**Statusrapport inför årsmöte 2019**

**Streckkodning av sötvattenorganismer för förbättrade biodiversitetsbedömningar (FRESHBAR)**

Projektledare Maria Kahlert

Diarienummer 18/171

**1. Kort beskrivning av genomförda aktiviteter**

WP1 (kiselalger):

* + provtagning av 30 färska kiselalgsprov inom den nationella monitoringen samt IKEU (Paul Andersson)
  + isolering av enstaka celler med mikropipettmetoden, skötsel och vidare rening/isolering av mikrokulturerna (M.Kahlert)
  + anställning av laborassistent Bonnie Bailet (SLU) för hjälp med kulturerna, etablering av laborationer för FRESHBAR i kollaboration med UMBLA (Katharina Ihrmark, SLU)
  + första SANGER sekvenseringen av äldre kloner på UMBLA/SciLIfeLab (B.Bailet)
  + genomgång av äldre kulturer & tidigare sekvenseringsresultat (genomförda av BGBM och i kooperation med INRA i Frankrike)
  + kollaboration med SLU Bioinformatik (SLUBI, Domenico Simone), Institutionen för skoglig mykologi och växtpatologi (Carles Soler) och Botanic Garden and Botanical Museum Berlin, Freie Universität Berlin (BGBM, Demetrio Mora) för att starta pilot-test av ny sekvenseringsteknik (PacBio’s long read Single-Molecule Real-Time (SMRT))

WP2 (invertebrater):

* + Uttag av bottenfaunaprov (profundalfauna) ur IVM:s provarkiv för metodtester på markörerna COI och 16S på chironomidlarver, samt påverkan av lagringstid i alkohol på hela provmaterialet analyserad med metabarcoding. 12 sjöar (2006-2017) i olika kategorier har valts ut och skickats till NRM.
  + Provtagning av vuxna chironomider med Malaisefällor nära fyra fjällsjöar i kollaboration med projektet Insect Biome Atlas, koordinerad av NRM (Andreia Miraldo). Pågående analys genom NRM.
  + Pågående metabarcodinganalys av bentiska invertebrater från 25 littoralprover ur IVM:s provarkiv i kollaboration med SCANDNAnet (projekt finansierad genom Nordic Council of Ministers)
* **Resultat & slutsatser hittills**

WP1 (kiselalger):

* + hittills (november 2019) 14 etablerade kiselalgskloner, ~30 på gång, färska prover sparade i inkubator för senare användning för nya isolationer med mikropipett. IVMs alglabor är under rekonstruktion, därför kan isoleringen och algkultur i år bara ske i mindre format, men kan genomföras i större format 2020-2021.
  + rbcL och 18S markörer har tagits fram för 15 kiselalgskloner i tidigare pilotprojekt vid INRA/BGBM. Försöket att genomföra SANGER sekvenseringen på UMBLA för det resterande kloner där INRA/BGBM inte lyckades var delvis framgångsrik. Analys av data pågår. Försöket visade dock också att vissa kulturer troligtvis inte är tillräcklig rena för en SANGER sekvensering. Försök pågår att återuppliva och nyisolera äldre kulturer ur SLUs samling för ett nytt försök.
  + PacBio SMRT: primers för markörerna rbcL och 18S är utvecklade och bör testas nu med qPCR och en monokultur av kiselalger med känt streckkod. Genomgången av tidigare SMRT sekvenseringsresultat visar att tidigare använda primers har av okänt anledning gått förlorade i processen, vilket betyder att olika prover inte kan hållas isär i de färdiga resultaten. De nya primers löser förhoppningsvis detta problem eftersom de är bättre anpassade. Testet av SLU pipeline “Skata” visar att vi kan hitta de förväntade kiselalgssekvenserna, dvs. pipeline fungerar även för kiselalger och kan användas inom FRESHBAR framöver. Utvärderingen visade dock mycket tydlig att ett tätt samarbete med insatta bioinformatiker är absolut nödvändig för att få fram resultat, samt förstå och kunna jobba med uppkommande problem.

WP2 har inga resultat ännu.

**2. Projektplanen.**

* FRESHBAR följer projektplanen utan avvikelser eller personförändringar hittills.

**3. Utförda kommunikationsinsatser**

* FRESHBAR hemsida: <https://www.slu.se/en/departments/aquatic-sciences-assessment/research/forskningsprojekt/active-research-projects/freshbar/> (utkast 17 december 2018, final etablerad 22 mars 2019)
* FRESHBAR Kickoff-möte 31 januari 2019, SLU Uppsala; deltagare Maria Kahlert (SLU), Willem Goedkoop (SLU), Richard Johnson (SLU), via videolänk: Jonas Zimmerman (Botanic Garden and Botanical Museum Berlin, Freie Universität Berlin (BGBM)), Thomas Lyrholm (Naturhistoriska riksmuseet, NRM), Yngve Brodin (NRM)
* Presentation vid Naturvårdsverkets DNA Uppstartsmöte & forskningsdag, 19 mars 2019, Stockholm (M. Kahlert)
* WP2 möte 25 mars 2019, SLU Uppsala; deltagare W. Goedkoop, R. Johnson, Domenico Simone (SLU, bioinformatics), T. Lyrholm, Y. Brodin.
* Presentation av FRESHBAR under intern BONUS FUMARI möte vid Baltic Sea Science Congress, Stockholm 19-23 Aug 2019 (M.Kahlert)
* Presentation av FRESHBAR vid kiselalgsworkshop på DNAqua-Net meeting, Limassol (Cyprus) 1-2 oktober 2019 (M.Kahlert)
* Etablering av FRESHBAR referensgrupp oktober 2019: Cecilia Lindblad Naturvårdsverket, Kristian Meissner Finnish Environment Institute (SYKE), och Michael Haldin, Miljöövervakningsenheten på Havs- och vattenmyndigheten, HaV (följare for FRESHBAR)
* 22 oktober planeringsmöte WP1 (via Skype) med J. Zimmermann & Olive Skibbe från BGBM
* Presentation av FRESHBAR, samt organisation av (M.Kahlert) & deltagande i (R.Johnson) EDNA/UMBLA workshopen ”(Meta)barcoding for research and environmental monitoring" 7 november 2019, SLU Uppsala; länk: <https://www.slu.se/ew-nyheter/2019/11/forskare-och-myndigheter-diskuterade-nya-miljoovervakningsmetoder-pa-slu/>

4. Tidsplan uppdaterat

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| year | 2019 | | | | | | | | | | | | 2020 | | | | | | | | | | | | 2021 | | | | | | | | | | | |
| month | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 |
| research |  | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1.1 Culturing and sequencing diatom clones isolated from a single cell |  |  |  |  |  |  |  |  | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 1.2 Direct single-cell sequencing of large diatom species |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 1.3a Diatom metabarcoding short barcodes |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 1.3b Diatom Metabarcoding long barcodes |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 1.4 Diatom vouchering (incl. deposition at OA databases) and long-term storage |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x |
| 2.1.1 Metabarcoding of midge larvae in stored environmental samples | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x |  |  |  |  |  |  | x | x | x | x | x | x |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 2.1.2 Additional sampling (adult midges & larvae) |  |  |  |  |  |  | x | x |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | x | x |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 2.1.3 Comparisons of performance of COI and shorter barcodes |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 2.2.1 Metabarcoding in stored environmental samples | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x |  |  |  |  |  |  | x | x | x | x | x | x |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 2.2.1 Additional sampling |  |  |  |  |  |  | x | x |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | x | x |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 2 Vouchering of new samples, evaluation |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x |
| communication |  | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Establishing project homepage | x |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Establishing reference group |  |  |  |  |  |  |  |  |  | x |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| SEPAs annual research day |  |  | x |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | x |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | x |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Stakeholder/reference group workshops |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | x |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | x |  |  |
| EDNA/UMBLA workshop |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | x |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | x |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | x |  |
| FUMARI meeting |  |  |  |  |  |  |  | x |  |  |  |  |  |  |  | x |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Annual national monitoring provider meetings |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | x |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | x |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | x |
| Havs and Vattenforum |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | x |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | x |  |  |  |  |  |  |
| Miljöövervakningsdagarna |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | x |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | x |  |  |  |
| Scientific meetings, incl. DNAqua-Net |  |  |  |  |  |  |  |  | x |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | x |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Publication in public environmental journals |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | x |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | x |  |  |  |  |  |  |
| Preparation scientific articles |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | x | x | x | x | x | x |
| Final report |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | x |
| Final workshop/meeting (incl. SEPA/SwAM) |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | x |