

# DNA-baserad övervakning av biodiversitet i svensk skogsmark

Provtagning, provhantering  
och analysmetoder

---

Björn Lindahl, Leticia Pérez-Izquierdo,  
Anders Dahlberg, Sara Hallin, Eva Krab,  
Johan Stendahl

RAPPORT 7121 | OKTOBER 2023



# DNA-baserad övervakning av biodiversitet i svensk skogsmark

Provtagning, provhantering och analysmetoder

av Björn Lindahl, Leticia Pérez-Izquierdo, Anders Dahlberg,  
Sara Hallin, Eva Krab och Johan Stendahl

**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 978-91-620-7121-9

ISSN 0282-7298

© Naturvårdsverket 2023

Tryck: Arkitektkopia AB, Bromma 2023

Omslagsfoto: Fruktkroppar av rimskivling i tallskog. Foto: Michael Krikorev



# Förord

Här presenteras resultaten från forskningsprojektet ”DNA-baserad övervakning av biodiversitet i svensk skogsmark – Provtagning, provhantering och analysmetoder”. Projektet är ett av åtta projekt som genomförts inom forskningssatsningen 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 Björn Lindahl (Sveriges Lantbruksuniversitet, Institutionen för mark och miljö), Leticia Pérez-Izquierdo (Sveriges Lantbruksuniversitet, Institutionen för mark och miljö; Basque Centre for Climate Change, Bilbao), Anders Dahlberg (Sveriges Lantbruksuniversitet, Institutionen för skoglig mykologi och växtpatologi), Sara Hallin (Sveriges Lantbruksuniversitet, Institutionen för skoglig mykologi och växtpatologi), Eva Krab (Sveriges Lantbruksuniversitet, Institutionen för mark och miljö) och Johan Stendahl (Sveriges Lantbruksuniversitet, Institutionen för mark och miljö). Rapporten har granskats för vetenskaplig kvalitet av Rasmus Kjølner (Terrestrisk økologi, Københavns Universitet) och Tryggve Persson (Institutionen för ekologi, Sveriges Lantbruksuniversitet) samt för praktisk relevans av Ola Inghe (Naturvårdsverket).

Författarna svarar för rapportens innehåll.

Stockholm i oktober 2023

Marie Uhrwing  
Avdelningschef, Hållbarhetsavdelningen

# Innehåll

<b>Förord</b>	3
<b>Sammanfattning</b>	5
<b>Summary</b>	6
<b>1. Inledning</b>	7
1.1 DNA och miljöövervakning av markorganismer	7
1.2 Den svenska skogsmarkens biologi	8
1.3 Analys av svampsamhällen inom Markinventeringen	9
1.4 Rumslig variation	10
1.5 Provhantering	11
1.6 Projektets syfte	12
<b>2. Metod</b>	13
2.1 Övergripande försöksupplägg	13
2.2 Provtagning	14
2.3 DNA-extraktion	16
2.4 Markörer, primers, PCR-amplifiering och sekvensering	17
2.4.1 Svampar och markvegetation	17
2.4.2 Prokaryoter	17
2.4.3 Markfauna	18
2.4.4 Kvantifiering av trädrotter	18
2.5 Bioinformatik	18
2.6 Övriga analyser	19
2.7 Statistik	19
2.7.1 Rumsliga samband	19
2.7.2 Effekter av behandlingar	20
<b>3. Resultat</b>	21
3.1 Rumslig variation	21
3.2 Markfauna	24
3.3 Effekter av provtagningsmetodik och provhantering	27
<b>4. Diskussion</b>	32
4.1 Skogstyper	32
4.2 Rumslig variation	32
4.3 Markfauna	34
4.4 Provhantering	34
<b>5. Slutsatser och förslag</b>	36
<b>6. Källhänvisning</b>	38
<b>7. Publikationer och data</b>	43

# Sammanfattning

Det finns ett ökande intresse att inkludera organismer och biodiversitet i miljöövervakning. Markorganismer spelar en avgörande roll i reglering av kollagring och näringsomsättning i terrestra ekosystem. Det svenska skogsbruket har stor påverkan på markens biodiversitet, med risk för långsiktiga effekter på biologiska processer – något som inte är förenligt med Sveriges miljömål. DNA-baserade metoder ger nya möjligheter till identifiering och övervakning av svampar, bakterier och fauna i marken – organismer som tidigare har varit svåra att studera. Skogsmarken karakteriseras av stor rumslig variation. För att kunna anpassa provtagning så att DNA-extrakt och sekvensdata avspeglar organismsamhället och fångar så mycket biodiversitet som möjligt krävs mer kunskap om marksamhällets heterogenitet på olika skalor. Det finns också en mängd frågor kring hur markprov hanteras på bästa sätt efter att de har samlats in.

I 12 olika skogsområden i Uppland använde vi DNA-baserad metodik för att studera den rumsliga variationen i samhällen av svampar och bakterier på olika skalor från 1 dm till 10 m. Huvudsyftet var att ta fram information som grund för effektiv provtagning inom miljöövervakning. Vi studerade också effekter av lagring och vidare hantering av prover. Dessutom testade vi preliminära protokoll för DNA-baserad analys av markfauna.

Både svamp- och bakteriesamhällen var tydligt rumsligt strukturerade inom det undersökta avståndintervall. Svampsamhällena hade den tydligaste strukturen med distinkta samhällen i 1 dm till över 3 m stora ”fläckar”. Svamp- och bakteriesamhällena uppvisade tydlig samvariation, men var också länkade till variation i växtsamhällen och markkemiska egenskaper. De mikrobiella samhällena ändrades märkbart under lagring i rumstemperatur – populationer av opportunistiska arter växte medan svampar associerade med levande rötter minskade sin andel av DNA-poolen. Bilden av organismsamhällena påverkades också av på vilket sätt delprov slogs samman till samlingsprov, och malning hade oväntat stor effekt. Primrarna som testades för DNA-baserad analys av markfaunan gav en otillförlitlig bild av hoppstjærtssamhället, även om resultaten till viss del var lovande.

Den tydliga heterogeniteten i markbiologiska samhällen innebär att tillförlitlig miljöövervakning av markorganismer i skogsmark (och andra markparametrar) bör baseras på samlingsprov av poolade delprov. Markinventeringens DNA-provtagning är idag baserad på 5 delprov, men mer biodiversitet skulle kunna fångas, och bilden av organismsamhällena skulle bli mindre slumpmässig med ett större antal delprov. Delprover bör spridas ut över hela målområdet, med så stort avstånd som möjligt, helst 5–10 m, mellan provpunkterna. Det är kritiskt att proverna fryses in så snabbt som möjligt efter provtagning. Mer studier krävs för att förstå hur malning av proverna påverkar DNA-baserade resultat för olika organismgrupper. DNA-baserad miljöövervakning av markfauna kräver utveckling av nya primrar med optimerad specificitet.

# Summary

Interest in environmental monitoring of organisms and their biodiversity is increasing. Soil organisms play decisive roles in the biogeochemical processes that regulate carbon and nutrient cycling in terrestrial ecosystems. In Swedish forest soils, forestry has a large impact on soil biodiversity, and there is a risk for long-term changes in belowground biological processes, which is not compatible with Swedish environmental goals. DNA-based methods open up new possibilities for identification and monitoring of soil bacteria, fungi and fauna, which previously have been difficult to study. Forest soils are characterized by large spatial variation. To adapt sampling so that DNA-extracts and sequence data reflect communities and capture as much biodiversity as possible, a better understanding of heterogeneity in soil communities at different spatial scales is needed. There are also many questions about how best to handle soil after sampling.

In 12 different forests stands in Uppland we used DNA-based methods to investigate spatial variation in fungal and bacterial communities on different scales from 1 dm to 10 m. The main objective was to derive information as a basis for efficient sampling in environmental monitoring, but we also studied influences of sample storage and processing. In addition, we tested preliminary protocols for DNA-based analyses of soil faunal communities.

Both fungal and bacterial communities were strongly structured across the entire investigated spatial range. Fungal communities had the most obvious structure, with distinct communities in 1 dm to more than 3 m large patches. Fungal and bacterial communities displayed strong covariation, but were also linked to plant communities and soil chemical properties. The microbial communities changed significantly during storage in room temperature, with opportunistic populations increasing and fungi associated with live roots decreasing their relative contribution to the DNA-pool. Community assessments were also affected by pooling of subsamples, and grinding had a surprisingly large impact. The tested primers for DNA-based analysis of faunal communities provided an incomplete picture of springtails, although results were somewhat promising.

The strong patchiness of communities implies that reliable monitoring of forest soil biota (and other soil parameters) depends on pooling of subsamples into composite samples. The current DNA sampling of the Swedish Soil Inventory is based on 5 subsamples, but with more subsamples, more biodiversity would be captured, and the picture of communities would become less stochastic. Subsamples should best be widely distributed, preferably with 5–10 m between them, across the entire target area. It is critical that samples are frozen as soon as possible upon sampling. Further investigation of how soil grinding affects DNA-based data for different organisms is needed. DNA-based monitoring of soil fauna requires development of new primers with optimized specificity.

# 1. Inledning

## 1.1 DNA och miljöövervakning av markorganismer

Miljöövervakning av mark är huvudsakligen inriktad på kemiska undersökningar av till exempel markförsurning, näringsinnehåll och kolförråd (Fridman et al. 2014), men det finns också ett behov av att följa upp och övervaka markens biodiversitet och organismsamhällen. Ökad kunskap om markorganismernas centrala roller i ekosystemprocesser har lett till ökat medvetande om hur markbiologiska förändringar kan få stora och oönskade konsekvenser för markens förmåga att leverera ekosystemtjänster. Markorganismer driver omsättning av organiskt material. De fragmenterar, blandar om och binder samman marken samt interagerar i komplicerade näringsvävar där de utför en rad olika biogeokemiska omvandlingar. Mykorrhizasvampar lever i symbios med växter och är tätt kopplade till växternas mångfald och produktivitet, medan andra organismer är potentiella skadegörare som kan orsaka växtsjukdomar. Markorganismer är också känsliga, integrerande indikatorer på förändringar i ekosystemen med dynamiska samhällen som reagerar på en mängd olika kemiska, fysikaliska och biologiska faktorer. Slutligen är markorganismerna en förbisedd komponent av biodiversitet som kan behöva övervakas med ett bevarandeperspektiv utifrån organismernas egenvärde.

Den explosionsartade utvecklingen av DNA-baserade metoder för att identifiera, karakterisera och studera mikroorganismer erbjuder tidigare oanade möjligheter till storskaliga analyser. Mikrobiell ekologi som vetenskapligt ämne har pånyttfötts i och med utvecklingen av nya sekvenseringstekniker – grupper av mikroorganismer som tidigare varit helt okända har ofta visat sig dominera samhällen. Den prokaryota taxonomin, det vill säga systematik för bakterier och arkéer, började omformas med hjälp av DNA-baserade fylogenetiska analyser redan under 1990-talet, även om prokaryot nomenklatur är under fortsatt debatt (Hugenholtz et al. 2021). Inom svampriket har den traditionella Linneanska taxonomin behållits, men nomenklaturen har i många fall ändrats för att svara upp mot ett DNA-baserat, fylogenetiskt artbegrepp (Hibbett et al. 2007), och nya svampgrupper upptäcks kontinuerligt, ibland på hög taxonomisk nivå (Rosling et al. 2011). Många mikrobiologiska grupper är endast beskrivna utifrån DNA-sekvenser och har aldrig observerats i fysisk form (Nayfach et al. 2021; Nilsson et al. 2023). Molekylära metoder har också sammanfört mykologins två grenar – den ”botaniska”, som i huvudsak byggde på observationer av fruktkroppar, och den ”mikrobiologiska”, som byggde på renodling av svampisolat. För markfauna har DNA-baserade tekniker inte kommit lika långt, och morfologiska studier av insamlade djur dominerar fortfarande. Det är dock uppenbart att DNA-baserade tekniker erbjuder stora möjligheter med betydligt större kapacitet att hantera stora mängder prover till en lägre arbetskostnad (Decaëns, 2020).

Före DNA-revolutionen var övervakning av markorganismer oftast begränsad till mer lokala vetenskapliga studier, naturvårdsinventeringar, samt allmänhetens rapporter av fruktkroppar av marksvampar. Preliminära DNA-baserade inventeringsdata visar tydligt att metodik som används för djur och växter – till exempel rapportering i Artportalen, inte ger en rättvisande bild av markorganismernas utbredningsmönster



(<http://svamparisverige.se>). Rapporter av svampfruktkroppar är användbara för att avgöra utbredningsområden, men den geografiska fördelningen av observationer avspeglar mer befolkningstäthet (det vill säga antalet kunniga svampletare) än svamparnas egentliga förekomster. Även på lokal nivå ger DNA-metoder en mer detaljerad och komplett bild av marksvamparnas diversitet än inventering av fruktkroppar (Frøslev et al. 2019). Direkta observationer är ännu svårare för markfauna, vars artbestämning kräver professionell taxonomisk kompetens, och är i stor sett omöjliga när det gäller bakterier.

Till skillnad från analyser av eDNA i akvatiska miljöer bygger analyser av markorganismer inte på DNA-spår som organismerna lämnat ifrån sig, utan oftast på markprov som inkluderar hela- eller delar av organismerna, inklusive deras DNA. Liksom växter bildar markorganismer mer eller mindre stationära samhällen som lämpar sig väl för systematisk inventering. Stora satsningar, till exempel inom EU-projekt, syftar till att kartlägga markorganismernas biodiversitet och biogeografi (Jeffery et al. 2010). Det ligger då nära till hands att försöka identifiera ”hotspots” av biologisk mångfald, där sannolikheten att påträffa många och eventuellt nya arter och former är hög. Om syftet, däremot, är att förstå de faktorer som formar biologiska samhällen och hur dessa samhällen sedan påverkar de ekosystem som de är del av, är det värdefullt att också samla in information från mer triviala miljöer, där biodiversiteten inte förväntas vara lika hög. Endast systematisk provtagning med standardiserad inventeringsmetodik möjliggör etablering av statistiska samband. Långsiktig, systematisk insamling av biologiska data möjliggör också analyser över tid, för att kunna utvärdera påverkan av miljö- och klimatförändringar.

## 1.2 Den svenska skogsmarkens biologi

I boreal barrskogsmark är svampsamhällena särskilt artrika (Tedersoo et al. 2014). Svampar utgör en större andel av den totala mikrobiella biomassan än i andra biom, men ändå dominerar oftast bakterier den mikrobiella biomassan i marken, även i skogsmark (Siles et al. 2023). Svamparnas biologi och variation i skogsmark är mer studerad och bättre känd än bakteriernas (Llado et al. 2017). Basidiesvampar, särskilt agaricomyceter (”storsvampar”), har välutvecklade enzymssystem för att bryta ned komplexa organiska föreningar och andra unika anpassningar som gör dem till konkurrenskraftiga nedbrytare i den ligninrika, kvävefattiga förnan och i humuslagret. Många basidiesvampar bildar ektomykorrhiza med trädens rötter och får socker från träden i utbyte mot näringsämnen. Vissa av de vanligaste mykorrhizasvampgrupperna i svensk barrskogsmark karakteriseras av en ovanligt hög förmåga att bryta ned- och mobilisera näring från svårnedbrytbara organiska näringskällor (Lindahl & Tunlid, 2015). Genom att driva näringsomsättning och stimulera vittring spelar mykorrhizasymbiosen en viktig roll i att upprätthålla produktivitet i näringsfattiga skogar, framför allt i nordligare områden (Lindahl et al. 2021; Clemmensen et al. 2021; Mahmood et al. 2023). I övrigt dominerar svamp-samhällena av tåliga sporsäckssvampar, särskilt leotiomyceter, som bland annat bildar mykorrhiza med ljungväxter.

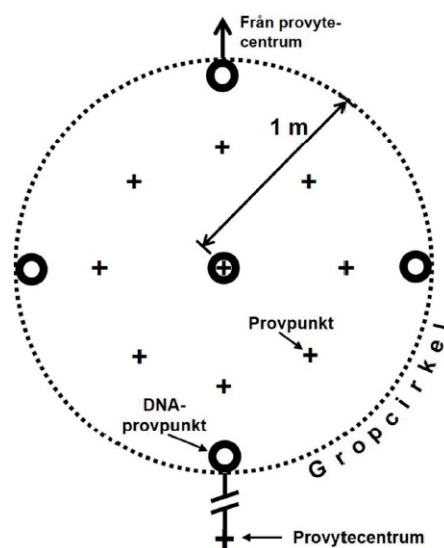
Bakteriesamhällen i skogsmark domineras av Acidobacteriota, Actinomycetota och Proteobacteria (Lindahl et al. 2010; Llado et al. 2017). Acidobacteriota har främst ansetts spegla låg näringstillgång och knappa resurser, men nyare forskning visar att de dominerar under både hög och låg tillgång på resurser. De är mångsidiga

och kan bryta ner olika komplexa kolföreningar, med extracellulära enzymer för nedbrytning av till exempel cellulosa. Även Actinomycetota är viktiga i nedbrytningsprocesser och är bland annat inblandade i nedbrytning av svampmycel. Både Acidobacteriota och klassen Alphaproteobacteria är vanliga i skogsjordar med lågt pH, medan Actinomycetota och Bacteroidota ökar när pH stiger. Bacteroidota beskrivs som ”kopirotrofer”, det vill säga med hög konkurrenskraft vid god tillgång på lättillgängliga resurser (Fierer et al. 2007), men de kan även bryta ner cellulosa och andra biopolymerer i skogsmark (López-Mondéjar et al. 2016). Det finns också bakterier som är involverade i vittring av mineraler i skogsmark (Uroz et al. 2011), liksom omsättning av näringsämnen.

I jämförelse med andra marktyper dominerar markfaunan i svensk skogsmark av mesofauna i längdspannet 0,1–10 mm. Hoppstjärter (Collembola), kvalster och småringmaskar (Enchytraeidae) är vanliga. Större maskar som räknas till ”makrofaunan” hittas framför allt i blandskogar och i barrskogar med pH över 4,5 (Huhta et al. 1998; Taylor et al. 2019). Många hoppstjärter och kvalster äter huvudsakligen svamphyfer, medan några arter livnär sig på olika förnäringskomponenter. En mindre andel kvalster är rovdjur. Mesofaunans rikliga förekomst i boreal skogsmark avspeglar i hög grad den stora svampbiomassan.

### 1.3 Analys av svampsamhällen inom Markinventeringen

Inom den nationella Markinventeringen (Fridman et al. 2014) har svampsamhällen systematiskt provtagits och analyserats sedan 2015 med hjälp av storskalig sekvensering av DNA-markörer. Provtagningen har anpassats för att vara praktisk genomförbar som en del i den ordinarie markprovtagningen. I nuläget är markinventeringen primärt inriktad på markkemisk och biogeokemisk miljöövervakning, men det finns ett intresse för ett större fokus på biodiversitet och organismsamhällen.



Figur 1. Provtagning inom den nuvarande Markinventeringen. Kors visar provpunkter för kemiska analyser och ringar visar de fem provpunkterna för DNA-baserade analyser av svampsamhällen.

Markinventeringen samlar in prover för kemiska analyser från en cirkel med 60 cm radie. Med nuvarande provtagning tas också 5 prover längs 1 m-cirkelns perimeter för analys av svampsamhället (Figur 1). Ett samlingsprov på totalt 50 ml från de översta 10 cm av humuslagret (gäller mår och mullmarker; förnalagret exkluderas) samlas in och skickas till SLU i Uppsala för lagring i frys och vidare analyser. Tiden från provtagning till infrysning har varierat mellan 1 och 47 dagar med en median på 6 dagar (1 815 prover från 6 år). Proverna frystorkas och mals till ett fint pulver, varifrån DNA extraheras från en liten mängd (ca. 0,2 ml), och ITS2-markörer amplifieras och sekvenseras. Efter bioinformatisk analys presenteras resultaten på projektets hemsida (<http://svamparisverige.se>).

För att vidareutveckla metodiken och på ett robust och pålitligt sätt kunna analysera organismsamhällen från markprover med hjälp av DNA-markörer krävs noggrann utvärdering av alla de olika delstegen från provtagning via laboratoriemetoder och sekvensering till bioinformatisk analys (Lindahl et al. 2013). Tidigare metodstudier har framför allt fokuserat på laboratorieprotokoll och bioinformatik. Hur man går tillväga för att på bästa sätt ta fram ett användbart och informativt DNA-extrakt har inte uppmärksammats lika mycket (Frøslev et al. 2022). Om extraherat DNA inte avspeglar organismsamhällena i marken kommer analyserna att vara missvisande, oavsett hur väl beprövade de laborativa och bioinformatiska protokollen är. Viktiga faktorer som påverkar detta är hur organismsamhällen varierar i rummet, hur provtagningen förhåller sig till denna variation, logistiken kring provhantering, och på vilket sätt DNA extraheras ur de insamlade proverna.

## 1.4 Rumslig variation

I jämförelse med akvatiska miljöer är marken ett stabilt system med obetydlig omblandning, vilket ger utrymme för stor rumslig variation. I detta avseende kan skogsmark, som har låg förekomst av omblandande maskar, förväntas vara särskilt variabel. Markens organismer har olika ekologiska nischer, och stark konkurrens kan förväntas leda till att marksamhällenas sammansättning är nära anpassade till de lokala förutsättningarna, även över små avstånd (Ettema & Wardle, 2002). Då markens organismer har en stor påverkan på marken bidrar de också till att forma sin miljö. Genom att driva viktiga markprocesser anpassar de sig inte enbart passivt till miljövariation, utan bidrar också aktivt till att skapa variation. Detta kan leda till starka återkopplingsmekanismer, där små, slumpvisa miljöskillnader kan förstärkas, när de selekterar för organismer som driver ekosystemet vidare i samma riktning (Kyaschenko et al. 2017a, Lindahl et al. 2021, Castaño et al. 2023). Olika organismgrupper påverkar också varandra. Ett tydligt exempel är vissa arter av marksvampar som bildar "häxringar" (f.a. i gräsmarker) där både vegetation, bakteriesamhällen och övriga svampar omstruktureras när mycelfronten passerar genom marken (Zotti et al. 2020). Det pågår intensiv forskning kring markorganismers biogeografi på större skalor (Delgado-Baquerizo et al. 2018; Niskanen et al. 2023; Potapov et al. 2023) och skillnader i organismsamhällen mellan olika mikromiljöer, till exempel kring rötter (Philippot et al. 2013) och i aggregat (Wilpiszeski et al. 2019). Däremot saknas information om rumsliga mönster på dm–m-skalan, som är relevant i samband med provtagning för miljöövervakning. En tidig studie av mykorrhizasvampsamhällen på rotspetsar i barrskogar i västra USA fann att

variation i artsammansättning ofta minskade inom 3 m avstånd (Lilleskov et al. 2004), och denna information har ofta använts som riktlinje (Lindahl et al. 2013). Pickles et al. (2010) fann också tydlig variation i artsammansättningen av ektomykorrhizasvampar inom 20 × 20 m provrutor i tallskog. Det finns få studier som undersökt rumslig variation av bakterier i skogsmark på skalor som är relevanta för miljöövervakning. I gräsmarker och jordbruksmark kan den rumsliga variationen vara betydande (Philippot et al. 2009; Jones och Hallin 2019). Överlag är kunskapen om rumslig variation inom skogsbestånd tunn, och mer djupgående studier behövs för att utveckla effektiva provtagningsstrategier för miljöanalys.

Även om vissa försök har gjorts att extrahera extracellulärt DNA från större jordvolymmer (Zinger et al. 2016), så utgår de flesta molekylära analysmetoder från väldigt små provmängder – några hundra mg. Inom miljöanalys är man i regel intresserad av information om biodiversitet och samhällen på en betydligt större skala – den svenska Riksskogstaxeringens huvudsakliga provytor har en radie på 10 m. Flera prover måste alltså samlas in från stora ytor, för att täcka in variationen på ett representativt sätt. Separat hantering av ett stort antal prov är resurskrävande, och man kan göra enorma besparingar i arbetstid och material genom att blanda samman prov från en stor provyta till ett enda samlingsprov – så kallad poolning. När man sedan extraherar DNA från några 100 mg av detta samlingsprov, är det avgörande att denna lilla provmängd avspeglar mångfalden i det marksystem som man vill analysera. Dessa utmaningar blir större ju mer organismsamhällena varierar över provytan; det krävs fler delprov för att få ett representativt samlingsprov från heterogena samhällen än från homogena.

## 1.5 Provhantering

I det ögonblick som ett prov tas upp från marken ändras förutsättningarna för markorganismerna dramatiskt (Frøslev et al., 2022). Många svamparter har mycel som är betydligt större än vad som är praktiskt möjligt att täcka in i ett markprov (Dahlberg & Mueller, 2011). När ett markprov flyttas från sitt ursprungliga sammanhang begränsas svamparnas möjlighet att transportera resurser i sina mycel. Detta problem är tydligast för mykorrhizasvampar, som är beroende av intakta mycel-länkar till levande trädrötter, och svamparnas samhällen kan förväntas påverkas kraftigt när rötter skärs av. Bakterieaktiviteten är också särskilt hög i närheten av levande rötter (Philippot et al. 2013) och när rötterna dör kan man förvänta sig att mikroorganismer i rhizosfären reagerar snabbt. När rötter och mykorrhizamycel dör i samband med provtagning frigörs en puls av lättillgängliga resurser för frilevande svampar och bakterier, och snabbväxande arter som är särskilt anpassade att tillgodogöra sig dessa nya resurser kan ta över samhället (Lindahl et al. 2010). Dessutom förändras temperatur, syre och fuktförhållande när markprover flyttas från sin ursprungliga miljö. I forskningsförsök med goda logistiska förutsättningar fryser man i regel in markprover direkt efter provtagning för att analyserna så långt som möjligt skall återspegla de ursprungliga samhällena (Lindahl et al. 2013). Vid miljöövervakning med fältprovtagning långt ifrån nödvändig infrastruktur kan det däremot ta lång tid innan prover kan transporteras till laboratorier för vidare hantering (Guerrieri et al. 2020; Pavlovska et al. 2021).

För att kunna extrahera representativt DNA från små provmängder är det viktigt att samlingsprov är väl homogeniserade, så att DNA från alla delprov finns representerat. Det finns en risk att sammansättningen av extraherat DNA påverkas av intensiteten i homogenisering/malning. Vissa organismer är mer robusta och deras celler kan kräva omfattande bearbetning för att brytas sönder och släppa ifrån sig DNA. Samtidigt kan DNA potentiellt också förstöras eller bindas upp i otillgängliga komplex om malningen är alltför intensiv. Olika extraktionsmetoder skiljer sig åt i effektivitet och ger DNA med olika kvalitet och renhet. Om en större andel av provets DNA kan extraheras ökar chanserna att extraktet är representativt. Samtidigt är det troligt att extraktet också innehåller mer oönskade ämnen från marken som kan inhibera PCR-amplifiering.

## 1.6 Projektets syfte

Det övergripande syftet var att kunna ge rekommendationer kring utformning av effektiv DNA-baserad provtagning för markorganismer inom Markinventeringen. Vi har därför genomfört en metodstudie i mellansvenska barrskogar för att:

1. Få en bättre bild av rumslig variation i markens samhällen av svampar och bakterier. Vi fokuserade på det organiska mårskiktet, där den biologiska aktiviteten och mångfalden är högst (Mundra et al. 2021). För att kunna formulera hypoteser om bakomliggande samband och processer undersökte vi också variation i rot- och svampbiomassa, markvegetation, oxidativa enzymer samt markbördighet (pH, mårstruktur och kväveinnehåll). Information om organismernas rumsliga variation användes för att dra slutsatser kring hur man bäst använder tillgängliga resurser inom miljöanalys för att erhålla pålitlig, relevant och substantiell information om marksamhällellens mångfald och sammansättning.
2. Utvärdera nya protokoll för DNA-baserad analys av markfauna. För jämförelse samlade vi in hoppstjärter för morfologisk artbestämning.
3. Undersöka hur DNA-baserad information om marksamhällen påverkas av provhantering, med fokus på lagring i rumstemperatur, malning av prover samt extraktionsprotokoll.

## 2. Metod

### 2.1 Övergripande försöksupplägg

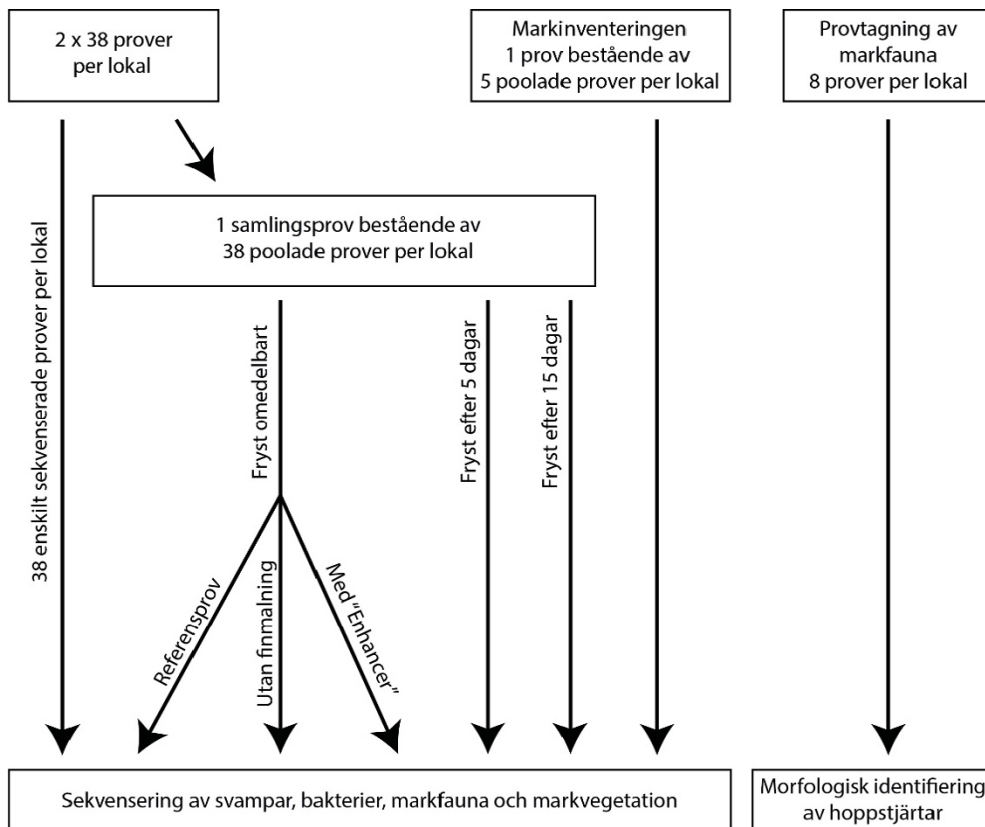
Den rumsliga variationen hos markorganismssamhällen i svensk boreal skogsmark undersöktes på en skala med relevans för provtagning inom miljöövervakning (< 10 m). Vi fokuserade på bakterier, svampar och viss markfauna; i denna studie hoppstjärter (Collembola). För jämförelse samlade vi också in data om rumslig variation i markvegetation, trädrotbiomassa, markbördighet (pH, kväveinnehåll, mineralinblandning i måren) och oxidativa enzymer. Vi undersökte 12 skogslokaler i Uppland som omfattar några av de vanligaste skogstyperna i Sverige med granskog (med blåbär och husmossa) och tallskog (med lingon och väggmossa), samt äldre primärskogsbestånd och yngre sekundärskogsbestånd (Tabell 1). Lokalerna valdes ut baserat på information från markägaren Bergvik Skog AB.

Tabell 1. Provtagningslokaler

Lokal	Koordinater	Skogstyp	pH†*	Organiskt*	Mårens tjocklek‡*
Skyttorp 1 (5076)	60.06611 N, 17.79666 E	Äldre granskog	4,1	60 %	11 cm
Kulla (17646)	60.29222 N, 17.05694 E	Äldre granskog	4,1	60 %	12 cm
Österbybruk	60.17472 N, 17.87083 E	Äldre granskog	4,7	51 %	7 cm
Vettsta	60.12777 N, 18.14527 E	Äldre tallskog	3,8	78 %	9 cm
Hade	60.29000 N, 17.06138 E	Äldre tallskog	3,5	87 %	18 cm
Film (9451)	60.22145 N, 17.92385 E	Äldre tallskog	3,7	75 %	12 cm
Lunsen	59.77004 N, 17.66470 E	Ung granskog	4,4	30 % (moderlik)	7 cm
Skyttorp 2 (4631)	60.10194 N, 17.79528 E	Ung granskog	4,2	85 % (torv)	NA
Bro (17947)	60.25083 N, 16.99389 E	Ung granskog	4,0	76 %	8 cm
Gimo	60.15888 N, 18.17138 E	Ung tallskog	3,9	71 %	9 cm
Prästarby	60.28166 N, 17.75583 E	Ung tallskog	4,0	63 %	9 cm
Juvansbo (17472)	60.28938 N, 17.06033 E	Ung tallskog	3,9	74 %	13 cm

\* medelvärde av 38 mårprover per lokal. † i vatten. ‡ inklusive döda delar av mossor.

Vi undersökte också effekter av lagring av markprover i rumstemperatur före DNA-extraktion, samt hur sammanslagning och homogenisering av prover före DNA-extraktion påverkar organismssamhällen analyserade med sekvensdata (Figur 2).

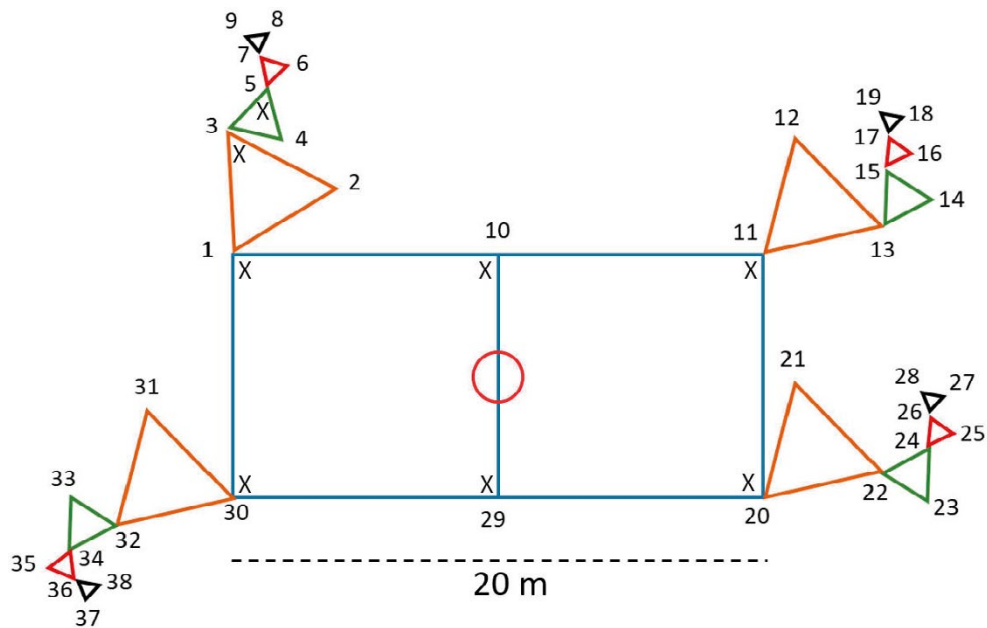


Figur 2. Översikt över studiens upplägg med provtagning och provhantering. För markfauna sekvenserades endast referensproven.

För marksvampar och bakterier använde vi etablerade laboratorieprotokoll för att analysera sammansättning och struktur av organismsamhällen (Clemmensen et al. 2023; Hellman et al. 2019). De primers som vi använde för PCR av svampmarkörer (Ihrmark et al. 2012) amplifierar också markörer från de flesta växter (ej barrträd), vilket möjliggjorde analys av markvegetation baserat på DNA från rötter. Metodiken för DNA-baserade analyser av markfauna är mindre beprövad. Vi testade tre olika primer-kombinationer i en förstudie, för att välja ut lämpliga markörer för leddjur. Vi gjorde också kvantitativa analyser av trädrötter med DNA-baserad qPCR metodik (Perez-Izquierdo et al. 2021), samt av mycelbiomassa med ergosterol som biomarkör (Nylund & Wallander, 1992). Slutligen uppskattade vi den rumsliga variationen i aktiviteten hos ett svampenzym – manganperoxidas, som spelar en avgörande roll i oxidativ nedbrytning och omsättning av svårnedbrytbart organiskt material i barrskogars mårskikt (Kyaschenko et al. 2017a).

## 2.2 Provtagning

De 12 skogsbestånden besöktes vid ett tillfälle vardera under perioden 7–18 oktober 2019. På varje lokal insamlades markprover från 38 provpunkter enligt ett förbestämt mönster med trianglar av varierande storlek (1 dm, 3 dm, 1 m, 3 m, samt 10 m kvadrater; Figur 3). Provtagningen designades för att möjliggöra analys av variation i samhällssammansättning på olika rumsliga skalor från 1 dm till 10 m, samtidigt som antalet prov hölls inom hanterbara gränser.



Figur 3. Provtagningsmönster med två kvadrater med 10 m sidor och fyra trianglar vardera med sidorna 3 m, 1 m, 3 dm och 1 dm (observera att trianglarnas proportioner inte är korrekta i figuren). Provtagningspunkter för morfologisk artbestämning av hoppstjärtar är markerade med X. Den röda cirkeln i mitten indikerar provtagning enligt Markinventeringens protokoll.

Provtagningen genomfördes med en provtagningsmall bestående av trianglar av plastband (Figur 4). Möjligheten att vrida trianglarna i förhållande till varandra gav viss flexibilitet att anpassa provtagningsmönstret för att undvika trädstammar och större stenblock.



Figur 4. Provtagning i tallskogsmark. (foto: Leticia Pérez-Izquierdo)



Vid varje provtagningspunkt togs två prover ned till mineraljord (eller till sten/grova rötter) med hjälp av en skarpvassad stålcylander med 2,5 cm diameter. Gröna växt-delar rensades bort, och markprovet delades vid gränsen mellan det organiska toppskiktet (måren) och den underliggande mineraljorden (där sådan förekom) med en kniv. Endast mårskiktet användes för vidare analyser, men mineraljordsprover sparades för eventuell senare analys. Vi fokuserade på mårskiktet, eftersom den biologiska aktiviteten och diversiteten generellt är betydligt högre i måren än i mineraljorden. En av lokalerna saknade ett välutvecklat mårskikt och hade en moderliknande humusform, medan en annan lokal hade torvmark. På dessa lokaler omfattade proverna den översta decimetern. Vid varje provpunkt gjorde vi en enkel mikrotopologisk bedömning av markytan som konvex, konkav eller platt. Det ena provet från varje provpunkt sparades för separat DNA-extraktion. Det andra provet blandades med övriga prov från lokalen till ett samlingsprov (Figur 2).

Vid varje lokal samlade vi också in ett mårprov enligt det provtagningsprotokoll som den nationella Markinventeringen har använt sedan 2015 för DNA-analyser av svampsamhällen. I en cirkel med 1 m diameter togs 5 markprover från mårлагret (4 längs cirkelns perimeter och ett i mitten) som blandades till ett samlingsprov (Figur 1).

Vid varje lokal togs 8 större prover (10 cm diameter) från mårлагret (Figur 3), varifrån markfauna drevs ut med Tullgren-trattar (van Straalen & Rijninks, 1982). Hoppstjärtar räknades och identifierades till art baserat på morfologiska karaktärer (Fjellberg 1998; 2007) av Ljudmila Skoglund vid Institutionen för ekologi, SLU.

## 2.3 DNA-extraktion

Varje samlingsprov vägdes, homogeniserades i en grovkvarn (förna, rötter och övrigt organiskt material sönderdelades till mm-stora bitar) inom några timmar efter provtagningen, och delades upp i delprov. Några delprov frystes in direkt vid  $-18^{\circ}\text{C}$  medan andra lagrades vid rumstemperatur i 5 dagar eller i 15 dagar, varefter även dessa frystes in. Övriga prover (enstaka markprover och markinventeringsprover) frystes in direkt efter provtagning. Alla prover frystorkades, och för varje samlingsprov beräknades vatteninnehåll genom vägning av delprov före och efter frys-torkning. Från fem lokaler sparades delprov för extraktion av DNA utan vidare malning, medan övriga delprov maldes till fint pulver i en kulkvarn (Figur 2).

DNA extraherades från 100 mg malet (eller omalet) material med NucleoSpin Soil (Macherey-Nagel) enligt tillverkarens protokoll. Från fem lokaler extraherades delprov med- eller utan tillsats av ”Enhancer SX” till extraktionsmediet. Enhancer SX kan öka extraktionseffektiviteten, potentiellt på bekostnad av DNA-extraktets renhet. DNA-koncentrationen i extrakten mättes med en Qubit fluorometer (Life Technologies).

## 2.4 Markörer, primers, PCR-amplifiering och sekvensering

### 2.4.1 Svampar och markvegetation

För analys av svampsamhällen amplifierades ett 200–400 baspar långt fragment av ITS2 (Internal Transcribed Spacer 2). ITS-regionen i operonet som kodar för ribosomer är en etablerad artmarkör för svampar (Schoch et al. 2012). Vi använde primer-kombinationen gITS7 (Ihrmark et al. 2012) och ITS4 (White et al. 1990) enligt ett väl testat och optimerat protokoll (Clemmensen et al. 2023). PCR utfördes i ett steg med båda primers försedda med provspecifika sekvenstaggar. Antalet PCR-cykler optimerades till 28 för att minimera risken för förvrängning av artsammansättningen (Castaño et al. 2020). PCR-produkterna renades med Sera-Mag (Cytiva), koncentrationen mättes med en Qubit fluorometer (Life Technologies), produkterna slogs ihop till 6 pooler, som renades igen med E.Z.N.A. cycle pure (Omega), och provkvaliteten kontrollerades med en Bioanalyser (Agilent). Sekvenserings-adaptors ligerades till PCR-produkterna. Sekvensering med PacBio SEQUEL I utfördes av SciLifeLab NGI Uppsala, med en SMRT-cell per amplikon-pool. PacBio valdes som sekvenserings-plattform, då dess sekvenseringseffektivitet inte beror så kraftigt på amplikonlängden, vilket är en stor fördel vid sekvensering av ITS-markörer, som har stor längdvariation (Castaño et al. 2020). Medan ITS4-primern matchar med ett flertal eukaryoter, designades gITS7-primern för att amplifiera svampmarkörer. Den är selektiv mot barrträd, vilket är önskvärt för att undvika att dessa dominerar sekvenspoolen på svamparnas bekostnad. Däremot matchar den bättre med de flesta övriga växter (Ihrmark et al. 2012), och växtmarkörer utgör alltid en mindre del av sekvenserna vid analys av svampsamhällen i jordprover (11 % i detta projekt). Information om markvegetation (baserat på rötter) erhålls alltså som en bieffekt vid analys av svampsamhällen med dessa primers. Sekvenser från mossor utgjorde 35 % av växtmarkörerna och inkluderades i vidare analyser.

### 2.4.2 Prokaryoter

För analys av prokaryota samhällen amplifierades ett ca. 400 bp långt fragment av 16S rRNA-genen som kodar för ribosomernas lilla subenhet och är den helt dominerande markören för fylogenetisk klassificering av prokaryoter. Vi använde primer-kombinationen 515F och 926R (Takahashi et al. 2014) enligt Nextera-protokollet (Illumina). I ett första PCR-steg användes korta primers och 25 PCR-cykler, och i ett andra steg användes primers förlängda med provspecifika sekvenstaggar och adaptors för sekvensering samt 8 PCR-cykler. PCR-produkternas renades med Sera-Mag, och deras koncentration mättes med en Qubit fluorometer, varpå de slogs ihop till 5 pooler som renades igen med E.Z.N.A. cycle pure. Provkvaliteten kontrollerades med Bioanalyser. Sekvensering med Illumina MiSeq utfördes av SciLifeLab NGI Uppsala, med en "flow-cell" per amplikon-pool. Illumina MiSeq är lämplig för sekvensering av 16S rRNA gener, då plattformen ger ett större sekvenseringsdjup än PacBio och längdvariationen är minimal för 16S rRNA. Endast en låg andel (0,05 %) av sekvenserna från mårsiktet kom från arkéer, varför samhället i fortsättningen omnämns som bakterier.

### 2.4.3 Markfauna

För analys av markfauna användes COI-genen som markör (Ratnasingham & Hebert, 2013). Då det saknas väl etablerade protokoll för sekvensering av markfauna, gjorde vi en förstudie baserad på de 12 samlingsproverna. Vi testade tre olika primerkombinationer (Tabell 2) med samma protokoll som för prokaryoter.

**Tabell 2. Primers som testades för amplifiering av COI-sekvenser från markfauna**

Primer 1	Primer 2	Specificitet	Referens
mICOlintF-0	jgHCO2198-0	Metazoa	Leray et al. 2013
ZBJ-ArtF1c	ZBJ-ArtR2c	Arthropoda	Zeale et al. 2011
ARC_F3	ARC_R6	Collembola	Schmidt et al. 2018

Då inga av de testade primrarna gav ett tillfredställande resultat (se avsnitt 3.2) gick vi inte vidare med DNA-baserade analyser av markfauna i individuella prover.

### 2.4.4 Kvantifiering av trädrötter

Vi använde kvantitativ PCR (qPCR) för att uppskatta mängden finrötter i markproverna med en metod (Pérez-Izquierdo et al. 2019) som vidareutvecklades inom projektet. Artspecifika primers designades mot ITS-regionen för tall och gran. Mängden ITS-markörer från tall och gran i DNA-extrakten kvantifierades med qPCR med standardkurvor erhållna från spädningsserier av malda finrötter utblandade i mår-material från skogsmark där mål-arten saknades.

## 2.5 Bioinformatik

ITS2-sekvenser från svampar analyserades på vår egen plattform SCATA (Ihrmark et al. 2012; Clemmensen et al. 2023). Detta web-baserade verktyg är särskilt anpassat för att på bästa sätt organisera ITS-sekvensdata i enheter som så långt som möjligt motsvarar biologiska arter. PacBio-sekvenserna filtrerades baserat på kvalitetskriterier och delades upp på prover enligt prov-taggar. Vid behov vändes läsriktningen på sekvenserna; något som är nödvändigt när sekvenseringsadapters ligeras på PCR-produkter i slumpvis orientering. Efter trimning av primers klustrades sekvenserna med en single-linkage-tröskel på 99 % sekvensmatchning som krav för att ingå i ett kluster. Unika sekvenser ansågs vara troliga artefakter och togs bort före klustringen. Vi kallar sekvensklustren för arthypoteser, för att markera att de är baserade på genetisk variation snarare än ett biologiskt artbegrepp (och därför är hypotetiska) men ändå syftar till att avgränsa grupper som motsvarar biologiska arter (Köljalg et al. 2020). Ett lokalt referens-dataset från sekvensering av markprover från Markinventeringen (svamparisverige.se) kopplat till UNITE-databasen (Köljalg et al. 2013) inkluderades i klustringen för robust identifiering av arthypoteserna. 89 % av svampsekvenserna kunde kopplas till identifierade referenssekvenser. ITS-sekvenser från markvegetation analyserades tillsammans med svampsekvenserna, och växtmarkörerna matchade sekvenser från 48 olika växtarter. Blåbär och lingon har snarlika ITS2-sekvenser, och klustrades tillsammans.

16S rRNA-gensekvenser från prokaryoter och COI-sekvenser från markfauna (endast samlingsprover) analyserades med DADA2 (Callahan et al. 2016). Sekvenserna kvalitetsfiltrerades och delades upp på prover enligt prov-taggar. Sekvenserna hänfördes sedan till unika ASV ("Amplicon Sequence Variants") som identifierades genom jämförelse med databasen SILVA SSU 138 för 16S rRNA-gensekvenser (Quast et al. 2013) och IDS-BOLD för COI-sekvenser (Ratnasingham and Hebert, 2013).

## 2.6 Övriga analyser

Markprovernas innehåll av kol och kväve analyserades med en Elemental Analyzer (Flash EA 2000) kopplad till en Isotope Ratio Mass Spectrometer (EA-IRMS; DeltaV; Thermo Fisher) vid SLU:s laboratorium för analyser av stabila isotoper i Umeå, och pH mättes i vatten med en 744 pH-meter (Metrohm).

Svampbiomassa uppskattades med ergosterol som biomarkör (Nylund & Wallander 1992). Frystorkade och malda jordprover extraherades med metanol, varefter cyklohexan tillsattes. Efter blandning och fassettering avskildes cyklohexanfasen och indunstades, varpå indunstningsresterna löstes i metanol. Ergosterol kvantifierades med HPLC (Agilent 1100) på en kolonn med omvänd fas (Nova-Pak C18, Waters) och detektion med en UV-detektor vid 280 nm.

Aktivitet av Mn-peroxidas analyserades i frystorkade och malda prover med MBTH-DMAB metoden (Daniel et al. 1994). Oxidering av reagens i närvaro av H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> och mangan ger ett färgat komplex vars bildning över tid mäts med en fotospektrometer (SpectraMax Plus, Molecular Devices). Den manganberoende aktiviteten uppskattas genom att subtrahera aktivitet i frånvaro av mangan (efter tillsats av EDTA).

## 2.7 Statistik

### 2.7.1 Rumsliga samband

Halten organiskt material beräknades ungefärligt genom att dividera kolinnehållet med 0,54 (det högsta uppmätta kolinnehållet i ett prov som antogs vara rent organiskt). Inblandning av mineraljord i måren beräknades som 1 minus halten organiskt material. Mängden finrötter (uppskattat med qPCR), ergosterol och manganperoxidas-aktivitet uttrycktes per mängd organiskt material. Kväveinnehåll uttrycktes som N/C. Rottäthet och Mn-peroxidas-aktivitet kvadratrot-transformerades och ergosterol log-transformerades för att erhålla normalfördelning. Alla variabler normaliserades per lokal:  $(x - \text{medelvärde}) / \text{standardavvikelse}$ . Därmed fokuserade alla följande rumsliga analyser enbart på variation inom lokaler och inte på skillnader mellan lokaler. I följande analyser behandlades enskilda prover från samma lokal som oberoende.

För att reducera samvariation i miljövariabler gjordes en PCA ("Principal Component Analysis"), där den första axeln var tydligt korrelerad med pH, N/C och mineralhalt och användes som ett index på lokal markbördighet. Den andra axeln korrelerade enbart med rottäthet.

Linjära korrelationsmodeller konstruerades med ergosterol eller Mn-peroxidas som responsvariabler och markbördighet (PCA-axel 1) och rottäthet som förklarande variabler. Samband mellan markbördighet, rottäthet, ergosterol och Mn-peroxidas som responsvariabler och "underlag" (mineraljord, sten eller grova rötter) och mikrotopologi (konvex, konkav eller plan) som förklarande variabler testades också med linjära modeller.

Rumslig variation i univariata variabler (markbördighet, ergosterol, rottäthet, Mn-peroxidas) analyserades genom att beräkna standardavvikelse inom trianglar (kvadrater för 10 m). Samband mellan standardavvikelse inom trianglarna och deras storlek testades med ANOVA följt av Tukey-test. Signifikant minskande standardavvikelse med minskande triangelstorlek tolkades som heterogenitet med tydligheten avspeglad i ANOVA-modellens förklarandegrad ( $R^2$ ).

För organismsamhällen beräknades relativ abundans av arthypoteser (svampar, vegetation) och ASV:er (bakterier) inom varje prov. Relativa abundanser kvadratrottransformerades (Hellinger-transformation), olikhet i samhällssammansättning (beta-diversitet) beräknades som Bray-Curtis-distanser, och medeldistanser beräknades inom trianglar och 10 m-kvadrater. Samband mellan beta-diversitet inom trianglarna och deras storlek testades med ANOVA följt av Tukey-test.

Artackumuleringskurvor beräknades för varje lokal baserat på ett lika stort antal slumpmässigt utvalda sekvenser från varje prov (svampar: 305; bakterier: 11183).

Samvariation mellan variabler analyserades med separata Mantel-test för varje skogslokal. För organismsamhällen beräknades distansmatriser baserat på Bray-Curtis-distanser av Hellinger-transformerade sekvensantal. En markbördighetsmatris beräknades som euklidiska distanser i den första PCA axeln, medan euklidiska distanser för svamp- och rotbiomassa samt Mn-peroxidas beräknades baserat på transformerade och standardiserade värden enligt ovan. Mantel-testen utvärderades med Spearmans rankkorrelation. Signifikansströskeln Bonferroni-korrigerades för upprepade ensidiga test (0,1/12 lokaler) till  $P=0,008$ .

## 2.7.2 Effekter av behandlingar

För jämförelse med fysiskt poolade prover skapades data-poolade prover genom att slumpvis ta ut ett lika stort antal sekvenser från var och en av de enskilt sekvenserade 38 provpunkterna och summera dem till en enda sekvenspool per lokal. För att utjämma sekvenseringsdjup för alla prover valdes ett lika stort antal sekvenser (svampar: 1 690, bakterier: 13 771) ut slumpmässigt från varje samlingsprov med olika behandlingar och från de data-poolade proverna.

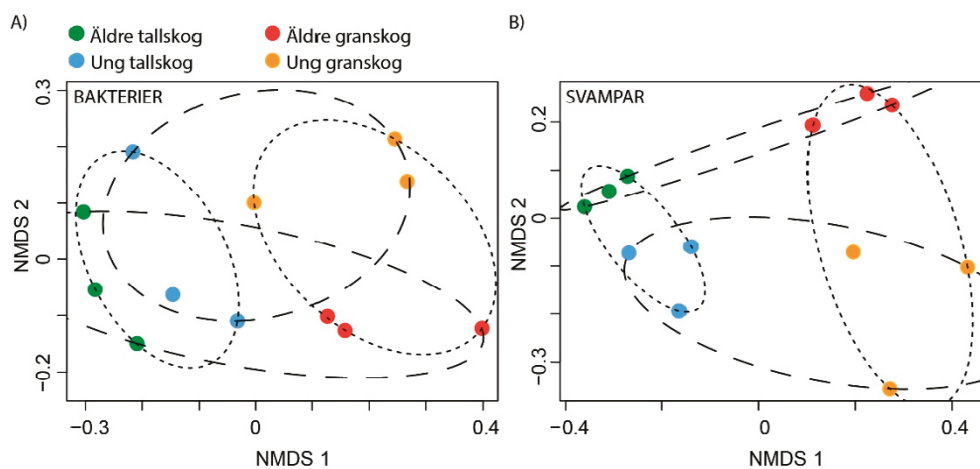
Sekvenssamhällets artrikedom, jämnhet och diversitet (Shannons index) beräknades som responsvariabler, och effekter av olika behandlingar – lagring före infrysning (0d, 5d, 15d;  $N=12$ ), provtagning (markinventeringsmetodik enligt Figur 1 vs. 38 utspridda provpunkter utlagda enligt mönstret i Figur 3;  $N=12$ ), poolning (fysisk poolning vs. poolning av data;  $N=12$ ) malning (med och utan kulkvarnsmalning;  $N=5$ ) samt DNA-extraktion (med och utan "Enhancer";  $N=5$ ) – testades med linjära modeller med behandling som fix effekt och "lokal" som slumpmässig effekt.

Effekter på artsammansättning analyserades med NMDS ("non-metric multi-dimensional scaling") baserat på Bray-Curtis-distanser beräknade på Hellinger-transformerade data, och signifikans av skillnader mellan skogstyper (samlingsprover;  $N=12$ ), provtagningsstrategier och provbehandlingar testades med PERMANOVA ("permutational multivariate analysis of variance"). Vid jämförelser mellan olika strategier och behandlingar begränsades permuteringar till inom lokaler.

## 3. Resultat

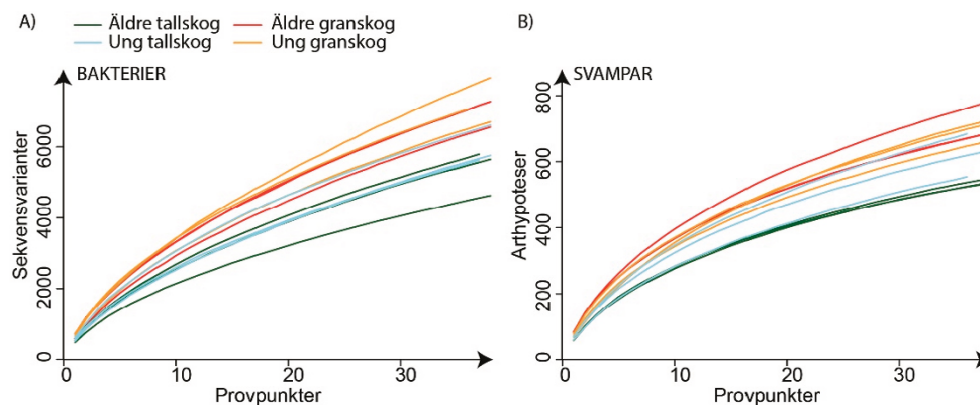
### 3.1 Rumslig variation

Organismsamhällen var signifikant olika mellan gran- och tallskogar för både bakterier ( $P=0,0006$ ) och svampar ( $P<0,0001$ ). Unga- och äldre skogar hade distinkta svampsamhällen ( $P=0,04$ ), medan bakteriesamhällena inte skiljde sig lika tydligt åt mellan ålderstyper ( $P=0,15$ ), åtminstone inte i tallskogar (Figur 5).



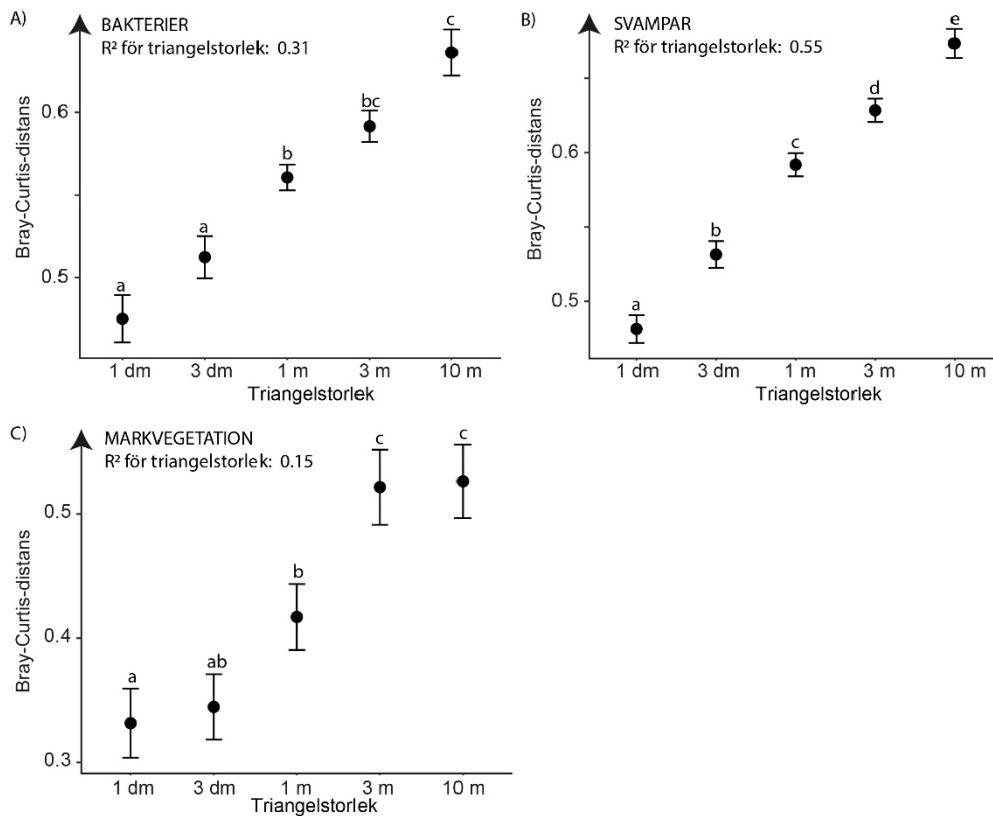
Figur 5. Skillnader i samhällssammansättning för A) bakterier och B) svampar i barrskogsmark från olika skogstyper baserat på sekvenserade 16S-markörer (bakterier) och ITS2-markörer (svampar) illustrerat med NMDS av Bray-Curtis-distanser. Elipserna markerar prov från samma trädart (prickade) eller åldersklass (streckade).

Både bakteriesamhällen och svampsamhällen uppvisade högre rikedom av sekvensvarianter och arter i granskogsmark än i tallskogsmark. De unga tallskogarna tenderade att ha en högre artrikedom av svampar än äldre tallskogar. Artackumuleringskurvorna var långt ifrån sin asymptot, vilket innebär att 38 markprover per lokal inte räckte för att täcka in den lokala biodiversiteten i marken (Figur 6).



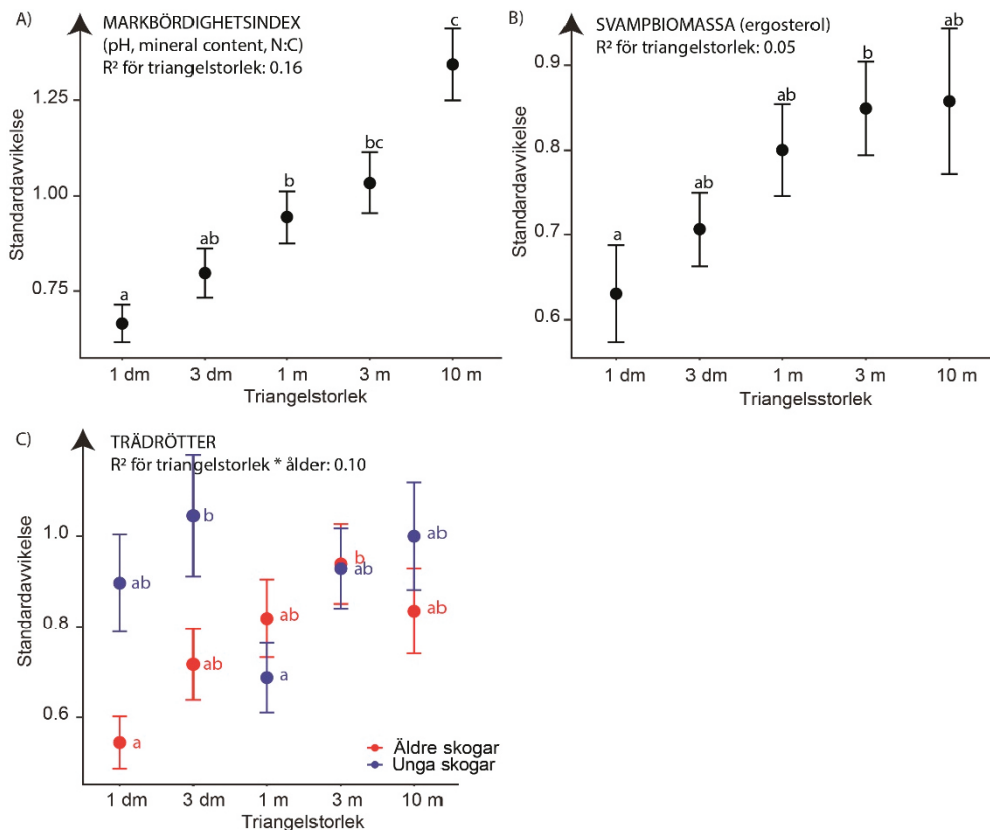
Figur 6. Artackumuleringskurvor av A) bakteriesamhällen och B) svampsamhällen i olika typer av barrskogsmark.

Inom lokalerna uppvisade både bakterie- och svampsamhällen tydlig rumslig struktur i sammansättning, med mer lika samhällen (lägre  $\beta$ -diversitet) mellan mer närliggande provpunkter. Dessa mönster var oberoende av trädslag och ålder.  $\beta$ -diversiteten ökade kontinuerligt över hela skalan, från 1 dm till 10 m. Sambandet var tydligast för svampar, med 55 % av variationen i artsammansättning förklarad av avståndet mellan provpunkter. För svampsamhällen uppvisade provpunkter på 10 m avstånd signifikant större skillnad i artsammansättning än provpunkter på 3 m avstånd. Svampsamhällen varierar alltså systematiskt på samma rumsliga skala som växtsamhällen, men också på en mindre dm-skala, med signifikant mindre skillnad mellan provpunkter på 1 dm avstånd än mellan provpunkter på 3 dm avstånd. Bakteriesamhällen uppvisade samma mönster som svamparna, men med något mindre tydlig heterogenitet i den rumsliga fördelningen; 31 % av variationen i samhällssammansättning förklarades av avståndet mellan provpunkter, och  $\beta$ -diversiteten varierade inte signifikant mellan alla triangelstorlekar, som den gjorde för svampar. Den rumsliga strukturen i svamp- och bakteriesamhällen var tydligare än för markvegetation (Figur 7).



Figur 7. Variation i A) bakteriesamhällen, B) svampsamhällen och C) växtsamhällen i barrskogsmark på olika rumsliga skalor. Skillnader i sammansättning (Bray-Curtis-distans) uppskattades mellan prov som insamlats enligt ett mönster med olika stora trianglar.  $R^2$ -värdet (marginellt  $R^2$ ) anger hur stor del av den totala variationen i samhällssammansättning som förklaras av avståndet mellan provpunkternas inbördes avstånd. Figuren visar medelvärden med standardfel (N=48 för 1 dm – 3 m; N=24 för 10 m). Signifikanta skillnader ( $P < 0,05$ ) i genomsnittlig Bray-Curtis-distans mellan olika triangelstorlekar anges med olika bokstäver.

Andra variabler varierade också systematiskt med avstånd och oberoende av skogstyp, men med mindre tydliga mönster än för svamp- och bakteriesamhällen. Variation i markbördighet – ett index som sammanfattade mårens surhet (negativt samband), kvävekoncentration och mineralinblandning – ökade med ökat avstånd mellan provpunkter, både på <1 m skalan och mellan 1–10 m. Svampbiomassa, uppskattat som markens ergosterolinnehåll, var mer slumpmässigt fördelad, med signifikanta skillnader i variation endast mellan provpunkter på 1 dm och 3 m avstånd. Rotbiomassa uppvisade ett liknande mönster som svampbiomassa, men endast i de äldre skogarna; i de unga bestånden fanns inga tydliga mönster med stor variation även mellan provpunkter på endast 1 dm avstånd från varandra (Figur 8). För manganperoxidase fann vi ingen signifikant skillnad i variation mellan olika triangelstorlekar – variationen var i stort sett lika stor mellan provpunkter på endast 1 dm avstånd som på längre avstånd.



Figur 8. Variation i A) markbördighet, B) svampbiomassa och C) rotbiomassa av träd i barrskogsmark på olika rumsliga skalor. Variation visas som standardavvikelse för prov som insamlats enligt ett mönster med olika stora trianglar.  $R^2$ -värdet (marginellt  $R^2$ ) anger hur stor del av den totala variationen som förklaras av avståndet mellan provpunkternas inbördes avstånd. Figuren visar medelvärden med standardfel (N=48 för 1 dm – 3 m; N=24 för 10 m). Signifikanta skillnader ( $P < 0,05$ ) i genomsnittlig standardavvikelse mellan olika triangelstorlekar anges med olika bokstäver.



Svampbiomassa (ergosterol) korrelerade signifikant negativt ( $P < 0,0001$ ) med markbördighet men positivt ( $P < 0,0001$ ) med rotbiomassa. Mn-peroxidasaktivitet korrelerade signifikant positivt ( $P = 0,0002$ ) med markbördighet, men negativt med svampbiomassa ( $P = 0,003$ ).

Markbördighet ( $P = 0,042$ ) och Mn-peroxidasaktivitet ( $P = 0,028$ ) var signifikant lägre och svampbiomassan högre ( $P = 0,024$ ) där provtagningen hindrades av stora rötter. Rot- ( $P = 0,018$ ) och svampbiomassa ( $P = 0,035$ ) korrelerade positivt med konvex mikrotopologi, medan Mn-peroxidasaktivitet var lägre ( $P = 0,015$ ) vid konvexa provpunkter.

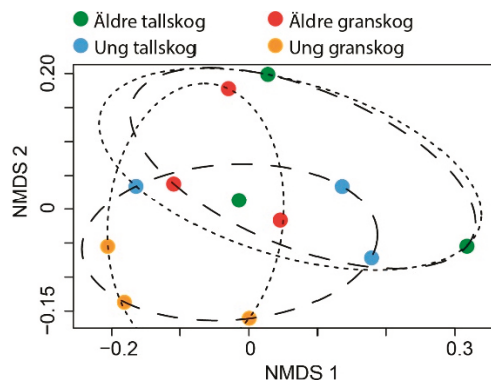
Bakterie- och svampsamhällen samvarierade tydligt med hög signifikans ( $P < 0,0001$ ) för alla lokaler. Sambandet mellan svampar och bakterier var betydligt starkare än med markvegetation och övriga parametrar. Signifikant korrelation med vegetation, markbördighet och svampbiomassa observerades i ett flertal lokaler för både svampar och bakterier. Samband med markbördighet och svampbiomassa var starkare för bakterier än för svampsamhällen. Markvegetationen uppvisade svaga samband med markbördighet och svampbiomassa. Samband med rotbiomassa och Mn-peroxidas var generellt svaga (Tabell 3).

**Tabell 3. Samvariation mellan organismsamhällets sammansättning och andra parametrar i barrskogsmark redovisad som genomsnittlig Spearmans rankkorrelation baserad på individuella Mantel-test i tolv lokaler. Antal av lokaler med signifikanta samband ( $P < 0,008$ ) anges i parentes och fetstil indikerar signifikans för en majoritet av lokalerna.**

	Bakterier	Svampar	Vegetation	Svamp-biomassa	Mark-bördighet	Rot-biomassa	Mn-peroxidas
<b>Bakterier</b>		<b>0,57</b> (12)	<b>0,24</b> (7)	<b>0,34</b> (10)	<b>0,33</b> (9)	0,11 (1)	0,07 (2)
<b>Svampar</b>	<b>0,57</b> (12)		<b>0,26</b> (8)	<b>0,22</b> (10)	<b>0,22</b> (7)	0,09 (1)	0,06 (1)
<b>Vegetation</b>	<b>0,24</b> (7)	<b>0,26</b> (8)		0,06 (2)	0,11 (2)	0,01 (0)	0,03 (0)

## 3.2 Markfauna

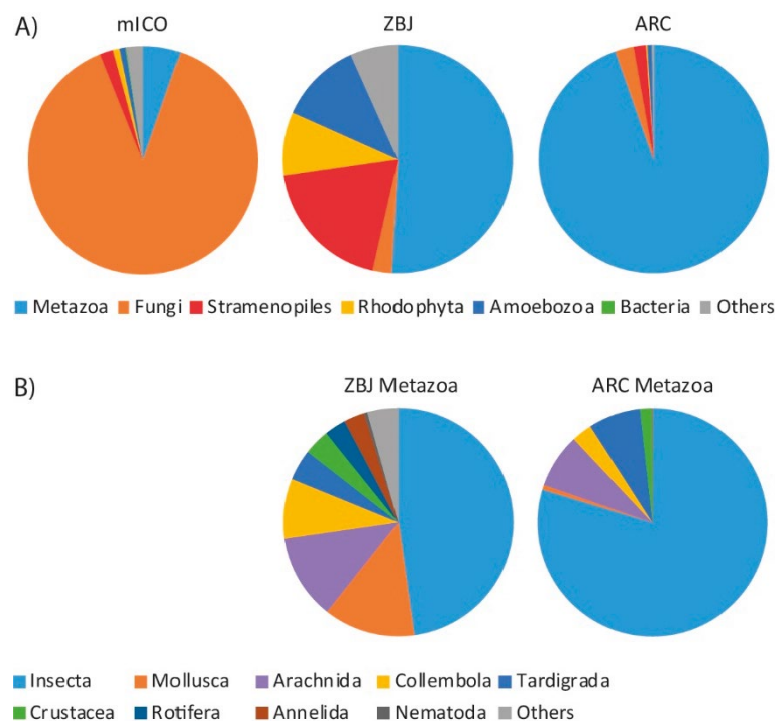
Baserat på traditionell morfologisk identifiering av hoppstjärter fann vi en tendens till skillnad i artsammansättningen mellan gran- och tallskogar ( $P = 0,058$ ). Framför allt avvek unga granskogar från de övriga skogstyperna (Figur 9) med en högre andel *Mesaphorura* och *Parisotoma* men lägre andel *Folsomia*.



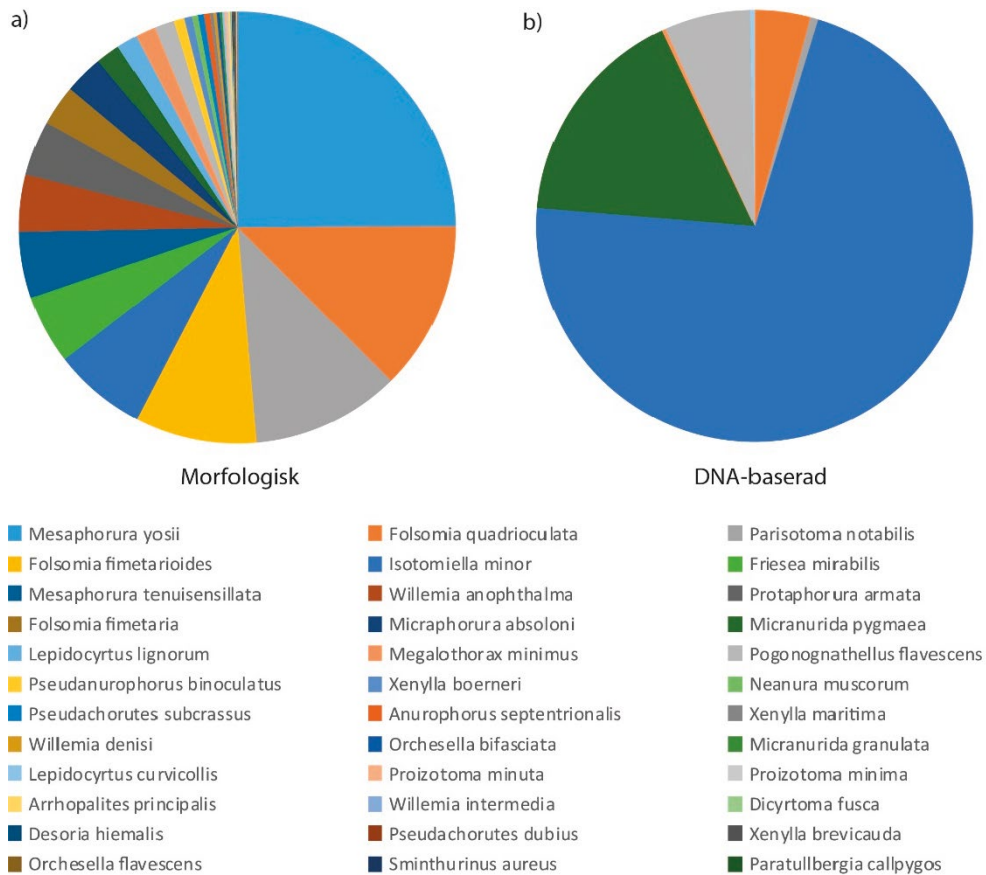
Figur 9. Skillnader i artsammansättning av hoppstjärter i barrskogsmark från olika skogstyper illustrerat med NMDS av Bray-Curtis-distanser baserat på antal morfologiskt identifierade individer. Ellipserna markerar prov från samma trädart (prickade) eller åldersklass (streckade).

Det minst specifika primerparet (mICO; Leray et al. 2013) amplifierade brett över olika eukaryoter, och flertalet av sekvenserna (89 %) kom från svampar (Figur 10). Båda de andra primer-paren (ZBJ and ARC) amplifierade huvudsakligen sekvenser från Arthropoda med dominans av Diptera (tvåvingar), troligen från marklevande larver. Detta gällde även de mest specifika ARC-primrarna (Schmidt et al. 2018), som i huvudsak förväntades amplifiera sekvenser från Collembola och Arachnida (Figur 10). Vi valde att gå vidare med ZBJ-primrarna (Zeale et al. 2011), som tidigare har gett goda resultat vid analyser av Arthropoda-samhällen i markprover (Oliverio et al. 2018).

Sekvenser från hoppstjärter (Collembola) utgjorde 4 % av sekvenserna som erhöles med ZBJ-primrarna och 9 % av djursekvenserna. De morfologiskt analyserade samhällena uppvisade en betydligt större artrikedom än de DNA-baserade (Figur 11). Sekvenserna dominerades av fyra arter, varav endast en (*Folsomia quadrioculata*) fanns bland de vanligaste morfologiskt identifierade arterna. Merparten av Collembola-sekvenserna kom från *Isotomiella minor* (71 %) och *Micranurida pygmaea* (17 %) som endast utgjorde en mindre andel (7 % och 2 %) av de observerade individerna. Den vanligast förekommande arten bland de morfologiskt identifierade hoppstjärterna – *Mesaphorura yosii* saknades helt bland DNA-sekvenserna. En jämförelse med referenssekvenser från de vanligast förekommande arterna påvisade avgörande variationer i primrarnas målsekvenser. De arter som saknades eller var underrepresenterade i sekvensdata avvek från primer-sekvenserna på flera ställen, medan de arter som var överrepresenterade i sekvensdata överensstämde med primersekvenserna över de 8 baserna närmast 3'-änden (Tabell 4).



Figur 10. A) Fördelning av sekvenserade markörer på organismgrupper baserat på bästa matchningen i NCBI-databasen (många matchningar är osäkra, och sekvenserna inom gruppen "Rhodophyta" (rödalger) skall tolkas som svårplacerade). DNA-extraherat från skogsmarkprover har amplifierats med tre olika primerpar (mICO, ZBJ och ARC). B) Fördelning av fauna-sekvenser på undergrupper.



Figur 11. Jämförelse mellan hoppstjärtssamhällen analyserade med a) morfologisk identifiering eller b) DNA-baserad analys. Figuren visar det totala samhället i 12 barrskogslokaler. Den morfologiska analysen är baserad på andel av det totala antalet individer, medan den DNA-baserade analysen visar relativ abundans av identifierade sekvenstyper inom Collembola, redovisade per art. DNA-analysen bygger på ZBJ-primrarna (Zeale et al. 2011).

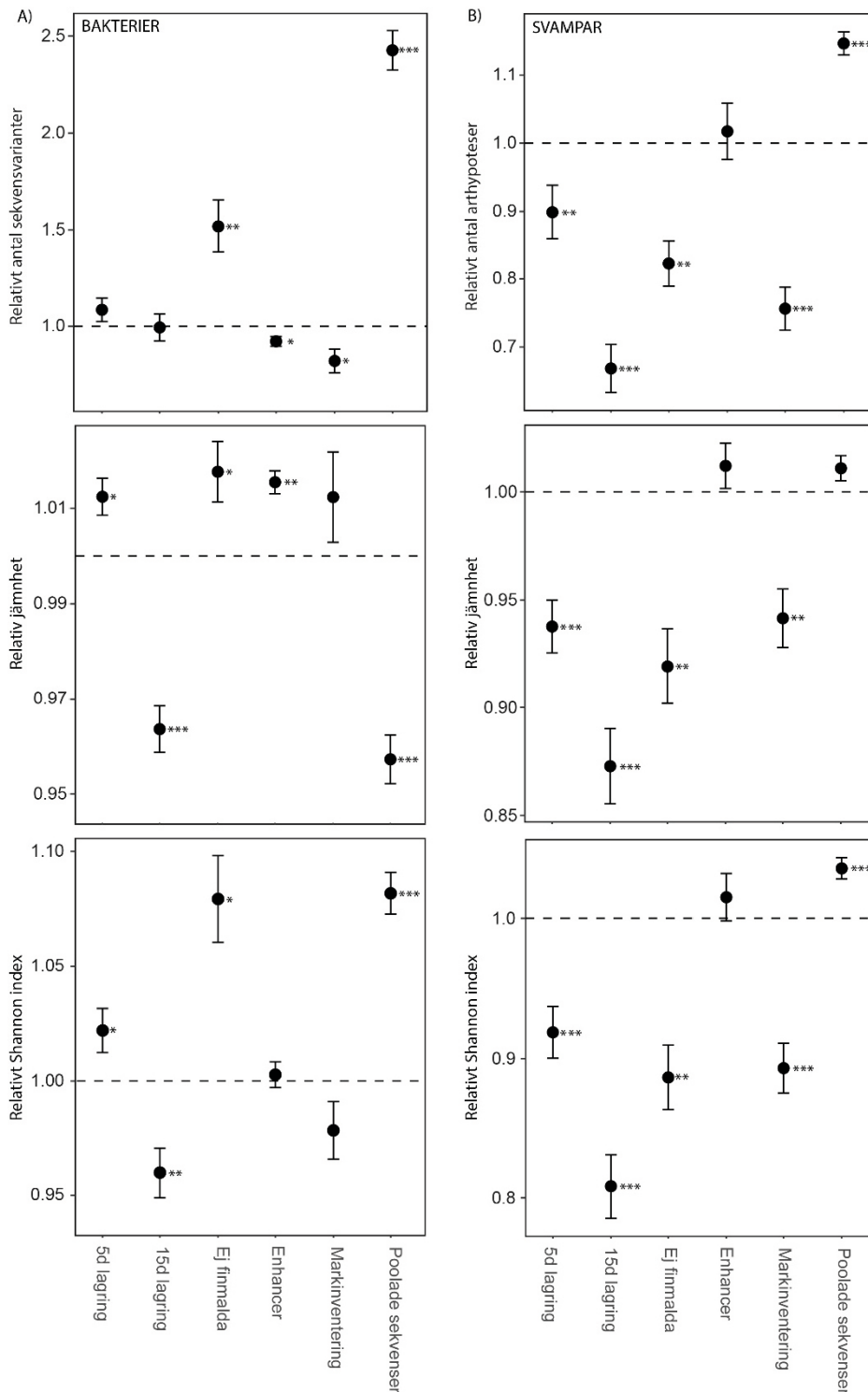
Tabell 4. Jämförelse mellan primer-sekvenser och målsekvenser (de 11 baserna närmast 3'-ändan) hos några av hoppstjärtsarter som var vanligast bland morfologiskt identifierade arter (*M. yosii*, *F. quadrioculata* och *P. notabilis*) samt i sekvensdata (*I. minor*, *M. pygmaea* och *P. flavescens*). Avvikelser från primersekvenserna är markerade i rött.

Artnamn	ZBJ-ArtF1c	ZBJ-ArtR2c
Primersekvens	TTTATTTTGG 3'	CCAAATCCTCC 3'
<i>M. yosii</i>	TTAATTCTAGG	CCAAACCTCC
<i>F. quadrioculata</i>	TTAATTTTCGG	CCAAACCCWCC
<i>P. notabilis</i>	TTAATTTTGG	CCAAACCTCC
<i>I. minor</i>	TTAATTTTGG	CCRAATCCTCC
<i>M. pygmaea</i>	TTTATTTTGG	CCAAATCCWCC
<i>P. flavescens</i>	CTAATTTTGG	CCAAAGCCTCC

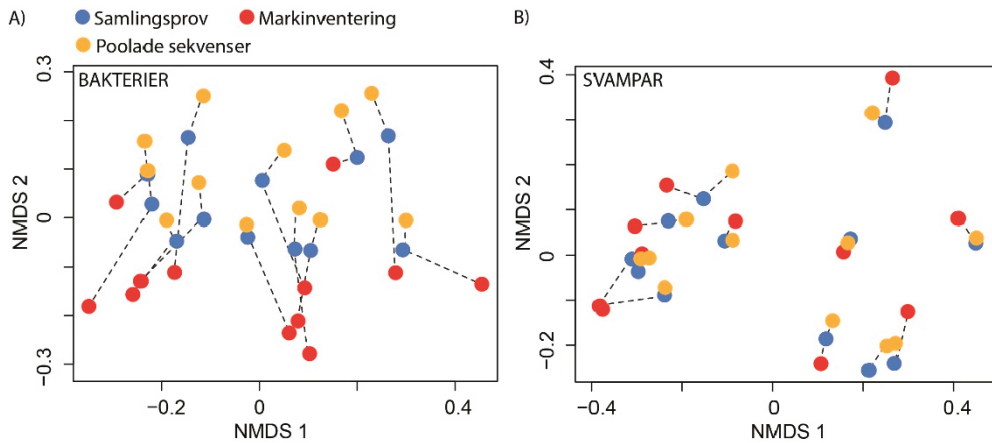
### 3.3 Effekter av provtagningsmetodik och provhantering

Sekvenssamhällena varierade i mångfald, jämnhet och sammansättning beroende på provtagningsmetodik. När prover sekvenserades separat, och sekvensdata slogs ihop i efterhand, var mångfalden betydligt större än när samlingsprover poolades direkt i fält, framför allt för bakterier, men också för svampar (Figur 12). Fördelningen av sekvensvarianter för bakterier var dock mer jämn i samhällen från samlingsprover. Sammansättningen skilde sig signifikant mellan samhällen från samlingsprover och samhällen av poolade sekvenser från enskilda provpunkter, både för bakterier ( $P < 0,001$ ) och för svampar ( $P = 0,002$ ). Prover insamlade enligt markinventeringens etablerade protokoll täckte in mindre biodiversitet än det mer utspridda samlingsprovet, och samhällssammansättningen skilde sig från samlingsproverna både för bakterier och för svampar ( $P < 0,001$ ). För bakterier var skillnaden i sekvensdata större beroende på provtagningsmetodik än på provernas ursprungslokal, medan för svampar var sekvenssamhällena från olika lokaler mer distinkta, oberoende av provtagningsmetodik (Figur 13).

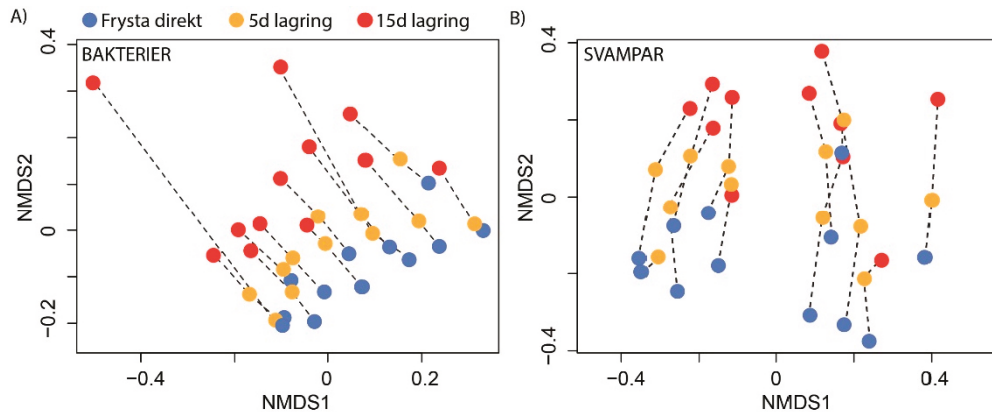
Lagring vid rumstemperatur hade stor effekt på samhällena, både för bakterier och för svampar (Figur 14). Lagring ledde till signifikanta ( $P < 0,002$  mellan 0 d, 5 d och 15 d) men enhetliga förskjutningar, med skillnader i sammansättning beroende på lagring i nivå med skillnader mellan skogslokaler. För bakterier påverkades inte den totala rikedom av sekvensvarianter, men samhällets jämnhet ökade under de första 5 dagarna för att sedan minska kraftigt under lagring upp till 15 dagar (Figur 12). Oavsett lagring dominerades bakteriesamhällena av Actinobacteria, men kortare lagring ledde till en högre andel Planctomycetes och Bacilli, och längre lagring ledde till en betydligt högre andel Bacilli (Figur 15). För svampar minskade artrikedomen tydligare än för bakterier (Figur 12), kopplat till en minskad andel Agaricomycetes och Eurotiomycetes, medan andelen Mucoromycetes och oidentifierade ascomyceter ökade (Figur 15).



Figur 12. Effekter av provtagningsmetoder, provlagring och DNA-extraheringsmetoder på uppskattad diversitet av A) bakterier och B) svampar i barrskogsmark. Figuren visar effektstorlekar i relation till referensprov (streckad linje – samlingsprov från 38 provpunkter som frysts in direkt, finnalds och extraherats utan ”Enhancer”) som medelvärden med standardfel (N=12 för lagring, markinventering och poolade sekvenser; N=5 för ej finnalda och ”Enhancer”). ”Poolade sekvenser” avser 38 provpunkter där varje enskilt prov sekvenserades separat och data slogs ihop i efterhand. \* P<0,05; \*\* P<0,01; \*\*\* P<0,001.

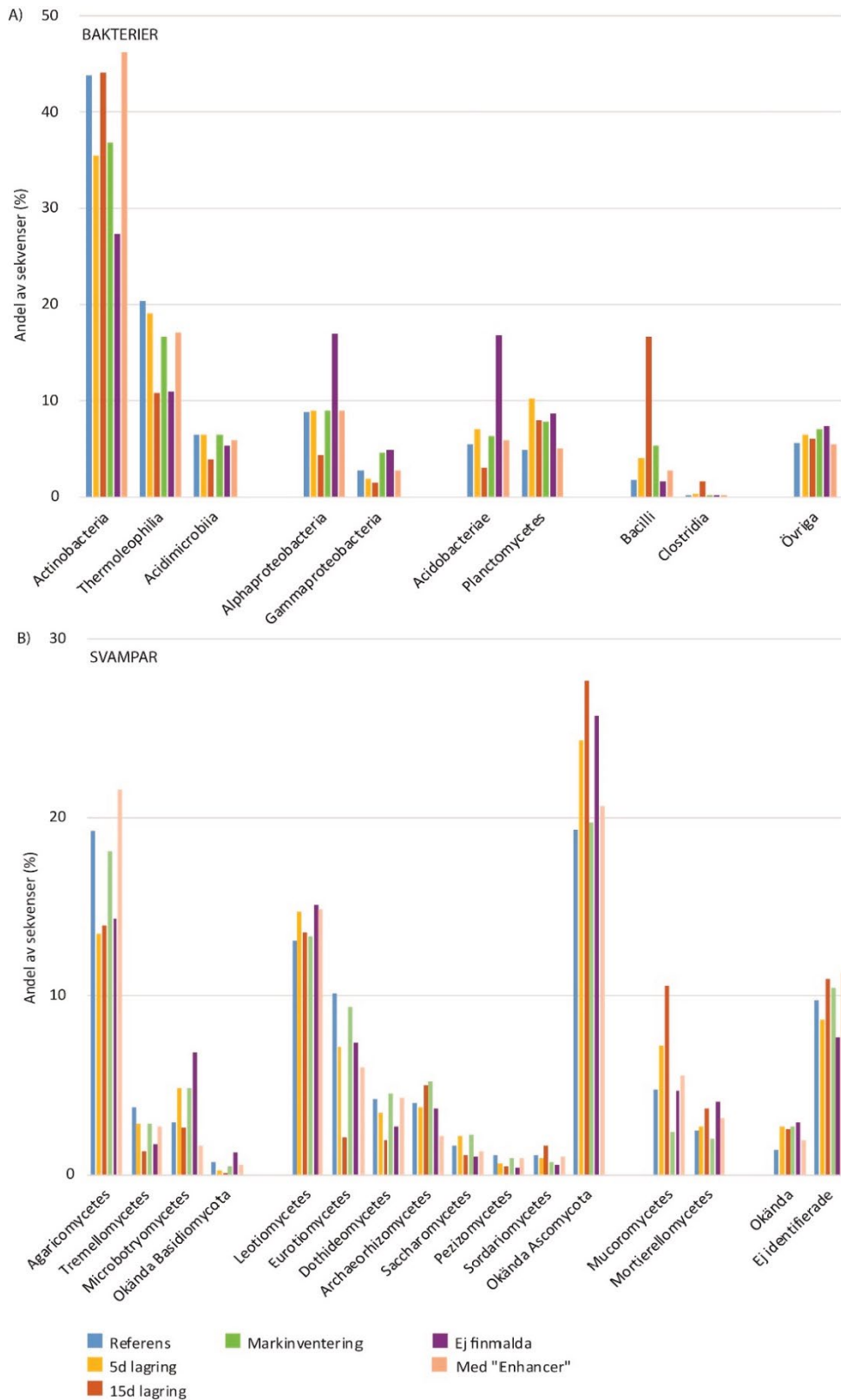


Figur 13. Effekt olika provtagningsmetoder på uppskattad sammansättning av A) bakteriesamhällen och B) svampsamhällen i barrskogsmark, illustrerat med NMDS baserat på Bray-Curtis-distanser. Streckade linjer binder samman olika provtagningsmetoder applicerade på samma lokal.

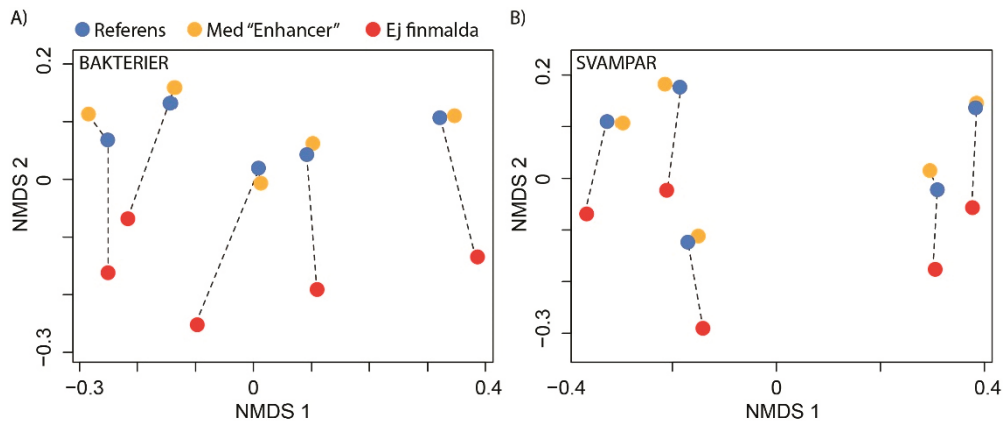


Figur 14. Effekt olika lagring vid rumstemperatur på uppskattad sammansättning av A) bakteriesamhällen och B) svampsamhällen i markprover från barrskog, illustrerat med NMDS baserat på Bray-Curtis-distanser. Streckade linjer binder samman olika lagringstider av prover från samma lokal.

Finmalning av proverna i kulkvarn minskade alla diversitetsmått för bakterier men ökade diversiteten av svampar i sekvenssamhällena (Figur 12). För båda organismgrupperna hade malning en tydlig effekt på sammansättningen (Figur 16;  $P=0,06$ ). För bakterier ökade finmalning andelen Actinobacteria och minskade andelen Proteobacteria och Acidobacteria. För svampar ökade finmalning andelen Agaricomycetes och minskade andelen Microbotryomycetes och oidentifierade ascomyceter (Figur 15). Metoden för DNA-extraktion ("Enhancer") spelade en jämförelsevis liten roll (antalet sekvensvarianter av bakterier minskade signifikant men marginellt).



Figur 15. Effekt av lagring, provtagning och extraktionsmetoder på taxonomisk sammansättning av sekvenserade markörer från A) bakteriesamhällen och B) svampsamhällen. Samhällena är uppdelade på klassnivå, och endast klasser som utgör >1% av sekvenserna i någon behandling är medtagna.



Figur 16. Effekt olika DNA-extraktionsmetoder på uppskattad sammansättning av A) bakterie-samhällen och B) svampsamhällen i markprover från barrskog, illustrerat med NMDS baserat på Bray-Curtis-distanser. Streckade linjer binder samman olika extraktionsmetoder applicerade på prover från samma lokal.



## 4. Diskussion

### 4.1 Skogstyper

När vi jämförde organismsamhällen i mark från tall- och granskogar, respektive i ungskogar och äldre bestånd, fann vi tydliga skillnader. Svampsamhällena var tydligast differentierade mellan de olika skogstyperna (Figur 5B), vilket är i linje med tidigare observationer av stora skillnader mellan svampsamhällen i skogar med olika trädslag och markbördighet (Sterkenburg et al. 2015; Kyaschenko et al. 2017a) samt långtgående och kvardröjande effekter av avverkning (Varenius et al. 2017; Kyaschenko et al. 2017b). Bakteriesamhällena skilde sig också tydligt åt mellan tall- och granskogar, men effekten av beståndsålder var otydlig (Figur 5A). Artsammansättningen av morfologiskt identifierade hoppstjärtar avvek i unga granskogar (Figur 9). Dessa skillnader visar att markorganismer är användbara indikatorer för både ståndortsegenskaper och påverkan av skogsbruk i svensk skogsmark. En mer omfattande och fortlöpande miljöövervakning av markorganismer med DNA-baserade metoder skulle dessutom göra det möjligt att karakterisera olika organismers ekologiska nischer som grund för bedömning av riskstatus och bevarandeinsatser.

### 4.2 Rumslig variation

Svampsamhällena uppvisade, som väntat och rapporterats tidigare (Lilleskov et al. 2004; Pickles et al. 2010), tydlig rumslig struktur med ojämna utbredningsmönster på alla skalor. Vi fann indikationer på småskalig struktur, med 1 dm fläckar inom 3 dm ytor, men också mer storskaliga mönster, med 3 m fläckar inom 10 m ytor (Figur 7B). Med vår provtagnings-strategi kan vi inte säga om svampsamhällena kan betraktas som mer homogena på större skala (>10 m). Här behövs ytterligare studier kring storskalig variation inom bestånd, men artsammansättningen av svampsamhällen har tidigare visat sig variera över lokala bördighetsgradienter (Toljander et al. 2006, Kyaschenko et al. 2017a). Det är slående att svamparna, som ofta betraktas som mikroorganismer, uppvisar tydlig variation i samhällsstruktur på samma skala som växter. Jämförelser mellan olika skogsbestånd har påvisat tydliga samband mellan svampsamhällen och trädslag, vegetation samt förnans och markens näringsinnehåll och pH (Sterkenburg et al. 2015). Här visar vi att liknande korrelationssamband är tydliga också på mindre rumsliga skalor, ända ned till 1 dm (Tabell 3).

Trädrötterna visade sig vara ganska jämt fördelade i marken, med viss rumslig struktur endast i äldre skogar, men markvegetationen uppvisade tydlig samhällsvariation, huvudsakligen på 1–3 m skalan. Mårens struktur, näringsinnehåll och surhet (sammanslaget till ett markbördighetsindex) varierade både på den största (1–10 m) och den minsta (1–10 dm) skalan (Figur 8). En enkel förklaring till svampsamhällets heterogenitet är att det anpassar sig efter växtsamhället och lokala markförhållanden. Man kan dock inte utgå från att det enbart är växterna som styr svamparna – studier av mykorrhizabildande dropptaggsvamp (Hintikka & Näykki, 1967) liksom av häxringar i gräsmark (Zotti et al. 2020) visar att enstaka svampmycel (alltså individer) kan ha en transformerande effekt på växtsamhällen. Svampindivider kan bli gamla, och deras genetiskt enhetliga mycel (geneter) kan breda ut sig över

stora områden (Dahlberg & Stenlid, 1994), även om de troligen ofta är fragmenterade i flera separata fysiska enheter (rameter). Enskilda svamparter/grupper verkar också kunna spela en avgörande reglerande roll i nedbrytning och omsättning av organiskt material på en meterskala (Lindahl et al. 2021). Svamparnas unika mycelform ger dem inte bara möjlighet att effektivt anpassa sig till variation i marken, utan också en förmåga att skapa variation genom att driva nedbrytning och näringsomsättning samt interagera med växter (Lindahl & Olsson, 2004). Vår studie tyder också på att den rumsliga strukturen är tydligare i svampsamhällena än för såväl växter som markens biogeokemi. Det är alltså fullt möjligt att svamparna inte bara svarar på variation i vegetation och mark, utan också spelar en central roll i att skapa variation.

Nya spännande mönster träder fram – lokala fläckar med hög svampbiomassa men låg peroxidaktivitet och markbördighet indikerar en småskalig mosaik av varierande omsättning av organiskt material och näringsämnen. Kring sådana provpunkter höjde sig mårskiktet i konvexa ”kullar”, vilket tyder på hämmad nedbrytning och ackumulering av organiskt material. Tidigare påvisade storskaliga samband mellan svampsamhällena, omsättning av organiskt material och kvävetillgänglighet (Clemmensen et al. 2013; Clemmensen et al. 2015; Kyaschenko et al. 2017a; Kyaschenko et al. 2019) verkar alltså uppträda också på en betydligt mindre rumsliga skala.

Även bakteriesamhällena uppvisade en tydlig rumslig variation. Samband mellan bakteriesamhällena och pH och näringsinnehåll i marken var förväntade, och starkare än för svamparna, men vi fann ännu starkare inbördes kopplingar mellan bakteriernas och svamparnas artsammansättning (Tabell 3). Det är möjligt att multivariata samhällsdata avspeglar många olika miljöaspekter, inklusive sådana som vi inte har mätt, och att både svamp- och bakteriesamhällena fungerar som känsliga och integrerade miljöbarometrar, och därför samvarierar. Ändå verkar det mer troligt att den starka kopplingen mellan svampar och bakterier i stor utsträckning beror på direkta interaktioner mellan organismgrupperna, såsom tidigare observerats i häxringar (Zotti et al. 2020). Svampar kan forma bakteriesamhällena i ”hyfosfären” genom specifika interaktioner (de Boer et al. 2005; Marupakula et al. 2017) som kan vara både aktivt stimulerande (lättillgängliga exudat), hämmande (antibiotika) eller mer passiva (till exempel nedbrytning av dött mycel). Vissa bakterier kan vara antagonistiska mot svampar, medan andra kan stimulera svamparnas myceltillväxt.

Orsakssambanden bakom den tydliga rumsliga variationen i svensk skogsmark är alltså komplexa, troligen med starka biologiska återkopplingsmekanismer. Interaktioner mellan svampar, bakterier, växter och biogeokemiska processer kan leda till självförstärkande processer (Kyaschenko et al. 2017a; Kyaschenko et al. 2019) som kan ge upphov till rumslig variation även i frånvaro av externa drivkrafter (mineralogi, hydrologi och topologi). Slumpartad etablering av arter och individer kan få stora konsekvenser för lokala förhållanden och senare etablering av andra organismer.

Heterogeniteten i svensk skogsmark får konsekvenser för provtagning i samband med miljöanalys. Även med ett stort antal delprov ökade antalet arter/genotyper i samlingsprov med ytterligare delprov (Figur 6). Våra resultat påverkas visserligen av den hierarkiska provtagningsstrategin, där delproverna inte var oberoende utan närliggande prover var mer lika. Med större avstånd, och därmed skillnad i artsammansättning, mellan alla delprov (högre beta-diversitet) skulle den detekterade diversiteten öka snabbare med antalet delprov. Vår mer intensiva provtagning

förmådde täcka in mer diversitet än den nuvarande Markinventeringen (Figur 12), men skillnaden var ganska liten – Markinventeringens fem delprov spridda över en cirkel med 2 m diameter förmådde att täcka in omkring 75 % av de svamparter och bakteriegenotyper som uppmättes med den betydligt mer intensiva provtagningen med 38 delprov (även om många av dessa var tätt klustrade). Analys av svamp-samhällen med nuvarande provtagning avspeglade också övergripande mönster i artsammansättning relativt väl (Figur 13B). Den tydliga rumsliga strukturen hos svamp- och bakteriesamhällen innebär att mervärdet av ytterligare delprov ökar med större avstånd mellan provpunkterna. Sambanden kvarstod på den största skalan som vi studerade (3–10 m), framför allt för svampar.

## 4.3 Markfauna

Vi utvärderade olika primeralternativ för DNA-baserade analyser av markfauna, med ett särskilt fokus på hoppstjärtar (Figur 10). ”DNA-barcoding” av djur med COI-markörer har framför allt fokuserat på att sammanställa databaser baserat på PCR-amplifiering av DNA från enstaka individer (Ratnasingham and Hebert, 2013). När markörer skall amplifieras från hela samhällen i komplexa markprover ställs det högre krav på primrarnas generalitet och specificitet. Ett av de COI-primerpar som vi testade (Leray et al. 2013) visade sig vara alltför generellt och amplifierade huvudsakligen markörer från svampar. Ett annat (Schmidt et al. 2018) var alltför specifikt och amplifierade mest markörer från insekter med endast en låg andel sekvenser från hoppstjärtar och kvalster, som är viktiga komponenter av markens mesofauna. ZBJ-primrarna (Zeale et al. 2011) verkade initialt lovande och gav en relativt hög andel sekvenser från målgrupperna (även om insekter dominerade). En jämförelse med morfologiskt identifierade hoppstjärtar från samma provytor visade dessvärre på stora avvikelser i artsammansättning och en betydligt lägre diversitet i den DNA-baserade analysen (Figur 11). En noggrannare granskning av referens-sekvenser från dominanta arter visade på variation i primrarnas målsekvenser (Tabell 4), vilket ledde till att ett fåtal arter dominerade sekvenspoolen medan andra helt saknades eller förekom i låg abundans. För att kunna använda DNA-analyser av markfauna inom svensk skogsmark krävs utveckling av nya primers, specifikt inriktade på önskade målgrupper, till exempel hoppstjärtar och kvalster. Alternativet att använda primers med vidare täckning är troligen problematiskt, då generalitet över breda djurgrupper lätt leder till att även svampar inkluderas och kommer att dominera sekvensdata, i kraft av sin stora biomassa i skogsmark.

## 4.4 Provhantering

Proverna som samlades in enligt markinventeringens protokoll skiljde sig åt från vår storskaliga provtagning, inte bara i att de fångade en något mindre andel av den totala diversiteten, men också i en systematiskt annorlunda sammansättning av svamparter och bakteriegenotyper (Figur 13). Detta var särskilt tydligt för bakterier, och en möjlig förklaring är skillnader i vilket material som samlades in. Markinventeringen inkluderar inte förnalagret (L-lagret), utan mårproverna omfattar endast material i mer avancerade nedbrytningsstadier (F- och H-lagren). I vår mer arbets-intensiva provtagning inkluderade vi förnakomponenter som separerades från gröna

växtdelar för hand. Då den mikrobiella aktiviteten är hög i färsk förna kan en liten andel färskt fönamaterial få ett tydligt genomslag i sekvenspoolen.

Lagring av prover leder till tydliga förändringar i svamp- och bakteriesamhällen (Figur 14, 15). Överlag fann vi samma taxonomiska förändringar som i en tidigare studie i en bokskog i Danmark (Frøslev et al., 2022). Opportunistiska taxa ökade sin andel av sekvenspoolen enligt ett förutsägbart mönster, och mångfalden minskade, särskilt för mykorrhizasvampar. I bakteriesamhället ledde 15 dagars lagring i rums-temperatur till att Bacilli ökade sin andel av sekvenspoolen från 2 % till 17 %. De är sporbildande och kan därmed klara sig under mer ogynnsamma förhållanden, vilket förklarar varför de till exempel dominerar i arkivjordar som lagrats torkade under lång tid (Ivanova et al. 2017; Zhao et al. 2021). Bland svamparna ökade Mucoromyceter, Mortierellomyceter och oidentifierade Ascomyceter, varibland de dominerande arterna var Leotiomyceter. Andelen sekvenser från Agaricomyceter (huvudsakligen mykorrhizasvampar) minskade från 19 % till 13 % efter 5 dagars lagring. Eurotiomyceter, dominerade av obeskrivna arter i ordningen Chaetothyriales som bildar mykorrhiza med ljungväxter, minskade också från 10 % till 2 %. I en tidigare studie i tallskog isolerades markprover från levande rötter genom att plaströr slogs ned genom mårskiktet (Lindahl et al. 2010). Efter 14 dagar (då rören lämnades i marken) hade svampsamhället förändrats tydligt med en minskad andel mykorrhizasvampar och en ökad andel Leotiomyceter och Mortierellomyceter. Ett troligt scenario är att mykorrhizamycetet snabbt dör när markprover förlorar kontakten med levande rötter, vilket stimulerar tillväxt av vissa grupper av svampar och bakterier som lever på lättillgängliga resurser från det döende mycelet. Även om dessa förändringar verkar vara ganska generella och förutsägbara, och i teorin skulle kunna justeras för i statistiska analyser, är det tydligt att lagring av markprover leder till stora omstruktureringar av organismsamhällena och i största möjliga mån bör undvikas. I andra studier har lagring haft mindre effekt (Frøslev et al., 2022).

Antalet detekterade bakteriegenotyper var mycket högre när delproven analyserades separat och data slogs samman bioinformatiskt, jämfört med när ett samlingsprov analyserades (Figur 12A). En möjlig förklaring är att DNA extraherades från en betydligt större provmängd (Penton et al. 2016) när delprover analyserades separat (totalt 3,8 g) än för samlingsprovet (100 mg). Detta skulle kunna tyda på att proverna inte var tillräckligt väl homogeniserade i samlingsprovet för att den totala diversiteten av bakteriellt DNA i delproverna skulle finnas representerad i DNA-extrakten. Den högre diversiteten efter pooling av sekvenser från enskilda prov kan också bero på att alla delprov får samma vikt i sekvenspoolen, medan prov med hög biomassa kommer att dominera samlingsprovet. Vi fann också att de sekvenserade samhällena påverkades tydligt av hur intensivt vi finfördelade proverna. Malning med kulkvarn mer än halverade andelen sekvenser från Proteobakterier och Acidobacteriota men ökade detektionen av svampar inom Agaricomycetes. Det är tydligt att homogenisering av samlingsprover är en avgörande faktor vid DNA-analyser av skogsmarkprover. Valet av metod kan ha ett stort inflytande på de sekvenserade samhällena, och noggrann optimering är nödvändig för att minimera systematiska skillnader mellan sekvensdata och de verkliga samhällena.

## 5. Slutsatser och förslag

- Den stora rumsliga variationen i marksamhällen gör det svårt att täcka in merparten av mångfalden vid provtagning. Möjligheterna att detektera arter/genotyper med låg abundans är begränsade, då ovanliga arter har mycket lokal utbredning i de heterogena samhällena. Antalet detekterade svamparter och bakteriegenotyper ökar med antalet delprover utan tydlig övre gräns, vilket innebär att provtagningsmetodiken måste bygga på en avvägning mellan arbetsinsats och täckning av biodiversitet. Med ett något större antal delprov kan den detekterade mångfalden och representativiteten ökas jämfört med nuvarande provtagning inom Markinventeringen. Samtidigt når Markinventeringens nuvarande provtagningsmetodik ganska långt med endast 5 delprov på 2 m avstånd från varandra – 75 % av biodiversiteten fångas och övergripande mönster i svampsamhällen avspeglas relativt väl.
- För att maximera provtagningsens effektivitet bör delproverna separeras så mycket som möjligt. Vi kan inte ange något minimiavstånd, eftersom samhällsvariationen ökade längs hela den rumsliga skala som vi studerade, och tidigare studier har funnit stor variation även på större skalor. Vi rekommenderar därför att delprov fördelas jämnt över hela den aktuella provtagningsytan, med så stort avstånd som möjligt mellan provpunkterna.
- Även markkemiska parametrar varierade tydligt på >1 m skala, och ett mer utspritt provtagningsprotokoll jämfört med nuvarande Markinventering skulle kunna leda till mindre slumpmässig variation och starkare korrelation med parametrar från Riksskogstaxeringen.
- Separat hantering av enskilda prover ökar den detekterade mångfalden, men innebär ett stort merarbete. Eventuellt kan motsvarande effekt uppnås genom att extrahera från en större mängd material av samlingsprov.
- Analyserna av bakteriesamhällen fungerade väl samt gav värdefull och användbar information. Nuvarande analyser av ITS2-sekvenser från svampar kan utökas med sekvensering av prokaryota 16S-markörer till en ganska liten merkostnad.
- Sekvensering av markfauna fungerade relativt dåligt, och utveckling av nya primers krävs för att DNA-baserade metoder skall kunna användas inom miljöanalys.
- Det är viktigt att markprover hamnar i frys så snart som möjligt – helst inom ett dygn, även om detta medför logistiska utmaningar. Kemisk konservering är en möjlighet, men troligen inte ett realistiskt alternativ för stora samlingsprover. Snabb torkning kan också vara en möjlighet.
- Malning hade oväntat stor effekt på bilden av marksamhällena, med olika påverkan på olika organismgrupper. Dessa effekter är underskattade och behöver studeras mer.

Hur kan data från DNA-baserad miljöövervakning användas? Med målsättningen att minimera riskerna för långsiktig minskning av biologisk mångfald i marken är en central aspekt att identifiera och skydda hotade arter. DNA-analys av slumpvis insamlade markprover är en trubbig inventeringsmetodik – endast en försumbar del av den totala marken analyseras – men denna nackdel kan vägas upp av metodens många fördelar och brist på alternativ. För svampar har DNA-baserad inventering av rödlistade arter visat sig vara nästan lika effektiv som inventering av fruktkroppar, men den rumsliga variationen ställer höga krav på ett stort antal väl spridda delprov från varje lokal (Frøslev et al. 2019). DNA-metodiken möjliggör utvidgning av rödlistor till att också inkludera mer anonyma organismer som inte kan observeras ovan mark och/eller endast har mikroskopiska strukturer. Här kan en prioritet vara att övervaka förändringar över tid för de vanligaste arterna, och det kan vara mer relevant att fokusera bevarandestrategier på typiska organismsamhällen än på enskilda arter (f.a. för prokaryoter). Karakterisering av samhällen ställer lägre krav på antalet delprov, men om man vill relatera marksamhällen till andra mätvariabler är det önskvärt att provtagningen sker på samma skala. Till exempel sker den nuvarande provtagningen av DNA inom Markinventeringen på en betydligt mindre skala (2 m) än Riksskogstaxeringens datainsamling (20 m). Spridning av delprover över ett större område minskar också slumpmässig variation och ökar därmed precisionen i statistiska samband.

Markorganismer kan också användas som känsliga indikatorer på markens egenskaper och biogeokemiska processer. Sveriges miljömål ”Levande Skogar” preciserar ett önskemål att bibehålla skogsmarkens biologiska egenskaper och processer, vilket är svårt att följa upp utan DNA-baserade metoder. Ökande förståelse av samband mellan olika organismgrupper och processer i marken (Clemmensen et al. 2015; Lindahl et al. 2021) öppnar möjligheter att precisera olika biologiska index som avspeglar till exempel näringsstatus, klimatpåverkan eller störning/kontinuitet. Därigenom kan DNA-baserad information erbjuda helt nya möjligheter för forskare, myndigheter, beslutsfattare och markägare att förstå markbiologiska effekter av klimatförändringar och markanvändning.

## 6. Källhänvisning

- Callahan, B., McMurdie, P., Rosen, M. et al. 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods* 13, 581–583.
- Castaño, C., Berlin, A., Brandström Durling, M. et al. 2020. Optimized metabarcoding with Pacific Biosciences enables semi-quantitative analysis of fungal communities. *New Phytologist* 228: 1149–1158.
- Castaño, C., Hallin, S., Egelkraut, D. et al. 2023. Contrasting plant-soil-microbial feedbacks stabilize vegetation types and uncouple topsoil C and N stocks across a subarctic-alpine landscape. *New Phytologist* 238: 2621–2633.
- Clemmensen, K.E., Bahr, A., Ovaskainen, O. et al. 2013. Roots and associated fungi drive long-term carbon sequestration in boreal forest. *Science* 339: 1615–1618.
- Clemmensen, K.E., Durling, M.B., Michelsen, A. et al. 2021. A tipping-point in carbon storage when forest expands into tundra is related to mycorrhizal recycling of nitrogen. *Ecology Letters* 24: 1193–1204.
- Clemmensen, K.E., Finlay, R.D., Dahlberg, A. et al. 2015 Carbon sequestration is related to mycorrhizal fungal community shifts during long term succession in boreal forests. *New Phytologist* 205: 1525–1536.
- Clemmensen, K.E., Ihmark, K., Brandström-Durling, M., Lindahl, B.D. 2023. Sample preparation for fungal community analysis by high-throughput sequencing of barcode amplicons. In: Martin, F., Uroz, S. (eds.) *Microbial Environmental Genomics* (2nd ed.). Springer.
- Dahlberg A., Mueller G. 2011. Applying IUCN red-listing criteria for assessing and reporting on the conservation status of fungal species. *Fungal Ecology* 4: 1–16.
- Dahlberg A., Stenlid, J. 1994. Size, distribution and biomass of genets in populations of *Suillus bovinus* (L, Fr) Roussel revealed by somatic incompatibility. *New Phytologist* 128: 225–234.
- Daniel, G., Volc, E., Kubatova, E. 1994. Pyranose oxidase, a major source of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> during wood degradation by *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, and *Oudemansiella mucida*. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 2524–2532.
- de Boer, W. Folman, L.B., Summerbell, R.C., Boddy, L. 2005. Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS Microbiology Reviews* 29: 795–811.
- Decaëns, T. 2020. DNA metabarcoding illuminates the black box of soil animal biodiversity. *Molecular Ecology* 30: 33–36.
- Delgado-Baquerizo M., Oliveria, A.M., Brewer, T.E. et al. 2018. A global atlas of the dominant bacteria found in soil. *Science* 359: 320–325.
- Ettema, C.H., Wardle, D.A. 2002. Spatial soil ecology. *Trends in Ecology and Evolution* 17: 177–183.
- Fierer, N., Bradford, M.A., Jackson, R.B. 2007. Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology* 88. 1354–1364.

- Fjellberg, A. 1998. The Collembola of Fennoscandia and Denmark. Part I: Poduromorpha. Brill, Leiden, Boston, Köln.
- Fjellberg, A. 2007. The Collembola of Fennoscandia and Denmark. Part II: Entomobryomorpha and Symphypleona. Brill, Leiden, Boston.
- Fridman, J., Holm, S., Nilsson, M. et al. 2014. Adapting National Forest Inventories to changing requirements –the case of the Swedish National Forest Inventory at the turn of the 20<sup>th</sup> century. *Silva Fennica* 48, 1095.
- Frøslev, T.G., Kjøller, R., Bruun, H.H., Ejrnæs, R., Hansen, A.J., Læssøe, T., Heilmann-Clausen, J. 2019. Man against machine: Do fungal fruitbodies and eDNA give similar biodiversity assessments across broad environmental gradients? *Biological Conservation* 233: 201–212.
- Frøslev, T.G., Ejrnæs, R., Hansen, A.J., Bruun, H.H., Broman Nielsen, I., Ekelund, F., Vestergård, M., Kjøller, R. 2022. Treated like dirt: Robust forensic and ecological inferences from soil eDNA after challenging sample storage. *Environmental DNA* 5: 158–174.
- Guerrieri, A., Bonin, A., Münkemüller, T. et al. 2020. Effects of soil preservation for biodiversity monitoring using environmental DNA. *Molecular Ecology* 30: 3313–3325.
- He, L., Rodrigues, J.L.M., Soudzilovskaia, N.A. et al. 2020. Global biogeography of fungal and bacterial biomass carbon in topsoil. *Soil Biology and Biochemistry* 151: 108024.
- Hellman, M., Bonilla-Rosso, G., Widerlund, A., Juhanson, J., Hallin, S. 2019. External carbon addition for enhancing denitrification modifies bacterial community composition and affects CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O production in sub-arctic mining pond sediments, *Water Research*, 158: 22–33.
- Hibbett, D.S., Binder, M., Bischoff, J.F. et al. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research* 111: 509–547.
- Hintikka, V., Näykki, O. 1967. Notes on the effects of the fungus *Hydnellum ferrugineum* (Fr.) Karst. on forest soil and vegetation. *Communicationes Instituti Forestales Fenniae* 62: 1–22.
- Hugenholtz, P., Chuvochina, M., Oren, A. et al. 2021. Prokaryotic taxonomy and nomenclature in the age of big sequence data. *ISME Journal* 15: 1879–1892
- Huhta, V., Persson, T., Setälä, H. 1998. Functional implications of soil fauna diversity in boreal forests. *Applied Soil Ecology* 10: 277–288.
- Ihrmark, K., Bödeker, I.T.M., Cruz-Martinez, K. et al. 2012. New primers to amplify the fungal ITS2 region – evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities. *FEMS Microbiology Ecology* 82: 666–677.
- Ivanova, E.A., Korvigo, I.O., Aparin, B.F., Chirak, E.L., Pershina, E.V., Romaschenko, N.S., Provorov, N.A., Andronov, E.E. 2017. The preservation of microbial DNA in archived soils of various genetic types. *PLoS One* 12(3):e0173901.
- Jeffery, S., Gardi, C., Jones, A. et al. 2010. *European Atlas of Soil Biodiversity*. Publications Office of the European Union.
- Jones, C.M. and Hallin, S. 2019. Geospatial variation in co-occurrence networks of nitrifying microbial guilds. *Molecular Ecology* 28: 293–306.



- Köljalg, U., Nilsson, R.H., Abarenkov, K. et al. 2013. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Molecular Ecology* 22: 5271–5277.
- Köljalg, U., Nilsson, H.R., Schigel, D. et al. 2020. The taxon hypothesis paradigm – on the unambiguous detection and communication of taxa. *Microorganisms* 8:1910.
- Kyaschenko, J., Clemmensen, K.E., Hagenbo, A. et al. 2017b. Shift in fungal communities and associated enzyme activities along an age gradient of managed *Pinus sylvestris* stands. *ISME Journal* 11: 863–874.
- Kyaschenko, J., Clemmensen, K.E., Karlton, E., Lindahl, B.D. 2017a. Below-ground organic matter accumulation along a boreal forest fertility gradient relates to guild interaction within fungal communities. *Ecology Letters* 20: 1546–1555.
- Kyaschenko, J., Ovaskainen, O., Ekblad, A. et al. 2019. Soil fertility in boreal forest relates to root-driven nitrogen retention and carbon sequestration in the mor layer. *New Phytologist* 221: 1492–1502.
- Leray, M., Yang, J.Y., Meyer, C.P. et al. 2013. A new versatile primer set targeting a short fragment of the mitochondrial COI region for metabarcoding metazoan diversity: application for characterizing coral reef fish gut contents. *Frontiers in Zoology* 10: 34.
- Lilleskov, E.A., Bruns, T.D., Horton, T.R. et al. 2004. Detection of forest stand-level spatial structure in ectomycorrhizal fungal communities, *FEMS Microbiology Ecology* 49: 319–332.
- Lindahl, B.D., de Boer, W. Finlay, R.D. 2010. Disruption of root carbon transport into forest humus stimulates fungal opportunists at the expense of mycorrhizal fungi. *ISME Journal* 4: 872–881.
- Lindahl, B.D., Kyaschenko, J., Varenus, K. et al. 2021. A group of ectomycorrhizal fungi restricts organic matter accumulation in boreal forest. *Ecology Letters* 24: 1341–1351.
- Lindahl, B.D., Nilsson, R.H., Tedersoo, L. et al. 2013. Fungal community analysis by high-throughput sequencing of amplified markers – a user’s guide. *New Phytologist* 199: 288–299.
- Lindahl, B.D., Olsson, S. 2004. Fungal translocation – creating and responding to environmental heterogeneity. *The Mycologist* 18: 79–88.
- Lindahl, B.D., Tunlid A. 2015. Ectomycorrhizal fungi – potential organic matter decomposers, yet not saprotrophs. *New Phytologist* 205: 1443–1447.
- Lladó, S., López-Mondéjar, R., Baldrian, P. 2017. Forest soil bacteria: Diversity, involvement in ecosystem processes, and response to global change. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 81: e00063-16.
- López-Mondéjar, R., Zühlke, D., Becher, D., Riedel, K., Baldrian, P. 2016. Cellulose and hemicellulose decomposition by forest soil bacteria proceeds by the action of structurally variable enzymatic systems. *Scientific Reports* 6: 25279.
- Mahmood, S., Fahad, Z., Bolou-Bi, E.B., King, K., Köhler, S.J., Bishop, K., Ekblad, A., Finlay, R.D. 2023. Ectomycorrhizal fungi integrate nitrogen mobilisation and mineral weathering in boreal forest soil. DOI: 10.1111/nph.19260.

- Marupakula, S., Mahmood, S., Jernberg, J. et al. 2017. Bacterial microbiomes of individual ectomycorrhizal *Pinus sylvestris* roots are shaped by soil horizon and differentially sensitive to nitrogen addition. *Environmental Microbiology* 19: 4736–4753.
- Mundra, S., Kjønnaas, O.J., Morgado, L.N. et al. 2021. Soil depth matters: shift in composition and inter-kingdom co-occurrence patterns of microorganisms in forest soils. *FEMS Microbiology Ecology* 97: fiab022.
- Nayfach, S., Roux, S., Seshadri, R. et al. 2021. A genomic catalog of Earth's microbiomes. *Nature Microbiology* 39: 499–509.
- Nilsson, R.H., Ryberg, M., Wurzbacher, C. et al. 2023. How, not if, is the question mycologists should be asking about DNA-based typification. *Mycosphere* 96: 143–157.
- Niskanen T, Lücking R, Dahlberg A. et al. 2023. Pushing the frontiers of biodiversity research: unveiling the global diversity, distribution, and conservation of fungi. *Annual Review of Environment and Resources* 2023. 48: X–X. *In press*.
- Nylund, J.E., Wallander, H. 1992. Ergosterol analysis as a means of quantifying mycorrhizal biomass. In: JR Norris, DJ Read, AK Varma (eds.) *Methods in Microbiology*, vol. 24. Academic Press.
- Pavlovskaya, M., Prekrasna I., Parnikoza I., Dykyi, E. 2021. Soil sample preservation strategy affects the microbial community structure. *Microbes and Environments* 36: ME20134.
- Penton, C.R., Gupta, V.S.R., Yu, J.L., Tiedje, J.N. 2016. Size matters: Assessing optimum soil sample size for fungal and bacterial community structure analyses using high throughput sequencing of rRNA gene amplicons. *Frontiers in Microbiology* 7: 824.
- Pérez-Izquierdo, L., Clemmensen, K.E., Stenroos, J. et al. 2019. Quantification of tree fine roots by real-time PCR. *Plant and Soil* 440: 593–600.
- Philippot, L., Bru, D., Saby, N.P.M., Cuhel, J., Arrouays, D., Simek, M. and Hallin, S. 2009. Spatial patterns of bacterial taxa in nature reflect ecological traits of deep branches of the 16S rRNA bacterial tree. *Environmental Microbiology*, 11: 3096–3104.
- Philippot, L., Raaijmakers, J.M., Lemanceau, P., van der Putten, W.H. 2013. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology* 11: 789–799.
- Pickles, B.J., Genney, D.R., Potts, J.M. et al. 2010. Spatial and temporal ecology of Scots pine ectomycorrhizas. *New Phytologist* 186: 755–768.
- Potapov, A.M., Guerra, C.A., van den Hoogen, J. et al. 2023. Globally invariant metabolism but density-diversity mismatch in springtails. *Nature Communications* 14, 674.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P. et al. 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research* 41: D590–D596.
- Ratnasingham & Hebert, 2013. A DNA-Based registry for all animal species: the barcode index number (BIN) system.
- Rosling, A., Cox, F., Cruz-Martinez K. et al. 2011. Archaeorhizomycetes: Unearthing an ancient class of ubiquitous soil fungi. *Science* 333: 876–879.

- Schmidt, N.M., Mosbacher, J.B., Eitzinger, B. et al. 2018. High resistance towards herbivore-induced habitat change in a high Arctic arthropod community. *Biology Letters* 14: 20180054.
- Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S. et al. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 109: 6241–6246.
- Siles, J.A., Vera, A., Díaz-López, M. 2023. Land-use- and climate-mediated variations in soil bacterial and fungal biomass across Europe and their driving factors. *Geoderma* 434: 116474.
- Takahashi, S., Tomita, J., Nishioka, K., Hisada, T., Nishijima, M. 2014. Development of a prokaryotic universal primer for simultaneous analysis of *Bacteria* and *Archaea* using next-generation sequencing. *PLoS One* 21: e105592.
- Taylor, A.R., Lenoir, L., Vegerfors, B., Persson, T. 2019. Ant and earthworm bioturbation in cold-temperate ecosystems. *Ecosystems* 22: 981–994.
- Tedersoo, L., Bahram, M., Pöhlme, S. et al. 2014. Global diversity and geography of soil fungi. *Science* 346: 1256688.
- Toljander, J.F., Eberhardt, U, Toljander, Y.K. 2006. Species composition of an ectomycorrhizal fungal community along a local nutrient gradient in a boreal forest. *New Phytologist* 170: 873–883.
- Uroz, S., Oger, P., Lepleux, C., Collignon, C., Frey-Klett, P., Turpault, M.P. 2011. Bacterial weathering and its contribution to nutrient cycling in temperate forest ecosystems. *Research in Microbiology* 162: 820–831.
- van Straalen, N., Rijninks, P., 1982. The efficiency of Tullgren apparatus with respect to interpreting seasonal changes in age structure of soil arthropod populations. *Pedobiologia* 24, 197–209.
- Varenius, K., Lindahl, B.D., Dahlberg, A. 2017. Retention of seed trees fails to lifeboat ectomycorrhizal fungal diversity in harvested Scots pine forests. *FEMS Microbiology Ecology* 93: fix105.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (eds.) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press.
- Wilpiseski, R.L., Aufrecht, J.A., Retterer, S.T. et al. 2019. Soil aggregate microbial communities: Towards understanding microbiome interactions at biologically relevant scales. *Applied and Environmental Microbiology* 85: e00324-19.
- Zeale, M.R., Butlin, R.K., Barker, G.L. et al. 2011. Taxon-specific PCR for DNA barcoding arthropod prey in bat faeces. *Molecular Ecology Resources* 11: 236–244.
- Zhao, J., Chen, D., Gao, W., Guo, Z., Jia, Z., Hernández, M. 2021. Resuscitation of soil microbiota after > 70-years of desiccation. *European Journal of Soil Biology* 103: 103290.
- Zinger, L., Chave, J., Coissac, E. et al. 2016. Extracellular DNA extraction is a fast, cheap and reliable alternative for multi-taxa surveys based on soil DNA. *Soil Biology and Biochemistry* 96: 16–19.
- Zotti, M., De Filippis, F., Cesarano, G. et al. 2020. One ring to rule them all: an ecosystem engineer fungus fosters plant and microbial diversity in a Mediterranean grassland. *New Phytologist* 227: 884–898.

## 7. Publikationer och data

Tre vetenskapliga publikationer i internationella tidskrifter är planerade utifrån data insamlade inom projektet (titlar och författare är preliminära):

- Packard, E., Pérez-Izquierdo, L., Clemmensen, K.E., Dahlberg, A., Spohn, M., Stendahl, J., Lindahl, B.D. Mycorrhizal decomposers and their ecological niche in Swedish forests. Rumslig variation i mangan-peroxidasaktivitet relateras till svampsamhället för att identifiera ektomykorrhizabildande arter kopplade till hög nedbrytningsaktivitet. Dessa arters ekologiska nisch studeras sedan utifrån svampdata från Markinventeringen.
- Pérez-Izquierdo, L., Dahlberg, A., Hallin, S., Krab, E., Stendahl, J., Lindahl, B.D. Fungal and bacterial communities in boreal forest soils are strongly interlinked and spatially clustered at scales from 1 dm to 10 m. Här redovisas den starka kopplingen mellan svamp- och bakteriesamhällen, deras tydliga rumsliga struktur och kopplingar till miljöfaktorer.
- Pérez-Izquierdo, L., Dahlberg, A., Hallin, S., Krab, E., Stendahl, J., Lindahl, B.D. Collection and handling of forest soil samples for microbiome analyses. Här presenterar vi metodrelaterade resultat och rekommendationer för provtagning och provhantering i samband med DNA-baserade analyser av markbiologiska samhällen i skogsmark.

All sekvensdata från projektet kommer att göras öppet tillgänglig på NCBI-SRA, och övriga data på Dryad i samband med publikation i internationell tidskrift.

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

# DNA-baserad övervakning av biodiversitet i svensk skogsmark

## Provtagning, provhantering och analysmetoder

Rapporten presenterar hur DNA-metodik kan komplettera markkemiska analyser för kartläggning av svampar, bakterier och fauna i marken – organismer som tidigare har varit svåra att studera. Projektet har testat och utvecklat DNA-baserade metoder för identifiering och övervakning av markorganismer på olika skalor i skogsmark.

Med fortsatt utveckling kan metodiken effektivisera övervakningen och ge kunskap för hållbar markanvändning. En slutsats är att Markinventeringens stickprov når ganska långt men att ett något större antal delprov utspridda över ett större område skulle öka kunskapen om markens biodiversitet.

Kunskapsluckor som identifierades var bland annat hur DNA-provtagning ska anpassas så att organismsamhället avspeglas och biodiversiteten fångas. Mer kunskap behövs också om skalor och hantering av markprover.

Markorganismernas artrikedom har en avgörande roll för jordens ämnesomsättning och kolinlagring i de svenska skogarna. Förändring av markens artrikedom kan på lång sikt negativt påverka skogens produktivitet och återväxt.

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