nationella nätverk av provtagningspersonal
- samarbeta med nationell och internationell infrastruktur för DNA-streckkodning, vilket också garanterade hög kvalitet och lämplig lagring och spårningsbara prover och arter
- samarbeta med pågående nationella och internationella projekt för att på så sätt säkerställa kunskapsutbyte och undvika dubbelarbete och upprepning av misslyckanden
- fokusera på indikatororganismer som är viktiga för bedömningen av miljöpåverkan och biologisk mångfald, d.v.s. bentiska kiselalger och bottenfaunagrupper som chironomider (fjädermyggor) och oligochaeter (fåborstmaskar)

### 1.3 Forskning på området

Sötvattensystem utgör en relativt liten del av jordens yta, men är hem åt en jämförelsevis stor andel mångfald. Globalt är sjöar och vattendrag också bland de mest hotade livsmiljöerna med minskad biologisk mångfald och försämrade förmåga att tillgodose ekosystemtjänster, allt på grund av mänskligt inducerade stressfaktorer i samband med markanvändning, kemiska föroreningar och klimatförändringar (Strayer and Dudgeon 2010). För att mäta dessa antropogena effekter på biologisk mångfald och ekologisk status analyseras data som visar förändringar i organismsamhällen (Lindegarth et al. 2016). Bentiska kiselalger och bottenfauna utgör kärnan i många europeiska system för bedömning av miljöpåverkan (Birk et al. 2012), eftersom de är nyckel-organismer i akvatiska ekosystem och svarar på ett förutsägbart sätt på förändringar i sin miljö (Johnson et al. 1993, Smol & Stoermer 2010). Trots den relativt goda kunskapen om deras taxonomi och ekologi är många arter av kiselalger och bottenfauna fortfarande okända, eftersom de är svåra att identifiera med traditionella metoder.

Den senaste utvecklingen inom DNA-baserade metoder ger bättre inblick i taxonomin för många komplexa grupper, inklusive identifiering av arter som inte kan skiljas åt morfologiskt (s.k. kryptiska arter) (Pawlowski et al. 2018). Biomolekylära tekniker revolutionerar vår kunskap om biologisk mångfald (Leese et al. 2018). I kombination med High Throughput Sequencing (HTS) utgör DNA-metastreckkodning även ett kostnadseffektivt tillvägagångssätt för biologisk övervakning (Pawlowski et al. 2018). Kiselalger är en av två organismgrupper där DNA-metastreckkodning har föreslagits som ett framtida verktyg för biologisk övervakning inom EU:s ramdirektiv för vatten (WFD) (Pawlowski et al. 2018). SLU och NRM har tillsammans med Havs- och Vattenmyndigheten (HaV), Naturvårdsverket och andra finansörer varit pionjärer inom streckkodsarbete i Sverige (Brodin et al. 2013; Kahlert et al. 2022).

Genom FRESHBAR finns nu mer uppdaterade referensdatabaser då projektet genererat många nya arters streckkoder för bentiska kiselalger och Chironomidae. Ett antal utmaningar kvarstår ännu innan dessa nya verktyg kan tas i drift, bland annat standardisering av provtagnings- och laboratorieprotokoll, slutförandet av referensbibliotek över streckkoder - särskilt för små organismer som mikroalger och bottenlevande djur (Hering et al. 2018, Weigand et al. 2019). FRESHBAR har utvecklat laboratorieanalyser på olika sätt och erfarenheter från detta och de nya framtagna referenssekvenserna bidrar till att vi kan komma ett steg längre med införandet av DNA-metoder. Vi ser att införandet medför en ökad kostnads-effektivitet, samt en förbättrad objektivitet och möjlighet till artidentifieringar för kiselalger och bottenfauna.

SLU har sedan flera decennier ansvar (på uppdrag av Naturvårdsverket & Havs- och vattenmyndigheten) för att genomföra den nationella övervakningen av sjöar och vattendrag. FRESHBAR bygger därför vidare på SLU:s infrastruktur för och expertis inom miljöövervakning, bestående av ett rikstäckande nätverk av provtagare, Swedac-certifierade labb för taxonomisk analys och en omfattande nationell sötvattensdatabas. Denna databas innehåller information om artsammansättningen för många hundra sjöar och vattendrag samt relevanta bakgrundsdata om vattenkemi och avrinningssegenskaper (Sonesten 2016). Till exempel kan personal som deltar i våra provnätverk mobiliseras för insamling av ytterligare (levande) prover från sjöar och för hjälp med fällor.

## 1.4 FRESHBARs delprojekt

En av utmaningarna med att införa molekylära metoder för identifiering av olika organismgrupper är t.ex. att referensbibliotek för nordiska arter av kiselalger är långt ifrån komplett (Weigand et al. 2019). Därför var FRESHBAR uppdelat i två delprojekt för de två olika organismgrupperna kiselalger (del 1) och bottenfauna (del 2) och med olika frågeställningar. Kiselalgsdelen var ett samarbete mellan SLU och Botanic Garden and Botanical Museum Berlin, Freie Universität Berlin (BGBM), Tyskland. Projektets andra del som fokuserade på bottenfauna var ett samarbete mellan SLU och Naturhistoriska riksmuseet (NRM).

## 2. FRESHBAR delprojekt 1 – kiselalger

### 2.1 Mål

Delprojektet som fokuserade på kiselalger hade som mål att generera referenssekvenser för arter som saknades idag i databaser, med fokus på relevanta nordiska arter (Rimet et al. 2019). Planen var att huvudsakligen använda den etablerade metoden att odla och sekvensera kiselalgskloner isolerade från en enda cell från provtagning i svenska sjöar och vattendrag. Vi planerade även direkt encellssekvensering av stora arter som inte var lätta att odla, samt metastreckkodning i kombination med parallell morfologisk analys av prover med låg diversitet. För metastreckkodningen planerades användning av både den etablerade metastreckkodningsmetoden, samt en ny metod där långa sekvenser används och därigenom möjliggör bättre artupplösning än korta streckkoder. Ett viktigt mål med projektet var att göra alla resultat offentligt tillgängliga för återbruk och vidare forskning. Vi planerade att lagra alla resultat, inklusive sekvenser, verifikationer och metadata, de levande klonerna och identifieringslänkarna till respektive information i offentliga samlingar och databaser.

### 2.2 Metoder

#### 2.2.1 Isolering, kultur och sekvensering av kiselalgskloner från enstaka celler

För att vidareutveckla referensbibliotek över DNA från fastsittande kiselalgsarter som lever i svenska sötvatten arbetade vi huvudsakligen med metoden att isolera, odla i kultur och sedan sekvensera kiselalgskloner från enstaka celler (Kelly et al. 2018). Kiselalger isolerades dels från 30 färska kiselalgsprov tagna 2019 i samordning med den nationella övervakningen, och dels från färska prover 2020, och äldre kulturer tagna i olika projekt. Arton kloner hade dessutom redan isolerats i ett pilotprojekt 2014-2016. Kiselalger isolerades med en mikropipett (Bild 1.1). Under 2019 gjordes 215 mikropipettisoleringar. Här ingår re-isoleringen av vissa kulturer som antingen inte var monoklonala än, eller kontaminerade av andra alger, svamp, eller bakterier. Arbetet resulterade i 147 växande kiselalgs kulturer. Under 2020 gjordes 275 mikropipettisoleringar vilket resulterade i 154 växande kiselalgs kulturer (Bild 1.2, 1.3). Ingen av dessa re-isoleras eftersom kulturerna var mycket renare än de från 2019. För varje kultur var målet att ta fotografier av levande alger. Kulturerna skördades när biomassan var tillräckligt stor. Kulturerna odlades i triplikat, av vilka en kultur skördades för DNA analyser, en för morfologisk analys, och en fick växa vidare som reserv. Vissa av reservkulturerna från 2019 delades i flera kulturer om de växte bra, och skördades mer än en gång för att säkerställa tillräcklig mängd med material för alla analyser. Kulturerna från 2020 skördades bara en gång. Skörderna genomfördes under 2019 och 2020.

Nästan alla kulturer kunde skördas och skickas för sekvensering (n=312). DNA-sekvensering av klonerna gjordes med Sangersekvensering enligt Zimmermann et al. (2011) för markören 18SV4, och Kelly et al. (2018) för *rbcL*-markören. Sekvenseringen genomfördes på laboratoriet av Botanic Garden and Botanical Museum Berlin, Freie Universität Berlin (BGBM), Tyskland (Bild 1.4-1.6). Sekvenseringen gjordes under 2020 och blev lyckade för nästan alla (300) prover för både *rbcL* och 18SV4 markörerna. Detta var tre gånger fler än vi hade planerat för i projektansökan.

Den planerade sekvenseringen av enstaka stora kiselalgs-celler (Hamilton et al. (2015) för arter som är svåra att odla i kultur kunde inte genomföras av logistiska skäl.



Bild 1.1. Isolering av enstaka celler med mikropipettmetoden på INRAE, CARTELE Limnology Center, Thonon-Les-Bains, Frankrike. Bild: Maria Kahlert.





Bild 1.2. FRESHBAR:s kiselalgskloner (isolerad från en cell med mikropipettmetoden) i kultur på tillväxt på SLU. Bild: Maria Kahlert.

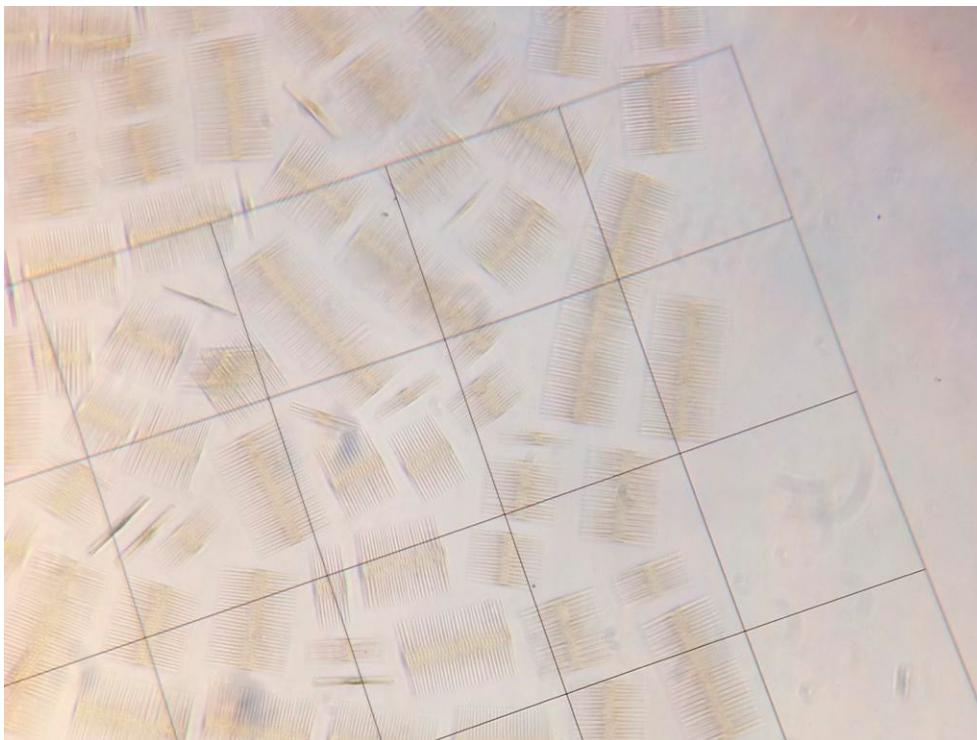


Bild 1.3. En av FRESHBAR:s kiselalgskloner efter isolering från en cell med mikropipettmetoden. Närbild av en *Fragilaria*-klon som bildar staketliknande kolonier (mikroskopbild, 40x). Bild: Demetrio Mora.



Bild 1.4. FRESHBAR:s kiselalgskloner efter skörd. DNA extrahering på DNA-laboratoriet vid Botanic Garden and Botanical Museum Berlin, Freie Universität Berlin (BGBM), Tyskland. Bild: Jana Bansemer.



Bild 1.5. PCR på gång av FRESHBAR:s kiselalgskloner på DNA-laboratoriet vid Botanic Garden and Botanical Museum Berlin, Freie Universität Berlin (BGBM), Tyskland. Bild: Jana Bansemer.

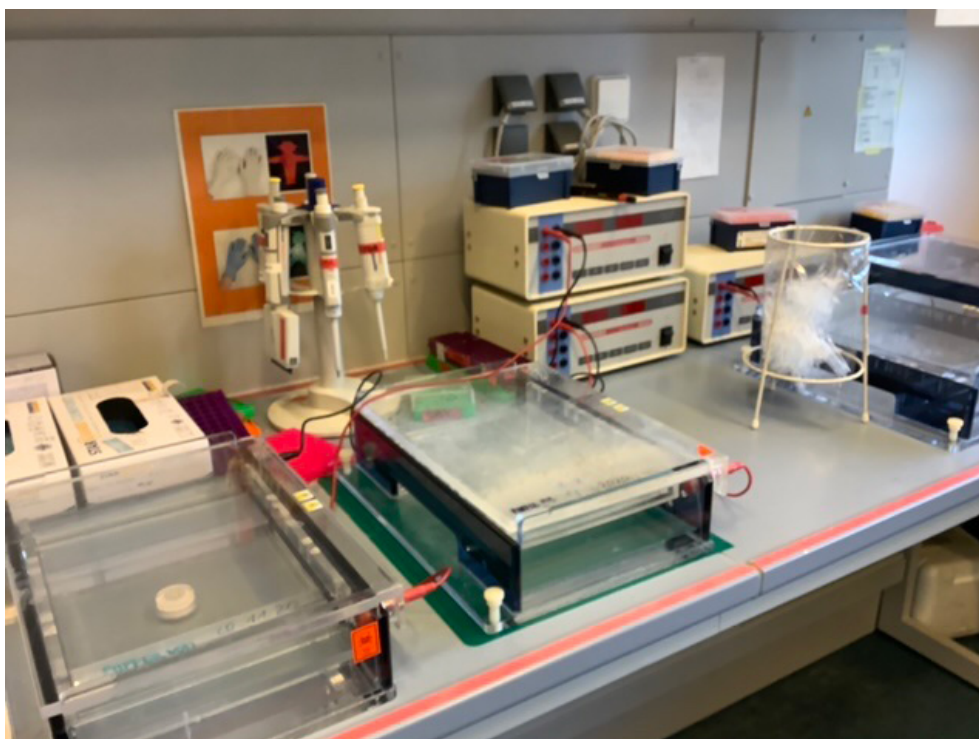


Bild 1.6. Gelelektrofores av PCR produkterna av FRESHBAR:s kiselalgskloner på DNA-laboratoriet vid Botanic Garden and Botanical Museum Berlin, Freie Universität Berlin (BGBM), Tyskland. Bild: Jana Bansemer.

## 2.2.2 Taxonomisk identifiering av etablerade kiselalgskloner

För taxonomisk identifiering av de sekvenserade klonerna användes ljus- och elektronmikroskop. De fotograferades, mättes och identifierades med hjälp av standardlitteratur för identifieringen av kiselalger samt nya vetenskapliga taxonomiska publikationer. För att förbereda kiselalgsproverna för fotografering gjordes preparat med en ny snabbmetod (Trobajo & Mann 2019) som rekommenderas särskilt för material från kulturer; och när beläggexemplar ska göras för museer. Metoden testades före användning och visade sig fungera mycket väl. Utöver analysen av det morfologiska materialet användes även själva sekvenserna för att kontrollera var i det fylogenetiska trädets sekvenserna hamnade i jämförelse med sekvenser från referensdatabaser; samt för att validera om existerande referenssekvenser skulle bekräfta eller motsäga den slutgiltiga identifieringen. Vi har använt referensdatabasen Diat.barcode för *rbcL* (Rimet et al. 2019), och referensdatabasen för 18S från Botanic Garden and Botanical Museum Berlin, Freie Universität Berlin (BGBM), Tyskland.

Arbetet med elektronmikroskop utfördes på Botanic Garden and Botanical Museum Berlin, Freie Universität Berlin (BGBM), Tyskland, som ett SYNTHESYS+ projekt (europeiskt projekt som stöder uppbyggnad och arbete med naturhistoriska samlingar). Taxa som prioriterades var de som saknades i referensdatabaser, eller som tillhörde kluster med väldigt få sekvenser. Vi lyckades preparera och fotografera 89 kloner under besöket. En högupplösande scanning electron microscope (SEM, SU810 FE-SEM, Hitachi) användes för att ta bilderna (Bild 1.7).

Ljusedmikroskoparbetet utfördes på institutionen för vatten och miljö, SLU, under 2022 och 2023. Preparat och bilder gjordes av de första 258 klonerna som sekvenserats. Mätningar av cellstorlek och analysen av cellform och -ornamentation gjordes under sommaren 2023. Den slutgiltiga taxonomiska identifieringen gjordes sedan med hjälp av litteraturen, det fylogenetiska trädets och i diskussion med experter under hösten 2023.



Bild 1.7. Identifiering av kiselalgskloner med hjälp av elektronmikroskop vid Botanic Garden and Botanical Museum Berlin, Freie Universität Berlin (BGBM), Tyskland. Bild: Maria Kahlert.

### 2.2.3 Metastreckkodning – etablering på institutionen för vatten och miljö, SLU

Parallellt med identifieringen av de etablerade kiselalgsklonerna började vi även arbetet med att etablera metoden att analysera miljöprov med DNA-metastreckkodning på det genetiska laboratoriet på avdelningen för Funktionell ekologi, institutionen för vatten och miljö, SLU (under ledning av Professor Stefan Bertilsson). Fokus var på bentiska kiselalger, och vi har testat och utvärderat olika metoder för provtagning, DNA extrahering, PCR (polymeraskedjereaktion), sekvensering och bioinformatik. Metoden för DNA extrahering av kiselalger ur bentiska miljöprov, samt PCR och sekvenseringen hade under hösten 2023 utvecklats så långt att den kan användas som rutin med hög genomströmning av prover. Bioinformatiken är under utveckling i samarbete med SBDI (Swedish Biodiversity Data Infrastructure). Vi har även tagit fram data för metastreckkodning, och använt dessa resultat för att undersöka hur väl Sveriges kiselalger är representerade i referensdatabaser, hur projektets resultat kan komplettera detta, och vilka framtida behov som finns.

## 2.2.4 Metastreckkodning knuten till morfologiska analyser av prover med låg diversitet

Vi testade som planerat att använda data från metastreckkodning för att generera nya referenssekvenser av korta konventionella amplikon (Rimet et al. 2018).

Vi testade även att utveckla metastreckkodning för längre målartssekvenser (Castano et al. 2018) för en högre taxonomisk upplösning.

För att hitta lämpliga prover med befintlig morfologisk analys och låg diversitet som skulle kunna ha analyserats för konventionella korta markörer använde vi alla lagrade prover på MVM-miljödatabas på SLU, och sållade ut prover med låg diversitet. En första analys av dessa prover visade att de fortfarande innehöll alldeles för många arter av ett målsläkte utan streckkod, d.v.s. det skulle inte ha varit möjligt att matcha arter identifierade i mikroskop med streckkoderna genererat genom metastreckkodning, så vi följde inte metoden vidare.

Utvecklingen av längre markörer utfördes både *in silico* (teoretisk modellering), och sedan *in vitro* (på laboratoriet) med monoklonala kiselagskulturer. Förstudier utfördes för att utveckla metastreckkodning av hela *rbcL*-genen (1400 bp lång) med sekvensering på PacBio's long read Single-Molecule Real-Time (SMRT) (Mora 2020). Logistiska problem hindrade en fortsättning av detta arbete.

## 2.2.5 Lagring och spårbarhet av prover och arter

Projektpartnern Botanic Garden and Botanical Museum Berlin, Freie Universität Berlin (BGBM), Tyskland, lagrar material och information av alla etablerade kloner för att göra materialet spårbart och användbart för vidare analys. Vi följer vägledningen för etablering av DNA-referensbibliotek etablerad enligt Rimet et al. (2021). Alla referenssekvenser och relaterade metadata länkas till fysiska vouchers (råmaterial i etanol, extraherad DNA i etanol, ljusmikroskop-preparat, elektronmikroskopiska preparat, fotografier av levande kulturer, och behandlade material från ljus- och elektronmikroskop). Referenssekvenserna länkas till formell taxonomisk litteratur. Referenssekvenserna sparas i offentliga databaser. Alla referenssekvenser och relaterade metadata länkas till beläggsmaterial för att kunna länka tillbaka till den formella taxonomiska litteraturen. Fysiska material (odlingsmaterial, mikroskopiska diabilder, SEM-stubbar, DNA-extrakt) deponeras på BGBM, och information kommer att göras tillgänglig via Global Genome Biodiversity Network (GGBN) och Global Biodiversity Information Facility (GBIF). Sekvenserna kommer att skickas till en INSDC-databas (EMBL) tillsammans med stamnummer, kupongnummer från Berlinherbariet (B) och DNA-biobanknummer. Även information om DNA-primers och georeferenser kommer att deponeras där. *rbcL*-sekvenserna kommer dessutom att skickas till Diat.barcode. Fotografisk dokumentation kommer att göras tillgänglig online från AlgaTerra Information System, länkad genom INSDC:s anslutningsnummer och anslutningsnummer från Berlinherbariet.

Morfologiska egenskaper, odlings-detaljer och provtagningsdata för insamlingsplatserna kommer också att deponeras i AlgaTerra Information System. Att länka samman herbarieinformation med annan dokumentation är dock en arbetskrävande insats, och det finns i nuläget inga resurser för detta. Själva råproverna från vilken kiselalger isolerades sparas i nuläget bara ett år i etanol på institutionen för vatten och miljö, SLU, sedan slängs de pga. platsbrist. Vi utredde möjligheterna att arkivera proverna, och har nu infört ett system där ett underprov av alla kiselalgsprover från vart tredje år sparas automatiskt i institutionens egen biobank.

Som planerat togs kontakt med BCCM/DCG Culture Collection i Gent, Belgien, för att etablera långtidskulturer av de kloner som hade isolerats och satts i kultur på SLU. På SLU finns inga resurser för upprätthållande av långtidskiselalgskulturer, det är en arbetskrävande insats med behov av stor expertkunskap. Tyvärr så kunde BCCM/DCG inte ta emot alla FRESHBAR-kloner pga. tids- och resursbrist. Vi tog därför kontakt med UTEX Culture Collection of Algae, USA, som tog emot några av de överlevande kulturerna. I slutändan sändes 36 kloner för långtidskultur/lagring (kryopreservation) till BCCM/DCG, och 32 till UTEX.

## 2.3 Resultat

### 2.3.1 Nya referenssekvenser för fastsittande kiselalgsarter

300 prover kunde framgångsrikt sekvenseras för markörerna *rbcL* och 18SV4 inom FRESHBAR. Av dessa kunde 258 identifieras till art eller släkte under projektets gång med hjälp av morfologiska och molekylära metoder. 42 prover identifierades enbart med molekylära metoder pga. tidsbrist. Ungefär hälften av dessa identifieringar är ganska säkra eftersom sekvenserna är identiska med andra som har validerats morfologiskt, och det ofta även finns anteckningar och ibland fotografier av levande kulturer som bekräftar namnet. Resten av sekvenserna måste analyseras vidare. Ett av de prover vi inte kunde sekvensera på BGBM blev senare sekvenserat framgångsrikt på DCG, inklusive morfologisk analys. De totalt 301 sekvenser kom från 202 unika kiselalgskulturer (36 kulturer hade re-isolerats och/eller skördats flera gånger). Vi kunde ordna sekvenserna till 17 genera, och identifiera 48 olika taxonkluster, som kan tolkas som olika arter (Tabell 1.1). Vi har alltså både resultat på arter, men även fått flera sekvenser inom en art. Under identifieringsarbetet blev det uppenbart att sekvenserna inte enkelt kan matchas med existerande morfologiska arter, varför många fått namn med attributen "cf." (confer). Detta betyder att man är ganska säker på namnet, men att någon morfologisk karaktär inte matchar precis med en art som redan är beskriven. Ett annat attribut är "aff." (affinis) som betyder att namnet är väldigt osäkert, men att morfologin liknar en viss annan art. Vissa grupper kunde tillordnas ett artkomplex, men matchade inte exakt morfologiska beskrivningar av någon existerande art. En del grupper kunde inte identifieras till art, antingen för att ingen av de nära besläktade beskrivna arter matchade, eller för att en art med sådana morfologiska karaktärer inte är beskriven alls än.

Tabell. 1.1. FRESHBAR resultat. Nya referenssekvenser (*rbcL* och 18SV4) för fastsittande sötvattens-kiselalgsarter från Sverige. Identifierade släkten och taxogrupper, samt antal ingående sekvenser och unika kloner (vissa med replikat).

Släkte	antal sekvenser	antal unika kloner	genetiska kluster (möjligen arter)		
Achnanthidium	71	40	3	A. minutissimum complex	
Fragilaria	60	59	9	F. campyla F. cf. acerosa F. cf. capucina F. cf. heatherae F. radians F. species unknown 1 F. species unknown 2 F. species unknown 3 F. tridentina	(Hilse) Van de Vijver, Kusber et D.M.Williams comb. nov. Van de Vijver, C.E.Wetzel, Jarlman et Ector sp. nov. Desmazières Kahlert & M. G. Kelly (Kützing) D.M.Williams et Round 1987 – epitype BERW-03510 Cantonati et Lange-Bertalot
Ulnaria	9	7	3	U. cf. grunowii U. cf. delicatissima U. cf. danica	(Lange-Bertalot & S.Ulrich) Cantonati & Lange-Bertalot in Kusber, Cantonati & Lange-Bertalot (W.Smith) M.Aboal & P.C.Silva (Kützing) Compère & Bukhtiyarova
Gomphonema	53	22	7	G. aff. drutlingense G. cf. "nordicum 1" G. cf. "nordicum 2" G. cf. angustatum G. cf. narodoense G. cf. lagenula G. montanum	E.Reichardt  (Kützing) Rabenhorst R. Jahn, Abarca, J. Zimmermann Kützing Schumann
Eunotia	51	26	11	E. bilunaris E. sp.1 E. cf. seminulum E. flexuosa/ pseudoflexuosa/ latitaenia - group E. glacialispinosa E. implicata E. implicata or minor E. incisa E. myrmica E. sp. 2 E. sp. 3	(Ehrenberg) Schaarschmidt  Norpel-Schempp & Lange-Bertalot in Lange-Bertalot & Metzeltin  H.Lange-Bertalot & M.Cantonati Nörpel, Lange-Bertalot & Alles  W.Smith ex W.Gregory H.Lange-Bertalot



Tabell. 1.1. FRESHBAR resultat. Nya referenssekvenser. Forts.

Släkte	antal sekvenser	antal unika kloner	genetiska kluster (möjligen arter)		
Tabellaria	17	16	1 (3)	T. flocculosa	(Roth) Kützing
Pinnularia	14	8	3	P. aff. bertrandii	K.Krammer
				P. biceps var. gibberula	(Hustedt) K.Krammer
				P. viridiformis MT2	Krammer
Nitzschia	12	12	2	N. cf. acidoclinata	Lange-Bertalot
				N. cf. gracilis	Hantzsch
Encyonema	4	2	2	E. vulgare	Krammer
				E. cf. silesiacum	(Bleisch) D.G.Mann
Brachysira	2	2	1	B. cf. microcephala	(Grunow) Compère
Craticula	2	2	1	C. buderii	(Hustedt) Lange-Bertalot
Asterionella	1	1	1	A. formosa	Hassall
Cyclotella	1	1	1	C. meneghiniana	Kützing
Frustulia	1	1	1	F. crassinervia-saxonica complex	(Kützing) Compère & Bukhtiyarova
Navicula	1	1	1	N. sp.	
Planothidium	1	1	1	P. lanceolatum	(Brébisson ex Kützing) Lange-Bertalot
Staurosira	1	1	1	S. cf. venter	(Ehrenberg) Cleve & Moeller

Några höjdpunkter ur resultaten är den relativt höga andelen *Eunotia* taxa och *Brachysira* sekvenserna – båda taxa är dåligt representerade i kiselalgsdatabaser men förekommer frekvent i svenska sötvatten. Den vackra arten *Eunotia myrmica* H.Lange-Bertalot har t.ex. inte funnits i databasen alls förut. Ungefär hälften av de 48 taxa/arter som vi har tagit fram är nya för Diat.barcode databasen. Vi har förutom sekvenserna även lyckats dokumentera flera morfologiska egenskaper på bild. I många fall har vi kunnat dokumentera kolonibildningar, och formen på dessa kolonier. I några enstaka fall har vi även lyckats dokumentera bildandet av auxosporer och celler av olika längd i livscykeln (Bild 1.8). Även våra bilder av de elektronmikroskopiska detaljerna ger värdefull information om de taxa i vår undersökning och hur de skiljer sig från närbesläktade taxa (Bild 1.9).

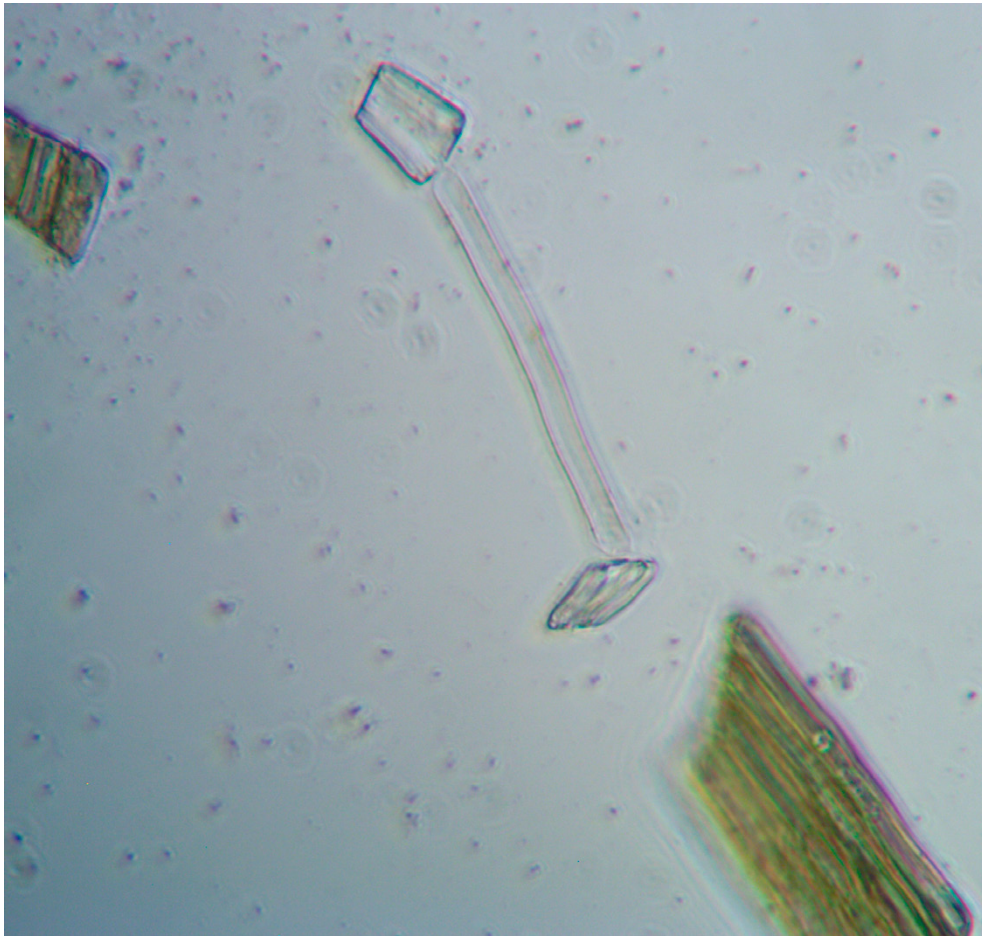


Bild 1.8. Kiselalgen *Eunotia myrmica* H.Lange-Bertalot i levande kultur. Små celler i slutet av livscykeln som bildar gameter och till slut en auxospor, som i sin tur delar sig och bildar långa bandkolonier av långa celler igen. Foto: M.Kahlert

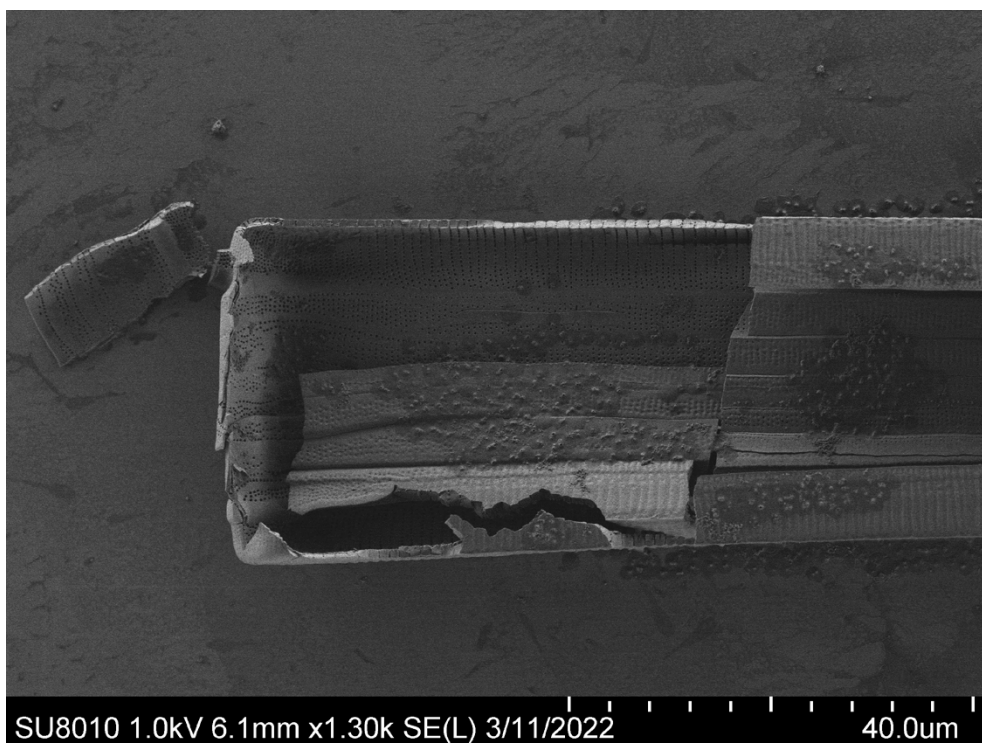


Bild 1.9. Kiselalgen *Eunotia myrmica* H.Lange-Bertalot under elektronmikroskop. Cellen är delvis uppbruten så tjockleken av glasväggen blir synligt, samt detaljer från både inre och yttre cellväggar av glas. Foto: M.Kahlert

### 2.3.2 Lagring och spårning av prover och arter

Arbetet med dokumentationen av alla FRESHBAR-kloner på Berlinherbariet är pågående i skrivande stund (höst 2023). Där finns nu 256 taxa delvis dokumenterat, och kan hittas genom att ange "FRESHBAR" i sökfältet "collection" i Databank-URL: [https://www.ggbn.org/algae\\_bgbm/sptool/sptool.php](https://www.ggbn.org/algae_bgbm/sptool/sptool.php). Sekvenserna är inte offentligt tillgängliga än, och själva det fysiska materialet är inte heller dokumenterat än. Detta arbete återstår. När alla kloner har fått ett dokumenterat stamnummer, kupongnummer från Berlinherbariet (B) och DNA-banknummer kommer vi publicera detta och övrig information om FRESHBAR-projektet i en översiktsartikel, samt implementera *rbcL*-sekvenserna i Diat.barcode. Den fullständiga informationen om alla kloner, sekvenser, samt annat material såsom bilder sparas tills dess internt hos institutionen för vatten och miljö, SLU, och kan beställas genom att skicka en förfrågan till Maria Kahlert.

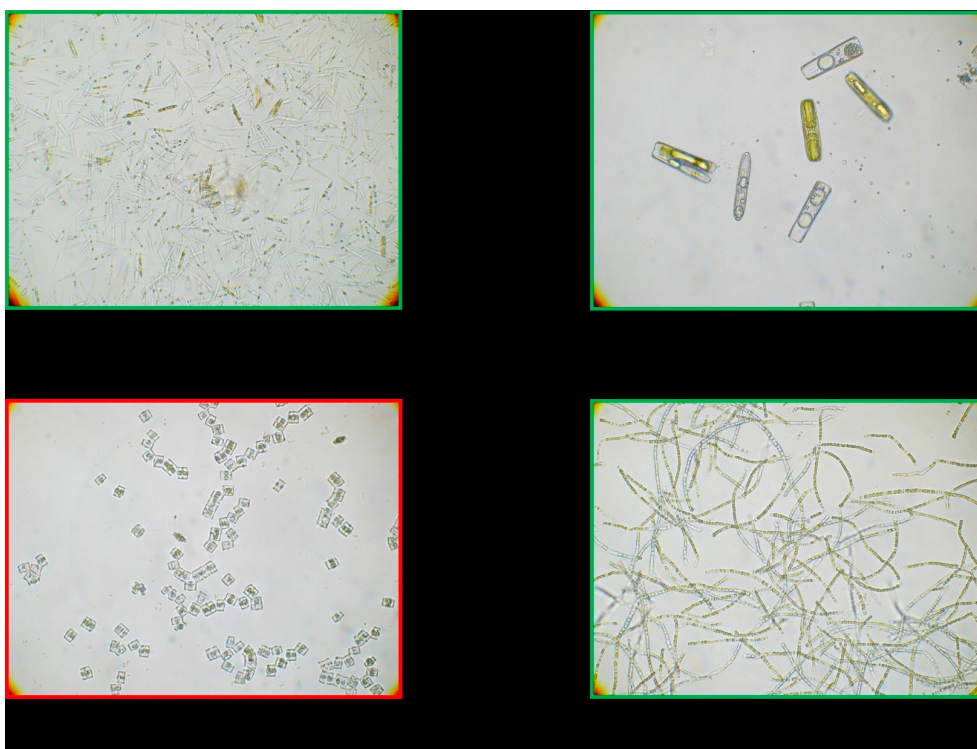


Bild 1.10. Fotografier från sparade FRESHBAR kiselalgs-kulturer hos BCCM/DCG samlingen i Belgien. Övre raden: *Fragilaria*, *Pinnularia*, nedre raden *Tabellaria*, *Staurosira*.  
Foto: Olga Chepurnova

De 36 kloner som skickades till BCCM/DCG samlingen i Belgien har lagts ut offentligt (<https://bccm.belspo.be/about-us/bccm-dcg>) med accession nummer DCG 1032, 1035-1045, 1093-1101, 1211-1225. Överenskommelsen med BCCM/DCG är att kulturerna överlåtas till samlingen med öppen tillgång (mot en avgift för deras arbete) till både kulturmaterial och eventuella resultat de tar fram. BCCM/DCG har arbetat med att rena kulturerna från föroreningar, odla fram friska kulturer, ta fram fyra olika streckkoder (ITS, LSU, rbcL, SSU), identifiera taxa, samt testa att långtidsförvara dem med kryokonservering. Streckkodningen, som innehåller tre andra markörer än de som vi analyserade i FRESHBAR, kunde genomföras av nästan alla prover. Enbart tre var redan döda vid ankomsten i Belgien och en dog innan den hade utvecklat tillräckligt biomassa. De flesta kulturer är nu kryokonserverade, förutom en som nu odlas i flytande medium, och fyra som dog efter en tid. 15 FRESHBAR taxa är nu sparade hos BCCM/DCG, och för ytterligare tre finns nya streckkoder och annan dokumentation (Tabell 1.2, Bild 1.10).

**Tabell. 1.2. FRESHBAR resultat för fastsittande sötvattenskiselalgsarter från Sverige. Kloner och nya referenssekvenser (ITS, LSU, rbcL, SSU) lagrade hos BCCM/DCG samlingen i Gent, Belgien. Identifierade släkten och taxongrupper, samt antal ingående sekvenser och unika kloner (vissa med replikat).**

Släkte	Antal unika kloner	Genetiska kluster (möjligen arter)	Lagring
<i>Achnanthidium</i>	8 (varav 2 med ett replikat)	<i>A. minutissimum complex</i>	kryopreserverad
<i>Fragilaria</i>	1	<i>F. species unknown 1</i>	kryopreserverad
	2	<i>F. species unknown 3</i>	kryopreserverad
<i>Gomphonema</i>	2 (varav en dog)	<i>G. montanum</i>	kultur
	2	<i>G. cf. "nordicum 2"</i>	kryopreserverad
	1	<i>G. cf. narodonense</i>	kryopreserverad
	2	<i>G. cf. angustatum</i>	kryopreserverad
	1	<i>G. sp.</i>	kryopreserverad
<i>Nitzschia</i>	1	<i>N. cf. gracilis</i>	kryopreserverad
	1	<i>N. sp.</i>	kryopreserverad
<i>Pinnularia</i>	1	<i>P. aff. bertrandii</i>	kultur
	1	<i>P. viridiformis MT2</i>	kultur
<i>Staurosira</i>	1	<i>S. cf. venter</i>	kryopreserverad
<i>Tabellaria</i>	2	<i>T. flocculosa</i>	kryopreserverad
<i>Ulnaria</i>	1	<i>U. cf. delicatissima</i>	kultur
<i>Eunotia</i>	2	<i>E. flexuosa/pseudoflexuosa/latitaenia - grupp</i>	död
	1	<i>E. bilunaris</i>	död

Matt P. Ashworth från UTEX Culture Collection of Algae, USA, informerade att de flesta av de 32 kulturer som hade skickats dit fortfarande lever och växer, och att även han har streckkodat, fotograferat, samt analyserat med elektronmikroskop många kloner. Vi har kommit överens om att samarbeta med vidarebearbetning av materialet och resultaten när tillfället ges. Eftersom samarbetet är informellt har Matt inte kunnat prioritera det. Han ska skicka information om de svenska kulturerna på UTEX snarast möjligt och han kommer att få all information om dokumentationen hos BGBM Berlin så att all information om kulturerna kan kopplas ihop. Prioriteringen i samarbetet har varit att få så många kulturer som möjligt i långtidsförvarning för att möjliggöra vidare forskning.

### 2.3.3 DNA-metastreckkodning av bentiska kiselalger från bentiska miljöprov på SLU

Sex olika separata DNA metastreckkodningsanalyser av miljöprover av bentiska kiselalger från sötvatten i Sverige har gjorts hittills. De första av dessa analyser gjordes inom ramen för ett pilotprojekt (Bailet, B. 2021). Där har totalt 324 prover analyserats från Sverige och andra nordiska länder, med en geografiskt, en när-salts- och en pH-gradient, delvis med en annan sekvenseringsmetod än den som numer är standard. Två andra metastreckkodningsanalyser av miljöprover har gjorts i HaV projekten Dnr. 1928-2020 och Dnr. 1152-21 med totalt 361 prover från vattendrag i fem avrinningsområden i Sverige. I dessa fanns fokus på hydromorfologisk påverkan i mestadels oligotrofa vatten (Öreälven, Lögdeälven, Gavleån, Emån, Lagan). Ytterligare två metastreckkodningsanalyser pågår inom HaV

projekten Dnr. 3739-22 och 1458-23. Här analyseras mer än 360 kiselalgsprover från olika habitat som redan har mikroskopresultat med syfte att bredda både den geografiska och näringsgradienten för de tidigare proverna.

En första analys av metastreckkodningresultaten från de relativt näringsfattiga vattendragen (HaV projekt Dnr. 1928-2020, 1152-21) visar att man kan ordna ungefär 2/3 av de unika sekvenserna (n=4095) till ett släktnamn i referensdatabasen Diat.barcode, de flesta av dessa (ca. 3/4) även till ett artnamn. Av de 20 vanligaste sekvenser är det bara två som inte kan ordnas till ett namn. Det ser alltså ut som om det finns en rätt så god täckning av svenska kiselalger i referensdatabasen. Tyvärr stämmer inte detta. En närmare analys av släktet *Eunotia*, dit 316 unika sekvenser hör, visar att 78 helt saknar artnamn, 48 har ”*Eunotia* sp.” som artnamn vilket betyder att sekvensen i referensdatabasen inte har ett säkert artnamn. 73 av de 316 *Eunotia* sekvenser sorteras under *Eunotia glacialis*, vilket är en felbestämning på grund av att det finns väldigt få *Eunotia*-sekvenser i referensdatabaserna. I sådana fall kopplar bioinformatik-algoritmerna nya sekvenser ofta till redan etablerade, men fel artnamn i avsaknaden av fler och korrekta sekvenser. Bioinformatiken fungerar mycket bättre för taxa som redan har ganska många referenssekvenser i databasen. Hela 199 unika *Eunotia* sekvenser har alltså inget artnamn alls, fast släktet *Eunotia* är viktigt i Sverige för bedömningen av rena och sura vatten. Den förekommer frekvent, och även dominant, i sura vatten. Fortfarande saknas många svenska sötvattenskiselalgsarter i referensdatabaser. Enbart inom släktet *Eunotia* fattas fortfarande cirka 80 arter som vi vet finns i Sverige. I den senaste versionen av Diat.barcode (11.1) ingår visserligen 119 *Eunotia* sekvenser, men dessa tillhör enbart 14 arter, och 42 faller på en enda art (*E. bilunaris*). 41 sekvenser har enbart identifierats till genus (*E. sp.*). De andra arterna är alltså mycket sämre representerade i databasen, vilket leder till att nya sekvenser av *Eunotia* får fel artnamn.

FRESHBAR:s nya sekvenser kommer att förbättra koppling av sekvenser till artnamn, och i sin tur förbättra resultaten av metastreckkodninganalyser. Metastreckkodningsarbetet pågår i högsta grad med att både analysera kiselalgsprover och att förbättra och etablera metoden som rutin på institutionen för vatten och miljö, SLU.

## 2.4 Diskussion och slutsatser i delprojektet fokuserat på kiselalger

Genom att samla in färska prover för isolering av kiselalgsceller i samarbete med befintlig miljöövervakning har vi kunnat arbeta kostnadseffektivt samt ta tillvara på mycket bakgrundsinformation av lokalerna. Det senare är viktigt både för artidentifieringen och för en ekologisk karakterisering. Med sådan information kommer det vara möjligt att utveckla kiselalgsindex som är baserat på metastreckkodningsdata, istället för som nu på mikroskopdata. Våra samarbeten med nationell och internationell infrastruktur för DNA-streckkodning har garanterat hög kvalitet och lämplig lagring och spårbarhet av prover och arter. Dessa samarbeten har också säkerställt ett värdefullt kunskapsutbyte och att vi har undvikit onödigt dubbelarbete och upprepning av misslyckanden.

Framförallt har vi samarbetat med två av Europas viktigaste referensdatabaser som har tagits fram för att möjliggöra kiselalgs-metastreckkodning för övervakning av sjöar och vattendrag: databasen vid Botanic Garden and Botanical Museum Berlin, Freie Universität Berlin (BGBM) (kontakt: Jonas Zimmermann) och Diat.barcode, som finns hos INRAE i Frankrike (kontakt: Frederik Rimét). Båda databaser är kurerade, vilket innebär att sekvenserna är kvalitetssäkrade, och kiselalgsartnamnet genomgått en kontroll av en eller flera experter. Vi har även samarbetat med långtidskiselalgssamlingarna BCCM/DCG och UTEX, som bidragit med stor taxonomisk expertis. Med hjälp av dessa partners, och den nyaste litteraturen, har vi nu identifierat 48 genetiska kluster till art (eller närmast möjligt), och håller på att implementera dessa taxa i databaserna för vidare användning inom forskning och miljöanalys.

Under arbetets gång har vi upptäckt att många kloner inte kunde identifieras till en redan beskriven art. Resultatet blev att många kloner enbart har identifierats till släkte, vilket betyder att vi har utslutit att klonen kan enkelt identifieras som en redan beskriven art. Andra kloner har fått en identifiering till en viss alggrupp när det inte var möjligt att komma ner till en viss art. Åter andra identifieringar blev osäkra av andra anledningar, och fick därför en brasklapp i namnet såsom ”cf.” eller ”aff.”. Det fanns flera skäl till att inte alla kloner fick ett säkert artnamn. En är att det behövs mera tid och kunskap för att förstå om klonen är en art som är ny för vetenskapen eller om den tillhör en art som har beskrivits med för lite morfologisk variation. Mera ingående analyser av den genetiska variationen och samhörighet med andra taxa behövs, och även flera morfologiska analyser. Dessutom krävs arbete att koppla ihop båda. Kiselagstaxonomi utvecklas i rasande takt, men tyvärr är det fortfarande vanligt att nya arter enbart beskrivs baserat på morfologiska karaktärer (e.g. Heudre et al. 2021, Van de Vijver and Williams 2022). Våra resultat måste användas för att förstå om dessa nya arter verkligen är genetiska enheter, eller om vi bör omvärdera definitionen av vissa arter. Det pågår många forskningsprojekt angående detta (e.g. Abarca et al. 2014, Kahlert et al. 2020, Pinseel et al. 2020). FRESHBAR resultaten kan nu användas för att ingå i sådana projekt då resultat och prover kommer att finnas tillgängliga i databaser och samlingar med Open Access. Vi har redan kontaktat kiselalgstaxonomer med expertis för vissa artgrupper för att planera ett framtida samarbete, men detta arbete behöver finansiering vilket vi i nuläget saknar. Ett verktyg som på ett mycket lovande sätt skulle kunna hjälpa forskningen är analysverktyget yapotu (<https://gitlab.inria.fr/biodiversiton/yap>) som kan jämföra sekvenser och deras skillnader och utvärdera släktskap baserat på var skillnaderna ligger.

Många av FRESHBAR-klonerna tillhörde taxa som redan fanns i referensdatabaserna. Dessa benämns ofta som kiselalgs”ogräs” eftersom de är lätta att odla. De är ändå värdefulla för de härstammar från Sverige och är vanliga även här. Vi kan nu använda dessa sekvenser för svensk metastreckkodning med större säkerhet än om det bara hade funnits sekvenser från andra biogeografiska områden. Dessutom bidrar resultaten till att öka kunskapen om deras biogeografiska utbredning, taxonomi och ekologi. Även om vi ”enbart” fått fram 48 olika taxa, så hör flera av dessa taxa till kiselalgssläkten där den taxonomiska forskningen pågår för fullt, och där alla sekvenser inom dessa släkten är värdefulla för forskningen. Detta gäller framförallt *Eunotia* (Vanormelingen et al. 2008, Lange-Bertalot et al. 2011) och *Fragilaria* (Kahlert et al. 2020), men även *Gomphonema* (Abarca et al. 2020),

*Pinnularia* (Kollár et al. 2021) och andra. Många nya arter beskrivs i dessa släkten och nu har vi resultat som kan sätta svenska taxa i ett sammanhang. Med fler sekvenser av samma art i databaserna kan vi även öka kunskapen om inomartsvariation och göra artbestämningen säkrare.

En erfarenhet från de genetiska analyserna inom FRESHBAR är att man borde ha långa sekvenser, gärna flera markörer, för att kunna analysera den genetiska variationen inom och mellan arter och släkten. Vi har bland annat undersökt hur man i Diat.barcode var tvungen att sammanfoga olika artnamn för att referenssekvensen är likadan på det korta markörsavsnittet. De korta avsnitt som används för metastreckkodningen kan ibland inte skilja mellan arter eftersom dessa inte alltid speglar genetiska skillnader mellan arter. Det är därför viktigt att det finns tydlig information i både referensdatabaser och i metastreckkodningresultat om vilka arter som eventuellt finns inom en art/taxonnamn. Det är även viktigt att redovisa sannolikheten för korrektheten i art/taxonnamnet. Varje tillfogad sekvens, även sekvenser av mera vanliga arter, underlättar identifieringen när man använder referensdatabasen i metastreckkodningsprojekt. En slutsats är att man måste ta nuvarande verktyg som kopplar artnamn till sekvenser med en nypa salt, eftersom artlistorna är väldigt beroende på hur kompletta referensdatabaserna är. Ju fler sekvenser det finns inom ett släkte eller artgrupp desto större säkerhet har det resulterande artnamnet. Att det finns ett artnamn överhuvudtaget betyder inte att den är korrekt. Mera arbete måste läggas på att tillsammans med bioinformatikerna arbeta fram fungerade lösningar för analysen av metastreckkodning. Här pågår redan vidareutvecklingen av verktyg genom ett samarbete med SBDI, och vi planerar för att kunna testa detta redan i början av 2024 med befintliga metastreckkodningsdata som vi har tagit fram.

En annan lösning för att lättare kunna skilja på arter är att övergå till användning av längre markörer (Gueidan and Li 2022). Längre streckkodningssekvenser kan ha fler variationer i sin sammansättning och möjligheten att kunna skilja mellan arter är då större. Ett resultat som vi kom fram till var att man behöver högkvalitativ DNA-material för metastreckkodningen av längre markörer.

Erfarenheten från arbetet med isolering och kultur av kiselalgerna visade att det krävs mycket stor kunskap och framförallt skicklighet att få till en ren kultur av en kiselalgsklon, och få den att växa tills tillräcklig biomassa för skörd och sekvensering finns tillgänglig. Det hjälper även att korta tiden från isolering till skörd så mycket som möjligt för att undvika kontamination. I dessa fall behövs utbildade laboratorieassistenter som har tid att kontrollera alla kulturer dagligen, samt skörda vid behov, eftersom de växer olika fort. Trots att vi arbetade så sterilt som möjligt fick vi svårigheter med kontaminering av kulturerna genom bakterier, svamp, mikroalger och celler från snabbväxande andra kloner som funnits i samma rum. En annan erfarenhet var att det lönar sig föga att använda gamla kulturer av kiselalger för ett sådant streckkodningsprojekt. De flesta av dessa kulturer hade förminskat sin cellstorlek så pass mycket att den morfologiska identifieringen ofta blev osäker eftersom de typiska kännetecknen saknades på dessa "miniceller". Det är bäst att isolera nya celler från färskt material. Vi lärde oss också att det tar mycket tid att dokumentera resultat, och att man är beroende av sina samarbetspartners för att komma framåt. Detta arbete, som ofta är ganska osynligt, bör i framtida projekt få en mycket större andel av budgeten än vi hade planerat för i FRESHBAR.



FRESHBARs kiselalgsresultat bidrar till vidareutveckling av DNA-referensbibliotek och kommer tillsammans med metastreckkodningstekniken göra det möjligt att använda miljö-DNA för övervakning av biologisk mångfald, samt ekologisk status av sjöar och vattendrag i Sverige. Fortfarande återstår mycket arbete för att komplettera DNA-referensbibliotek. Mera taxonomiskt arbete måste göras som kopplar ihop den morfologiska och den molekylära artbestämningen. Bland annat behöver vi lägga tid på att beskriva flera av FRESHBARs nya arter eftersom många är typiska för Sverige. För att sedan kunna använda metastreckkodning som beslutsstöd krävs att kunskap finns om referenssamhällen och skillnaden mellan god och måttlig status,. För detta behöver kiselalgsindex baserad på genetiska data utvecklas. I början kommer DNA-metoden ha större osäkerhet både med avseende på korrekt analys av mångfalden och den ekologiska statusen, eftersom det krävs tid för att arbeta bort okända felkällor. Framförallt behöver vi arbeta med taxonomin, och att identifiera den ekologiska nischen för kiselalgstaxa baserad på streckkodningen. Den ekologiska nischen är inte samma som för arter identifierad med mikroskop, främst för att vi grupperar kiselalger på ett helt nytt sätt. Nu har vi kunskap som gör att vi kan ta hänsyn till genetisk variation, men som samtidigt visat sig inte är detsamma som morfologiska skillnader.

## 3. FRESHBAR delprojekt 2 – bottenfauna

### 3.1 Mål

I FRESHBARS andra delprojekt (WP2) strävade vi efter att introducera och etablera streckkodnings- och metastreckkodningstekniker i nationell miljöövervakning i Sverige. Detta gällde nyckelgrupper av bottenlevande ryggradslösa djur (det vill säga bottenfauna). Specifika mål var att

- analysera DNA-metastreckkoder hos ryggradslösa sötvattensdjur, med fokus på Chironomidae och Oligochaeta, för att få bättre insikt i den biologiska mångfalden hos dessa ekologiskt viktiga, men taxonomiskt komplexa grupper
- komplettera befintliga referensbibliotek av streckkoder genom att samla in och analysera prover från vuxna fjädermyggor för taxonomisk identifiering av ännu okända arter
- undersöka användbarheten av kortare fragment från COI-genen (c:a 420 bp) för artbestämning mot referensbiblioteket med COI och i metastreckkodning av lagrade prover
- identifiera nya arter som kan användas som bioindikatorer över miljögradienter
- jämföra ekologiska statusindex baserade på taxonomisk information från morfologiska och DNA-metoder
- testa om metastreckkodning kan användas i utvecklingen av nya biologiska index för att bedöma ekologiska status för sjöar.

### 3.2 Metoder

#### 3.2.1 Metoder för streckkodning av Chironomidae

I delprojektet för streckkodning av fjädermyggan Chironomidae har vi analyserat prover från ca 100 sjöar som ingår i den nationella miljöövervakningen. Ett 20-tal av dessa ligger i den svenska fjällkedjan och nordligaste Norrland (arktisk/alpin ekoregion). Litoralprover som samlats in på årsbasis och lagrats vid SLU har använts för detta ändamål.

#### REFERENSFREKVENSER

För att få fram mer material från sjöar i fjällområdet har vi samarbetat med ett annat projekt (Insect Biome Atlas, projektledare Fredrik Ronquist, NRM) och placerat ut malaisefällor nära några av sjöarna i det nationella övervakningsprogrammet (Abiskojaure, Stor Tjulträsket, Stor Björsjön och Övre Särnmansjön). Från dessa prover samlade vi veckovis in vuxna fjädermyggor och analyserade dessa med traditionell taxonomi.

Materialet från malaisefällorna gjordes tillgängligt för utsortering och analys av fjädermyggor för FRESHBAR projektet. Särskild fokus var att ge material för arter som ännu inte har en streckkodssekvens i databasen BOLD (<http://www.bold-systems.org/>). Fjädermyggorna preparerades och artbestämdes morfologiskt (av Dr Yngve Brodin, NRM). Ett par ben avlägsnades för DNA-extraktion och sanger-sekvensering av en del av CO1-genen i mtDNA som används för standardiserad artspecifik sekvensering, s.k. streckkodning. Amplifiering med PCR primers gjordes med primerparet LCO1490 och HCO2198 (Folmer et al 1994) som ger ett 680 baspar (bp) fragment. De sekvenser som metoden resulterade i, adderades till streckkods-sekvenserna i databasen BOLD, varefter en summering av antalet svenska arter med sekvenser gjordes.

## METODTEST AV PRIMERS OCH JÄMFÖRELSE MELLAN LOKALER OCH PROVÅLDER

Vi har även studerat effekterna av provets ålder (lagringstid) för resultatet av streckkodningen. Till detta använde vi nyligen etanolfixerade litoralprover från övervakningssjöar (år 2017) som representerar olika sjötyper (oligotrofa humösa sjöar och dito klarvattensjöar, samt för näringsrika humösa och dito klarvattensjöar) som vi jämförde med prover som lagrats i SLU:s arkiv i flera år (sedan 2006 eller 2009). Oligotrofa humösa sjöar som ingick var Remmarsjön, Bjännsjön och Långsjön, medan de näringsrika humösa sjöarna som ingick i testet var Ämten, Svartsjön och Harasjön. Näringsfattiga klarvattensjöar som ingick var Vuolejaure, Njalakjaure och Trönntjärnarna, medan de näringsrika klarvattensjöarna var Ymsen, Havgårdssjön och Krageholmssjön. Urvalet av dessa olika sjötyper om-fattade många taxa. Testet utfördes vid NRM.

Bottenfaunaprover användes för tester av metastreckkodning-primers och kvalitén på prover från olika sjöar och årtal bedömdes. Organismerna homogeniserades och DNA extraherades för varje sjö/årgång/prov. För dessa samlingsprover användes interna primers för CO1-genen som ger kortare fragment, eftersom analyser av samlingsprover som har lagrats i flera år förväntades ha sämre DNA kvalitet.

För dessa analyser användes PCR primers BF2-BR2 (Elbrecht & Leese 2017) som ger 420 bp av CO1, med specifika DNA-märkningar för varje sjö och år, för att möjliggöra sammanslagna bibliotek av prover i sekvensering och separering av resultaten. Sekvenseringen utfördes på SciLife-lab i Stockholm med instrumentet Illumina MiSeq v3. Sekvenserna analyserades bioinformatiskt med programpaketet Obitools (<https://git.metabarcoding.org/obitools/obitools3>, kompletterat med olika specialsript (Marquina et al. 2019). Artbestämning baserades på ett *tröskelvärde* av minst 95% likhet i sekvenser vid klustringen.

I denna rapport redovisar vi hur olika metoder påverkar utfallet för ett antal index som ingår i de svenska bedömningsgrunderna. Vid indexberäkningar (BQI, DJ) där arternas abundans behövs har vi satt abundansen som summan av antalet taxa i ett prov för data baserade på resultat från DNA-streckkodning (se Buchner et al. 2019). Detta förfarande behövdes då abundansdata, som ingår i vissa index inte kunde fås fram från DNA-sekvenserna då användningen av antalet "reads" inte är tillräckligt utvecklat.

### 3.2.2 Metoder för metastreckkodning av profundalprover

I delprojektet för metastreckkodning av profundalprover har vi analyserat bottenfaunaprover tagna 2020 i 104 sjöar inom programmet för den nationella miljöövervakningen och från åtta påverkade (eutroferade) sjöar i Uppland. De senare var en del av en riktad satsning för att förlänga miljögradienter, då eutrofa sjöar är underrepresenterade i den nationella miljöövervakningen. Med dessa prover kunde vi jämföra utfallet av streckkodning med traditionella morfologiska identifieringar som utfördes av experter vid det ackrediterade laboratoriet vid institutionen för vatten och miljö, SLU. Efter morfologisk identifiering lagrades proverna i 98 % etanol innan analys av DNA-metastreckkodning. Metastreckkodning och traditionell morfologisk artbestämning jämfördes i samarbete med projektet SCANDNAnet (Nordic Council of Ministers 2020). Dataanalys utfördes med både multivariata (PCA, NMDS) och med regressionsanalyser och PERMANOVA.

## 3.3 Resultat och diskussion

### REFERENSSEKVENSER

Materialet från malaisefällorna vid fjällsjöarna innehöll över 30000 insekter, varav över 8000 var chironomider. Streckkodssekvenser togs fram för 23 individer som bedömdes representera arterna av fjädermyggor. Bra sekvenser (650 bp) erhöles för 20 individer som representerade 19 arter. Två arter hittades som är nya för Sverige och en art ny för vetenskapen. Vid streckkodssekvenseringen återfanns cirka 84% av de kända arterna av fjädermyggor i Sverige.

### METODTEST AV PRIMERS OCH JÄMFÖRELSE MELLAN LOKALER OCH PROVÅLDER

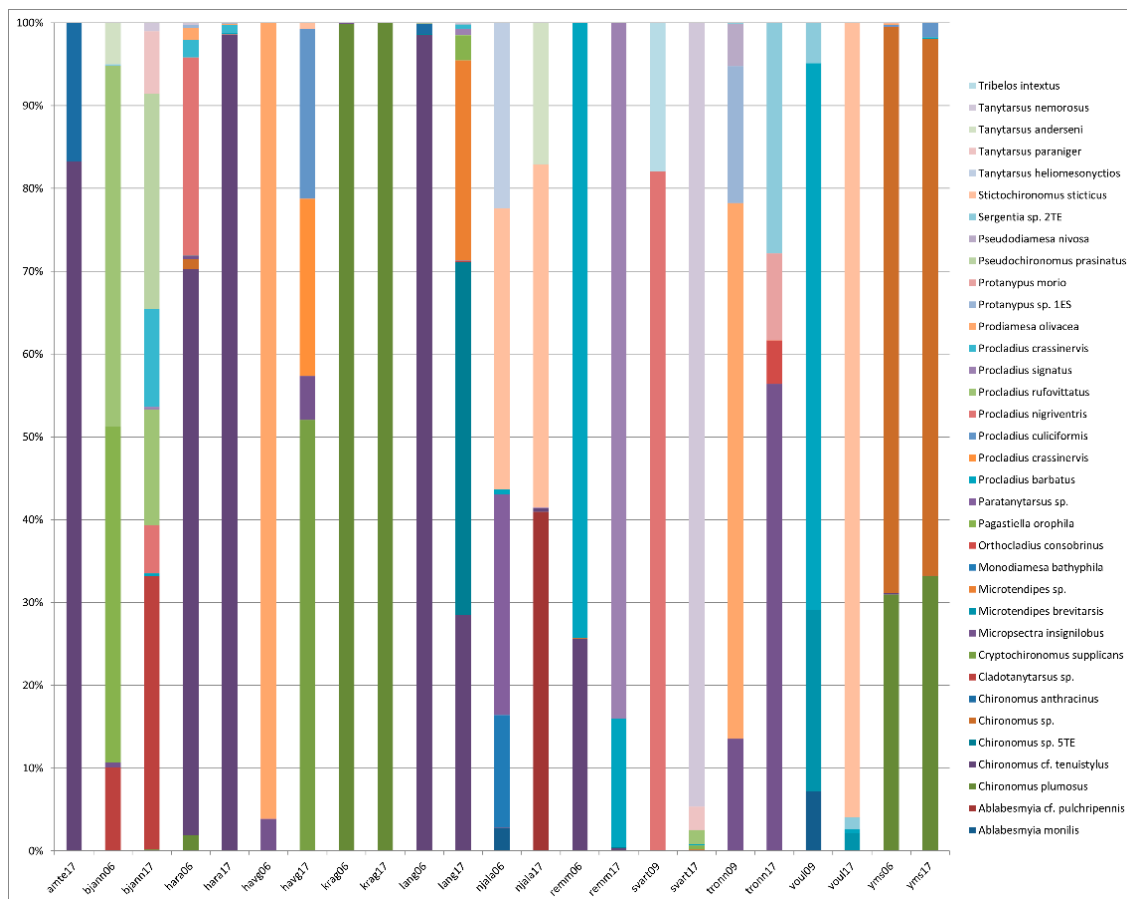
Illuminasekvenseringen resulterade i 21 miljoner sekvenser varav cirka 90% hade kvaliteten > Q30. Metastreckkodning från littoralbottenprover från de tolv sjöarna identifierade 78 taxa av chironomider (Figur 2.1). Av dessa kunde 69 identifieras till art genom jämförelse med BOLD, övriga bara till släkte. Av de identifierade arterna var fem nya för Sverige, inklusive en som var ny för Europa. Chironomiderna dominerade materialet och utgjorde cirka 85% av de identifierade insekterna. Den näst vanligaste gruppen (50-60%) av samtliga identifierade evertebrater i bottenproverna var Clitellata (Oligochaeta).

Artbestämningen med metastreckkodning gav betydligt fler arter av fjädermyggor än vad som tidigare identifierats morfologiskt från samma provtagning, 78 arter jämfört med 20. De flesta arter som identifierats morfologiskt fanns också bland de från metabarcoding. Fördelat på sjöar identifierades cirka sex gånger fler arter per prov med metastreckkodning än med morfologiska identifieringar.

Artförekomst och antalet sekvenser per art (som förväntas återspegla artens abundans) varierade mellan proverna, såväl inom som mellan sjöar och år. Det noterades dock inte systematiskt färre sekvenser per art i äldre prover (som skulle kunna förväntas beroende på mer nedbrytningen av DNA över tid). Variationen

i fjädermyggarternas diversitet och relativa abundans fördelat på sjöar och år är föremål för ytterligare analyser. En indikation illustreras i nedanstående figur.

Omkring 90% av arterna fjädermyggor med larver i sjöars profundal kan identifieras med DNA streckkodning, jämfört med 15-20% som kan identifieras utifrån larvernas morfologi.



Figur 2.1. Relativ sammansättning av chironomidfaunan i profundalprover från 2017 (17) och 2006 (06) från ett olika miljöövervakningssjöar inom olika kategorier (se text) framtagen med metastreckkodning. amte17 = Ämten 2017, bjann06=Bjännsjön 2006, bjann17=Bjännsjön 2017, hara06=Harasjön 2006, hara17=Harasjön 2017, havg06=Havgårssjön 2006, havg17= Havgårssjön 2017, krag06=Krageholmssjön 2006, krag17= Krageholmssjön 2017, lang06=Långsjön 2006, lang17=Långsjön 2017, njala06=Njalakjaure 2006, njala17= Njalakjaure 2017, remm06=Remmarsjön 2006, remm17=Remmarsjön 2017, svart09=Svartsjön 2009, svart17=Svartsjön 2017, tronn09=Tronntjärnarna 2009, tronn17= Tronntjärnarna 2017, vuol09=Vuolejaure 2009, vuol17= Vuolejaure 2017, yms06=Ymsen 2006, Yms17=Ymsen 2017.

## JÄMFÖRELSE AV TRADITIONELL MORFOLOGISK IDENTIFIERING MED DNA-STRECKKODNING

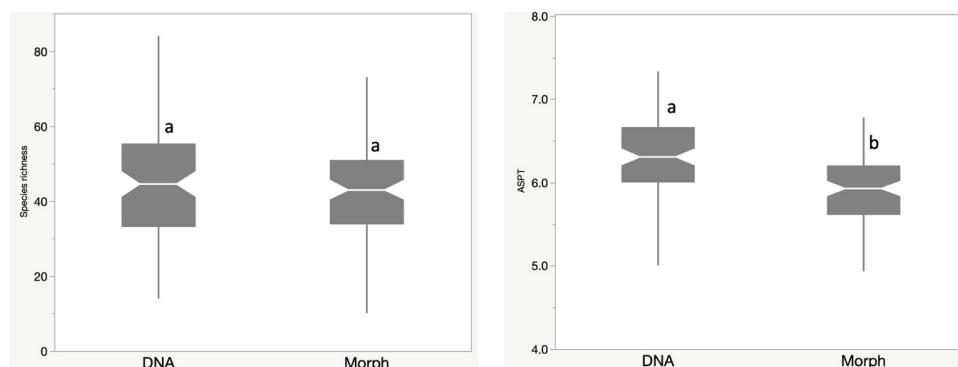
För litoralfaunaprover fann vi totalt 1,6 gånger fler taxa (arter) av djur med hjälp av DNA-metoder än med traditionell morfologisk identifiering (546 respektive 339 taxa). Analysen visade vidare att båda metoderna endast hade 120 taxa gemensamt och att DNA-streckkodning resulterade i 427 unika arter. Den främsta orsaken till denna diskrepans var att morfologiska identifieringar ofta togs till släktnivå, medan DNA-metoden alltid resulterade i arter. För profundalprover registrerades

fler taxa med hjälp av DNA-streckkodning än med traditionell morfologisk identifiering (507 av totalt 606 taxa, 83,7%) och endast 39 taxa delades. I likhet med litoralproverna var den största skillnaden att morfologisk identifiering sällan kunde identifiera chironomider till arter och att oligochaeter aldrig identifieras till arter (då detta endast kan göras på köns mogna individer).

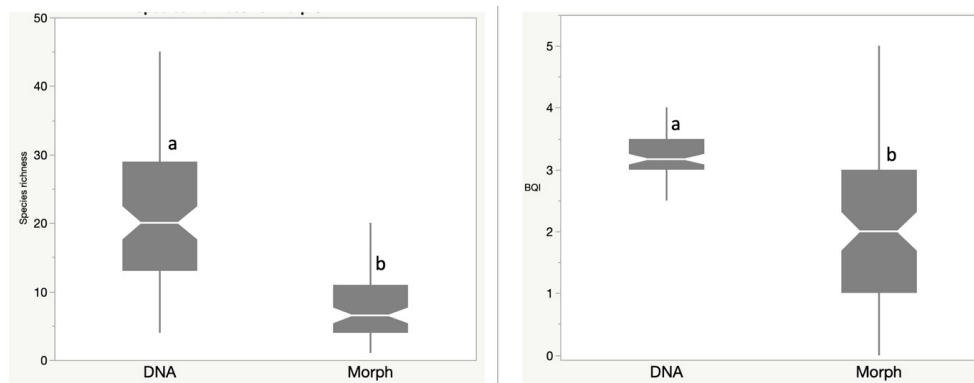
För enskilda sjöar skilde sig artrikedomen i litoralfaunaprover inte mellan morfologisk identifiering och DNA-baserade metoder. Men trots detta resultat, var ASPT-indexvärdena signifikant högre när de beräknades med data från DNA-streckkodning än med data från morfologiska identifieringar ( $6,2 \pm 0,56$  respektive  $5,8 \pm 0,52$ ) (Fig. 2.2), antagligen för att DNA-streckkodning identifierade fler familjer.

För profundalprover var både BQI-indexet och artrikedomen högre när de beräknades med DNA-streckkodning än med morfologiska data (Fig. 2.3). Att i genomsnitt 2,7 gånger fler arter registrerades av DNA-streckkodning ( $23,4 \pm 26,6$  arter) än för morfologisk identifiering ( $8,6 \pm 4,7$  arter) är inte förvånande, eftersom oligochaeter normalt inte identifieras till art och många chironomider är taxonomiskt svåra att identifiera i larvstadiet. Vårt resultat att BQI var högre med hjälp av DNA-streckkodning, beror på att denna metod även identifierar små arter som finns i låg förekomst och som sannolikt missas vid traditionell morfologisk identifiering. Noterbart var också att BQI-indexvärden beräknade med hjälp av DNA-metodens data var mindre varierande än de baserade på morfologisk identifiering.

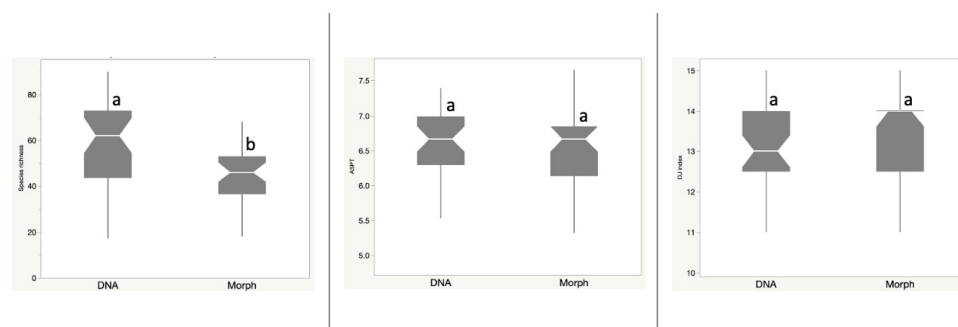
För vattendrag registrerades en högre artrikedom med hjälp av DNA-streckkodning ( $57,8 \pm 18,8$  arter) än med morfologisk identifiering ( $45 \pm 13,6$  arter). Inget av de två nationella indexen (ASPT och DJ) skilde sig mellan beräkningar baserade på DNA och morfologiska data (Fig. 2.4).



Figur 2.2. Artrikedom och ASPT för litoralprover från sjöar beräknade med data från DNA-streckkodning (DNA, P/A data) och med traditionell morfologisk identifiering (Morph, abundans data). Skilda bokstäver indikerar signifikanta skillnader.



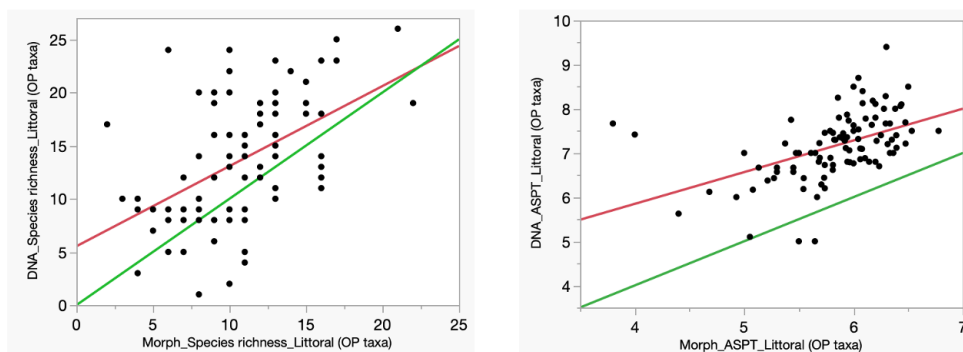
Figur 2.3. Artrikedom (vänster) och BQI (höger) beräknade med data från DNA-streckkodning (DNA, P/A data) och med traditionell morfologisk identifiering (Morph, abundans data) för profundalprover. Skilda bokstäver indikerar signifikanta skillnader.



Figur 2.4. Artrikedom (vänster), ASPT (mitten) och DJ-index (höger) för vattendrag beräknade med data från DNA-streckkodning (DNA, P/A data) och med traditionell morfologisk identifiering (Morph, abundans data). Skilda bokstäver indikerar signifikanta skillnader.

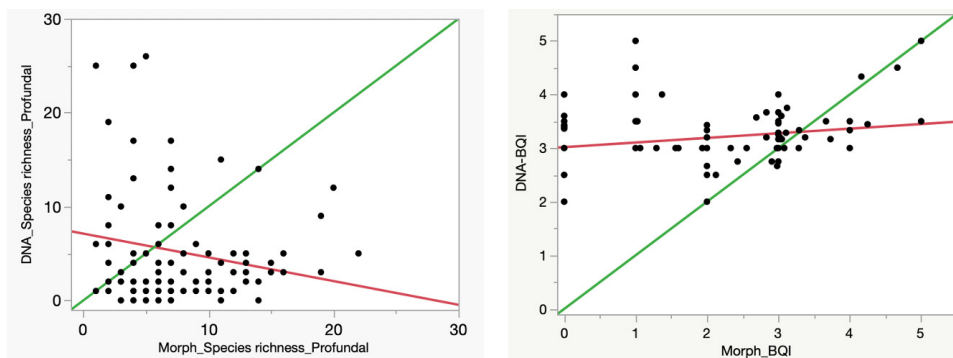
Linjära regressioner av biologiska index beräknade med standardiserade taxa (operativa taxa) respektive DNA-streckkodning data gav lovande resultat. Operativa taxa består av 540 taxa som används för att beräkna bottenfaunaindex för att bedöma den ekologiska statusen i svenska sjöar och vattendrag. (<https://miljodata.slu.se/MVM/DataContents/OperativeStandardisedTaxonomy?v=2018>).

Korrelationen av artrikedomen för litoralprover beräknade med data från morfologisk identifiering respektive DNA-streckkodning var signifikant ( $R^2 = 0,245$ ,  $P < 0,0001$ ). Som väntat upptäcktes även här fler arter med hjälp av DNA-streckkodning (Fig. 2.5). På samma sätt var ASPT-indexvärden beräknade med morfologiska data och DNA-streckkodning svagt korrelerade ( $R^2 = 0,139$ ,  $P = 0,0004$ ). ASPT-index beräknade med DNA-streckkodningsdata var nästan genomgående högre än med data från morfologisk identifiering (Fig. 2.5), vilket kunde förklaras med upptäckten av fler familjer, särskilt när artförekomsten i provet var relativt låg.



Figur 2.5. Regressionsanalyser (röd linje) som visar sambanden mellan artrikedomen (vänster) och ASPT-index (höger) för 86 littoralprover beräknade med data från traditionell morfologisk identifiering (X-axeln) och med DNA-streckkodning (Y-axel) och med operativa arter. Den gröna linjen ger 1:1 linjen.

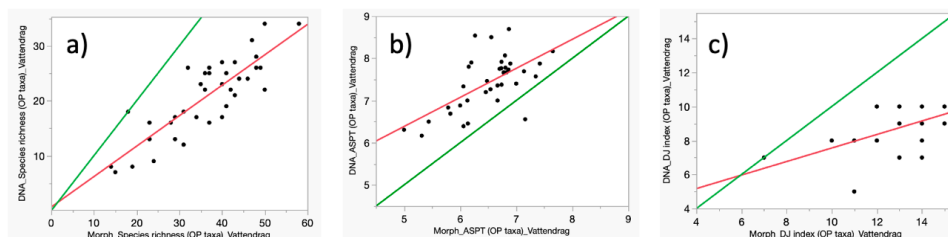
Sambanden mellan morfologisk identifiering och DNA-streckkodning för profundalfaunaprover i 104 sjöar var inte signifikant för artrikedomen ( $R^2$  0,021,  $P = 0,1424$ ) och inte heller för BQI-värden ( $R^2$  0,035,  $P = 0,0758$ ) (Fig. 2.6).



Figur 2.6. Regressionsanalyser (röd linje) som visar sambanden mellan artrikedomen (vänster) och BQI (höger) för profundalfaunaprover beräknade med data från traditionell morfologisk identifiering (X-axeln) och med DNA-streckkodning (Y-axel) och med operativa arter. Den gröna linjen ger 1:1 linjen. Notera att en outlier (Valasjön med 60 DNA-arter) inte visas i figuren.

Linjära regressioner för tre index beräknade för 37 vattendrag visade däremot signifikanta samband mellan morfologisk identifiering och DNA-streckkodning (Fig. 2.7a). Artrikedomen i vattendragen beräknad med båda metoderna var starkt korrelerad ( $R^2 = 0,713$ ,  $P < 0,0001$ ) och DNA-streckkodning resulterade i flera arter. Jämförelse mellan morfologiska och DNA-baserade metoder för ASPT var också signifikant korrelerade ( $R^2 = 0,386$ ,  $P < 0,0001$ ) och DNA-streckkodning resulterade i fler familjer och högre ASPT-värden i likhet med sjöars littoralprover (Fig. 2.7b). Sambandet mellan DJ-index beräknade med morfologisk identifiering och DNA-streckkodning var signifikant ( $R^2 = 0,338$ ,  $P = 0,0002$ ), men streckkodning resulterade ej i högre värden (Fig. 2.7c).





Figur 2.7. Regressionsanalyser (röd linje) som visar sambanden mellan artrikedomen (a), ASPT (b) och DJ-index (c) för vattendragsprover beräknade med data från traditionell morfologisk identifiering (X-axeln) och med DNA-streckkodning (Y-axel) och med operativa arter. Den gröna linjen ger 1:1 linjen.

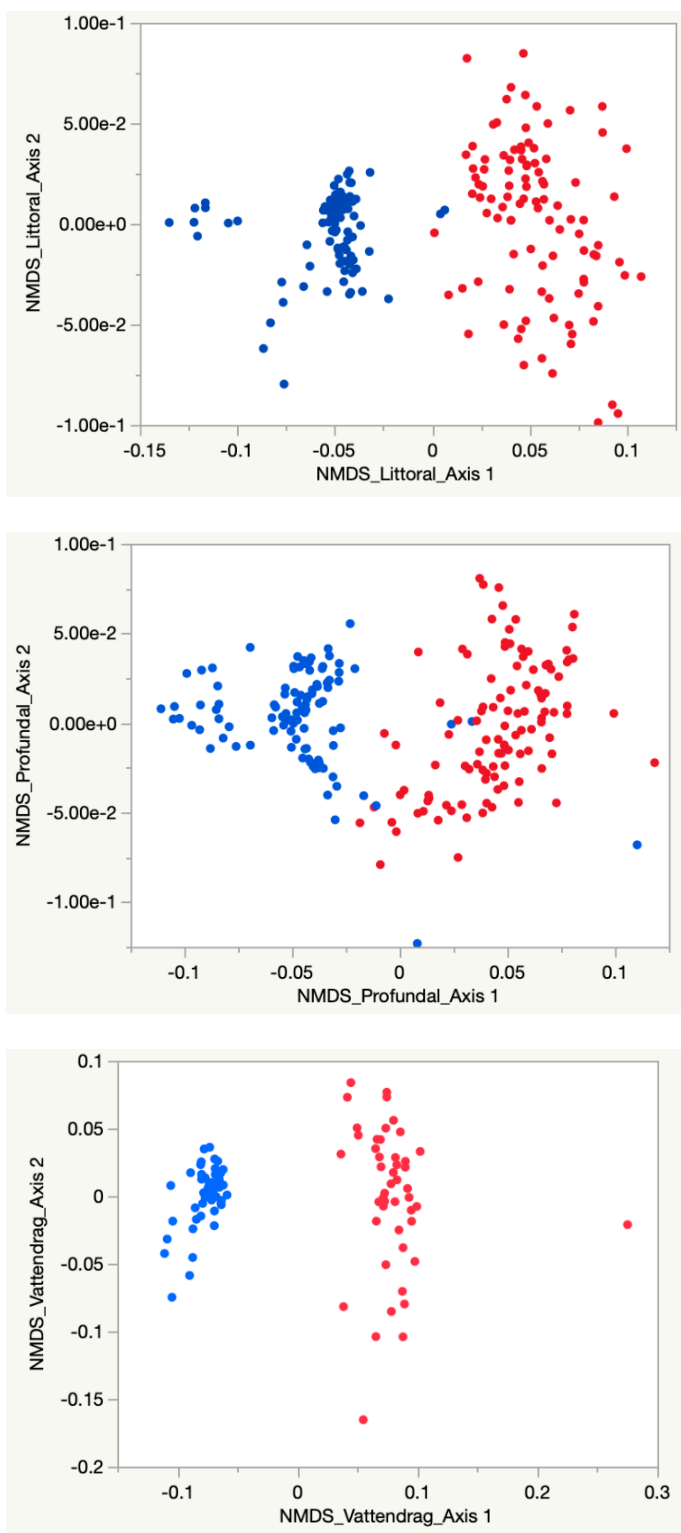
## ORDINATIONER AV PROVER ANALYSERADE MED TRADITIONELL MORFOLOGISK IDENTIFIERING OCH DNA-STRECKKODNING

NMDS-ordinationer baserade på Bray-Curtis/Jaccard-likhetsmatriser kombinerade med PERMANOVA avslöjade signifikanta skillnader i bottenfaunsamhällellens sammansättning mellan båda identifieringsmetoder för alla tre habitat (Fig. 2.8). Detta berodde till stor del på den högre taxonomiska upplösningen som uppnåddes med DNA-streckkodning.

PERMANOVA Bray-Curtis/Jaccard-matris visade att litorala samhällen skilde sig när identifieringen gjordes från traditionell morfologisk identifiering (X-axeln) och med DNA-streckkodning ( $F = 67,71$ ,  $P = 0,0001$ ). SIMPER visade på 89,3% olikhet och de fem taxa som skiljer mest mellan de två grupperna var Oligochaeta, Ceratopogonidae, *Conchapelopia* och *Psectrocladius* för data från traditionell identifiering och *Lumbriculus variegatus* för DNA-baserade data.

Profundalsamhällen skilde sig också mellan de två metoderna (PERMANOVA,  $F = 55,63$ ,  $P = 0,0001$ ). De taxa som hade störst skillnad var Oligochaeta och *Procladius* för morfologiskt identifierade taxa och *Chironomus anthracinus*, *Rhyacophila carollina* och *Chironomus tenuistylus* för DNA-baserade data. Den genomsnittliga skillnaden mellan morfologiska och DNA-baserade identifieringar var 91,3%.

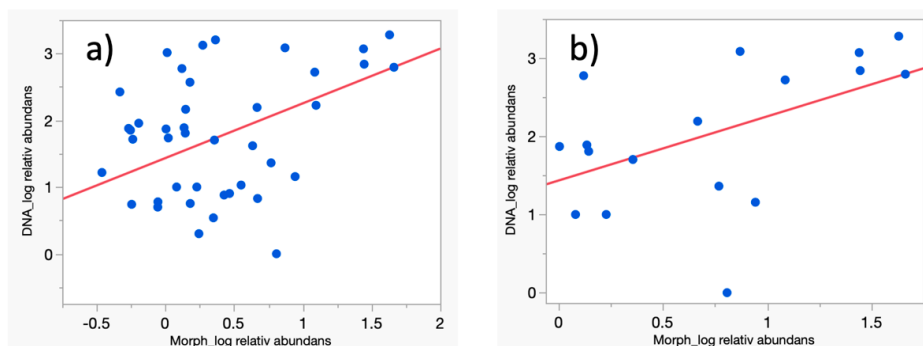
Även för vattendragsprover skilde sig bottenfaunasamhällen mellan de båda identifieringsmetoderna (PERMANOVA,  $F = 45,42$ ,  $P < 0,0001$ ). SIMPER identifierade Oligochaeta, Orthocladiinae och Tanytarsini som viktiga diskriminatorer för morfologiskt identifierade taxa och *Leuctra hippopus*, *Isoperla grammatica* och *Simulium ornatum* för DNA-baserade identifieringar. Den genomsnittliga skillnaden mellan morfologiska och DNA-baserade identifieringar var 86,9%.



Figur 2.8. NMDS för bottenfaunasamhällen i sjöars littoral (överst) och profundal (mitten), samt för vattendrag (längst ner). Röda prickar avser resultat för bestämmningar med DNA-baserade metoder, medan de blå prickarna visar den för traditionell morfologisk identifiering.

## SAMBAND MELLAN TRADITIONELL BESTÄMNING AV ABUNDANS OCH DNA-RELATIVT ANTAL AVLÄSNINGAR (RRA I %)

Att kombinera morfologiskt identifierade arter med DNA-identifierade arter från litoralprover resulterade i 110 matchningar. Sex arter hittades i mer än 50 % av de morfologiskt identifierade proverna: *Leptophlebia vespertina* (83 %), *Asellus aquaticus* (81 %), *Caenis horaria* (67 %), *Leptophlebia marginata* (57 %), *Kageronia fuscogrisea* (54 %) och *Pseudochironomus prasinatus* (53%). Jämförelse av den relativa förekomsten av morfologiska arter och DNA-baserade artförekomster var inte signifikant (n=110 arter,  $R^2=0,019$ ,  $P=0,1516$ ). Begränsning av analyserna till arter förekom på minst 10% av lokalerna (baserat på morfologiska identifieringar) och visade ett svagt men signifikant samband (n=42 arter,  $R^2=0,10$ ,  $P=0,041$ , Fig. 2.9a). Sambandet blev något starkare när endast arter som förekommer i  $\geq 30$  % av lokalerna beaktades (n=17 arter,  $R^2=0,26$ ,  $P=0,036$  Fig. 2.9b).



Figur 2.9. Jämförelse mellan logaritmerad relativ abundans baserad på morfologisk identifiering (räknad abundans, X-axel) och DNA-streckkodning ("relative reads", RR, Y-axel) för (a) de 42 vanligaste arter (morfologiskt identifierat) som fanns på minst 10% av lokalerna samt (b) för 17 arter som förekommer på minst 30% av lokalerna (b).

## 3.4 Slutsatser och förslag: Bottenfauna

FRESHBAR andra delprojekt bidrar med viktig, ny kunskap om hur resultat från DNA-streckkodningsmetoder förhåller sig till traditionell, morfologisk artbestämning, så som den har använts inom svensk miljöövervakning.

Resultaten visar att COI-streckkodning fungerar mycket bra för bottenfauna, samt att streckkodningsmetoden ger ett bättre mått på biologisk mångfald än morfologisk identifiering. Detta gäller då svårbestämda grupper som Chironomidae (fjädermyggor) och Oligochaeta (maskar) bestäms till art i högre grad.

DNA-streckkodning gav fler arter än morfologisk identifiering, vilket främst berodde på att fler arter inom svåra grupper och livsstadier som t.ex. Diptera/ (Chironomidae), Annelida (Oligochaeta) och Hydrachnidia (vattenkvalster) kunde bestämmas till art, samt att små individer som inte kan bestämmas morfologiskt detekterades med DNA-streckkodning. Skillnaden minskade dock när den operativa taxalistan, som tillämpas för de svenska bedömningsgrunderna, användes. DNA-streckkodning är därför ett bra och kostnadseffektivt sätt att övervaka biologisk mångfald och torde dessutom ge goda förutsättningar att upptäcka sällsynta, nya och potentiellt invasiva arter.

DNA streckkodning ger möjligheten att utöka antalet operativa taxa inom miljöövervakningen (nu 540 taxa) med ytterligare indikatorarter. Genom inkludering av flera arter kan, som ett nästa steg, även bedömningsgrunder för miljö kvalitet förbättras.

Biologiska index baserade på DNA-streckkodning ger något högre indexvärden än de som beräknats utifrån morfologiska identifieringar. Abundansskattningar utifrån antalet "reads" är dock mindre bra än de som baseras på traditionella identifieringsmetoder.

## 4. Slutsatser och förslag

Institutionen för vatten och miljö vid SLU har genom FRESHBAR-projektet och genom strategiska nyrekryteringar byggt upp en kompetens som passar för att tillämpa DNA-baserade metoder inom svensk miljöövervakning. Vi har dessutom fått förtroende från Havs- och vattenmyndigheten att arbeta vidare med att utveckla och etablera metoden för övervakningen av biologisk mångfald för EU:s strategi för biologisk mångfald 2030 och statusklassning inom vattenförvaltningen. Vi arbetar nu för att få in DNA-streckkodningsmetoder inom den svenska miljöövervakningen. Utmaningen består i uppbyggnaden av kompetens inom streckkodningsmetoder och bioinformatik hos samtliga utförare av miljöövervakning, samt byggandet av en säker databasinfrastruktur där data kvalitetssäkras och tillhandahålls. Parallellt är vi aktiva i framtagandet av standarder, både nationellt och internationellt, bland annat genom deltagande i SIS-grupper.

Den molekylära kiselalgsmetoden har vi utvecklat så långt att det nu finns standarder för provtagning och sparandet av prover, att den tekniska utrustningen är upprustad av SLUs laboratoriet och att vi har testat och valt ut protokoll för analyserna. Vi har således rutiner på plats för att analysera ett miljöprov taget från substrat fram till resultat. Om man väljer att använda sig av amplikonsekvensvarianter (ASV:s) som unik taxonomisk enhet är vi i princip redo att påbörja en fortlöpande övervakning av kiselalger med eDNA metoden redan idag. I detta fall behöver vi dock identifiera ASV-specifika indikatorvärden och biologiska index som baserar på molekylära data. För detta behövs stora databaser som har analyserats med den molekylära metoden. Alternativt eller som komplement måste man arbeta vidare med att komplettera referensdatabaser med referenssekvenser för arter som fattas. Det finns också fortfarande behov av att utveckla både den laborativa delen av eDNA-metoden och den del där eDNA-data används för en bedömning av tillstånd.

Vad gäller streckkodning av bottenfauna har vi påbörjat etablering en molekylär rutinmetod. Det återstår ännu arbete med att testa och välja ut protokoll, att standardisera dessa och att utveckla ekologiska index baserade på molekylära data, precis som för kiselalger. Vidare behöver en infrastruktur tas fram för lagring av prov och data, samt en plan och medel för att kunna köra parallella prover (metastreckkodning och traditionell taxonomisk artbestämning).

## 5. Tack

FRESHBAR är ett av åtta forskningsprojekt finansierad av Naturvårdsverkets miljöforskningsanslag i samarbete med Havs- och vattenmyndigheten som ska bidra till att utveckla DNA-metoder som kan användas inom den nationella miljöövervakningen. Vi tackar Gunilla Ejdung och Kari Stange från Naturvårdsverket, samt Michael Haldin från Havs- och Vattenmyndigheten för deras intresse och stöd i att utveckla DNA metoder. Vi tackar även alla miljöövervakare och forskare som har visat nyfikenhet och erbjudit hjälp, inte minst med att skicka färska kiselalgsprover. Vi tackar Demetrio Mora och Bonnie Bailet för allt arbete de lagt ner på kiselalgs-kulturerna. Vi tackar alla medarbetare på BGBMs Research Group Diatoms för samarbetet, särskilt Jana Bansemer och Juliane Bettig som genomförde DNA analyserna och Wolf-Henning Kusber som arbetar för fullt med dokumentationen. Maria tackar särskild Juliane för hjälpen med elektronmikroskopet och för att göra tillsammans med Agnes Kirchhoff, Oliver Skibbe, Henning och Jonas vistelsen i Berlin väldigt trevlig även under Corona-restriktionerna. Stort tack för hjälpen med levande kulturernas långtidsförvaring till Olga Chepurnova och Peter Chaerle från BCCM/DCG och Matt Ashworth från UTEX. This research received support from the SYNTHESYS+ project <http://www.synthesys.info/> which is financed by European Community Research Infrastructure Action under the H2020 Integrating Activities Programme, Project number 823827.” Ett speciellt tack till Åke Olson och Katarina Ihrmark när Maria behövde låna utrymme i en -80° frys. För hjälp med bottenfaunaanalyserna tackar vi: Stefan Bertilssons DNA-Lab vid institutionen för vatten och miljö vid SLU, särskilt Prune LeRoy, Aliecha van 't Spijker och Moritz Buck. Biologlab vid institutionen för vatten och miljö vid SLU, särskilt Magda-Lena Wiklund McKie och Karin Almlöf. Scarlett Szpryngiel och projektet Insect Biome Atlas vid NRM för bra samarbete kring placeringen av malaisefällor vid fjällsjöar och dataanalys, samt DNA labbet vid NRM, särskilt Petter Larsson och Daniel Marquina, för hjälp med DNA analyser.. Christer Erséus vid Naturhistoriska museet i Göteborg för samarbete kring biodiversitet bland oligochaeter i sjöar. Tack till Science for Life Laboratory, National Genomic Infrastructure och Uppmax (vid Uppsala universitet) för tillgång till infrastruktur för massiv parallellsekvensering och datoranalyser.

## 6. Källförteckning

Abarca, N., et al. (2014). "Does the Cosmopolitan Diatom *Gomphonema parvulum* (Kützing) Kützing Have a Biogeography?" *PloS one* 9(1): e86885.

Abarca, N., et al. (2020). "Defining the core group of the genus *Gomphonema* Ehrenberg with molecular and morphological methods." *Botany Letters* 167(1): 114-159.

Bailet, B. (2021). New methods for improving water management - Exploring the role of diatoms in ecosystems. Sveriges lantbruksuniv., Acta Universitatis Agriculturae Sueciae, 1652-6880: 113.

Birk et al. & Hering. 2012. *Ecol Ind* 18:31-41.

Brodin, Y., Ejdung, G., Strandberg, J. & Lyrholm, T. 2013 Improving environmental and biodiversity monitoring in the Baltic Sea using DNA barcoding of Chironomidae (Diptera). *Molecular Ecology Resources* 13, 296-1004.

Buchner D, Beerman AJ, Laini A, Rolaufgs P, Vitecek S, Herring D, Leese F. 2019. Analysis of 13,312 benthic invertebrate samples from German streams reveals minor deviations in ecological status class between abundance and presence/absence data. *PlosOne*14: e0226547. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226547>

Castano et al. & Bonet. 2018. *New Phytol.* doi:10.1111/nph.15205

Elbrecht V & Leese F. 2017. Short COI markers for freshwater macroinvertebrate metabarcoding. *Metabarcoding and Metagenomics* 1: e14625. DOI: 10.3897/mbmg.1.14625

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: 294–299. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2002.tb00191.x>

Gueidan, C. and L. Li (2022). "A long-read amplicon approach to scaling up the metabarcoding of lichen herbarium specimens." *MycKeys* 86: 195-212.

Hamilton, Lefebvre & Bull 2015. *Front. Microbiol.* 6:16.

Hering et al. & Kelly, M. 2018. *Water Research* 138:192-205.

Heudre, D., et al. (2021). "A review of *Tabellaria* species from freshwater environments in Europe." *Fottea* 21(2): 180-205.

Johnson et al. 1993. *Freshwater Biomonitoring & Benthic Invertebrates*. Chapman & Hall, pp. 40-158.

Kahlert, M., et al. (2020). "Connecting the morphological and molecular species concepts to facilitate species identification within the genus *Fragilaria* (Bacillariophyta) (vol 55, pg 948, 2019)." *Journal of Phycology* 56(1): 243-243.

Kahlert, M. (2022). DNA barcoding of benthic diatoms. <https://www.slu.se/en/departments/aquatic-sciences-assessment/research/forskningsprojekt/active-research-projects/dna-barcoding/> [2024-05-31]

- Kelly et al. & Glover. 2018. Environment Agency, Bristol.  
Hamilton, Lefebvre & Bull 2015. *Front. Microbiol.* 6:16.
- Kollár, J., et al. (2021). “A time-calibrated multi-gene phylogeny provides insights into the evolution, taxonomy and DNA barcoding of the *Pinnularia gibba* group (Bacillariophyta).” *Fottea* 21(1): 62-72.
- Lange-Bertalot, H., et al. (2011). *Diatoms of the European Inland Waters and Comparable Habitats. Vol. 6. Eunotia and some related genera.* Ruggell, A.R.G. Gantner Verlag K.G.
- Lindgarth et al. & Wikström (Eds). 2016. WATERS report no 2016:10. Havsmiljöinstitutet.
- Leese et al. & Jackson 2018. *Advances in Ecological Research.* Academic Press, pp. 63-99.
- Marquina, D. Esparza-Salas, R., Roslin, T. & Ronquist, F. 2019. Establishing arthropod community composition using metabarcoding: Surprising inconsistencies between soil samples and preservative ethanol and homogenate from Malaise trap catches. *Molecular ecology resources* 19:1516-1530.
- Mora, D. 2020. Long-read diatom metabarcoding to improve taxonomic resolution and environmental assessment of freshwater ecosystems – clonal cultivation, primer validation and optimization of library preparation for PacBio sequencing. Short term scientific mission (STSM) Scientific Report, COST action CA15219. 3p.
- Nordic Council of Ministers. 2020. Report 538: Metabarcoding for use in routine aquatic biomonitoring – A validation study.  
<https://miljodata.slu.se/MVM/DataContents/OperativeStandardisedTaxonomy?v=2018>). Operativa taxa
- Pawlowski et al. Leese & Kahlert. 2018. *Sci Total Environ* 637-638:1295-310.
- Pinseel, E., et al. (2020). “Global radiation in a rare biosphere soil diatom.” *Nature Communications* 11(1): 2382.
- Rimet et al. & Zimmermann. 2018. *Fottea* 18:37-54.
- Rimet F., Gusev E., Kahlert M., Kelly M., Kulikovskiy M., Maltsev Y., Mann D., Pfannkuchen M., Trobajo R., Vasselon V., Zimmermann J., Bouchez A., 2019. Diat. barcode, an open-access curated barcode library for diatoms. *Scientific Reports.* <https://www.nature.com/articles/s41598-019-51500-6>
- Rimet, F., et al. (2021). “Metadata standards and practical guidelines for specimen and DNA curation when building barcode reference libraries for aquatic life.” *Metabarcoding and Metagenomics* 5: e58056. [Doi.org/10.3897/mbmg.5.58056](https://doi.org/10.3897/mbmg.5.58056).
- Smol & Stoermer. 2010. Cambridge University Press.
- Sonesten 2016. <https://www.slu.se/institutioner/vatten-miljo/miljoanalys/sjoar-och-vattendrag/>
- Strayer & Dudgeon. 2010. *J N Amer Benthol Soc* 29:344-58.
- Trobajo, R. and D. G. Mann (2019). “A rapid cleaning method for diatoms.” *Diatom Research* 34(2): 115-124.



Van de Vijver, B. and D. M. Williams (2022). “Four new *Fragilaria* (Fragilariaceae.)” *Nova Hedwigia* 115(3?4): 317-347.

Vanormelingen, P., et al. (2008). “Genetic Divergence and Reproductive Barriers among Morphologically Heterogeneous Sympatric Clones of *Eunotia bilunaris* Ssensu Lato (Bacillariophyta).” *Protist* 159(1): 73-90.

Weigand, H., et al. (2019). “DNA barcode reference libraries for the monitoring of aquatic biota in Europe: Gap-analysis and recommendations for future work.” *Science of The Total Environment* 678: 499-524.

Zimmermann, Jahn & Gemeinholzer. 2011. *Organisms Diversity & Evolution* 11:173-92.

## 7. Publikationer och data

En FRESHBAR hemsida med information om projektet och resultat har etablerats på Institutionen för vatten och miljö:

<https://www.slu.se/en/departments/aquatic-sciences-assessment/research/forskningsprojekt/active-research-projects/freshbar/>

Hemsidan kommer efter avslutat projekt kompletteras med slutrapporten och resultat så fort de är tillgängliga, samt flyttas över permanent till "completed research projects" på institutionens webbplats.

### 7.1 Publikationer och data del 1: kiselalger

1. (301 sekvenserade kiselalgsprover (17 genera med 48 olika taxonkluster) inför-livas nu (höst 2023) i BGBMs databas och herbarium av projektpartnern Botanic Garden and Botanical Museum Berlin, Freie Universität Berlin (BGBM), Tyskland. De svarar för att lagra material och information av alla etablerade kloner, och för att göra dem spårbart och användbart för vidareanalys.  
<https://www.bo.berlin/en/science/biological-collections>  
Datenbank-URL: [https://www.ggbn.org/algae\\_bgbm/sptool/sptool.php](https://www.ggbn.org/algae_bgbm/sptool/sptool.php)  
Search Field "Collections" FRESHBAR  
Tills arbetet har genomförts kan alla resultat efterfrågas genom att kontakta Maria Kahlert ([maria.kahlert@slu.se](mailto:maria.kahlert@slu.se))
2. Långtidsförvaring och information om en del av proverna finns hos
  - a. BCCM/DCG diatoms collection (<https://bccm.belspo.be/about-us/bccm-dcg>) under accession numbers DCG 1032, 1035-1045, 1093-1101, 1211-1225.". (36 prover)
  - b. UTEX (<https://utex.org/>, 32 prover). UTEX planerar att ta in proverna i sin samling, men de är inte offentliga än eftersom inga medel finns för detta. Under tiden kan information fås genom att kontakta Maria Kahlert ([maria.kahlert@slu.se](mailto:maria.kahlert@slu.se))
3. Publikationer WPI: Vi har kommit överens om i WPI arbetsgruppen att publicera kiselalgsdelen i journalen Metabarcoding & Metagenomics (<https://mbmg.pensoft.net/about>) som är en OA journal med en särskild fokus på utveckling av genetiska metoder även för tillämpad användning. Publikationen ska informera om vad som gjordes i FRESHBAR WPI, samt översiktlig presentera resultaten, inklusive länkar till herbarier, samlingar och databaser där resultaten kan hittas OA.

Publicering av taxonomiska analyser som baserar på våra resultat måste anstå ett tag, eftersom dessa analyser kan först börja nu då projektet är färdig. Vi planerar att arbeta med följande genera, och planerar en artikel var för varje genus: *Eunotia*, *Fragilaria*, *Tabellaria*. Möjligtvis finns det även möjlighet att arbeta med de andra genera också framöver, beroende på möjligheter att rekvirera finansiering och samarbete med relevanta taxonomer.

## 7.2 Publikationer och data del 2: Bottenfauna

Data från metodstudierna som kördes vid NRM:s DNA-lab under projektets första år finns i nuläge lagrade i NRM:s DNA-databaser (kontaktperson Thomas Lyrholm). Data kommer efter projektets avslut att överföras till SLU (kontaktperson Stefan Bertilsson).

Data från de proverna från övervakningssjöar och -vattendrag finns för närvarande i en databas vid SLU (kontaktperson Stefan Bertilsson). Data kommer, tillsammans med metadata, att överföras under 2024 till en LIMS-baserad databas vid institutionen för vatten och miljö. Etableringen av en sådan databasinfrastruktur vid SLU-vatten och miljö sker i samarbete med Havs- och vattenmyndigheten som har gett SLU i uppdrag att utveckla och etablera eDNA-baserade metoder för övervakning av biologisk mångfald och miljö i Sverige (HaV projekt Dnr. 3739-22).

En ny art av fjädermyggor för världen identifierades i prover av vuxna djur vid Stor-Björnsjön. Ett långt kommet manuskript finns för en vetenskaplig publikation 2024 med beskrivning av arten. Den nya arten samt annat material av fjädermyggor från FRESHBAR-projektet ingår i underlaget för en redan publicerad vetenskaplig artikel, nämligen Brodin, Y. & Hellberg, J. (2023) Smaller, lighter coloured and less hairy Procladius (Diptera, Chironomidae) in warmer climate. – *Biologia*. <https://doi.org/10.1007/s11756-023-01322-9>. Inga nya arter av bottenfauna har hittats. Referenssekvenser för barcoding av fjädermyggor som framtagits i projektet har deponerats i BOLD <https://boldsystems.org/>

Vi arbetar för närvarande med flera manuskript, som vi ska publicera i högt rankade tidskrifter med Open Access:

- DNA metabarcoding reveals the complex and hidden responses of chironomids and oligochaetes to multiple stressors (Johnson et al.)
- Increasing the discriminatory power in ecological status classifications with metabarcoding using an extended list of indicator taxa. (Johnson et al.)
- DNA-metabarcoding of monitoring samples as a tool for quantifying the unique biodiversity of subarctic lakes and streams. (Goedkoop et al.)
- *Procladius* (Diptera, Chironomidae) of Europe and a global view. (Brodin)

Rapporten uttrycker nödvändigtvis inte Naturvårdsverkets ställningstagande. Författaren svarar själv för innehållet och anges vid referens till rapporten.

# FRESHBAR – Streckkodning av sötvattenorganismer för förbättrade bedömningar av biodiversitet

## Barcoding of freshwater taxa for improved assessment of biodiversity

Forskningsprojektet FRESHBAR har vidareutvecklat DNA-referensbiblioteken för sötvattensorganismer i syfte att skapa verktyg för övervakning av miljöpåverkan och den biologiska mångfalden.

Vid inventeringen av bottenfaunan upptäcktes flera organismer som tidigare inte varit kända i Sverige, samt en för vetenskapen ny art av fjädermygga *Procladius exilis* (Brodin 2024). Arbetet med att identifiera och kartlägga viktiga organismer i bottenfaunan visar att COI-streckkodning ger ett bättre mått på den biologiska mångfalden än morfologisk identifiering. I kiselalgs-delen av projektet togs 301 nya kiselalgssekvenser fram varav hälften fattades i referensdatabaserna. Identifieringen till art visade att 14 av dem inte beskrivits alls i den taxonomiska litteraturen, vilket gör dem till nyupptäckta arter som nu inväntar officiell beskrivning.

Forskningsprojektet har visat att metastreckkodning ('metabarcoding') är en bra och kostnadseffektiv metod för miljöövervakning, och även har goda förutsättningar att upptäcka sällsynta, nya och potentiellt invasiva arter.

Projektet har finansierats med medel från Naturvårdsverkets miljöforskningsanslag som finansierar forskning till stöd för Naturvårdsverkets och Havs- och vattenmyndighetens kunskapsbehov.