

Statusrapport inför årsmöte 2020

Streckkodning av sötvattenorganismer för förbättrade biodiversitetsbedömningar (FRESHBAR)

Projektledare Maria Kahlert

Diarienummer 18/171

1. Kort beskrivning av genomförda aktiviteter

WP1 (kiselalger):

- Isolering (enstaka celler med mikropipettmetoden), kultur, fotografering & skörd av totalt 220 kiselalgskloner (inkl. kloner som isolerades redan 2019), arbetet genomfördes av gästforskaren Demetrio Mora (BGBM Botanic Garden and Botanical Museum Berlin, Freie Universität Berlin) med hjälp av forskningsassistenten Bonnie Bailet (SLU)
- Prover skickades för analys och ankom till BGBM 10/6 2020; inklusive en prioriteringslista för särskilt intressanta taxa, eftersom från början bara 100 kloner var planerade
- Grant Agreement med BGBM har signerats
- 10 kiselalgskloner skickades till DCG Diatoms Collection i Ghent, Belgien för OA långtidskultur, men DCG valde att inte ta emot fler pga. oväntad mycket arbete med kulturerna. DCG informerade att de skulle höra av sig när vi fick skicka fler kloner.
- Demetrio Mora kom 20/1-13/3 2020 till Institutionen för Vatten och Miljö (IVM), SLU, med en "Short-term scientific mission" (STSM) från EU nätverket COST DNAqua-Net, och arbetade inom FRESHBAR med att isolera nya kiselalgsarter för streckkodning, samt började utveckla "long-read sequencing" (PacBio) för kiselalger ihop med UMBLA (SLU Metabarcoding Laboratory), där han framförallt samarbetade med Carles Soler (Institutionen för skoglig mykologi och växtpatologi, SLU)

WP2 (evertebrater):

- SLU (Willem Goedkoop) har plockat fram profundalprover från 2006 och 2017 ur miljöövervakningens bottenfaunaarkiv för 12 sjöar (24 prover) i olika kategorier (bruna, klara, näringsfattiga, näringsrika) och levererat dem till Naturhistoriska riksmuseet (NRM) för metodtester (COI och 16S) på främst chironomidlarver.
- NRM (Thomas Lyrholm) har kört dessa prover i enlighet med ansökan (inkl. test av olika metoder).
- En analys av innehållet av arter av fjädermyggor i dessa prover har gjorts av NRM (Yngve Brodin).
- För att komplettera BOLD (en fritt tillgänglig internationell databas för streckkoder av djur, växter och svampar) med nya arter förekommande i Sverige har NRM plockat ut arkiverade vuxna fjädermyggor från främst Svenska sjöar och vattendrag för streckkodning under 2021.
- Med samma syfte arbetar NRM med att sortera ut och artbestämma ett urval av vuxna chironomider från de insektsfällor som SLU haft uppställda vid Abiskojaure, Stor Björsjön och Övre Särnmanssjön i samarbete med Insect BIOME Atlas projekt som drivs av NRM (kontaktperson Andreia Miraldo).

- SLU (W. Goedkoop & R. Johnson) har tagit fram bottenfaunaprover från 2019 för ca 100 sjöar för streckkodningsanalys ur SLU's arkiv av konserverade miljöövervakningsprover. Proverna ska analyseras vid institutionen för vatten och miljö (IVM) vid Prof. Stefan Bertilssons nya DNA laboratoriet under 2021. Målet är att etablera DNA metabarkodningskompetens för bottenfauna vid IVM.

- **Resultat & slutsatser hittills**

- WP1 (kiselalger):

- 220 etablerade kiselalgskloner är färdiga för analyser. Av dessa har 200 redan sekvenserats för 18SV4 och rbcl, och av dessa 200 har ca. 100 sekvenser redan bearbetats och matchats med existerande referenser för att identifiera släkte (för arter som ännu saknar streckkod) eller art (när det redans finns en streckkod). Matchning pågår och beräknas vara färdig i slutet av 2020. En av höjdpunkterna är att vi hittills har hittat fyra nya arter inom släktet *Eunotia*, ett kiselalgssläkte som är mycket vanlig och viktigt för miljöövervakning och -bedömning i de Nordiska länderna, men där det nästan inga arter alls streckkodade än.
 - D. Mora har utvecklat ett protokoll för DNA extraktion, PCR-amplifiering och parallell sekvensering av långa streckkoder med PacBio SMRT metoden. Han har först manuellt testat olika primers i modell ("in silico primer validering") på klonala kulturer (streckkod: rbcl), tagit fram de bäst lämpade streckkoder för parallell sekvensering (multiplexing), express-beställd dessa hela oligo-sekvenser ("tagged primers") och testat de på laboratoriet med några av våra odlade kloner. D. Mora har sedan arbetat med att optimera bibliotek-preparering både med klonala kulturer och med mock-samhällen där flera kloner blandas i ett prov för att likna ett naturligt samhälle. Effektiviteten på den slutgiltiga mängden amplifierade streckkoder har mätts med kvantitativ PCR (qPCR). Nästa steg är att testa det färdiga protokollet naturliga prover från sjöar och vattendrag.
 - Slutsatser WP1: Nya arter har sekvenserats som saknas i referensbiblioteken. Nästa steg är att identifiera och dokumentera dessa arter morfologiskt med elektronmikroskopi, vilket sker vid BGBM. PacBio SMRT protokoll borde fungera på naturliga prover, men måste testas nu.

- WP2 (fjädermyggor, övrig bottenfauna):

- Profundalprover från 12 sjöar från 2006 och 2017 har använts för bulkextraktion av samlingsprov (separata år/sjöar) och metabarcoding amplifiering med CO1 primers (BF2-BR2), varje prov med individuella dubbla index för multiplex sekvensering. Tre olika bibliotek, vardera med alla prov, sekvenserades med Illumina 300 bp 'paired end' sekvensering (SciLife lab). Sekvensering fungerade bra och gav över 20 miljoner sekvenser.
 - Analys av sekvenserna pågår för att prova olika bioinformatikmetoder. Preliminärt och som förväntat kan vi se att det mest är chironomider (fjädermyggor) och oligochaeter. Ett antal andra taxa finns i mindre mängd.
 - NRMs matchning i BOLD av DNA-sekvenserna från profundalproverna visade följande:
 - Det finns 78 arter av fjädermyggor i proverna, vilket är lite fler än förväntat.

- Av dessa arter hade 76, motsvarande 97%, streckkoder i BOLD. En något högre procent än förväntat.
- Av arterna kunde 67, motsvarande 86%, ges ett säkert artnamn via BOLD och 9 arter till släkte med icke säkert identifierat artnamn.
- Resultaten indikerar att miljöövervakning av fjädermyggor från sjöar i Sverige genom streckkodning kan potentiellt identifiera cirka 90-95% av arterna i profundalen och 85-90% av arterna i littoralen. I jämförelse så kan man med nuvarande miljöövervakning som för närvarande görs i Sverige (morfologisk analys av larver från bottenprov) identifiera en mycket lägre andel av fjädermyggor till art, nämligen bara cirka 15-20% i profundalen och 10-20% i littoralen.
- Den mycket högre mängden identifierade arter via streckkodning ger ett mycket bättre underlag för att analysera förändringar i biologisk mångfald och konsekvenser av miljöförändringar så som ett varmare klimat och övergödning.
- Sju av arterna är nya för Sverige och en möjligen ny för Europa. En oväntad hög siffra.
- Omkring 15-25 av arterna är inte tidigare säkert kända från profundalen. Detta är ny ekologisk kunskap viktig för miljöövervakningen av sjöar.
- Fjädermyggorna utgjorde cirka 85% av alla identifierade arter av insekter i proverna och cirka 57% av alla identifierade arter av djur (bottenfauna) i proverna.
- Totalt har 136 arter av bottenlevande djur identifierats i proverna. En genomgång av NRM visar att ungefär 84% av de 665 fjädermyggarter som är kända för Sverige har streckkoder med artnamn i BOLD. Om man inkluderar de som kan identifieras till släkte men med ett okänt eller osäkert artnamn blir det cirka 90% som har streckkoder i BOLD.
- Streckkodning hos NRM av ytterligare material av vuxna fjädermyggor kan höja dessa siffror till cirka 85-87% respektive 90-92% (högre siffror för profundalen än för littoralen).
- Sekvenserna för oligochaeter kommer att delas med Christer Erséus (projektet Etablering av bibliotek av DNA streckkoder för svenska gördelmaskar) för att se om fler maskarter kan identifieras.
- Slutsatser WP2: Metabarcoding med BF2-BR2 CO1 primers verkar fungera väl på dessa prover och alternativa primers och loci kommer testas.

2. Projektplanen.

- FRESHBAR följer projektplanen utan större avvikelser eller förändringar i personalsammansättningen, men med fördröjningar pga. coronapandemin. Det senare har fördröjt kompletterande provtagningar och analyser. Vi kommer därför att söka en förlängning av projektet med ett helt år hos Naturvårdsverket.
- Detaljerade justeringar inom WP1:
 - Laboratorierna vid BGBM har varit stängda pga. coronapandemin under 6 månader. Detta har inte bara fördröjt sekvenseringen av kiselalgsklonerna, utan gjort det omöjligt att resa dit med färska prover för att utföra direktisolering av DNA från enstaka (stora) kiselalgs-celler

som ursprungligen planerat. Detta kan tidigast utföras när resorna kommer vara möjliga igen, och analyserna kommer säkert inte kunna göra förrän vinter/vår 2022.

- Arbetet att få fram långa streckkoder med metabarcoding kunde inte slutföras än eftersom Demetrio Mora som har arbetat med detta inte kunde resa till Sverige för en fortsättning av arbetet. Det är i nuläget oklart om D. Mora kan fortsätta arbetet när resorna är möjliga igen, eller om hur på annat sätt kan föra över sin kunskap till ett labor på SLU för vidareutvecklingen av metoden. Planering pågår för att lösa detta.
- En positiv ändring i planer är att behovet för metabarcoding-prover delvis kan bli tillgodosett genom prover från andra projekt (Bonnie Baileys doktorandarbete, HaVs projekt "Mindre vattendrag"). Frigjorda resurser kommer med fördel nyttjas för analys av de 120 nya kiselalgskloner som vi har tagit fram utöver de 100 planerade.
- Detaljerade justeringar inom WP2:
 - Ställt in årets fältarbete med kompletterande provtagningar pga. covid-19 restriktionerna. Komplettering kommer tidigast vara möjligt sommar/höst 2021, och analyserna kan då tidigast göras vinter 2022.
 - Fortsatta tester av alternativa metabarcoding metoder på redan påbörjade prover är planerade för 2021, men är fördröjda för att även NRM laboratoriet är påverkad av corona-restriktioner (fördröjd anställning av laborpersonal mm.)

3. Utförda kommunikationsinsatser

- FRESHBAR hemsida: <https://www.slu.se/en/departments/aquatic-sciences-assessment/research/forskningsprojekt/active-research-projects/freshbar/>
- WP1: 21 januari 2020, M. Kahlert & D. Mora möte med Fabien Burki & Mahwash Jamy, Uppsala universitet, för att diskutera erfarenheter med 18S och en eventuell Kooperation ifall Mora får sin forskningsansökan beviljat (Marie Curie, DAAD, FORMAS)
- FRESHBAR projekt-möte 11 maj 2020, Zoom; deltagare Maria Kahlert (SLU), Willem Goedkoop (SLU), Richard Johnson (SLU), Jonas Zimmerman (Botanic Garden and Botanical Museum Berlin, Freie Universität Berlin (BGBM)), Thomas Lyrholm (Naturhistoriska riksmuseet, NRM), Yngve Brodin (NRM)
- Internt FRESHBAR möte den 13 november 2020, Zoom: deltagare Maria Kahlert (SLU), Willem Goedkoop (SLU), Richard Johnson (SLU)
- FRESHBAR projekt-möte 26 november 2020, Zoom; deltagare Maria Kahlert (SLU), Willem Goedkoop (SLU), Richard Johnson (SLU), Jonas Zimmerman (Botanic Garden and Botanical Museum Berlin, Freie Universität Berlin (BGBM)), Thomas Lyrholm (Naturhistoriska riksmuseet, NRM), Yngve Brodin (NRM)
- Presentation Swedish EPA and HaV in December (8-9). The conference focus on eDNA in monitoring/management (M. Kahlert). Fler deltagare från FRESHBAR: W. Goedkoop, R. Johnson, Y. Brodin, T. Lyrholm, J. Zimmermann.
- Interna arbetsmöten inom WP2 hölls 1 juli, 19 augusti, 21 oktober och den 3 november 2020 (alla på Zoom). Vid dessa möten diskuterades främst urvalet av bottenfaunaprover och rekrytering av en forskningsingenjör till projektet för att bistå med provberedning.

- Flera presentationer av projektet har ställts in som följd av inställda evenemang (t.ex. miljöövervakningsdagarna och Havs- och vattenforum).
- Presentation på HaV Utförarmöte 2020 – Programområde Sötvatten, 7 december 2020 (Richard Johnson).

4. Tidsplan

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	x															
1.2 Direct single-cell sequencing of large diatom species																																						x?	x?		
1.3a Diatom metabarcoding short barcodes																																									
1.3b Diatom Metabarcoding long barcodes																																									
1.4 Diatom vouchers (incl. deposition at OA databases) and long-term storage																																									
2.1.1 Metabarcoding of midge larvae in stored environmental samples	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x																													
2.1.2 Additional sampling (adult midges & larvae)																																									
2.1.3 Comparisons of performance of COI and shorter barcodes																																									
2.2.1 Metabarcoding in stored environmental samples	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x																													
2.2.1 Additional sampling																																									
2 Vouchering of new samples, evaluation																																									
communication																																									
Establishing project homepage	x																																								
Establishing reference group																																									
SEPA's annual research day																																									
Stakeholder/reference group workshops																																									
EDNA/UMBLA workshop																																									
FUMARI meeting																																									
Annual national monitoring provider meetings																																									
Havs and Vattenforum																																									
Miljöövervakningsdagarna																																									
Scientific meetings, incl. DNAqua-Net																																									
Publication in public environmental journals																																									
Preparation scientific articles																																									
Final report																																									
Final workshop/meeting (incl. SEPA/SwAM)																																									