2022

Genetisk variation hos fjällhumlor

SLUTRAPPORT TILL NATURVÅRDSVERKET

MATTHEW WEBSTER & YUANZHEN LIU

UPPSALA
UNIVERSITET

Undersökning av genetisk variation hos fjällhumlor

Matthew Webster, Yuanzhen Liu
Inst. medicinsk biokemi och mikrobiologi, Uppsala universitet

Slutrapport till Naturvårdsverket

Överenskommelse/avtal nr: **225-21-003**
Naturvårdsverkets ärendenummer: **NV-04697-21**

Projektledare (utförare): **Matthew Webster**
Kvalitetsansvarig: **Matthew Webster**

Programområde: **Kunskap om genetisk mångfald**
Delprogram: **Pollinatörer - populationsövervakning**

Ansvarig handläggare på Naturvårdsverket: **Kristin Löwenborg**

Kontakt:
Professor Matthew Webster
IMBIM, BMC D11:3, Box 582, Uppsala universitet, 75 123 Uppsala
e-post: matthew.webster@imbim.uu.se
Tel: 018 471 4391

Omslagsbild: *Bombus alpinus* © Göran Holmström

SAMMANFATTNING AV RAPPORTEN

- Vi använde helgenomsekvensering för att undersöka genetisk variation hos sju humlearter i Sverige: sex arter som bara finns i fjällmiljöer och en som är mer utbredd.
- Beräkning av effektiv populationsstorlek (N_E) visar att ingen av arterna är akut hotad av utrotning, men den genetiska mångfalden är betydligt lägre hos arter med begränsad utbredning på högre höjder och breddgrader.
- Vi hittar inga bevis för populationsstruktur hos fjällhumlearterna, vilket tyder på att det inte finns några långsiktiga hinder för genflöde mellan populationer.
- Vi identifierade en inavlad steril diploid hane av den sällsynta specialistarten *Bombus hyperboreus*, insamlad nära den södra gränsen för dess utbredningsområde, vilket indikerar att inavel har en negativ påverkan på denna population.
- Rekonstruktion av historiska fluktuationer av N_E avslöjar att två arter som är begränsade till arktiska miljöer (Bombus *hyperboreus* och *Bombus pyrrhopygus*) har minskat i populationsstorlek sedan den senaste istiden.
- De flesta, eller alla, lämpliga livsmiljöer för dessa fjällarter i Skandinavien har förutsagts försvinna inom ett sekel på grund av klimatförändringar.
- Vi föreslår fortsatt genetisk övervakning av dessa arter, kombinerat med analys av genetisk variation i historiska populationer representerade i museisamlingar. Detta skulle göra det möjligt att upptäcka pågående eller framtida populationsminskningar och styra lämpliga bevarandeåtgärder.

ABSTRAKT

Förekomsten av många humlearter håller på att minska, och klimatförändringarna är en starkt bidragande orsak. Humlornas utbredning flyttar norrut, i takt med att lämpliga klimatzoner också förflyttas geografiskt. Några av de mest sårbara arterna återfinns i Arktis och har därmed ingen möjlighet att flytta längre norrut. En viktig indikator på en populations livskraft är genetisk mångfald, som kan uppskattas över tid genom genetisk övervakning för att identifiera populationer som minskar eller är i riskzonen. Arktiska humlearter hemmahörande i de svenska fjällen anses vara högprioriterade för inkludering i genetisk övervakning, på grund av dess utsatthet för klimatförändringar. I den här rapporten använder vi helgenomsekvensering för att undersöka genetisk variation hos sju humlearter som lever i de svenska fjällen. Sex av arterna är begränsade till arktiska- och fjällmiljöer, medan en är utbredd i hela Europa. Totalt sekvenserade vi 333 prover av dessa arter från hela deras utbredningsområde i Sverige. Uppskattningar av effektiv populationsstorlek (N_E), beräknade från genetisk variation, varierar mellan ~55 000 för de arter som har den mest begränsade högalpina utbredningen, till 200 000 för de vanligare fjällarterna och 220 000 för de utbredda arterna. Populationsfragmenteringen är i allmänhet mycket låg, eller omöjlig att upptäcka, i de svenska fjällen, vilket tyder på att det saknas hinder för genflöde mellan delpopulationer. Ingen av arterna verkar ha omedelbar risk för negativa genetiska effekter på grund av höga mängder av genetisk drift. Rekonstruktion av historiska fluktuationer i N_E indikerar att den arktisk specialistarten *Bombus hyperboreus* redan har undergått betydande populationsminskningar sedan den senaste istiden och vi upptäckte en mycket inavlad individ av denna art, vilket tyder på att arten kan vara särskilt sårbar. Utbredningsområdena för alla fjällhumlearter förväntas krympa drastiskt på grund av klimatförändringarnas effekter. Framtida genetisk övervakning skulle vara ett effektivt sätt att upptäcka om populationer har påverkats negativt av nedgångar eller fragmentering som kan hota deras förmåga att överleva. De data som presenteras här fungerar som ett viktigt första steg mot framtida genetiska övervakningsprogram för de inblandande arterna.

BAKGRUND

- Intraspecifik genetisk variation är en betydande komponent i den biologiska mångfalden, men den övervakas bara i en liten del av arterna på planeten.
- Genetisk variation är avgörande för att populationer ska kunna anpassa sig till en skiftande miljö och en viktig indikator på populationens livskraft.
- På grund av tekniska framsteg är det nu möjligt att analysera genetisk variation med hjälp av helgenomsekvensering.
- Genetisk övervakning av pollinatörer anses ha hög prioritet på grund av deras ekosystemtjänster och nytta för jordbruket.
- Humlor är livsviktiga pollinatörer i tempererade områden, men hotas av förlust av lämpliga livsmiljöer på grund av klimatförändringarna. Humlor i arktiska och alpina miljöer har en särskilt dålig prognos.
- Denna studie syftade till att bedöma genetisk variation hos sju humlearter som lever i arktiska och alpina miljöer i Sverige med hjälp av helgenomsekvensering. Sex av dessa arter är begränsade till dessa miljöer medan en finns i stor utbredning över hela Europa.
- Studien hade följande syften:
    - Upptäckt av kryptiska arter
    - Beräkning av intraspecifik genetisk variation (H_{OBS}, θ_W)
    - Beräkning av effektiv populationsstorlek (N_E)
    - Beräkning av populationsstruktur (PCA, Admixture)
    - Rekonstruktion av historiska förändringar i N_E (SMC++)
    - Analys av inavel med genom analys av ”runs of homozygosity” (ROH) i varje individ
- Resultaten av denna analys kan användas för att bedöma sårbarheten hos varje art och för att utforma framtida genetiska övervakningsprogram.

BAKGRUND

Intraspecifik genetisk variation är en betydande men undervärderad komponent i den biologiska mångfalden

Den pågående förlusten av biologisk mångfald är en kris som har beskrivits som ett sjätte massutdöende (Ceballos et al. 2017; IPBES 2019). Det är klarlagt att halten av genetisk variation inom arter är en avgörande komponent av den biologiska mångfalden som stöder viktiga ekologiska funktioner och naturens bidrag till människor (Des Roches et al. 2021). Genetisk variation inom och mellan populationer är avgörande för att arter ska kunna anpassa sig, utvecklas och överleva över tid. Förlust av genetisk variation i samband med populationsminskningar och fragmentering är ett centralt hot mot många vilda populationer, vilket kan minska populationernas motståndskraft mot utmaningar som förlust och försämring av livsmiljöer, miljöföroreningar och klimatförändringar (Willi et al. 2022). Trots den genetiska variations stora betydelse saknas specifika insatser som syftar till att övervaka och bevara den i internationell naturvårdspolicy (Hoban et al. 2021; Laikre m.fl. 2020). Till exempel övervakas endast 1,1% av de arter som utvärderats av International Union for Conservation of Nature (IUCN) på inomartsnivån (Des Roches et al. 2021).

Eftersom genetisk variation kodar för fenotypisk variation är den viktigt för miljöanpassning. Denna variation är nödvändig för att arter ska kunna anpassa sig till en föränderlig miljö eller

överleva i ett område där miljön gradvis förändras över stora avstånd. Förekomsten av en hög diversitet av genotyper kan också vara fördelaktig för att motstå patogener eller invasiva arter, för stabil habitatkonstruktion, för att säkerställa populationsstabilitet och för att upprätthålla ekosystemtjänster (Des Roches et al. 2021). Att bevara variationen är därför viktigt för att maximera en arts motståndskraft mot utmaningar så som framtida miljöförändringar. Dessutom är kunskap om hur den genetiska variationen är spridd över en arts utbredningsområde viktig för att fatta förvaltningsbeslut. Till exempel kan arter delas upp i lokalt anpassade delpopulationer, som var och en kan vara viktig att upprätthålla för att bevara en arts motståndskraft genom välinformerade beslut om s.k. genetic rescue eller komplettering av specifika populationer.

Genetisk variation är också en viktig indikator på populationers livskraft (Willi et al. 2022). Låga halter av genetisk variation är ett tecken på liten effektiv populationsstorlek (N_E), vilket i sig kan tyda på att populationen riskerar att utveckla försämrad fitness. Detta samband förklaras av följande tre huvudorsaker: 1) Inavel är mer sannolikt i små populationer, vilket leder till minskad fitness på grund av en ökad förekomst av skadliga alleler i homozygot tillstånd. 2) Det naturliga urvalet är mindre effektivt i små populationer, vilket leder till att det genomsnittliga antalet skadliga mutationer per individ (s.k. genetic load) ökar. 3) Små populationer är mindre kapabla att anpassa sig till miljöförändringar på grund av förlust av funktionell genetisk variation och ett mindre effektivt naturligt urval.

Övervakning av genetisk mångfald är ett användbart verktyg för artsbevarande

Genom att undersöka den genetiska variation vid enstaka tidpunkter är det möjligt att uppskatta viktiga populationsgenetiska parametrar som återspeglar en populations livskraft. Dessa inkluderar uppskattning av N_E, inavel och populationsfragmentering. Dessa bedömningar kan identifiera populationer som är sårbara eller riskerar att utrotas. En standardregel inom bevarandegenetik är att populationer med N_E mindre än 500 löper risk att tappa i fitness och därmed kan vara i behov av naturvårdsinsatser (Allendorf et al. 2022).

Det finns större statistisk styrka att dra slutsatser om populationer hotas eller minskar om genetisk variation analyseras vid flera tidpunkter (Díez-del-Molino et al. 2018). Detta är viktigt eftersom en art kan ha låg N_E på grund av biologiska egenskaper snarare än populationsminskningar senare i tiden (Ellegren & Galtier 2016; Webster et al. 2023). Dessutom har vissa populationer av insekter visat sig hålla hög N_E trots att de är små och fragmenterade (Hoffmann et al. 2021). Genetisk övervakning kvantifierar tidsmässiga förändringar i en tidsserie av genetiska mätningar (Schwartz et al. 2007). Detta kan specifikt användas för att beräkna om N_E har förändrats över tid, om populationer blir mer fragmenterade, samt uppskatta migrationsnivån och genflödet mellan populationer. Övervakning av den genetiska mångfalden inom och mellan populationer av vilda djur bidrar till att spåra deras långsiktiga livskraft.

Naturvårdsverket har publicerat ett förslag till genetisk övervakning av arter i Sverige (Posledovich et al. 2021a) som understryka vikten av genetisk variation inom arter. Detta förslag använder flera kriterier såsom prioritet och genomförbarhet för att skapa en lista med 167 arter, varav 60 är markerade som högprioriterade, inklusive ryggradsdjur, ryggradslösa djur och växter, för inkludering i ett svenskt program för genetisk övervakning. En separat rapport fokuserar specifikt på pollinatörer (Posledovich et al. 2021b).

Ett viktigt första steg i alla genetiska övervakningsprogram är en analys av genetisk variation i populationer av intresse. Detta ger en uppskattning av flera viktiga populationsgenetiska parametrar och identifierar populationer under omedelbart hot. Dessutom möjliggör denna första uppskattning av populationsgenetiska parametrar en utvärdering av prioritet och genomförbarhet för att inkludera arten i ett genetiskt övervakningsprogram och ger en första uppskattning som ingår i ett sådant program.

Helgenomsekvensering kan användas för att analysera genetisk variation

Under de senaste två decennierna har det skett en revolution inom DNA-sekvenseringstekniken, vilket har gjort det möjligt att analysera genetisk variation på en hel genomskala billigt och effektivt. Bevarandegenetiska analyser har traditionellt förlitat sig på analys av variation vid ett begränsat antal genetiska loci, till exempel mikrosatellitmarkörer eller enstaka mitokondriella eller nukleära loci. Genetisk variation i populationer kan nu analyseras på helgenomskalan med hjälp av ”next-generation sequencing” (NGS). Till skillnad från traditionella genetiska markörer kan helgenomsekvensering mer exakt uppskatta populationsgenetiska parametrar som N_E och fixeringsindex (F_{ST}) och möjliggöra ytterligare analyser som att hitta loci som är involverade i anpassning, identifiera skadliga mutationer eller rekonstruera demografisk historia (Webster et al. 2023; Hohenlohe et al. 2021).

Det mest effektiva sättet att använda NGS för att analysera genomvariation hos en art av intresse är att utföra Illumina ”short read” sekvensering med hög kapacitet på ett populationsprov. För att identifiera och analysera genetisk variation måste sekvenserings fragment som genereras av detta tillvägagångssätt mappas till ett referensgenom Det är därför viktigt att det redan finns ett referensgenom för arten av intresse, eller en närbesläktad art. Det finns nu stora internationella ansträngningar för att generera referensgenom för allt eukaryot liv, och referensgenom finns tillgängliga för snabbt ökande antal arter (Formenti et al. 2022; Lewin m.fl. 2022). Möjligheten att analysera genetisk variation på genomskalan är därför tillgänglig för ett allt större antal vilda arter.

Genetisk övervakning av pollinatörer

På senare tid har flera rapporter avslöjat bevis för massiva minskningar av insektpopulationer, som potentiellt är ännu allvarligare än nedgångar som observerats i andra djurtaxa (Wagner 2020; Sánchez-Bayo & Wyckhuys 2019; Seibold m.fl. 2019; van Klink m.fl. 2020). I en viktig longitudinell studie i norra Tyskland rapporterades mer än 75% förlust av flygande insektsbiomassa på mindre än 30 år (Hallmann et al. 2017) och många indikatorer tyder på att detta är en global trend (Webster et al. 2023; Sánchez-Bayo & Wyckhuys 2019). Insekter är kritiska komponenter i ekosystem som matkälla och genom sina roller i processer som nedbrytning och pollinering. Globalt sett är försämring av livsmiljöer, bekämpningsmedel och klimatförändringar några av de viktigaste faktorerna som orsakar insektsförluster (Wagner 2020).

En förlust av pollinerande insekter har identifierats i flera studier, vilket är särskilt oroande på grund av deras viktiga roll för ekologi och jordbruk (Potts et al. 2010). En bedömningsrapport om pollinatörer, pollinering och livsmedelsproduktion tagits fram av IPBES belyser det enorma ekonomiska värdet av pollinering av insekter och beviset för deras minskning i antal och mångfald (IPBES 2016). Pollinatörer ansågs vara högprioriterade för inkludering i genetiska övervakningsprogram i en rapport till Naturvårdsverket (Posledovich et al. 2021b),

som identifierade 34 pollinerande insektsarter för inkludering i ett sådant program. Femton arter identifierades som högprioriterade, däribland tio humlearter.

Inavel kan vara särskilt problematiskt för bin och humlor

Förekomsten av inavel är skadlig för små populationer. Inavlade individer har ökade nivåer av homozygositet i sitt genom, vilket gör att recessiva skadliga alleler förekommer oftare i det homozygota tillståndet där de orsakar minskad kondition och genetiska avvikelser. Inavel är särskilt skadligt när det förekommer hos arter av Hymentoptera (steklar), som inkluderar alla bin, getingar och myror, på grund av den genetiska grunden för hur kön bestäms hos dessa arter (Lozier & Zayed 2017; Zayed & Packer 2005).

I motsats till människor och andra ryggradsdjur, där både hanar och honor är diploida, är alla Hymentoptera haplodiploid, som betyder att hanar är haploida och honor är diploida. Detta styrs av det komplementära könsbestämningssystemet, där heterozygositet vid en könsbestämmande gen krävs för att producera honor (Crozier 1971; Heimpel & de Boer 2007). Produktionen av honor säkerställs genom närvaron av ett stort antal alleler vid denna gen, så att diploida individer i stora populationer nästan alltid ärver två olika alleler och blir honor. I sällsynta fall kan dock en diploid individ ärver två kopior av samma allel vid denna gen och utvecklas då till en diploid hane istället för en hona.

Diploida hanar kan inte reproducera sig, och det är extremt skadligt för en population om diploida hanar produceras vid höga frekvenser. Diploida hanar förekommer med högra sannolikhet från parning mellan två besläktade individer och är därför vanligare i mindre populationer där inavel förekommer oftare. Produktionen av diploida hanar lägger därför en ytterligare genetisk börda på populationer av Hymentoptera och leder till en ökad risk för utrotning på grund av inavel (Zayed & Packer 2005). Förekomst av diploida hanar i en population är därför en indikator på att den är sårbar för utrotning.

Humlor hotas av klimatförändringarna

Det finns cirka 260 humlearter i världen. Alla tillhör släktet *Bombus* och är uppdelade i 15 för närvarande erkända undersläkten (Cameron et al. 2007; Williams m.fl. 2008). De är effektiva pollinatorer som är särskilt viktiga i tempererade regioner på norra halvklotet. Minskningar av humlearternas förekomst och utbredning har rapporterats globalt under de senaste decennierna (Williams et al. 2009; Cameron & Sadd 2020). Enligt IUCN:s rödlista minskar populationsstorlek av nästan en fjärdedel av de humlearter som har bedömts (De Meulemeester et al. 2016). Globalt sett bidrar faktorer som förlust och försämring av livsmiljöer, patogener och bekämpningsmedel i hög grad till dessa minskningar. Dessutom, eftersom humlor vanligtvis är kallanpassade, förutspås ett varmare klimat ha en stor negativ inverkan på deras populationer (Cameron & Sadd 2020).

Prognosen för humlepopulationer i Europa har undersökts i en rapport med titeln "Climatic Risk and Distribution Atlas of European Bumblebees" (Rasmont et al. 2015) som är resultatet av EU FP7-projektet STEP (Status and Trends of European Pollinators; http://step-project.net/). Detta projekt använde över en miljon registrerade observationer över alla humlearter som finns i Europa för att modellera deras klimatnisch och projicera framtida lämpliga livsmiljöer på grundval av flera framtida klimatförändringsscenarier. Denna studie visade att majoriteten av arterna förutspås förlora en betydande del av sina nuvarande intervall inom detta århundrade. Upp till 36 % av arterna förutspås förlora mer än 80 % av sitt

nuvarande utbredningsområde, med alpina arter och arktiska arter bland de som är hårdast hotade av klimatförändringarna.

Utbredningen av både nordamerikanska och europeiska humlearter har förskjutits norrut under de senaste decennierna. Men även om de södra kanterna av deras utbredningar har dragit sig tillbaka snabbt, sker expansioner av de norra kanterna mycket långsammare. Klimatförändringar är den mest troliga förklaringen till dessa förändringar, och i synnerhet den ökade förekomsten av extrema väderhändelser som begränsar överlevnaden (Soroye et al. 2020; Kerr m.fl. 2015). Humlepopulationer i arktiska regionerna hotas särskilt av klimatförändringar eftersom det är omöjligt för dem att flytta sina utbredningar längre norrut (Williams & Osborne 2009; Rasmont m.fl. 2015; Soroye m.fl. 2020; Kerr m.fl. 2015).

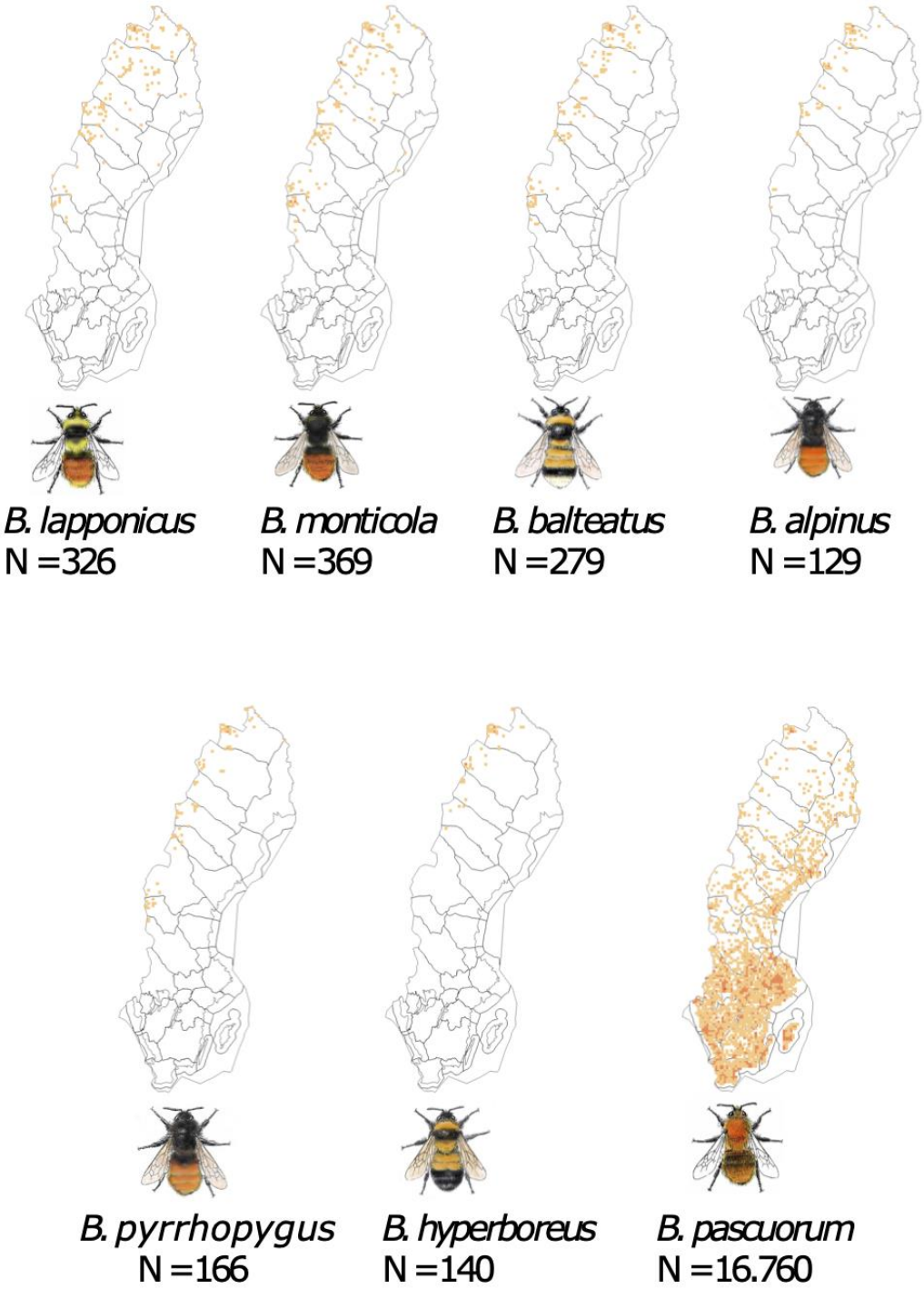
Syfte med studien: Bedömning av genetisk mångfald hos fjällhumlor i Sverige

Huvudfokus för denna studie är att ge en översikt av den genetiska variationen hos humlearter som finns i fjällmiljöer i Sverige. Dessa arter är bland de mest hotade av klimatförändringar (Rasmont et al. 2015). Vi fokuserar på sex arter begränsade till arktiska och fjällmiljö, samt en art som finns i de svenska fjällen men som också är utbredd över hela Europa (tabell 1, bilaga I). Fältobservationer av dessa sju arter från Artdatabanken visas i fig. 1, och återspeglar deras geografiska utbredningsområde i Sverige. Dessa sju arter tillhör tre olika undersläkten och alla betraktas som högprioriterade för inkludering i genetisk övervakning av pollinatörer av Naturvårdsverket (Posledovich et al. 2021b).

De sex fjällbegränsade arterna tillhör två undersläkten: Alpinobombus och Pyrobombus. *Bombus balteatus*, *Bombus hyperboreus*, *Bombus pyrrhopygus* och *Bombus alpinus* klassificeras som Alpinobombus. *B. balteatus* är relativt vanlig i de svenska fjällen, medan de andra tre har ett mer begränsat utbredningsområde och bebor högre breddgrader och höjder. *B. pyrrhopygus* var tidigare känd som *B. polaris* men denna art har delats i två baserat på fylogenetisk analys. Denna artrevision innebär att *B. polaris* anses vara begränsad till Nordamerika, medan *B. pyrrhopygus* bara återfinns i Eurasien (Williams et al. 2019, 2015). Till skillnad från de andra arterna är *B. hyperboreus* en boparasit som lägger ägg i andra humlebon, snarare än att etablera ett eget bo (Ødegaard et al. 2015). *Bombus lapponicus* och *Bombus monticola* klassificeras som Pyrobombus; båda dessa arter finns i hela de svenska fjällen.

Förutom utbredningsområdet i Skandinavien finns två av dessa arter även i fjällmiljöer längre söderut i Europa. *B. monticola* finns på höga höjder på många platser i Europa, inklusive de brittiska öarna, Pyrenéerna, Alperna och Balkan. *B. alpinus* förekommer, förutom i de skandinaviska bergen, på de högsta höjderna i Alperna. De andra fjällarterna, *B. lapponicus*, *B. pyrrhopygus*, *B. balteatus*, *B. hyperboreus* finns inte söder om Skandinavien. Alla dessa arter förutom *B. alpinus* och *B. monticola* finns också längre österut i Sibirien (Rasmont et al. 2015).

Den sista arten, *Bombus pascuorum*, tillhör undersläktet Thoracobombus. Till skillnad från de andra arterna är den vanlig över hela Europa och finns i en rad livsmiljöer från Arktis till Medelhavet. Det är den vanligaste humlearten i Europa och är relativt ohotad av klimatförändringar jämfört med andra arter (Rasmont et al. 2015). Den fungerar därför som en mycket användbar jämförelsepunkt för de andra arterna, eftersom den förväntas ha relativt höga nivåer av genetisk variation.



Figur 1. *Utbredning av studiearter i Sverige. Punkterna på kartan representerar observationer sedan 1997 som redovisats i Artdatabanken (N är antalet observationer). B. lapponicus, B. monticola och B. balteatus finns i stor utbredning i de svenska fjällen och i Arktis. B. alpinus, B. pyrrhopygus och B. hyperboreus är begränsade till högre höjder och breddgrader i dessa områden. B. pascuorum är en vanlig humla i hela Europa, utbredd från Arktis till Medelhavet. Kartor från artfakta.se. Teckningar © Björn Cederberg.*

Alla fjällarter hotas av klimatförändringarna, och de som är mest utsatta är de som är begränsade till de högsta höjderna och breddgraderna: *B. pyrrhopygus*, *B. alpinus* och *B. hyperboreus*. I synnerhet klassificeras *B. alpinus* och *B. hyperboreus* som sårbara i arternas rödlista, medan alla andra arter som studeras här anses vara livskraftiga, det vill säga inte omedelbart hotades (tabell 1). Förutom klassificeringen på rödlistan har arterna klassificerats i klimatriskkategorier baserat på modellering av artutbredning (Rasmont et al. 2015). Två av de arter som studeras här, *B. pyrrhopygus* och *B. hyperboreus* placerades i den mest extrema riskklassen, HHHR, vilket indikerar att >95% av deras beboeliga miljö förutses gå förlorad fram till och med år 2100 under ett realistiskt framtida klimatförändringsscenario. De övriga fyra fjällarterna, *B. alpinus*, *B. balteatus*, *B. lapponicus* och *B. monticola* klassificeras i kategorin HHR, vilket indikerar en habitatförlust på >85%.

Bombus pascuorum är en mycket polytypisk art med 24 beskrivna underarter som finns i hela Europa (Lecocq et al. 2015). Fyra av dessa underarter finns i Sverige. *B. p. smithianus* norr om polcirkeln, *B. p. sparreanus* i Norrland söder om polcirkeln, *B. p. pallidofacies* i Svealand och Götaland, och *B. p. gotlandicus* på Gotland. Underarter av de andra sex arterna av intresse här har inte beskrivits. *B. pascuorum* är den mest utbredda och vanligaste humlearten i Europa och kan överleva i stads- och förortsområden där andra humlearter är mer sällsynta (Rasmont et al. 2015). *B. pascuorum* klassificeras i den lägre klimatriskkategorin R, vilket indikerar >50% förväntad habitatförlust under en liknande tid. Det är viktigt att notera att dessa uppskattningar av klimatrisk inte tar hänsyn till möjligheten till migration. *B. pascuorum* kan kanske kompensera för förlust av lämplig livsmiljö genom att expandera till högre breddgrader och höjder. Däremot befinner sig de arktiska arterna redan vid den norra gränsen för sin potentiella utbredning.

Målet med projektet är att ge en första uppskattning av genetisk variation hos dessa sju humlearter med hjälp av helgenomsekvensering genom att analysera populationer i hela deras utbredningsområde i Sverige. Detta används för att undersöka populationsgenetiska parametrar som N_E och beräkna nivåer av populationsstruktur och inavel. Resultaten används för att utvärdera prioriteringen och genomförbarheten att inkludera dessa arter i ett genetiskt övervakningsprogram och ge första uppskattningar av populationsgenetiska parametrar för ett sådant program.

Genomiska resurser tillgängliga för fokala arter

Vi valde att analysera genetisk variation med helgenomsekvensering eftersom det är kostnadseffektivt och ger maximal mängd information som finns tillgänglig för att exakt uppskatta populationsgenetiska parametrar. För att analysera genetisk variation hos en art med hjälp av genomsekvensering behöver man en referensgenom av arten av intresse eller närbesläktad för att använda för att placera sekvensfragment på rätt ställe i genomet.

Eftersom Pyrobombus och Alpinobombusarterna bildar två distinkta kluster är det möjligt att använda en enda representativ arts genom från varje undersläkte för att kartlägga sekvensfragment från alla andra arter i den undersläktet. Som en del av tidigare undersökningar av dessa grupper har vi producerat genom av *B. lapponicus sylvicola* (Pyrobombus) och *B. kirbiellus* (Alpinobombus) med hjälp av prover från Klippiga bergen, USA (Christmas et al. 2021, 2022). B. lapponicus *sylvicola* i USA är en mycket nära släkting till *B. lapponicus* i Sverige. Den senaste taxonomiska revisionen anser att de är samma art (*B. lapponicus*) även om de tidigare ansågs vara två arter: B. *sylvicola* (Nordamerika) och *B. lapponicus* (Eurasien) (Martinet et al. 2019). En liknande situation finns för *B. kirbiellus* i

Nordamerika och *B. balteatus* i Eurasien. I detta fall ansågs dessa två arter tidigare båda vara *B. balteatus*, men den senaste taxonomiska revisionen har delat *B. balteatus* i två arter: *B. kirbiellus* i Nordamerika och *B. balteatus* i Eurasien (Williams et al. 2019). De genom som finns tillgängliga är därför från arter som idag kallas *B. lapponicus sylvicola* (tidigare *B. sylvicola*) och *B. kirbiellus* (tidigare *B. balteatus*), som är nära besläktade med de studiearter *B . lapponicus* och *B. balteatus* som finns i Sverige. *Bombus pascuorum* är avlägset besläktad med de andra studiearterna och dess genomsammansättning är allmänt tillgänglig.

Tidigare studier av fokala arter

Som nämnts ovan har fjällhumlearterna som studeras här systerarter i Nordamerika och deras undersläkte har cirkumpolära fördelningar. Vi har tidigare använt helgenomsekvensering för att bedöma genetisk variation och populationsstruktur i *B. lapponicus sylvicola* (systerart till B. *lapponicus*) och *B. kirbiellus* (systerart till *B. balteatus*) på flera höghöjdslokaler i Colorado, USA (Christmas et al. 2021, 2022) . Ett viktigt fynd var upptäckten av förekomsten av en tidigare okänd kryptisk art, som inte kunde skiljas från *B. lapponicus sylvicola* med vanliga morfologiska egenskaper. Av 281 prover som artbestämdes som *B. lapponicus sylvicola* bildade 67 ett distinkt genetiskt kluster baserat på hela genomsekvensdata, som representerar denna kryptiska art, som vi kallade "incognitus" (Christmas et al. 2021). Om arten förekommer i Sverige är okänt. Dessutom är det möjligt att framtida undersökningar av genetisk variation med hjälp av helgenomsekvensering hos andra arter kan avslöja fler dolda kryptiska arter.

Vi har också analyserat nivåer av genetisk variation och populationsfragmentering i Coloradopopulationerna av *B. lapponicus sylvicola* och *B. kirbiellus.* Vi fann inga bevis för att populationer var strukturerade över ett avstånd på över 150 km i Klippiga bergen, vilket indikerar att det inte finns några hinder för genflöde mellan olika berg (Christmas et al. 2022). Liknande låga nivåer av populationsstruktur har observerats för andra berghumlearter (Ghisbain et al. 2020; 2011), även om humlearter med låg förekomst kan uppvisa hög populationsdifferentiering (Darvill et al. 2006). Förekomsten av populationsstrukturen i de svenska fjällhumlorna är okänd.

Sammanfattning av specifika projektmål

Vi avsåg att göra en bedömning av nivåer av intraspecifik genetisk variation hos sex arter av fjällhumla och en vanlig humla. Detta uppnåddes genom att samla in 333 humleprover från varje arts utbredningsområde i Sverige och utföra helgenomsekvensering. Data användes för att uppskatta en rad populationsgenetiska parametrar för varje art för att informera om deras bevarandestatus och för att utvärdera vikten och genomförbarheten av att inkludera arten i ett långsiktigt genetiskt övervakningsprogram. Specifika mål var följande:

1) Att generera fylogenetiska träd av alla prover för att a) bekräfta evolutionärt förhållande mellan arter, b) bekräfta arten på varje prov, c) identifiera prover som var felidentifierade och bekräfta deras identitet, och d) söka efter närvaron av tidigare okända kryptiska arter som inte delar genetiskt kluster med tidigare kända arter.

2) Att utföra en analys av populationsstrukturen hos varje art för att upptäcka förekomsten av populationsstruktur och hinder för genflöde över deras utbredningsområden. Denna analys utfördes genom att analysera fylogenetiska träd, principkomponentanalys (PCA) och använda klustringsalgoritmen Admixture (Alexander et al. 2009).

3) Att uppskatta nivåer av genetisk variation över genomet och använda dessa värden för att uppskatta effektiv populationsstorlek (N_E) för varje art. Vi använde Wattersons theta (θ_W) (Watterson 1975) för att uppskatta genetisk variation. Detta är en uppskattning av det harmoniska medelvärdet av effektiv populationsstorlek över evolutionär tid som har resulterat den nivå av genetisk variation som ses i populationen i dag. Vi mätte också observerad heterozygositet (H_{OBS}).

4) Att utföra en rekonstruktion av historisk variation i N_E. Vi använde programmet SMC++, som analyserar variation i koalescenstid och frekvensspektrumet för alla genetiska varianter över genomet (Terhorst et al. 2017). Den här metoden för att rekonstruera historiska fluktuationer i N_E genom evolutionär tid och kan ge insikt om populationsminskningar har inträffat.

5) Att analysera distributionen av ”runs of homozygosity” (ROH) i prover av varje art. Fördelningen av ROH påverkas av populationsdynamiken och återspeglar förekomsten av populationsflaskhalsar och inavel (Ceballos et al. 2018).

SAMMANFATTNING AV RESULTAT

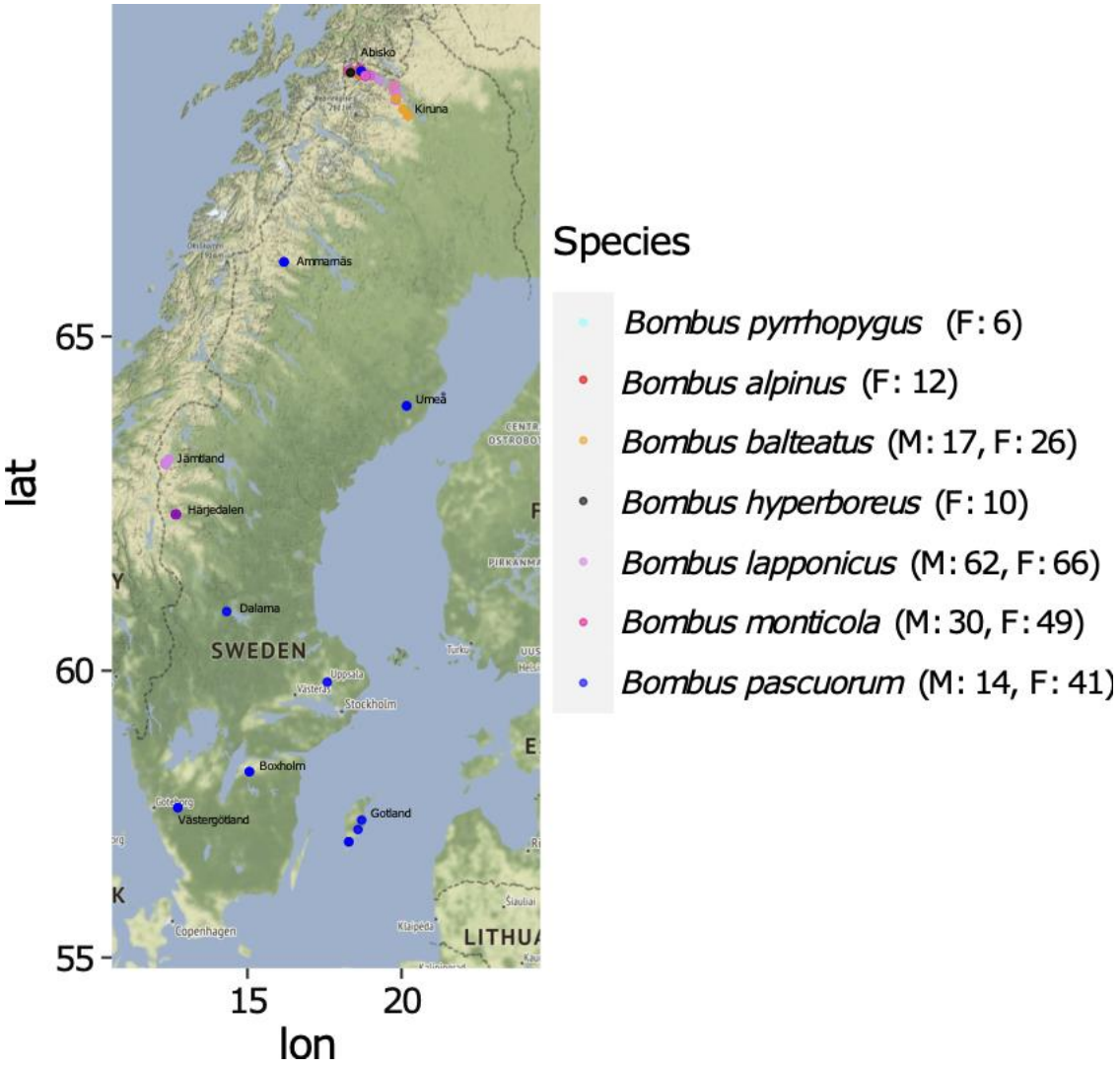
- Vi samlade in och helgenomsekvenserade 333 prover av sju humlearter i Sverige.
- Sex av arterna är begränsade till arktiska och alpina miljöer och samlades in i Lappland, Jämtland och Härjedalen. Den sjunde arten är utbredd och samlades in från lokaler i hela Sverige.
- Uppskattningar av N_E från genetisk variation (θ_W) ligger i intervallet 55 000 - 225 000. Arter med mer begränsade utbredningar på högre breddgrader och höjder tenderar att vara i den nedre änden av detta intervall.
- Inga kryptiska arter upptäcktes och släktskap mellan arter rekonstruerade med hjälp av fylogenetiska träd matchade förväntningar från tidigare studier.
- Vi hittade inga tecken för geografisk populationsstruktur hos fjällhumlearterna med hjälp av PCA och Admixture, vilket speglar frånvaron av stora hinder för genflöde mellan befintliga populationer på de platser vi undersökte.
- Vi identifierade en diploid hane av arten *Bombus hyperboreus*, samlad nära den södra gränsen för dess utbredningsområde. Produktionen av diploida hanar, som är sterila, indikerar att denna population lider av negativa effekter av inavel.
- Vi använde SMC++ för att dra slutsatser om tidigare fluktuationer i N_E. Två av de arter som för närvarande är sällsyntare och har begränsade utbredningar (*B. hyperboreus* och *B. pyrrhopygus*) visade signaler om populationsminskning sedan den senaste istiden.
- Analys av ”runs of homozygosity” (ROH) i varje diploid prov visade att den diploida hanen *B. hyperboreus* var homozygot vid mer än hälften av dess genom, men att tecken på inavel i andra prover var mycket svagare eller frånvarande.
- Vi jämförde uppskattningar av N_E hos dessa arter med deras systerarter i Nordamerika och fann att N_E för systerarten *B. balteatus* var betydligt högre i Nordamerika än i Europa, vilket tyder på att den förekommer oftare.

RESULTAT

Fältinsamling av sju humlearter

Prover av de sju studerade arterna samlades in under sommaren 2021. En stor insamlingsinsats genomfördes genom en expedition till Abisko med omnejd, som resulterade i prover tillhörande alla sju arter (totalt 263 prover). Ytterligare utflykter för att samla fjällarter gjordes till Jämtland (19 prover) och Härjedalen (23 prover). Insamlingsinsatserna i dessa fjällorter längre söderut var mindre lyckade. Det är oklart om det beror på minskande populationer, tillfälliga populationsfluktuationer eller andra effekter, så som dåliga väderförhållanden. Prover av den utbredda arten *B. pascuorum* samlades in från hela dess utbredningsområde i Sverige, inklusive Gotland och Skåne. Detta innefattar sex huvudsakliga geografiska områden där fyra olika underarter och hybrider mellan dem var belägna.

Det slutliga datasetet bestod av 333 prover. Tre av arterna - *B. alpinus*, *B. pyrrhopygus* och *B. hyperboreus* - har en mer begränsad fördelning vid högre höjder och breddgrader. Dessa arter hittades i lägre antal än de andra, mer utbredda, fjällarterna och fanns bara i ett urval av samlingslokalerna. Alla samlingslokaler för alla sju arter visas i fig. 2. En sammanfattning av de prover som samlats in på varje plats presenteras i tabell 2. En fullständig lista över prover som sekvenserats och tillhörande metadata presenteras i tilläggstabell S1.



Figur 2. *Karta över humleprovsamling för denna studie. De punkterna i olika färger betecknar insamlingslokaler för varje art i hela Sverige. Antal hanar (M) och honor (F; arbetare och drottningar) som samlats in anges.*

Helgenomsekvensering och bioinformatisk analys

Alla prover helgenomsekvenserades med instrumentet Illumina NovaSeq vid National Genomics Infrastructure, SciLifeLab, Stockholm. Råsekvensfragment från varje prov placerades på ett lämpligt referensgenom för att generera tre separata sekvensjämförelser som innefattade flera arter: 1) De 207 Pyrobombus-proverna (*B. lapponicus* och *B. monticola*) mappades till *B. lapponicus sylvicola* referensgenomet (ASM1967717v1) (Christmas et al. 2021). 2) De 71 Alpinobombus-proverna (*B. alpinus, B. pyrrhopygus, B. balteatus, B. hyperboreus*) mappades till B. *kirbiellus* referensgenomet (ASM1920181v1)(Christmas et al. 2022). 3) De 55 *B. pascuorum*-proverna mappades till *B. pascuorum* referensgenomet (iyBomPasc1.1).

Vi bestämde först ploiditeten i varje prov genom att detektera förekomsten av heterozygota loci. Denna analys bekräftade om proverna var hanliga (haploida) eller honliga (diploida). Ett prov av *B. hyperboreus* identifierades morfologiskt som en hane, men visades vara diploid av den genetiska analysen, vilket indikerar att det är en diploid hane (se nedan för ytterligare analys). I några fall uppdaterade vi felaktiga fältklassificeringar baserat på den genetiska

ploiditetesanalysen. Artbestämningen bekräftades sedan genom att bygga neighbour-joining (NJ) evolutionärt träd för var och en av de tre flerartsskevensjämförelserna. De sju olika arterna kunde tydligt särskiljas utifrån NJ-träden. Ett litet antal prover som hade artbestämts felaktigt omidentifierades baserat på sin position i NJ-träden och klassificerades korrekt. Dessutom kunde identiteten hos de två arterna *B. alpinus* och *B. pyrrhopygus*, som är svåra att artbestämma på grund av deras konvergens i morfologi, bekräftas genom en kombination av genetisk klustring i NJ-träd och detaljerad morfologisk analys.

Beräkning av genetisk variation

Vi uppskattade nivån av genetisk variation hos alla arter med hjälp av Wattersons theta (θ_W) och nukleotiddiversitet (π; genomsnittligt antal parvisa skillnader per position), som båda är uppskattningar av populationsmutationsparametern θ (Watterson 1975)(Tabell 3). Uppskattningar av θ_W är 0,06% - 0,25%, vilket är något lägre än det intervall som observerats i populationer av honungsbiet *Apis mellifera* (Wallberg et al. 2014). Denna parameter kan omvandlas till en uppskattning av effektiv populationsstorlek (N_E). Denna uppskattning representerar ett harmoniskt medelvärde av N_E under tidsperioden till koalecensen mellan sekvenserna i provet, vilken uppskattas ligga tiotusentals år tillbaka i tiden (Nadachowska-Brzyska et al. 2022).

N_E-uppskattningarna varierar mellan arter. De högsta uppskattningarna av N_E uppvisas av *B. pascuorum* (~ 220 000; Tabell 3). Detta överensstämmer med det faktum att det är en utbredd art i Europa, som finns i många habitater, och som möjligen expanderar i antal för närvarande (Rasmont et al. 2015). Som jämförelse har förvaltade populationer av honungsbin i Europa, som också är utbredda, liknande N_E på cirka ~200 000 (Wallberg et al. 2014). Två andra arter som är relativt utbredda i de svenska fjällen, *B. lapponicus* och *B. balteatus* uppvisar också relativt högt N_E (~195 000 respektive ~180 000). *B. pyrrhopygus* uppvisade också relativt högt N_E (~ 170 000), vilket är förvånande med tanke på att den är begränsad till höga höjder och var den art som observerades minst antal gånger under insamlingen. De arterna med de mest begränsade utbredningsområdet visade signifikant lägre nivåer av genetisk mångfald. Uppskattningar av N_E för *B. alpinus*, *B. hyperboreus*, var alla cirka 60 000 (tabell 3). Överraskande nog har *B. monticola* också en relativt låg N_E, trots att den är en av de vanligare fjällarterna, vilken därmed skulle kunna förväntas ha högre N_E.

I allmänhet överensstämde därför skillnader i långsiktigt N_E mellan arter med förväntningar baserade på artens förekomst och utbredningsstorlek, med några undantag. Ingen av uppskattningarna av N_E är nära 500, under vilka en population anses vara sårbar för negativa effekter av genetisk drift (Allendorf et al. 2022). Dessa analyser tyder på att N_E har varit historiskt stort hos dessa arter och att de inte visar tecken på drastiska nedgångar. Det är dock viktigt att ta prover vid flera tidpunkter för att kunna beräkna samtida N_E och hur den förändras i dagens populationer.

Populationsstruktur

Vi uppskattade populationsstruktur och släktskap mellan arter för alla arter med hjälp av tre metoder: Neighbour-joining (NJ) träd (Saitou & Nei 1987), principkomponentanalys (PCA) och Admixture (Alexander et al. 2009).

NJ-trädet av *B. lapponicus* och *B. monticola* visar att proverna klustrar utefter art utan ytterligare uppenbar struktur (fig. 3). Det är också intressant att notera att inga ytterligare

kryptiska arter observerades. En liknande studie av systerarten *B. lapponicus sylvicola* i Colorado avslöjade att 67 av 281 prover som ursprungligen identifierades som *B. l. sylvicola* tillhörde en tidigare obeskriven art "incognitus" (Christmas et al. 2021). Vi observerade inte kryptiska arter relaterade till *B. lapponicus* i vårt dataset från Sverige med 129 prover. Detta överensstämmer med hypotesen att "incognitus" är begränsad till Nordamerika, och om det förekommer utanför Colorado är okänt.

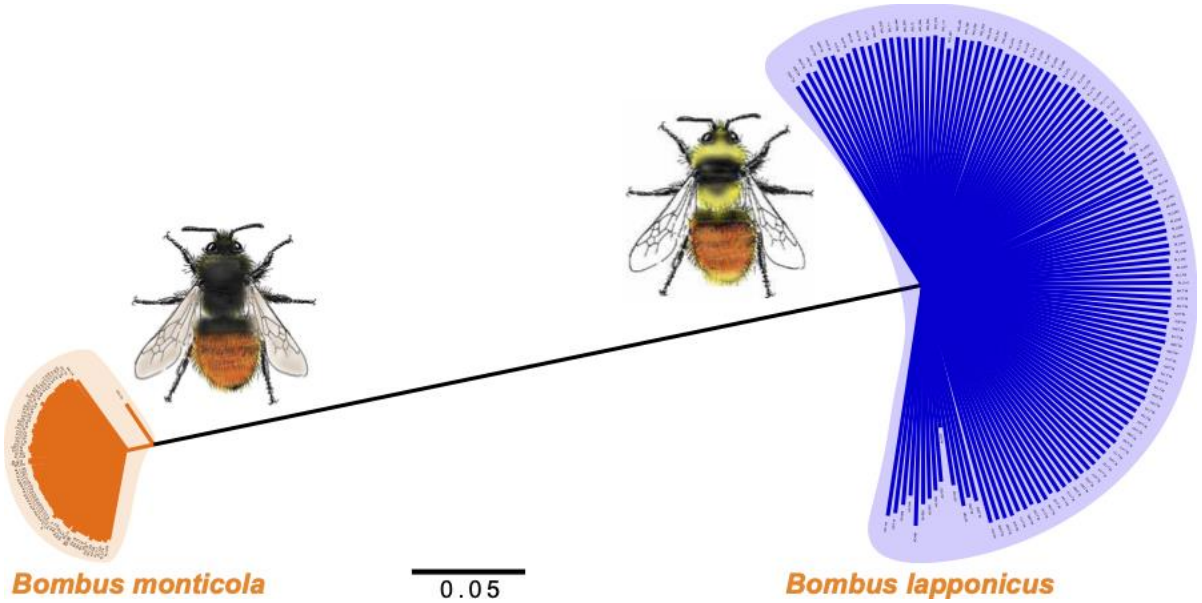
Prover av *B. lapponicus* från Lappland, Jämtland och Härjedalen visade inga tecken på populationsstruktur eller klustring enligt geografisk position i PCA (fig. 4). Detta stöddes ytterligare av Admixture-analysen, där en enda population var modellen med den bäst stöd av data efter korsvalidering (fig. 5). Prover av *B. monticola* från Abisko bildade olika kluster enligt PCA (fig. 4). De tre proverna som bildar ett separat kluster samlades dock in på exakt samma plats och den mest troliga orsaken till klustringen är att de är släkt. Ingen geografisk struktur upptäcktes i PCA och Admixture-analysen för *B. monticola* mellan Lappland, Jämtland och Härjedalan, ett utfall som också stöder en enda panmiktisk population (fig. 5). Dessa resultat ger därför inga belägg för hinder för genflöde mellan populationer av vare sig *B. lapponicus* eller *B. monticola* i de svenska fjällen, vilket överensstämmer med hypotesen att de fortplantar sig fritt över hela sitt utbredningsområde i Sverige.

NJ-trädet för arterna av undersläktet Alpinobumbus - *B. balteatus*, *B. alpinus*, *B.* p*yrrhopygus* och *B. hyperboreus* - avslöjar de evolutionära förhållandena mellan dessa arter (fig. 6). Dessa artsläktskap liknar de som publicerats baserat på analyser av fenotypiska karaktärer och molekylära streckkoder (Williams et al. 2019), som placerar *B. alpinus* och *B. pyrrhopygus* som systertaxa. Arterna *B. alpinus* och *B. pyrrhopygus* är extremt lika i morfologi, och det fylogenetiska trädet från genomdata var ett viktigt hjälpmedel för att bekräfta artidentiteten för varje prov av dessa arter.

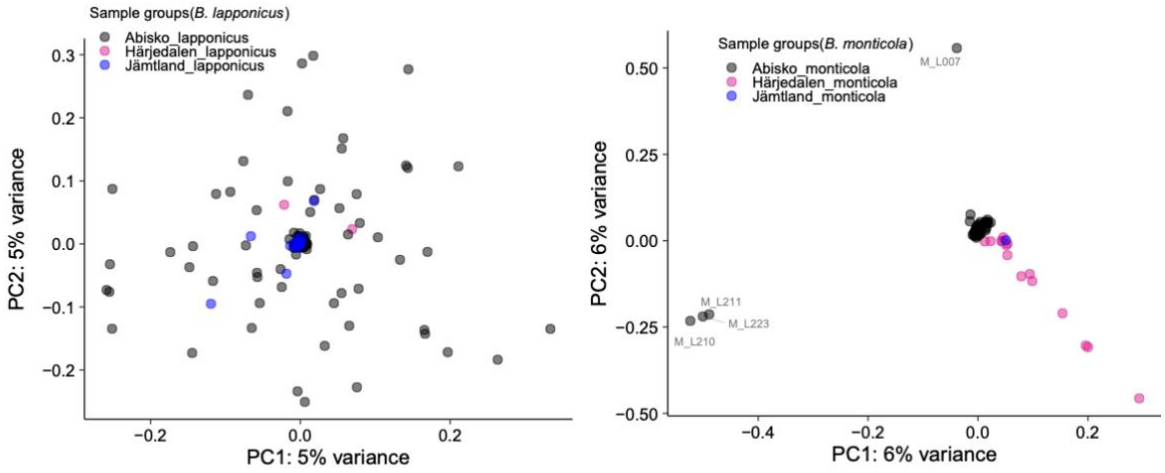
Förekomsten av genetisk struktur bland populationer av Alpinobombus-arter undersöktes med hjälp av PCA och Admixture. Inga signifikanta tecken på klustring, varken inom eller mellan geografiska regioner observerades för någon av dessa fyra arter med PCA (fig. 7). Korsvalidering med hjälp av Admixture resulterade i att en enda population var modellen med mest stöd för alla arter (fig. 8). Det bör dock noteras att antalet prover för *B. alpinus*, *B. pyrrhopygus* och *B. hyperboreus* alla var relativt låga (6 – 12 individer per art), vilket resulterar i låg statistisk styrka för att upptäcka populationsstruktur. *B. alpinus* hittades endast i Abisko, vilket innebär att det är omöjligt att identifiera genetisk strukturering bland geografiska regioner för denna art. För *B. hyperboreus* samlades inte ett enda prov i Jämtland ihop med de andra proverna från Abisko, vilket skulle kunna indikera förekomsten av geografisk struktur hos arten även om fler prover skulle krävas för att bekräfta eller motbevisa detta.

Till skillnad från de arter som redan diskuterats är *B. pascuorum* en polytypisk art som finns i ett brett spektrum av livsmiljöer över hela Europa (Lecocq et al. 2015). Insamlingsstrategin för denna art omfattade de fyra underarter som finns i Sverige, förutom prover som identifierats som hybrider mellan par av underarter som samlas in i hybridzoner. NJ-trädet i dessa prover avslöjade begränsade nivåer av kluster (fig. 9). De prover som samlades in från Gotland, från underarten, *B. p. gotlandicus*, var tydligt separerade från de andra proverna. En begränsad mängd separation observerades också för prover från Abisko, bestående av underarten *B. p. smithianus*. De återstående proverna, bestående av *B. p. sparreanus*, *B. p. pallidofacies* och hybrider mellan underarter, samlade över ett stort geografiskt område, visar inga tecken på populationsstruktur. PCA-diagrammet avslöjar ett liknande mönster, med

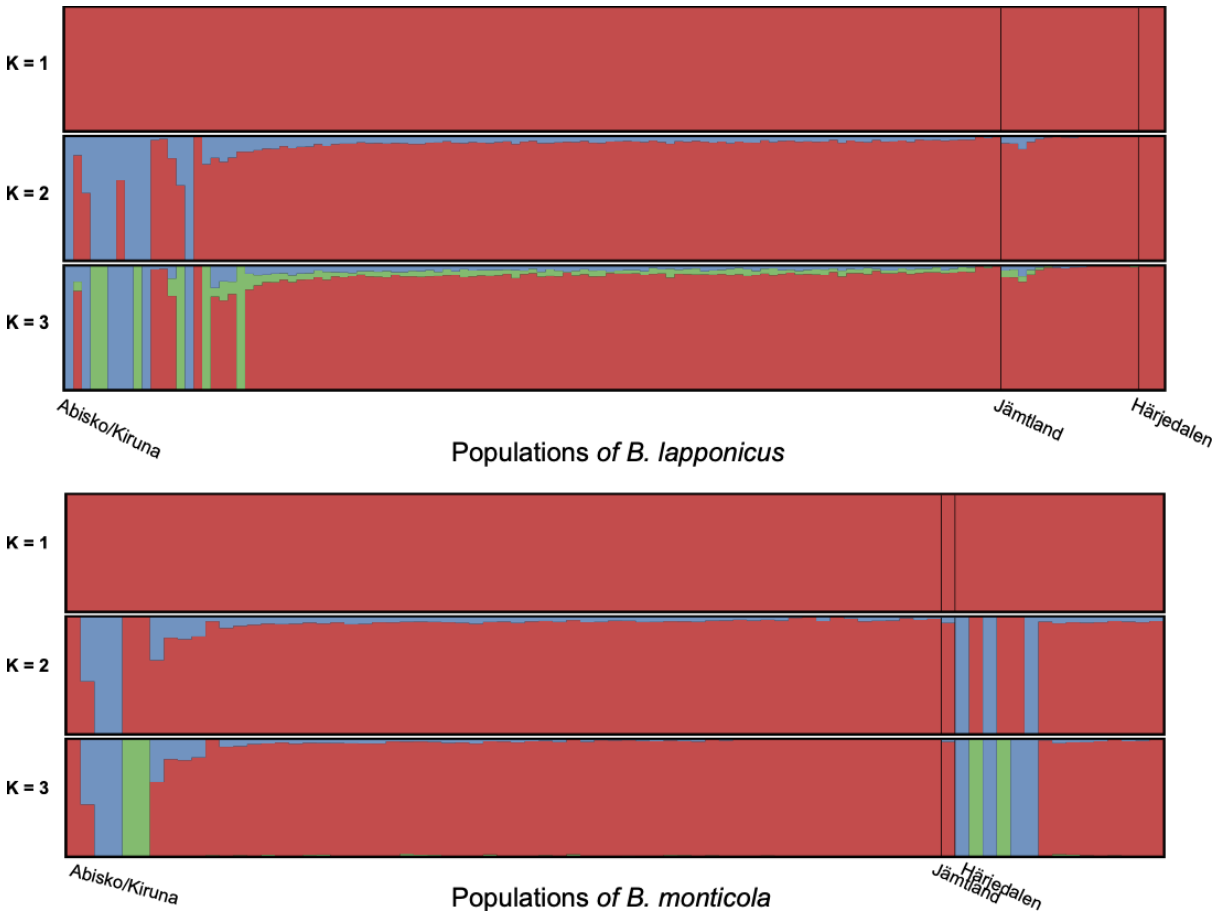
prover från Gotland och Abisko som bildar separata kluster från de återstående proverna från fastlandet Sverige. Dessa återstående prover visar inte bevis för geografisk strukturering



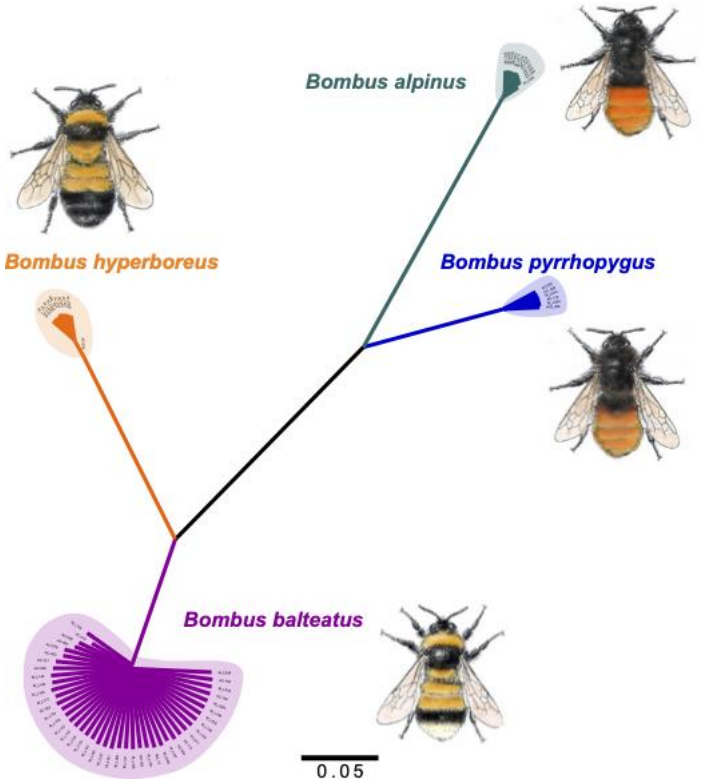
Figur 3. *NJ-träd för prover av B. lapponicus och B. monticola genererade med hjälp av helgenomsekvensdata. Båda arterna tillhör undersläktet Pyrobombus. Varje extern gren representerar ett enskilt prov.*



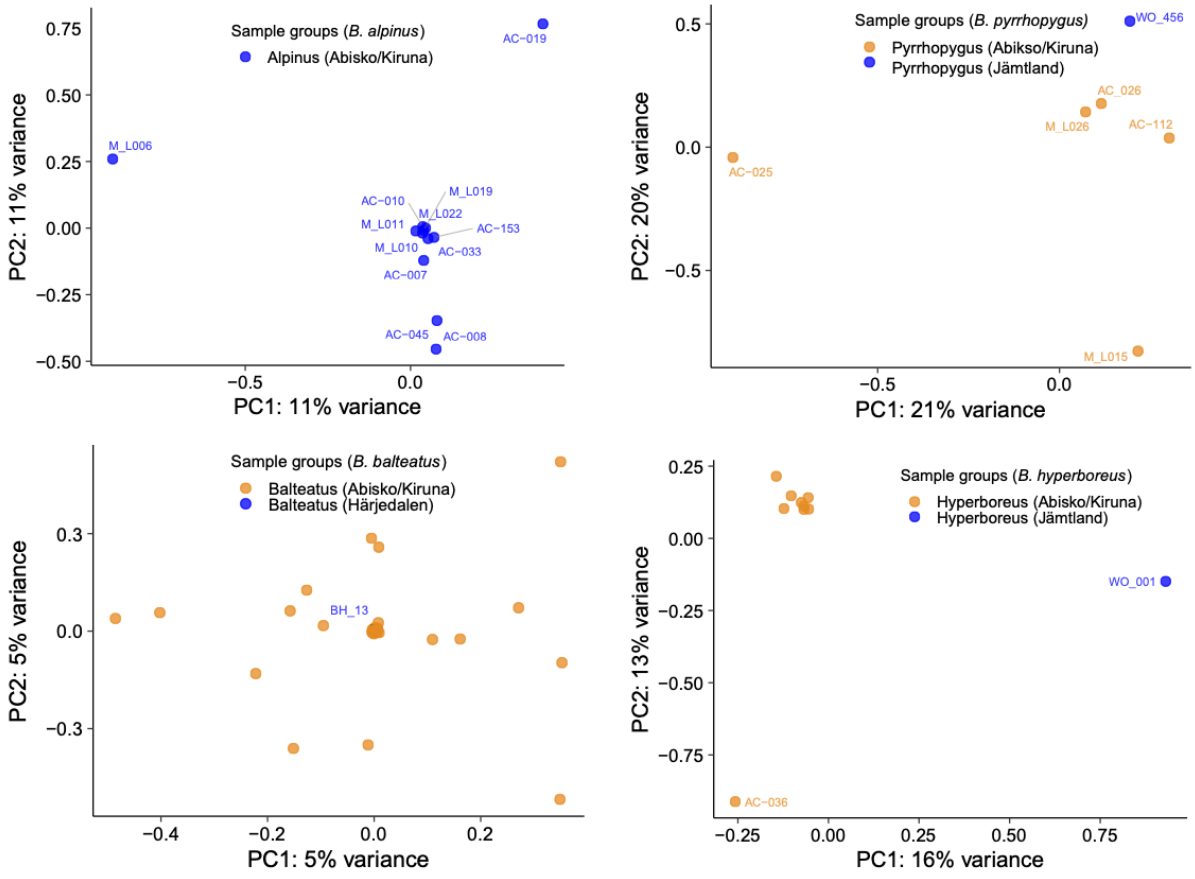
Figur 4. *PCA för alla geografiska populationer av B. lapponicus (vänster) och B. monticola (höger). Provtagningsplatserna för varje prov är markerade.*



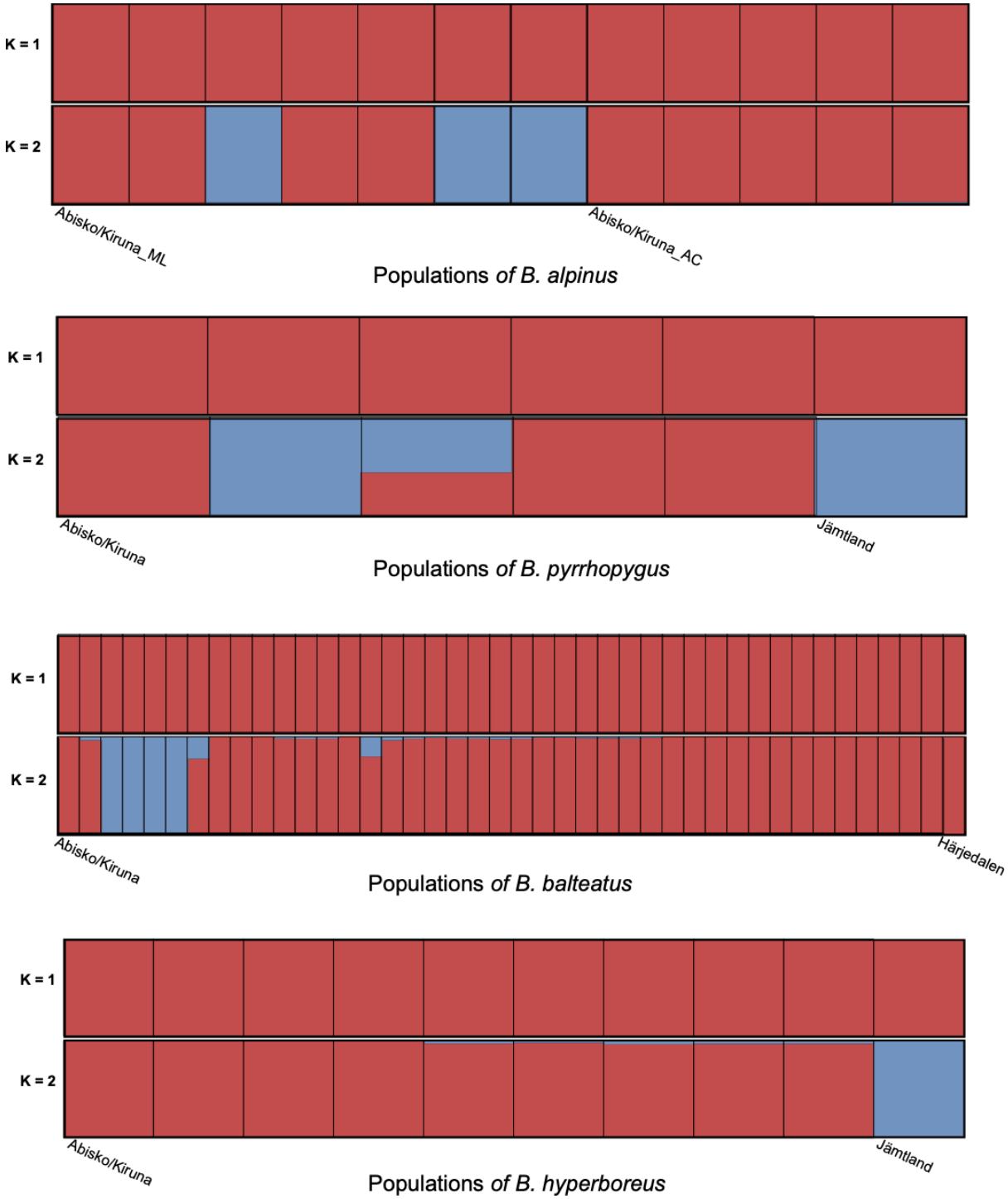
Figur 5. *Admixture-analyser för alla geografiska populationer av B. lapponicus (överst) och B. monticola (nederst). Ingen signifikant struktur upptäcktes för någon av arterna och K=1 var det bästa parametervärdet som stöddes för båda arterna.*



Figur 6. *NJ-träd för B. alpinus, B. pyrrhopygus, B. baltatetus och B. hyperboreus. Alla arter tillhör undersläktet Alpinobombus. Varje extern gren representerar ett enskilt prov.*



Figur 7. *PCA för alla geografiska populationer av B. alpinus, B. pyrrhopygus, B. baltatetus och B. hyperboreus. insamlingsplatserna för varje prov är markerade.*



Figur 8. Admixture-analyser för alla geografiska populationer av B. alpinus, B. pyrrhopygus, B. baltatetus och B. hyperboreus. Ingen signifikant struktur upptäcktes för någon av arterna och K=1 var det bästa parametervärdet som stöddes för alla arter.

(fig. 10). Blandningsanalysen visade också att prover från Abisko och Gotland bildade separata kluster från de återstående proverna (fig 11). Korsvalideringsanalys indikerade att K=2 hade bäst stöd, vilket innebar två större populationer, en på Gotland och en på fastlandet Sverige, även om Admixtureanalyserna också visar att en viss grad av olikhet hos Abiskopopulationen.

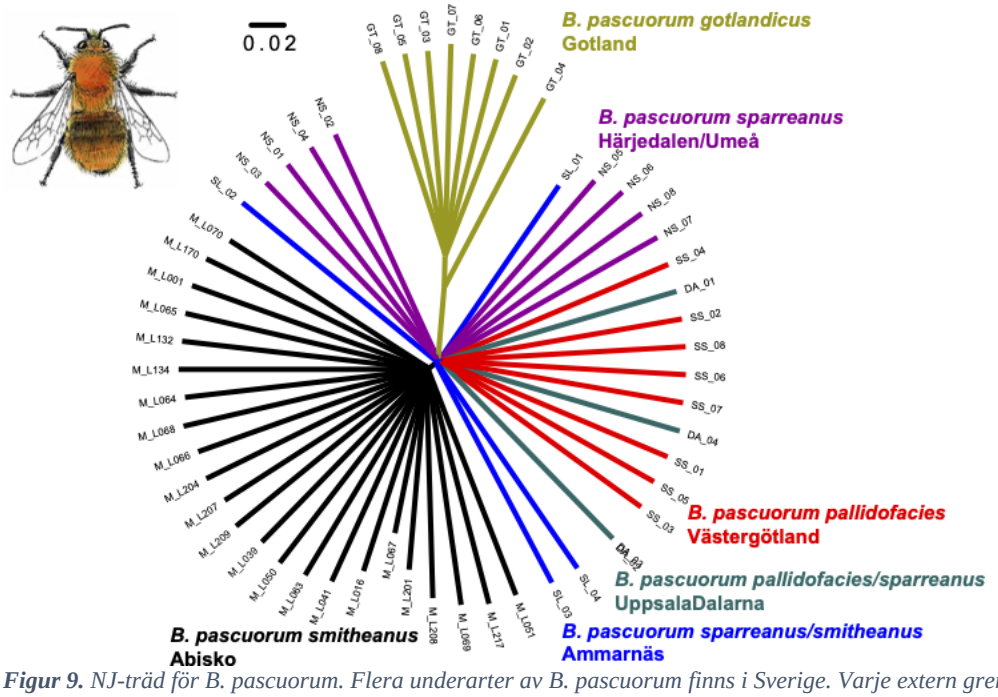
Sammantaget tyder dessa analyser på att de sex fjällhumlearter som studeras här inte uppvisar någon uppenbar populationsunderstruktur över sina utbredningsområden i Sverige. Däremot uppvisar den utbredda polytypiska arten *B. pascuorum* en viss grad av populationsstruktur. En population på Gotland verkar vara isolerad från fastlandspopulationen. Dessutom verkar prover som samlats in i Abisko ha en viss grad av isolering från andra fastlandspopulationer längre söderut, som uppvisar olika färgmönster och beskrivs tillhöra olika underarter (Lecocq et al. 2015).

Spårning av historiska fluktuationer i N_E med SMC++

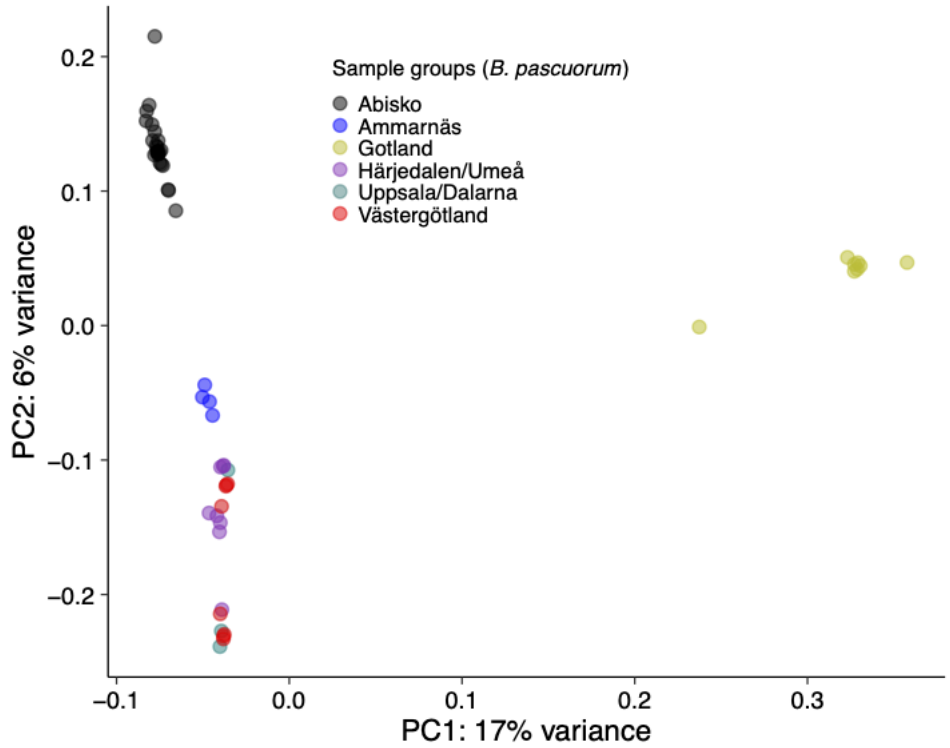
Vi använde programmet SMC++ för att härleda historiska fluktuationer i N_E hos alla sju studiearterna (Terhorst et al. 2017). Denna metod använder den härledda fördelningen av koalescenstider för loci över hela genomet och den lokala frekvensfördelningen av SNPer för att uppskatta variation i N_E över tid. Därför, medan punktskattningar, som θ_W, ger ett harmoniskt medelvärde av N_E över artens evolutionära historia, kan SMC ++ uppskatta fluktuationer i N_E över evolutionär tid.

Resultaten av SMC++ analysen för alla arter visas i fig. 12. Perioden sedan ~10^4 år sedan representerar tiden sedan slutet av den senaste istiden. Under denna tidsperiod tyder resultaten på att populationer av *B. hyperboreus* har genomgått en ganska drastisk nedgång. Denna analys tyder på att deras nuvarande N_E kan vara mindre än 5 000, även om det historiskt sett har varit mer än 10 gånger högre (tabell 3, ~ 70 000). Arten *B. pyrrhopygus* visar också tecken på nedgång under denna period, vilket kan indikera en samtida N_E runt 25 000 jämfört med ett värde på ~ 75 000 uppskattat från θ_W. Båda dessa arter har begränsad arktisk utbredning, men kan ha varit mer utbredda tidigare under den nuvarande postglaciala perioden, när förhållandena var mer gynnsamma i en större del av Europa. Det är därför möjligt att deras populationer har minskat under den nuvarande postglaciala perioden. De andra fjällarterna som undersöks visar inga signaler om större populationsexpansioner eller minskningar och har varit relativt stabila under holocenen.

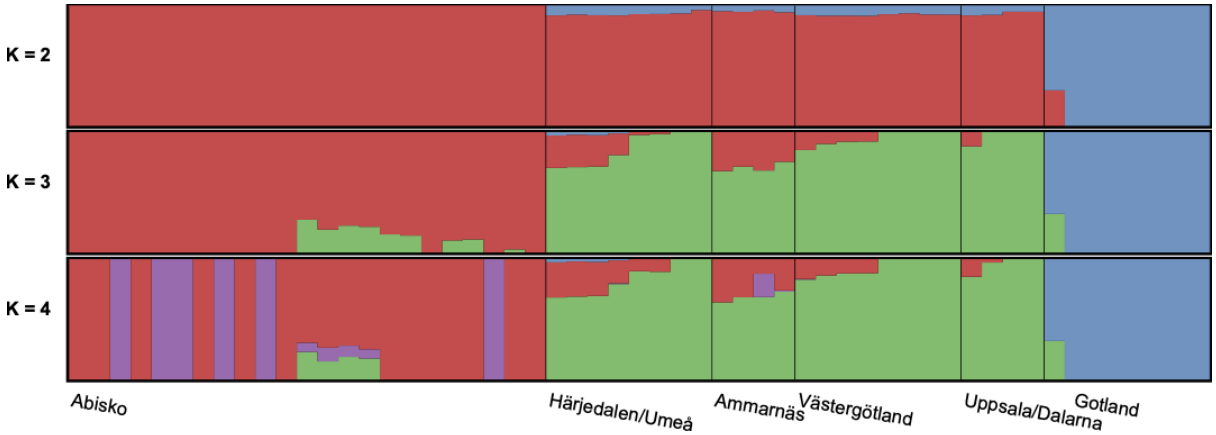
Till skillnad från arterna hemma hörande i fjällen och Arktis, finns det tecken på att *B. pascuorum* har genomgått en populationsexpansion under denna period. *B. pascuorum* är för närvarande den mest utbredda och vanliga humlan i Europa och kan överleva i en rad moderna habitat (Lecocq et al. 2015). Det är därför inte osannolikt att denna art har expanderat under den nuvarande postglaciala perioden.



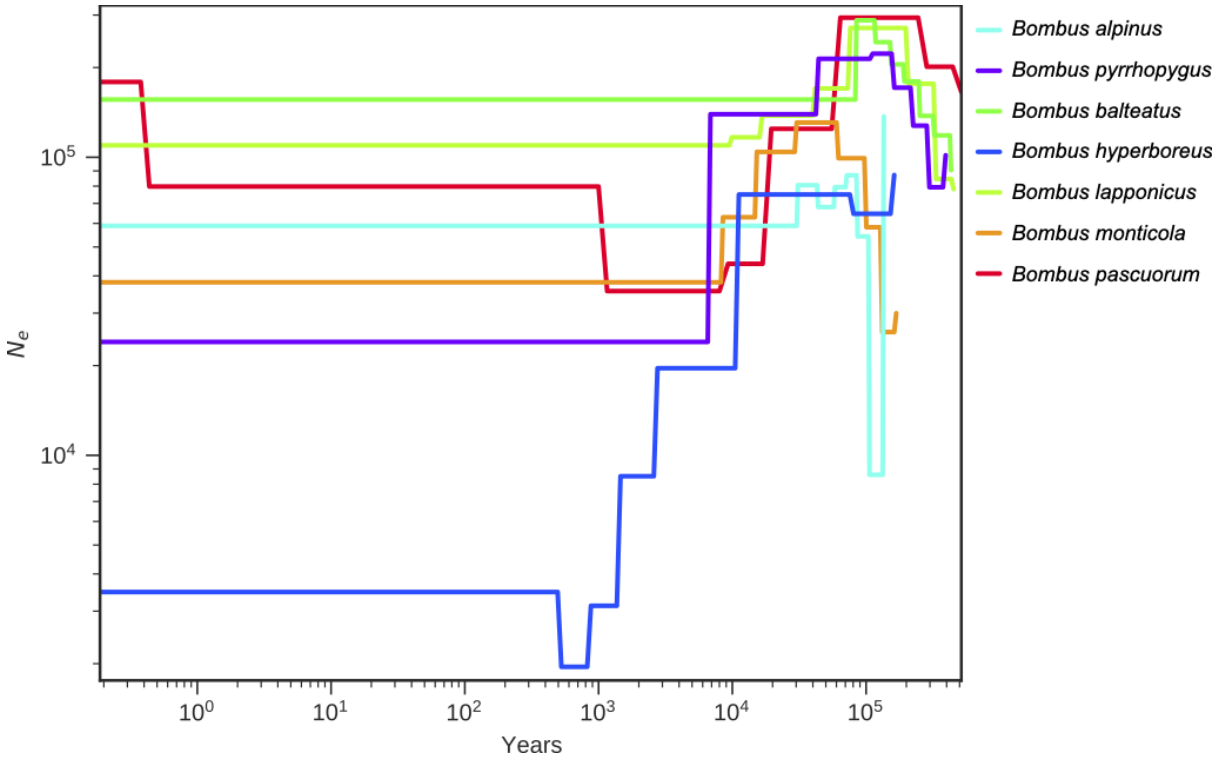
Figur 9. *NJ-träd för B. pascuorum. Flera underarter av B. pascuorum finns i Sverige. Varje extern gren representerar ett enskilt prov. Provtagningsplatser och underarter anges, inklusive flera från hybridzoner.*



Figur 10. *Huvudkomponentanalyser för alla geografiska populationer av B. pascuorum. Provtagningsplatser anges.*



Figur 11. *Blandning går för alla geografiska populationer av B. pascuorum. Det bästa parametervärdet som stöds är K=2, vilket indikerar förekomsten av en distinkt delpopulation på Gotland (B. pascuorum gotlandicus).*



Figur 12. *Uppskattning av historisk variation i N_E med hjälp av SMC++-metoden. Starka signaler om populationsminskning antyds för B. hyperboreus, medan populationsstorleksökning härleds för B. pascuorum.*

”Runs of homozygosity”

Vi skannade genomerna i alla diploida prover (vanligtvis honor) för ”runs of homozygosity” (ROH). Endast diploida prover användes eftersom haploida prover inte kan innehålla ROH. I allmänhet förväntas inavel generera långa ROH-sträckor i genomet. Däremot kan genomen hos utavlade populationer innehålla många kortare ROH-sträckor (Ceballos et al. 2018). Distributionen av ROH i populationer kan därför vara ett tecken på inavel i en population, vilket kan tyda på att en population är i riskzonen.

En sammanfattning av ROH-analysen presenteras i tabell 4 och en fullständig analys per prov visas i kompletterande fig. S1-4. Fig. 13 visar andelen av genomet för varje prov som faller i ROH >0,1 Mb, grupperat efter art. Det mest slående fyndet var en enda individ av *B. hyperboreus* (WO_001) med >55% av genomet som ligger i ROH längre än 0,1 Mb (fig. 13). Detta mönster förutspås bero på en syskonparning. Detta prov klassificerades också som en diploid hane, vilket indikerar att det är homozygot vid det könsbestämmande lokuset. Provet är det enda *B. hyperboreus* som samlats in från Jämtland. Alla andra prover av denna art hittades i närheten av Abisko. Upptäckten av denna mycket inavlade individ tyder på att inavel potentiellt kan vara vanligt hos *B. hyperboreus*, och då särskilt närmare den södra gränsen för dess utbredning i Jämtland. Observationen av en diploid hane indikerar att denna population lider av negativa effekter av inavel.

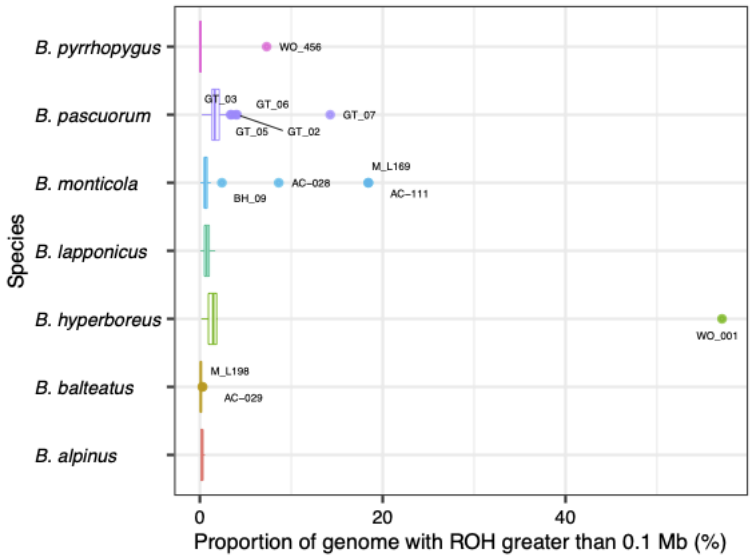
Ett litet antal individer av *B. pyrrhopygus*, *B. pascuorum* och *B. monticola* identifierades också med 5-20% av genomet som omfattas av ROH- sträckor längre än 0,1 Mb, vilket indikerar att inavel förekommer sporadiskt även hos dessa arter (fig. 13). Avvikande regioner av långa ROH- sträckor upptäcktes inte hos de andra arterna, men kan fortfarande förekomma i låg frekvens. Endast ett litet antal prover innehöll några ROH-sträckor längre än 1 Mb och för majoriteten av arterna hade inget av proverna några ROH av de n längden (tabell 4). Den genomsnittliga täckningen av genomet av ROH är <5% för alla arter utom *B. hyperboreus*, där den ovan nämnda, mycket inavlade, diploida hanliga individen har en stark påverkan på värdet.

Genomsnittliga mängder av ROH i *B. pascuorum* är höga jämfört med andra arter, med ROH som täcker ~ 5% av genomet i genomsnitt (tabell 4). Eftersom *B. pascuorum* är en extremt utbredd humla är det osannolikt att den upplever inavel. Det är därför osannolikt att de genomsnittliga mängder av ROH som observerats hos någon av arterna här återspeglar en stark inverkan av inavel på deras populationer eftersom de inte skiljer sig markant från dem som observerats i *B. pascuorum.*

Jämförelse med genetisk variation hos nordamerikanska berghumlearter

Systerarter till *B. lapponicus och B. balteatus* finns också i bergiga och arktiska lokaler i Nordamerika. Dessa arter är mycket lika i morfologi och har nyligen evolutionärt separerats från sina europeiska motsvarigheter. Systerarten till *B. lapponicus* i Nordamerika är också känd som *B. lapponicus* (underart *sylvicola*). Systerarten till *B. balteatus* i Nordamerika är *B. kirbiellus.* För både *B. lapponicus* och *B. balteatus* har det diskuterats om systerarterna i Nordamerika och Europa ska betraktas som en och samma eller som separata arter (Williams et al. 2019; Martinet m.fl. 2019). Eftersom systerarterna är mycket lika i livsstil och beteende är det intressant att undersöka om mängder av genetisk variation skiljer sig mellan de europeiska och nordamerikanska populationerna.

Vi samlade tidigare in 214 prover av *B. lapponicus* och 299 prover av *B. kirbiellus* från Rocky Mountains, Colorado, USA (Christmas et al. 2021, 2022). Den data som genereras här gjorde det också möjligt att jämföra genetisk mångfald i denna population (tabell 5). För att göra detta beräknade vi gemensamt genetisk variation i båda dataseten samtidigt. För de två populationerna av *B. lapponicus* (USA och Sverige) finner vi att uppskattningarna av nukleotiddiversitet och effektiv populationsstorlek är extremt lika. Vi finner att *B. kirbiellus* (USA) har signifikant högre mängder av genetisk variation jämfört med *B. balteatus* (Sverige). Detta indikerar att denna systerart kan vara, relativt sett, vanligare i Nordamerika, vilket överensstämmer med observationer från fältinsamlingar (Christmas et al. 2022).



Figur 13. *Andel av genomet för varje prov som består av ROH > 0,1 Mbp. Outliers är märkta.*

SAMMANFATTNING AV DISKUSSIONEN

- Uppskattningar av N_E för alla arter är mycket högre än vad som vanligtvis ses hos hotade arter, vilket indikerar att ingen av arterna löper omedelbar risk för minskad livskraftighet eller inavel.
- Våra uppskattningar av N_E representerar dock harmoniska medelvärde över evolutionär tid, vilket kan dölja nedgångar under senare tid. Det är därför viktigt att få ytterligare mätningar separerade i tid för att exakt kunna utläsa populationstrender.
- Den avsaknad av populationsstruktur som observerats i de svenska fjällen speglar vad som observeras hos systerarter i Nordamerika. Upptäckt av populationsstruktur i framtida genetiska övervakning skulle vara ett tecken på minskande populationer.
- Vi upptäcker några signaler om minskande populationsstorlekar i våra data:
    - Vi observerar en diploid hane av *B. hyperboreus* med mycket homozygositet i genomet i den södra kanten av dess utbredningsområde, vilket indikerar att populationen lider av effekterna av inavel.
    - Vi drar slutsatsen att både *B. hyperboreus* och *B. pyrrhopygus* har upplevt populationsminskningar sedan den senaste istiden med hjälp av SMC++ analys. Dessa arter båda har begränsade arktiska/alpina utbredningar.
- De sex fjällarter som studeras här klassificeras alla i kategorierna "mycket hög risk" eller "extremt hög risk" för klimatförändringar, vilket tyder på att det är viktigt att noggrant uppskatta populationstrender och övervaka dem i framtiden.
- Vi föreslår två huvudvägar för framtida övervakning av dessa arter:
    - Genetisk övervakning av populationer i framtiden kan användas för att avslöja populationstrender i framtiden och bedöma effekterna av klimatförändringar
    - Omfattande museisamlingar av arten inklusive exemplar >100 år gamla kan användas för att uppskatta genetisk variation i det förflutna och bedöma bevis för populationsminskningar

DISKUSSION

Vi använde helgenomsekvensering för att kartlägga genetisk variation och populationsstruktur hos sex humlearter som är inhemska i de svenska fjällen (n=278) och en utbredd humleart (n=55). Resultaten är användbara för att utvärdera varje arts bevarandestatus, för att utforma framtida genetiska övervakningsprogram och för att informera förvaltningsbeslut. Denna studie ger också baslinjedata för användning vid framtida genetisk övervakning. Nedan diskuterar vi de viktigaste konsekvenserna av våra resultat. Vi redogör också för förslag till framtida genetisk övervakning och för jämförelser med genetisk variation i det förflutna genom sekvensering av museiprover.

Relativt högt N_E i fjällhumlor

Ett värde på N_E för en population mindre än 500 anses i allmänhet vara oroande, vilket tyder på att det kan vara i riskzonen för nedgång eller utrotning (Allendorf et al. 2022). Populationer med lågt N_E kan drabbas av de negativa effekterna av genetisk drift och inavel, vilket gör att skadliga mutationer byggs upp och uttrycks i homozygoter, vilket leder till större dödlighet (Willi et al. 2022). Små populationer är också sårbara för utrotning av andra orsaker. För alla arter som studeras här uppskattar vi att N_E är större än 50 000. Detta tyder på

att arten sannolikt inte kommer att möta omedelbara hot på grund av drift eller inavel. Det är dock viktigt att notera att denna uppskattning av N_E från θ_W återspeglar det harmoniska medelvärdet över evolutionär tid, snarare än att vara en uppskattning specifikt av samtida N_E. Ytterligare studier, som mäter hur genetisk variation förändras över tid i en population, krävs för att avgöra om dagens N_E skiljer sig från denna uppskattning baserat på genomsnittliga mängder av genetisk variation.

Variationer i uppskattningar av N_E mellan arter återspeglar skillnader i deras utbredningsområde och förekomst. *B. pyrrhopygus*, *B. baltatetus* och *B. lapponicus* har N_E nära den som uppskattas för den utbredda arten *B. pascuorum* (~ 200 000), vilket indikerar att deras utbredningsområde och antal individer också är relativt stora. N_E-uppskattningarna liknar också andra utbredda sociala bin, så som honungsbin (Wallberg et al. 2014). Däremot har *B. alpinus*, *B. monticola* och *B. hyperboreus* lägre N_E än de andra fjällhumlearterna. *B. alpinus* och B. *hyperboreus* har en mer begränsad utbredning på högre höjder och breddgrader, och förväntas därför ha mindre populationsstorlekar. Lägre N_E i *B. monticola* är förvånande med tanke på att denna art är ganska vanlig i de svenska fjällen.

Svag populationsstruktur hos fjällhumlor

De sex fjällarter av humlor som studerades här visade inte på tecken för populationsstruktur bland de lokaler där de samlades i Lappland, Jämtland och Härjedalen. Detta indikerar att det inte finns några väsentliga hinder för genflödet och att populationerna historiskt har varit kontinuerliga över den svenska fjällkedjan. Detta ger en viktig baslinje för framtida genetisk övervakning, eftersom förekomsten av populationsdifferentiering i framtiden skulle indikera minskningar.

Flera tidigare studier har undersökt populationsstruktur i humlepopulationer. Studier av genetisk struktur hos berghumlearter från Colorado, USA, inklusive *B. kirbiellus* och *B. lapponicus sylvicola* som är systerarter till två av de arter som studeras här, visar inga bevis för geografisk populationsstruktur inom Klippiga bergen (Christmas et al. 2022). Andra studier har dock funnit bevis för genetisk differentiering av dessa populationer på andra bergskedjor i Nordamerika (Koch et al. 2017; Whitley 2018). I allmänhet har studier i både Europa och Nordamerika visat att relativt vanliga humlearter som *B. terrestris* inte uppvisar mätbar populationsstruktur över tusentals kilometer (Colgan et al. 2022; Ghisbain m.fl. 2020; 2011), medan sällsynta och minskande arter (t.ex. *B. muscorum*) kan visa struktur på ett avstånd av endast 10 km (Darvill et al. 2006). Genetisk differentiering av populationer kan förekomma inom bergskedjor om arter är begränsade till höga höjder, som med *B. bifarius* i den södra delen av dess utbredningsområde i västra USA (Jackson et al. 2018). De resultat som presenteras här överensstämmer därför med observationer från andra studier som indikerar att humlor inte uppvisar populationsstruktur i frånvaro av geografiska barriärer om de inte har särskilt låg förekomst.

Vissa arter visar tecken på inavel och populationsminskningar

Haplodiploida organismer som humlor och andra Hymenoptera (steklar) är särskilt sårbara för inavel eftersom det kan leda till homozygositet vid könsbestämmandelokuset (se Bakgrund). Detta ger diploida hanar, som inte kan befrukta honor. Förekomsten av diploida hanar kan därför allvarligt minska populationens livskraftighet. När en population blir små och inavel är vanligt, kan denna effekt leda till en särskilt extrem utrotningsvirvel (Zayed & Packer 2005).

I vår analys identifierade vi ett exempel på en diploid hane – en *B. hyperboreus* som samlats in i Jämtland. Detta prov hade också den högsta graden av inavel som upptäckts i något prov: >50% av dess genom består av ROH större än 100 kbp i längd. Det var den enda *B. hyperboreus* som samlats in i Jämtland. Det är anmärkningsvärt att detta är den enda observation av *B. hyperboreus* så här långt söderut som rapporterats i Artdatabanken, som har register omfattande de senaste 25 åren, i motsats till alla andra (143) rapporterade observationer, vilka är begränsade till Lappland (majoriteten i närheten av Abisko). Detta indikerar att detta prov påträffades vid eller nära den södra gränsen för artens utbredning i de svenska fjällen. Detta fynd indikerar att inavel kan vara ett stort hot mot populationen av *B. hyperboreus*, särskilt i utkanten av dess utbredningsområde.

Ett litet antal prover av *B. pyrrhopygus* och *B. pascuorum* befanns också ha omfattande ROH. Detta tyder på att inavlade individer förekommer vid detekterbara frekvenser i dessa populationer och det kan vara viktigt att övervaka populationerna i framtiden för ökade mängder av inavel.

Vi utförde också en SMC++ analys för att uppskatta fluktuationer i N_E över populationernas evolutionära historia (Terhorst et al. 2017). Detta analyserar variation i koalescenstid över genomet kan endast utföras med hjälp av populationssekvenseringsdata i genomskala. Förmågan att utföra sådana analyser är en stor fördel med att använda helgenomsekvensering för att kartlägga genetisk mångfald. Ett signifikant resultat av denna analys var att *B. hyperboreus* och i mindre utsträckning *B. pyrrhopygus* visade signaler om populationsminskning under den nuvarande postglaciala perioden under de senaste ~ 10 000 åren. Detta kan tyda på att utbredningsområdet för dessa arter har krympt och att nuvarande N_E är mycket mindre än vad som beräknades från den totala mängden av genetisk variation. Observationen av inavlade individer i dessa arter från ROH-analysen stöder också detta förslag.

Bedömning av arters sårbarhet

Tre av de fjällarter som studeras här, *B. lapponicus, B. monticola* och *B. balteatus*, finns relativt vanligt förekommande i de svenska fjällen. Av dessa finns *B. monticola* också på högre höjder i Storbritannien och i bergskedjor på det europeiska fastlandet, medan de andra arterna är begränsade till de skandinaviska bergen. Enligt IUCN Red List kategoriseras alla dessa arter som "minst oroande" (Rasmont et al. 2015). Men de faller också i klimatriskkategorin HHR (mycket hög risk), vilket indikerar att de förväntas förlora >85% av sitt nuvarande intervall år 2100. Detta innebär att alla dessa arter skulle bebo ett betydligt minskat utbredningsområde i de skandinaviska bergen, och *B. monticola* skulle dessutom förlora mycket av sitt utbredningsområde någon annanstans i Europa utom de höga Alperna.

Vår analys av genomvariation hos dessa tre arter avslöjade inga bevis för minskade mängder av genetisk variation som skulle tyda på att de ligger i den omedelbara riskzonen för att uppleva negativa genetiska effekter på grund av inavel eller genetisk drift. Vi finner att mängder av variation är lägre än väntat i *B. monticola* baserat på dess relativa förekomst, men inga indikationer på populationsminskning eller inavel. Detta tyder på att populationen för närvarande är frisk, även om den kommer sannolikt att hotas starkt av klimatförändringar i framtiden.

De övriga tre fjällsarterna, *B. alpinus*, *B. pyrrhopygus*, och *B. hyperboreus*, har en mycket mer begränsad utbredning i de svenska fjällen och förekommer på högre höjder och breddgrader. Av dessa finns *B. alpinus* också på högre höjder i Alperna, medan de andra är begränsade till Scandinavia. *B. alpinus* och B. *hyperboreus* kategoriseras som "sårbara" enligt rödlistan, medan *B. pyrrhopygus* anses vara "minst oro". *B. hyperboreus* och *B. pyrrhopygus* placeras i HHHR-klimatriskkategorin (extremt hög risk), vilket indikerar att de förutsägs förlora >95% av sitt bebolig habitat framm till år 2100 medan *B. alpinus* placeras i kategori HHR (mycket hög risk).

Bland dessa tre arter finner vi bevis på populationsminskningar eller inavel under evolutionär tid. *B. hyperboreus* är en mindre vanlig art med ett mycket begränsat utbredningsområde och har, till skillnad från de andra arter som studeras här, en specialiserad parasitisk livsstil. Vår analys indikerade att denna art har blivit mycket mindre vanlig under den nuvarande postglaciala perioden, och vi upptäckte en mycket inavlad diploid hanlig individ bland de tio prover vi samlade in. Denna art anses vara en av de mest utsatta för utrotning i Europa (Rasmont et al. 2015) och vår analys tyder på att den kan drabbas av negativa genetiska effekter av populationsminskningar, särskilt i den södra gränsen för dess utbredningsområde. Vi finner också bevis för att B. *alpinus* och *B. pyrrhopygus* uppvisar lägre eller minskande N_E i förhållande till de andra arterna, i överensstämmelse med deras relativt begränsade antal individer och utbredning.

Klimatförändringarna är det största hotet mot de sex fjällhumlearter som studeras här. Vår analys tyder på att deras nuvarande utbredningsområden i de svenska fjällen skulle vara tillräckliga för att stödja friska populationer i framtiden, även om det finns vissa indikationer på inavel och populationsminskningar. Dessa områden förutsägs dock krympa drastiskt under framtida scenarier med klimatförändringar, vilket kan leda till flaskhalsar och fragmentering av populationer och så småningom förlust av alla lämpliga livsmiljöer. Övervakning av dessa populationer med både genetiska och konventionella metoder skulle vara lämpligt, för att förstå hur deras populationer påverkas av förändrade klimat i framtiden.

Rekommendationer för framtida studier av fjällhumlepopulationer

Att inventera arters utbredning och förekomst genom observationer i fält skulle vara ett effektivt sätt att övervaka effekterna av framtida klimatförändringar. För närvarande registreras observationer i Artportalen, men det finns bara några hundra observationer av varje fjällart i denna databas från en period på över 20 år. Detta är otillräckligt för att upptäcka förändringar över tiden och beror främst på bristen på organiserade studiebesök till de svenska fjällen för att identifiera humlor. Under detta projekt genomförde vi fåtal studiebesök till fjällen. Vi var mindre framgångsrika med att samla bergshumlor i de södra delarna av bergskedjan, men om detta beror på slumpen eller återspeglar minskande populationer är omöjligt att veta. Alla fjällarter som studeras här förutspås förlora de södra delarna av sina utbredningsområden och bli mer begränsade till högre höjder och breddgrader på grund av klimatförändringar i framtiden. Det krävs samordnade insatser för att registrera observationer av dessa arter i hela de svenska fjällen för att kunna följa förändringar i deras utbredning.

De data som presenteras här kan användas som baslinje för framtida studier. Temporal förändring i flera statistik med relevans för populationens livskraft kan undersökas (Hoban et al. 2022). För det första kan förändringar i mängder av genetisk variation analyseras med hjälp av observerad och förväntad heterozygositet (H_{OBS} och H_{EXP}) eller med θ_W. För det

andra kan förändringar i N_E övervakas med hjälp av uppskattningar baserade på mått på genetisk variation som θ_W och med hjälp av nyutvecklade metoder baserade på ”linkage disequilibrium”(LD) som är tillämpliga på arter med högre N_E, såsom de flesta insekter (Nadachowska-Brzyska et al. 2022; Hollenbeck m.fl. 2016; Browning & Browning 2015; Santiago m.fl. 2020; Webster m.fl. 2023). För det tredje kan omfattningen av ROH övervakas över tid. Om omfattningen av ROH i en population ökar över tid är detta ett tecken på ökad inavel (Ceballos et al. 2018). Förekomsten av mycket inavlade individer kan också upptäckas och övervakas av denna statistik. För det fjärde kan populationsstrukturen detekteras med hjälp av algoritmer som Admixture (Alexander et al. 2009) och genetiskt avstånd mellan populationer kan uppskattas med hjälp av F_{ST}-statistik.

All statistik som nämns ovan kan användas för att upptäcka förändringar i genetisk variation genom att jämföra värden vid flera tidpunkter. Flera studier har föreslagit tröskelvärden för denna statistik som leder till klassificering av populationer som sårbara eller hotade (Schwartz et al. 2007). Till exempel skulle en förlust av heterozygositet >0,1% per år under en lång tidsperiod leda till en betydande förlust av genetisk variation. En standardbedömning är att 95% av den genetiska variationen bör förutses förbli över 100 år för att överväga att en population inte är sårbar (Allendorf et al. 2022).

Vi föreslår två huvudsakliga uppföljningsstudier: För det första kan ett genetiskt övervakningsprogram användas för att bestämma framtida förändringar i statistiken som nämns ovan jämfört med de initiala värdena som presenteras här. Vi föreslår insamling av alla arter som studeras här med cirka 5 års mellanrum i framtiden för upprepad genetisk analys. En mängd av högst 50 prov totalt per art bör vara tillräcklig, från upp till 10 insamlingsplatser spridda över ett nord-sydligt transekt som omfattar hela deras utbredningsområde i de svenska fjällen. För det andra kan samtida förändringar i genetisk variation avslöjas genom jämförelse med historiska populationer, som kan analyseras med hjälp av genomsekvensering av museiprover. Vi har kontaktat flera museer i Norge och Sverige som rymmer omfattande samlingar, bland annat många exemplar som samlades in för >100 år sedan. Helgenomsekvensering av dessa prover är möjlig genom att ta bort en liten bit vävnad. Detaljerade förslag till dessa uppföljningsstudier finns i bilaga II.

Denna studie har visat nyttan av helgenomsekvensering för att analysera genetisk variation, vilket är både kostnadseffektivt och analyserar all tillgänglig genetisk information hos en individ. Det är särskilt fördelaktigt hos humlor på grund av deras lilla genomstorlek, vilket innebär att flera hundra prover kan sekvenseras samtidigt på samma sekvenseringsfält och ge tillräckliga data. Det skulle därför vara möjligt att genomföra genetisk övervakning av fjällhumlor i framtiden med hjälp av helgenomsekvensering. Helgenomsekvensering är också den optimala tekniken för att läsa av DNA-sekvenser från museiprover (Dabney et al. 2013).

En viktig rekommendation för framtida insatser för att analysera genetisk variation med hjälp av genetisk övervakning skulle vara att genomföra icke-dödliga provtagningar, till exempel genom att ta bort en del av en tarsus, snarare än att ta prover på hela individen. Detta är särskilt viktigt för sårbara arter som *B. hyperboreus* vars populationer potentiellt kan skadas av insamling, med vidhörande avlivning, av individer. Dessa insamlingsmetoder är också tillämpliga på museiprover, som bör förbli intakta efter provtagning.

Förvaltningsutsikter

Förlust av livsmiljöer och användning av bekämpningsmedel är starkt kopplade till minskningar av insekter över hela världen (Cameron & Sadd 2020; Webster m.fl. 2023). Dessa faktorer är dock osannolikt att vara lika viktiga för de humlearterna som studeras här eftersom de svenska fjällen är relativt opåverkade av jordbruk och urbanisering jämfört med övriga Europa. Det finns dock en stor risk att dessa områden blir obeboeliga för de fjällarter som studeras här på grund av ett varmare klimat och dess indirekta effekter på livsmiljö och ekologi.

Det finns några alternativ för förvaltningen om det i framtiden sker allvarliga populationsminskningar av dessa arter. En möjlighet är att aktivt flytta arter till regioner med lämpliga klimat (Thomas 2011), även om detta tillvägagångssätt är kontroversiellt (Webber et al. 2011). De mest hotade arterna som studerats här (*B. alpinus*, *B. pyrrhopygus*, *B. hyperboreus*, *B. balteatus*) förutsägs försvinna från det europeiska fastlandet inom ett sekel. Tre av dessa arter (eller deras systerarter) rapporteras förekomma i den nordligaste delen av Sibiriens Arktis, Alaska, norra Kanada och/eller Grönland, där de sannolikt kommer att kunna överleva längre än i Europa på grund av ett kallare klimat. *B. alpinus* rapporteras inte funnen utanför Europa och skulle därför utrotas om den försvann från kontinenten. Ett potentiellt sätt att bevara hotade skandinaviska arter skulle därför kunna vara att introducera dem till lämpliga livsmiljöer i andra världsdelar eller nordliga ögrupper, som Svalbard. Förflyttningar från dylika populationer skulle också kunna användas för att stödja de skandinaviska. Mer forskning behövs dock för att bekräfta om systerarterna som finns på andra kontinenter är samma eller andra arter än de som studeras här och om de framgångsrikt kan para sig innan de genomför translokationer till områden där dessa systerarter finns (Williams et al. 2019; Martinet et al. 2019).

Slutsats

På grund av den extrema förlust av livsmiljöer som förutsägs för fjällhumlearter på grund av framtida klimatförändringar, är det viktigt att övervaka deras populationer för tecken på utbredningsminskning, populationsminskningar och förlust av genetisk mångfald. Genetisk övervakning skulle kunna vara en viktig del av denna övervakning och skulle möjliggöra tidig upptäckt av tecken på populationsfragmentering eller inavel. Denna studie visar att sådan övervakning är genomförbar och ger den första uppsättningen data som kan användas för ett övervakningsprogram.

METODER

Provinsamling och DNA-extraktion

Individer tillhörande sju humlearter samlades in under sommaren 2021 från flera platser i Sverige. Det innebar studiebesök på höghöjdslokaler i Lappland, Härjedalen och Jämtland för att samla fjällarter och ytterligare samlingar av den utbredda arten *B. pascuorum* på platser i hela Sverige. Ett stort antal medarbetare deltog i insamlingarna. Insamlingsplatser visas i fig. 2, en sammanfattning av samlingar finns i tabell 2 och en fullständig lista över prover och tillhörande data presenteras i tabell S1. Prover togs med svepande handnät och förvarades tillfälligt i Falcon-rör tillsammans med ispaket. Art och kön, och i lämpliga fall kast, för varje prov identifierades med hjälp av en guide (Ødegaard et al. 2015). Prover lagrades i 95% etanol vid -20C. DNA:t extraherades med hjälp av Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit från ett mellanben och bröstkorgsmuskeln som tagits från koxalhålan i mittbenet.

Sekvensering och variantanrop (variant calling)

Parkopplade (paired-end) sekvenseringsbibliotek förbereddes med Nextera DNA Flex Library Preparation Kit och prover sekvenserades på en Illumina NovaSeq6000 med 2 x 150 bp-fragment. Läsdata för varje art mappades till deras motsvarande referensgenom. *B. monticola* och *B. lapponicus* mappades till *B. lapponicus sylvicola* (Pyrobombus) (NCBI-projekt-ID: PRJNA646847). *B. balteatus*, *B. alpinus*, *B. hyperboreas* och *B. pyrrhopygus* mappades till B. *kirbiellus* (tidigare *B. balteatus*, Alpinobombus) (PRJNA704506), och *B. pascuorum* mappades till *B. pascuorum* (*Thoracobombus*) (PRJEB43481). Mappningen utfördes med hjälp av BWA-MEM-algoritmen (Li 2013). Mappningar sorterades och skrevs till bam-filer med hjälp av samtools. Picard användes för att lägga till läsgrupper (read groups) och markera dubbletter (PCR duplicates) i bam-filerna som sedan indexerades i samtools. Varianterna anropades (variant calling) enligt GATK:s bästa praxis för icke-modellarter (https://gatk.broadinstitute.org/hc/en-us/articles/360035535932-Germline-short-variant-discovery-SNPs-Indels-, senaste åtkomst 1 mars 2022). HaplotypeCaller kördes med varje bam-fil med flaggan "-ploidy" för att generera individspecifika gVCF-filer. Alla gVCF-filer slogs samman per contig av GenomicsDBImport och kallades varianter av GenotypeGVCFs. De resulterande variantdatauppsättningarna hårdfiltrerades efter de rekommenderade GATK-tröskelvärdena (https://gatk.broadinstitute.org/hc/en-us/articles/360035890471-Hard-filtering-germline-short-variants, senaste åtkomst 3 mars 2022) för att endast behålla högkvalitativa varianter med hög konfidens.

Ytterligare SNP-filter applicerades med bcftools (Li 2011): (1) endast bialleliska SNP med ett minsta mindre allelantal (minor allele count) på 2 eller högre och exklusive SNP med läsdjup och genotypkvalitet i varje prov under 3 respektive 20, dvs. (-v snps -m 2 -M 2 --min-ac 2:minor -e 'FMT/DP < 3 | FMT/GQ < 20'); (2) Med undantag för platser där uppgifter saknas som överstiger 0,5, dvs. "F_MISSING > 0,5". (3) exklusive platser med högt medeldjup i alla prover och överskridande heterozygositet (INFO/DP > X | INFO/ExcessHet > 25), där X = 1000 var för både *B. pascuorum* och *B. balteatus* datauppsättning och X = 3134 för *B. sylvicola*. De extra filtren INFO/DP och INFO/ExcessHet gjorde det möjligt för oss att ta bort varianter på grund av anpassningar till flera regioner och variantanropsfel. Heterozygota varianter som upptäcktes när HaplotypeCaller kördes med "-ploidy 2" för haploida prover var falska och filtrerades bort för varje kohortdataset. Tre SNP-dataset genererades, motsvarande uppsättningar av prover som mappades till var och en av de tre referensgenomen, redo för de efterföljande analyserna.

För att direkt jämföra mängder av genetisk variation hos *B. lapponicus* och *B. balteatus* med deras systerarter i Nordamerika kombinerades gVCF-filerna som genererades av HaplotypeCaller med en liknande datauppsättning av prover som samlats in tidigare i de amerikanska Klippiga bergen (Christmas et al. 2021, 2022). Varianterna genotypades sedan och filtrerades för de två kombinerade gVCF-filerna enligt samma steg och filter förutom -e 'INFO / DP > 25000' som används för dem. Gränsvärdet 25000 valdes på grundval av INFO/DP-fördelningar i varje kombinerad datauppsättning.

Populationsstruktur

Rekonstruktion av NJ-träd (Saitou & Nei 1987), principal components analyser (PCA) och Admixture (Alexander et al. 2009) analyser utfördes för att avslöja den genetiska mångfalden för varje geografisk population med hjälp av SNP-dataseten. För dessa analyser inkluderades endast SNP med mindre allelfrekvens (minor allele frequency) större än 5%. Skript från

Simon Martin användes för att beräkna avståndsmatris för NJ-träd med hänsyn till blandad ploidi av prover (https://github.com/simonhmartin/genomics_general). Träden gjordes och visualiserades med FastMe (Guindon & Gascuel 2003) respektive FigTree v1.4.4 (http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/). NJ-träden användes för att identifiera prover där artbestämmingen i fält var tvetydig och morfologin för dessa prover studerades av en expert (Björn Cederberg). Detta gav en säker artbestämmelse för alla prover som bekräftas av både genetik och morfologi. Prover analyseras ursprungligen med alla betecknades som diploider, vilket gjorde det möjligt för oss att med säkerhet bekräfta könet för varje prov genom frånvaro av heterozygota loci hos haploida hanar.

PCA-analyser för varje art implementerades i PLINK v1.9 (Chang et al. 2015). För att bättre presentera den geografiska klustringen, ett prov (DA_2) av *B. pascuorum* som överlappade med prov DA_03 avlägsnades på grund av deras nära släktskap, troligen från samma bo. Admixture-programmet användes för 8 körningar av populationsstruktur genom att ange ploidin för varje prov (Alexander et al. 2009). De bästa värdena för K som stöds kontrollerades med hjälp av "korsvalidering" genom att lägga till flaggan "--cv" i det här programmet.

Uppskattning av effektiv populationsstorlek

Effektiv populationsstorlek (N_E) för varje art uppskattades med hjälp av en uppskattning av populationsmutationshastigheten, Wattersons estimator (θ_W), som involverar två ekvationer: $\theta_W = \frac{K}{a_n \text{ (genome size)}}$, där K är antalet SNP:er i arten och a_n är det (n-1):e harmoniska talet, n som betecknar antalet kromosomuppsättningar. N_E kan erhållas med hjälp av en uppskattning av θ_W och en uppskattning av mutationshastigheten per bas μ, baserad på $\theta = 2pN_E\mu$, där p är artens ploiditet (p = 1,5 för humlor, som är haplodiploida) (Fu 1994; Ferretti & Ramos-Onsins 2015). För dessa analyser använde vi en direkt uppskattning av mutationshastigheten från *B. terrestris* ($\mu = 3{,}6 \times 10^{-9}$) (Liu et al. 2017).

Detektion av ”runs of homozygosity” (ROH)

Olika algoritmer kan implementeras för att identifiera ROH som diskuteras i Ceballos et al. (2018) såsom PLINK som skannar varje kromosom genom att flytta ett fönster av fast storlek (Shi et al. 2020) och HMM-metoder i BCFtools/ROH (Grossen et al. 2020). Med finskaliga genomiska data mappade till ett referensgenom kan vi identifiera homozygota segment av genomet som har få eller inga heterozygota positioner, eftersom de två haplotyper som ärvts från föräldrarna är identiska. Distributionen av ROH-regionslängder kan avslöja detaljer om demografisk historia och tidsskalan för inavel. Till exempel ärvs det mindre ROH från avlägsna förfäder, vilket återspeglar äldre inavel, medan långa ROH-regioner återspeglar mer nylig inavel (Ceballos et al. 2018; Grossen et al. 2020)

Segment av ROH för honor från varje art identifierades med flaggan "--homozyg" i PLINK v1.9 (Chang et al. 2015), som använder en glidande fönstermetod för att skanna varje individs genotyp vid varje markör över hela genomet. Följande kriterier definierades för att presentera längden på ROH: (1) en minsta ROH-längd på 10 kb som innehåller minst 50 SNP; (2) Ett maximalt gap mellan på varandra följande SNP på 1 Mb. 3) En densitet på minst en SNP i 50 kb. (4) ett skjutfönster med 50 SNP över genomet med ett SNP-steg; (5) Ingen tolerans för heterozygota platser och högst tre saknade genotyper. (6) ett

standardfönstertröskelvärde på 0,05. Längderna på ROH delades in i tre klasser: 0,01 ~ 0,5 Mb, 0,5 ~ 1 Mb, 1 ~ 1,5 (detekterad maximal längd) Mb.

Härledning av populationsdemografisk historia

SMC++ (Terhorst et al. 2017) användes för att härleda tidigare fluktuationer i N_E. För att säkerställa tillförlitligheten för SNP-anrop (SNP calling) valdes endast honliga prover med lästäckning (read depth) större än 13X ~ för att köra SMC++. Medeldjupet per individ uppskattades med hjälp av flaggan "--djup" i VCFtools (Danecek et al. 2011). De tidigare filtrerade VCF-filerna användes som indata genom att endast behålla dessa exempel. Så småningom användes 49 prover för den demografiska härledning, inklusive sju B. *pascuorum*, 10 *B. monticola* och 11 *B. lapponicus*, samt 12 *B. balteatus* och tre var för *B. alpinus*, *B. hyperboreus* och *B. pyrrhopygus*. Alternativet "composite likelihood (-d)" användes eftersom det innehåller genealogisk information från ytterligare individer i analysen, vilket potentiellt kan leda till förbättrade uppskattningar (Terhorst et al. 2017). Uppskattningar från SMC++ skalades med hjälp av en generationstid (g) på 1 år och en mutationshastighet (μ) $3{,}6 \times 10^{-9}$ substitutioner per baspar och år (se ovan).

Lagring av prover och dataarkivering

Alla prover som samlats in under denna studie lagras i 95% etanol vid låg temperatur (-20 ° C) och är i stort sett intakta förutom avlägsnande av en liten mängd vävnad för DNA-extraktion. Alla sekvensdata som genereras av studien har deponerats vid National Center for Biotechnology Information (NCBI) tillsammans med tillhörande metadata under BioProject PRJNA890771. Skript för bioinformatisk analys finns på GitHub: https://github.com/yzliu01/Swedish_mountain_bumblebee.

MEDARBETARE OCH BIDRAG

Följande personer deltog i provinsamlingen: Matthew Webster (Lappland, Gotland), Aoife Cantwell-Jones (Lappland), Johan Lindell (Lappland), Björn Cederberg (Härjedalen, Uppland, Dalarna), Willhelm Osterman (Jämtland), Peter Nolbrant (Västergötland), Niklas Johansson (Östergötland), Sven Hellqvist (Västerbotten).

Yuanzhen Liu, Anna Olsson och Tuuli Larva utförde DNA-extraktioner. Yuanzhen Liu utförde dataanalysen. Björn Cederberg ritade illustrationer och utförde morfologisk klassificering av några prover. Göran Holmström bidrog med fotografier av studiearten. Turid Everitt och Matthew Christmas bidrog till dataanalysen. Mats Pettersson och Erik Axelsson bidrog med översättningshjälp.

I projektet användes anläggningar vid Abisko naturvetenskapliga station, som är ansluten till SITES (Swedish Infrastructure for Ecosystem Science), INTERACT (International Network for Terrestrial Research and Monitoring in the Arctic) och SLU (Sveriges lantbruksuniversitet).

Beräkningsanalysen möjliggjordes av resurser från Swedish National Infrastructure for Computing (SNIC) vid UPPMAX som delvis finansierades av Vetenskapsrådet genom bidragsavtal nr 2018-05973. Vi uppmärksammar också stöd från National Genomics

Infrastructure (NGI) i Stockholm finansierat av Science for Life Laboratory, Knut och Alice Wallenbergs Stiftelse och Vetenskapsrådet.

REFERENSER

Alexander DH, Novembre J, Lange K. 2009. Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. Genome Res. 19:1655–1664. doi: 10.1101/gr.094052.109.

Allendorf FW, Funk WC, Aitken SN, Byrne M, Luikart G. 2022. *Conservation and the Genomics of Populations*. Oxford University Press.

Browning SR, Browning BL. 2015. Accurate Non-parametric Estimation of Recent Effective Population Size from Segments of Identity by Descent. Am J Hum Genet. 97:404–418. doi: 10.1016/j.ajhg.2015.07.012.

Cameron SA, Hines HM, Williams PH. 2007. A comprehensive phylogeny of the bumble bees (Bombus). Biological Journal of the Linnean Society. 91:161–188. doi: 10.1111/j.1095-8312.2007.00784.x.

Cameron SA, Sadd BM. 2020. Global Trends in Bumble Bee Health. Annu. Rev. Entomol. 65:209–232. doi: 10.1146/annurev-ento-011118-111847.

Ceballos FC, Joshi PK, Clark DW, Ramsay M, Wilson JF. 2018. Runs of homozygosity: windows into population history and trait architecture. Nat Rev Genet. 19:220–234. doi: 10.1038/nrg.2017.109.

Ceballos G, Ehrlich PR, Dirzo R. 2017. Biological annihilation via the ongoing sixth mass extinction signaled by vertebrate population losses and declines. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 114. doi: 10.1073/pnas.1704949114.

Chang CC et al. 2015. Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets. Gigascience. 4:s13742-015-0047–8.

Christmas MJ et al. 2022. A genomic and morphometric analysis of alpine bumblebees: Ongoing reductions in tongue length but no clear genetic component. Mol Ecol. 31:1111–1127. doi: 10.1111/mec.16291.

Christmas MJ et al. 2021. Genetic Barriers to Historical Gene Flow between Cryptic Species of Alpine Bumblebees Revealed by Comparative Population Genomics. Mol Biol Evol. doi: 10.1093/molbev/msab086.

Colgan TJ et al. 2022. Genomic Signatures of Recent Adaptation in a Wild Bumblebee. Molecular Biology and Evolution. 39:msab366. doi: 10.1093/molbev/msab366.

Crozier RH. 1971. Heterozygosity and Sex Determination in Haplo-Diploidy. The American Naturalist. 105:399–412. doi: 10.1086/282733.

Dabney J et al. 2013. Complete mitochondrial genome sequence of a Middle Pleistocene cave bear reconstructed from ultrashort DNA fragments. PNAS. 110:15758–15763. doi: 10.1073/pnas.1314445110.

Danecek P et al. 2011. The variant call format and VCFtools. Bioinformatics. 27:2156–2158. doi: 10.1093/bioinformatics/btr330.

Darvill B, Ellis JS, Lye GC, Goulson D. 2006. Population structure and inbreeding in a rare and declining bumblebee, *Bombus muscorum* (Hymenoptera: Apidae). Molecular Ecology. 15:601–611. doi: 10.1111/j.1365-294X.2006.02797.x.

De Meulemeester T et al. 2016. *European Red List of Bees*. Publications Office of the European Union doi: doi/10.2779/51181.

Des Roches S, Pendleton LH, Shapiro B, Palkovacs EP. 2021. Conserving intraspecific variation for nature's contributions to people. Nat Ecol Evol. 5:574–582. doi: 10.1038/s41559-021-01403-5.

Díez-del-Molino D, Sánchez-Barreiro F, Barnes I, Gilbert MTP, Dalén L. 2018. Quantifying Temporal Genomic Erosion in Endangered Species. Trends in Ecology & Evolution. 33:176–185. doi: 10.1016/j.tree.2017.12.002.

Ellegren H, Galtier N. 2016. Determinants of genetic diversity. Nature Reviews Genetics. 17:422–433. doi: 10.1038/nrg.2016.58.

Ferretti L, Ramos-Onsins SE. 2015. A generalized Watterson estimator for next-generation sequencing: From trios to autopolyploids. Theoretical Population Biology. 100:79–87. doi: 10.1016/j.tpb.2015.01.001.

Formenti G et al. 2022. The era of reference genomes in conservation genomics. Trends in Ecology & Evolution. 37:197–202. doi: 10.1016/j.tree.2021.11.008.

Fu YX. 1994. Estimating effective population size or mutation rate using the frequencies of mutations of various classes in a sample of DNA sequences. Genetics. 138:1375–1386. doi: 10.1093/genetics/138.4.1375.

Ghisbain G et al. 2020. Substantial genetic divergence and lack of recent gene flow support cryptic speciation in a colour polymorphic bumble bee (*Bombus bifarius*) species complex. Systematic Entomology. 45:635–652. doi: 10.1111/syen.12419.

Grossen C, Guillaume F, Keller LF, Croll D. 2020. Purging of highly deleterious mutations through severe bottlenecks in Alpine ibex. Nat Commun. 11:1001. doi: 10.1038/s41467-020-14803-1.

Guindon S, Gascuel O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. Systematic biology. 52:696–704.

Hallmann CA et al. 2017. More than 75 percent decline over 27 years in total flying insect biomass in protected areas. PLOS ONE. 12:e0185809. doi: 10.1371/journal.pone.0185809.

Heimpel GE, de Boer JG. 2007. Sex Determination in the Hymenoptera. Annu Rev Entomol. 53:209–230. doi: 10.1146/annurev.ento.53.103106.093441.

Hoban S et al. 2021. Global Commitments to Conserving and Monitoring Genetic Diversity Are Now Necessary and Feasible. Bioscience. 71:964–976. doi: 10.1093/biosci/biab054.

Hoban S et al. 2022. Global genetic diversity status and trends: towards a suite of Essential Biodiversity Variables (EBVs) for genetic composition. Biological Reviews. 97:1511–1538. doi: 10.1111/brv.12852.

Hoffmann AA et al. 2021. An endangered flightless grasshopper with strong genetic structure maintains population genetic variation despite extensive habitat loss. Ecology and Evolution. 11:5364–5380. doi: 10.1002/ece3.7428.

Hohenlohe PA, Funk WC, Rajora OP. 2021. Population genomics for wildlife conservation and management. Molecular Ecology. 30:62–82. doi: 10.1111/mec.15720.

Hollenbeck CM, Portnoy DS, Gold JR. 2016. A method for detecting recent changes in contemporary effective population size from linkage disequilibrium at linked and unlinked loci. Heredity. 117:207–216. doi: 10.1038/hdy.2016.30.

IPBES. 2019. *Global assessment report on biodiversity and ecosystem services of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services*. Zenodo doi: 10.5281/zenodo.6417333.

IPBES. 2016. *Summary for policymakers of the assessment report of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services on pollinators, pollination and food production.* Zenodo doi: 10.5281/zenodo.2616458.

Jackson JM et al. 2018. Distance, elevation and environment as drivers of diversity and divergence in bumble bees across latitude and altitude. Molecular Ecology. 27:2926–2942. doi: 10.1111/mec.14735.

Kerr JT et al. 2015. CLIMATE CHANGE. Climate change impacts on bumblebees converge across continents. Science. 349:177–180. doi: 10.1126/science.aaa7031.

van Klink R et al. 2020. Meta-analysis reveals declines in terrestrial but increases in freshwater insect abundances. Science. 368:417–420. doi: 10.1126/science.aax9931.

Koch JB, Looney C, Sheppard WS, Strange JP. 2017. Patterns of population genetic structure and diversity across bumble bee communities in the Pacific Northwest. Conserv Genet. 18:507–520. doi: 10.1007/s10592-017-0944-8.

Laikre L et al. 2020. Post-2020 goals overlook genetic diversity. Science. 367:1083–1085. doi: 10.1126/science.abb2748.

Lecocq T, Brasero N, Martinet B, Valterovà I, Rasmont P. 2015. Highly polytypic taxon complex: interspecific and intraspecific integrative taxonomic assessment of the widespread pollinator Bombus pascuorum Scopoli 1763 (Hymenoptera: Apidae). Syst Entomol. 40:881–890. doi: 10.1111/syen.12137.

Lewin HA et al. 2022. The Earth BioGenome Project 2020: Starting the clock. Proceedings of the National Academy of Sciences. 119:e2115635118. doi: 10.1073/pnas.2115635118.

Li H. 2011. A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. Bioinformatics. 27:2987–2993.

Li H. 2013. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. arXiv preprint arXiv:1303.3997.

Liu H et al. 2017. Direct Determination of the Mutation Rate in the Bumblebee Reveals Evidence for Weak Recombination-Associated Mutation and an Approximate Rate Constancy in Insects. Mol Biol Evol. 34:119–130. doi: 10.1093/molbev/msw226.

Lozier JD, Strange JP, Stewart IJ, Cameron SA. 2011. Patterns of range-wide genetic variation in six North American bumble bee (Apidae: Bombus) species. Mol Ecol. 20:4870–4888. doi: 10.1111/j.1365-294X.2011.05314.x.

Lozier JD, Zayed A. 2017. Bee conservation in the age of genomics. Conserv Genet. 18:713–729. doi: 10.1007/s10592-016-0893-7.

Martinet B et al. 2019. Integrative taxonomy of an arctic bumblebee species complex highlights a new cryptic species (Apidae: Bombus). Zool J Linn Soc. 187:599–621. doi: 10.1093/zoolinnean/zlz041.

Nadachowska-Brzyska K, Konczal M, Babik W. 2022. Navigating the temporal continuum of effective population size. Methods in Ecology and Evolution. 13:22–41. doi: 10.1111/2041-210X.13740.

Ødegaard F, Staverløkk A, Gjershaug JO, Bengtson R, Mjelde A. 2015. *Humler i Norge*. Norsk institutt for naturforskning: Trondheim.

Posledovich D, Ekblom R, Laikre L. 2021a. *Mapping and monitoring genetic diversity in Sweden: A proposal for species, methods and costs*. Naturvårdsverket: Stockholm.

Posledovich D, Ekblom R, Laikre L. 2021b. *Mapping and monitoring genetic diversity in Sweden: Suggestions for pollinating species*. Naturvårdsverket: Stockholm.

Potts SG et al. 2010. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. Trends Ecol Evol. 25:345–53. doi: 10.1016/j.tree.2010.01.007.

Rasmont P et al. 2015. Climatic Risk and Distribution Atlas of European Bumblebees. BR. 10:1–236. doi: 10.3897/biorisk.10.4749.

Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution. 4:406–25.

Sánchez-Bayo F, Wyckhuys KAG. 2019. Worldwide decline of the entomofauna: A review of its drivers. Biological Conservation. 232:8–27. doi: 10.1016/j.biocon.2019.01.020.

Santiago E et al. 2020. Recent Demographic History Inferred by High-Resolution Analysis of Linkage Disequilibrium. Molecular Biology and Evolution. 37:3642–3653. doi: 10.1093/molbev/msaa169.

Schwartz MK, Luikart G, Waples RS. 2007. Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management. Trends in Ecology & Evolution. 22:25–33. doi: 10.1016/j.tree.2006.08.009.

Seibold S et al. 2019. Arthropod decline in grasslands and forests is associated with landscape-level drivers. Nature. 574:671–674. doi: 10.1038/s41586-019-1684-3.

Shi L et al. 2020. Estimation of inbreeding and identification of regions under heavy selection based on runs of homozygosity in a Large White pig population. J Animal Sci Biotechnol. 11:46. doi: 10.1186/s40104-020-00447-0.

Soroye P, Newbold T, Kerr J. 2020. Climate change contributes to widespread declines among bumble bees across continents. Science. 367:685–688. doi: 10.1126/science.aax8591.

Terhorst J, Kamm JA, Song YS. 2017. Robust and scalable inference of population history from hundreds of unphased whole genomes. Nat Genet. 49:303–309. doi: 10.1038/ng.3748.

Thomas CD. 2011. Translocation of species, climate change, and the end of trying to recreate past ecological communities. Trends in Ecology & Evolution. 26:216–221. doi: 10.1016/j.tree.2011.02.006.

Wagner DL. 2020. Insect Declines in the Anthropocene. Annu Rev Entomol. 65:457–480. doi: 10.1146/annurev-ento-011019-025151.

Wallberg A et al. 2014. A worldwide survey of genome sequence variation provides insight into the evolutionary history of the honeybee *Apis mellifera*. Nat Genet. 46:1081–1088. doi: 10.1038/ng.3077.

Watterson GA. 1975. On the number of segregating sites in genetical models without recombination. Theoretical Population Biology. 7:256–276.

Webber BL, Scott JK, Didham RK. 2011. Translocation or bust! A new acclimatization agenda for the 21st century? Trends in Ecology & Evolution. 26:495–496. doi: 10.1016/j.tree.2011.06.007.

Webster MT, Beaurepaire A, Neumann P, Stolle E. 2023. Population genomics for insect conservation. Annu Rev Anim Biosci. 11.

Whitley KM. 2018. Genetic structure and gene flow barriers among populations of an alpine bumble bee (Bombus balteatus) in the central Rocky Mountains. M.Sc., Appalachian State University.

Willi Y et al. 2022. Conservation genetics as a management tool: The five best-supported paradigms to assist the management of threatened species. Proceedings of the National Academy of Sciences. 119:e2105076119. doi: 10.1073/pnas.2105076119.

Williams P, Colla S, Xie Z. 2009. Bumblebee Vulnerability: Common Correlates of Winners and Losers across Three Continents. Conservation Biology. 23:931–940. doi: 10.1111/j.1523-1739.2009.01176.x.

Williams PH et al. 2015. Genes Suggest Ancestral Colour Polymorphisms Are Shared across Morphologically Cryptic Species in Arctic Bumblebees. PLOS ONE. 10:e0144544. doi: 10.1371/journal.pone.0144544.

Williams PH et al. 2019. The arctic and alpine bumblebees of the subgenus Alpinobombus revised from integrative assessment of species' gene coalescents and morphology (Hymenoptera, Apidae, Bombus). Zootaxa. 4625:1–68. doi: 10.11646/zootaxa.4625.1.1.

Williams PH, Cameron SA, Hines HM, Cederberg B, Rasmont P. 2008. A simplified subgeneric classification of the bumblebees (genus Bombus). Apidologie. 39:46–74. doi: 10.1051/apido:2007052.

Williams PH, Osborne JL. 2009. Bumblebee vulnerability and conservation world-wide. Apidologie. 40:367–387. doi: 10.1051/apido/2009025.

Zayed A, Packer L. 2005. Complementary sex determination substantially increases extinction proneness of haplodiploid populations. Proceedings of the National Academy of Sciences. 102:10742–10746. doi: 10.1073/pnas.0502271102.

Kompletterande figurer och tabeller

Tabell S1. Sammanfattande statistik över humleprover från Sverige som samlats in och sekvenserats som en del av studien.

Figur S1. Längd av ROHs (Kb) över genomet för varje diploid (honlig) prov av *B. lapponicus.*

Figur S2. Längd av ROH (Kb) över genomet för varje diploid (honlig) prov av *B. monticola.*

Figur S3. Längd av ROH (Kb) över genomet för varje diploid (honlig) prov av B. alpinus, B. *balteatus*, B. *hyperboreus* och *B. pyrrhopygus*.

Figur S4. Längd av ROH (Kb) över genomet för varje diploid (honlig) prov av *B. pascuorum.*

Bilaga I – Bilder av studiearter

Bilaga II – Förslag till ytterligare studier

Tabell 1 – Humlearter som analyserats i denna studie

***Bombus* sp.**	**Undersläktet**	**Engelska**	**Svenska**	**IUCN:s rödlista (3.1)**	**Klimatrisk[1]**	**Distribution i Europa**
alpinus	Alpinobombus	Alpine bumblebee	Alphumla	Sårbar	HHR	Europeiska höglandet och Arktis
pyrrhopygus	Alpinobombus	Polar bumblebee	Polarhumla	Livskraftig	HHHR	Arktisk
balteatus	Alpinobombus	Golden-belted bumblebee	Fjällhumla	Livskraftig	HHR	Skandinaviska höglandet och Arktis
hyperboreus	Alpinobombus	High-Arctic bumblebee	Tundrahumla	Sårbar	HHHR	Arktisk
lapponicus	Pyrobombus	Lapland bumblebee	Lapphumla	Livskraftig	HHR	Skandinaviska höglandet och Arktis
monticola	Pyrobombus	Mountain bumblebee	Berghumla	Livskraftig	HHR	Europeiska höglandet och Arktis
pascuorum	Thoracobombus	Common carder bee	Åkerhumla	Livskraftig	R	Utbredd

[1]Klimatriskkategorier: **HHHR,** extremt hög klimatförändringsrisk, förlust av >95 % av det nuvarande utbredningsområdet fram till 2100; **HHR,** mycket hög klimatförändringsrisk, förlust av >85% av det nuvarande utbredningsområdet år 2100, **HR**, hög klimatförändringsrisk, förlust av >70% av det nuvarande utbredningsområdet år 2100, **R**, klimatförändringsrisk, förlust av >50% av det nuvarande utbredningsområdet år 2100, **LR**, lägre klimatförändringsrisk, <50% förlust av det nuvarande utbredningsområdet till 2100 (Rasmont et al. 2015).

Tabell 2 – Humleprover som används i denna studie.

	Landskap									
Bombus sp.	Lappland	Jämtland	Härjedalen	Västerbotten	Uppland	Dalarna	Östergötland	Västergötland	Gotland	**Total**
alpinus	12	0	0	0	0	0	0	0	0	12
pyrrhopygus	5	1	0	0	0	0	0	0	0	6
balteatus	42	0	1	0	0	0	0	0	0	43
hyperboreus	9	1	0	0	0	0	0	0	0	10
lapponicus	109	16	3	0	0	0	0	0	0	128
monticola	63	1	15	0	0	0	0	0	0	79
pascuorum	23	0	4	8	2	2	4	4	8	55
Antal	**263**	**19**	**23**	**8**	**2**	**2**	**4**	**4**	**8**	**333**

Tabell 3 – Genetisk variation hos sju svenska humlearter

***Bombus* sp.**	**Hane**	**Hona**	**Haploida genom provtagna**	**Antal SNP**	**Watterson's theta per bas (θ_W) (%)**	**Nukleotid diversitet (π) (%)**	**Effektiv populationsstorlek (N_E)**	**Observerad heterozygositet (H_{OBS})**
alpinus		12	24	570 149	0,061	0,08	56 534	0,333
pyrrhopygus		6	12	1 390 927	0,184	0,236	170 545	0,371
balteatus	17	26	69	2 370 054	0,197	0,24	182 673	0,283
hyperboreus		10	20	660 899	0,074	0,099	68 978	0,306
lapponicus	62	66	194	3 095 046	0,21	0,227	194 583	0,280
monticola	28	48	124	1 085 476	0,08	0,091	73 814	0,298
pascuorum	14	41	96	3 800 079	0,241	0,273	222 742	0,218

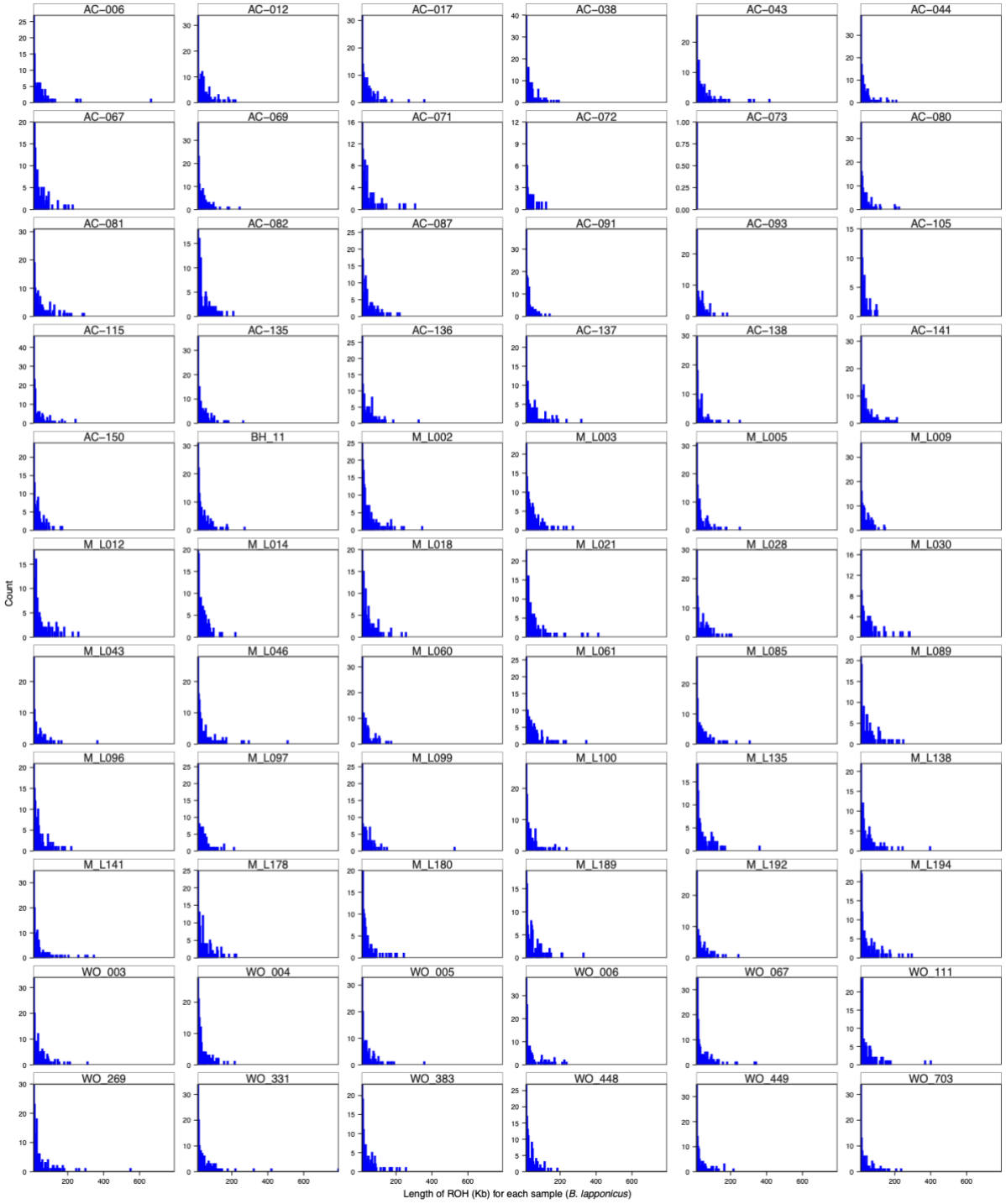
Tabell 4 – Sammanfattande statistik över ”runs of homozygosity” (ROH)

		Antal ROH				
***Bombus* sp.**	**Honor nr.**	**0,01 - 0,1 Mb**	**0,1 - 1 Mb**	**>1 Mb**	**Genomsnittlig total längd per individ (Mb)**	**Genomsnittlig genomtäckning med total ROH (%)**
alpinus	12	301	48	0	1,72	0,69%
pyrrhopygus	6	290	87	0	5,17	2,07%
balteatus	26	4797	55	0	4,51	1,80%
hyperboreus	10	1844	804	1	25,47	10,18%
lapponicus	53	7511	771	0	5,45	2,16%
monticola	49	3799	971	2	6,99	2,77%
pascuorum	41	12329	1325	3	14,42	4,69%

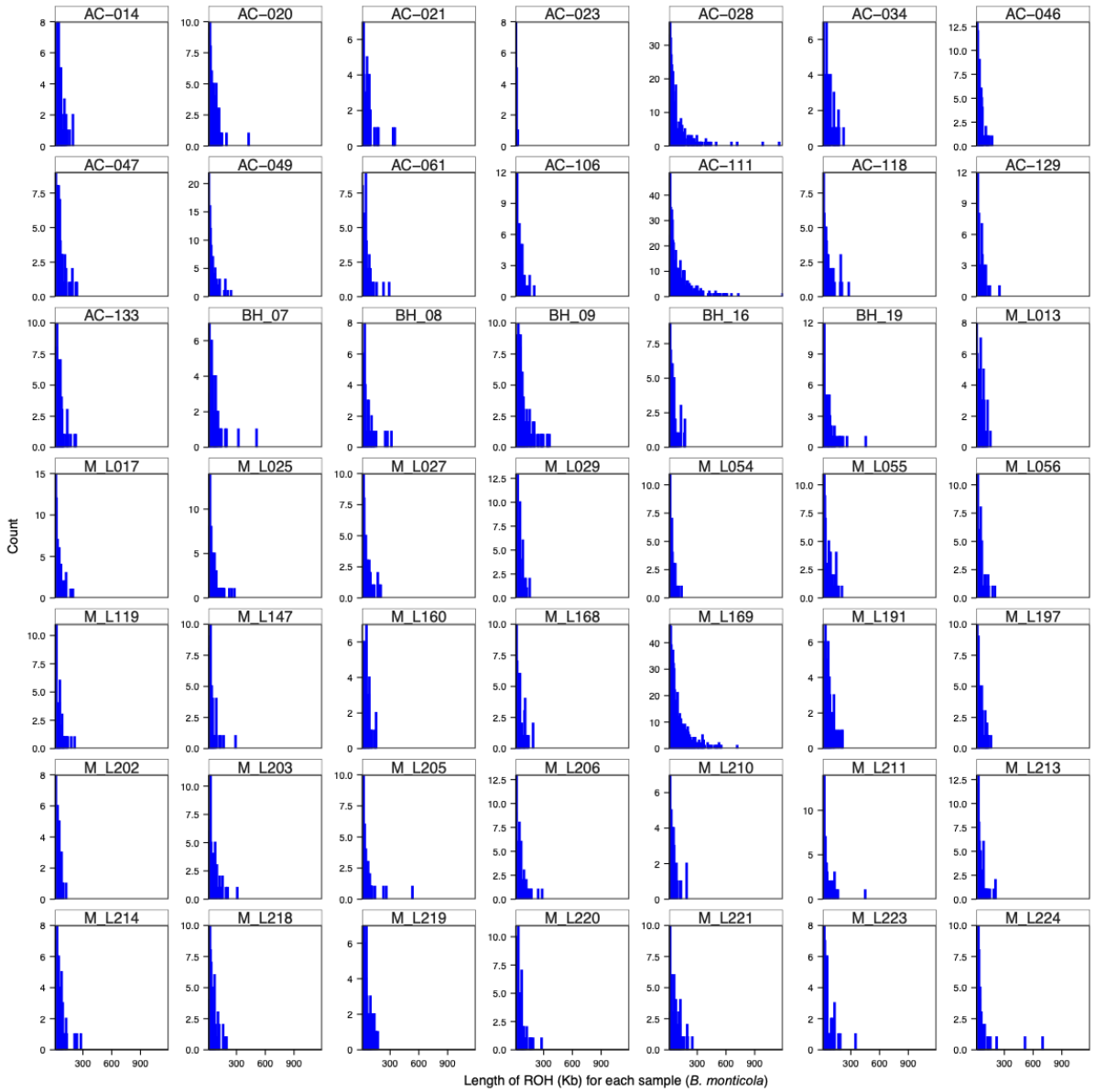
Tabell 5 – Jämförelse av genetisk variation hos besläktade arter från Nordeuropa och Nordamerika.

Art	**Antal haploida genom**	**Antal SNP**	**Watterson's theta per bas (θ_w) (%)**	**Nukleotiddiversitet (π) (%)**	**Effektiv populationsstorlek (N_E)**
B. lapponicus kluster					
B. lapponicus (SWE)	194	2 514 341	0,171	0,161	158 075
B. lapponicus[1] (USA)	428	3 010 424	0,18	0,219	166 652
B. balteatus kluster					
B. balteatus (SWE)	69	2 250 496	0,187	0,207	173 458
B. kirbiellus[2] (USA)	598	5 824 609	0,334	0,271	309 427

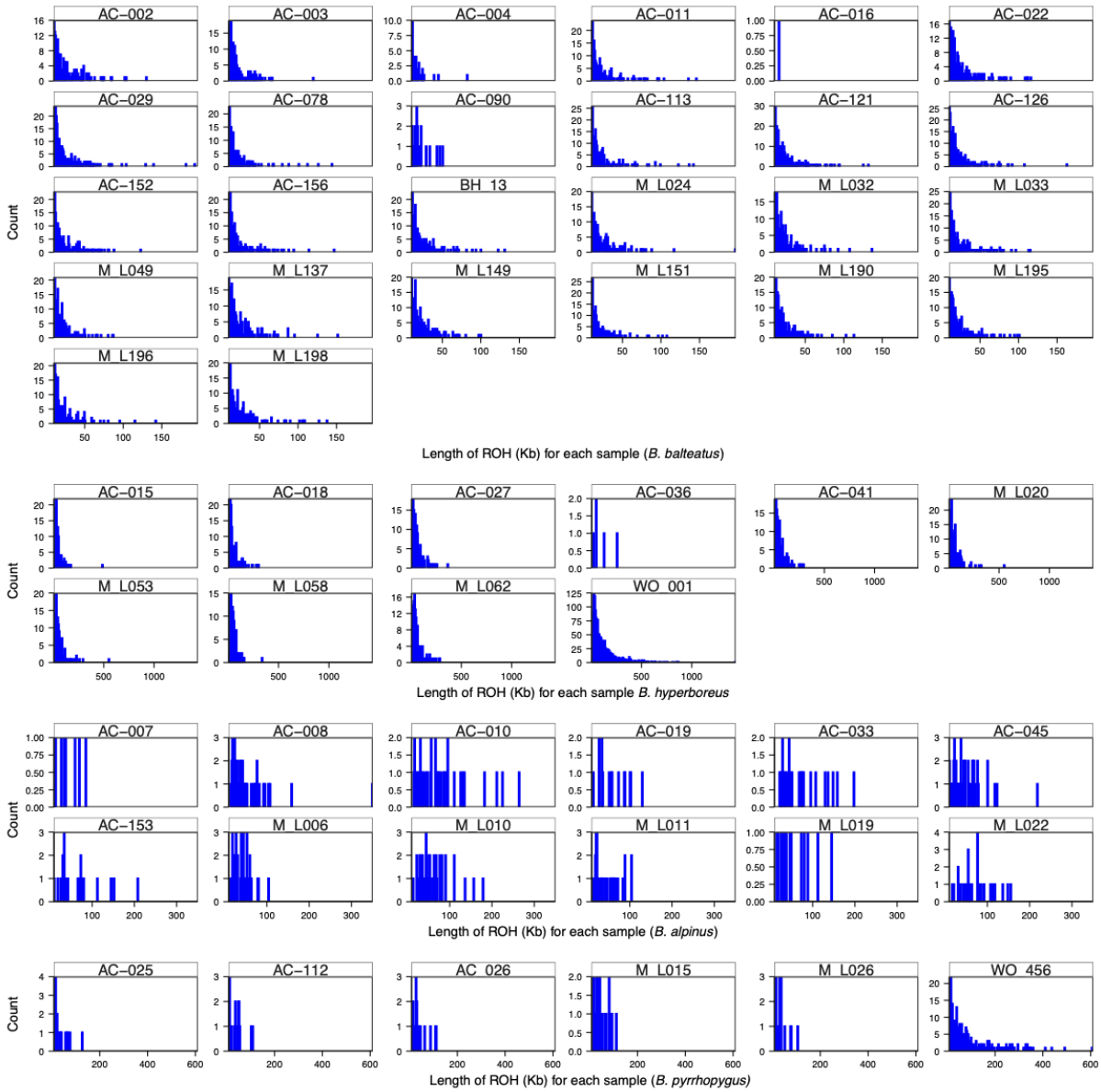
[1]Arten i Nordamerika som för närvarande heter *Bombus lapponicus* (underart *sylvicola*), ansågs tidigare vara en separat art med namnet *Bombus sylvicola* (Martinet et al. 2019).
[2]Arten *Bombus kirbiellus* i Nordamerika har nyligen bytt namn och var tidigare kallats för *Bombus balteatus* (Williams et al. 2019).



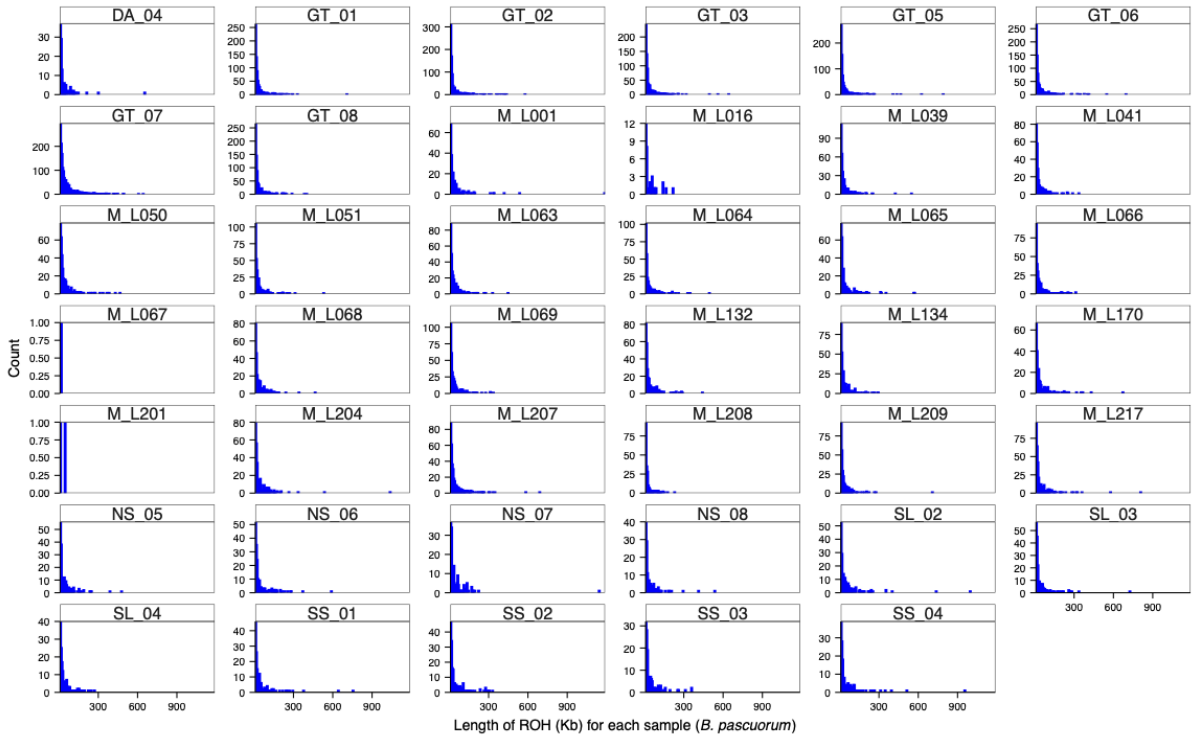
Figur S1. *Längd av ROHs (Kb) över genomet för varje diploid (honlig) prov av B. lapponicus.*



Figur S2. *Längd av ROH (Kb) över genomet för varje diploid (honlig) prov av B. monticola.*



Figur S3. *Längd av ROHs (Kb) över genomet för varje diploid (honlig) prov av B. alpinus, B. balteatus, B. hyperboreus och B. pyrrhopygus.*



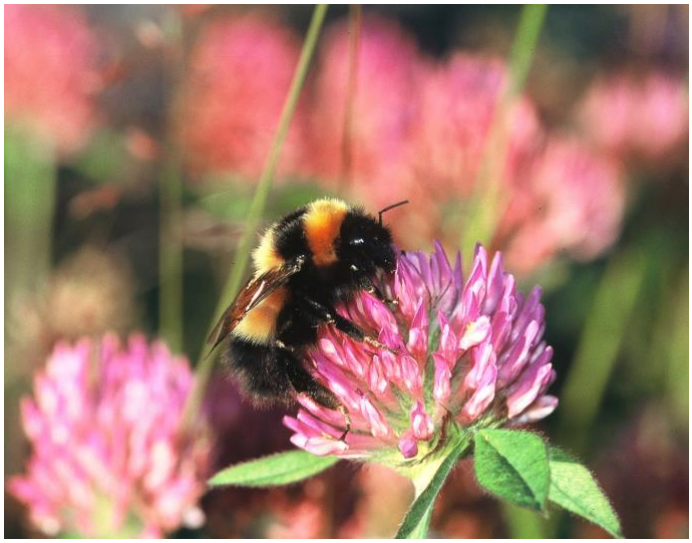
Figur S4. *Längd av ROH (Kb) över genomet för varje diploid (honlig) prov av B. pascuorum.*

BILAGA I

BILDER AV STUDIEARTER

Bombus alpinus

Bombus balteatus



Bombus hyperboreus

Bombus lapponicus

Bombus monticola

Bombus pascuorum
(subsp. *Pallidofacies*)

Alla bilder © Göran Holmström

BILAGA II

FÖRSLAG TILL YTTERLIGARE STUDIER

För att lära oss mer om populationstrender och bevarandestatus för de studerade arterna kan vi jämföra de mönster av genetisk variation som presenteras i denna rapport med populationer i framtiden eller det förflutna. Detta kan göras genom att: 1) upprätta ett genetiskt övervakningsprogram och 2) Analysera genetisk variation med hjälp av historiska museiprover. Här föreslår vi projektplaner och potentiella budgetar för dessa två forskningsprogram.

1) Genetisk övervakning

Ett genetiskt övervakningsprogram skulle kunna genomföras genom att den aktuella studien upprepas med jämna mellanrum i framtiden. En rimlig tidsram skulle vara vart femte år. För varje övervakningstillfälle skulle målet vara att samla in upp till 20 prover av var och en av de sju arterna från de tre orter som redan analyserats (Härjedalen, Jämtland, Abisko – Lappland). Dessa lokaler är lämpliga för att spåra effekterna av klimatförändringar på humlepopulationer eftersom de sannolikt är mer stabila i de norra orterna (Abisko) men mer sårbara i de södra orterna. De sällsynta arter som är mer specialiserade på arktiska klimat har för närvarande ganska stabila populationer på högre höjder i Abisko men är extremt sällsynta i de södra orterna. Vi förespråkar icke-dödlig provtagning av de sällsynta arterna för att förhindra att deras populationer skadas. Bioinformatisk och populationsgenetisk analys kommer att följa den metodik som används i den här rapporten.

Nedan ger vi en potentiell budget för varje femårigt genomförande av genetisk övervakning:

	Kostnader	SEK
1	Löner inklusive sociala kostnader	
	Postdoktor 10 månader	550 250
	Labbassistent 6 månader	330 150
2	Totala driftskostnader	585 600
3	Lokalkostnader	73 000
4	**Delsumma**	1 539 000
5	Indirekta kostnader	353 970
6	**Total projektkostnad**	**1 892 970**
	Specifikation av löpande kostnader	
1	Biblioteksförberedelse av populationsprover	257 600
2	Illumina DNA-sekvensering	168 000
3	Molekylärgenetik förbrukningsvaror	40 000
4	Datorer	20 000
5	Fältarbete	100 000
6	**Totala driftskostnader**	585 600

Budgetposter:
1) Löner inklusive sociala kostnader
En postdoktor i 10 månader, vars ansvar inkluderar a) provinsamling b) projektledning c) sekvensdataanalys d) förberedelse av rapport.
En labbassistent i 6 månader, vars ansvar kommer att omfatta a) provorganisation b) DNA-extraktioner c) samordning med sekvenseringsplattform: National Genomics Infrastructure (NGI), SciLifeLab.

2) Löpande kostnader
2a) Biblioteksförberedelse av prover
I budgeten ingår sekvensering av sekvenseringsbibliotek för 368 prover till en kostnad av 700 kronor per prov. Detta använder Illumina Nextera Flex-biblioteksförberedelser med användar-QC för att minska kostnaderna. Denna tjänst tillhandahålls av NGI.
2b) Illumina DNA-sekvensering
Sekvensering av prover på 4 banor av Illumina NovaSeq med en S4-flödescell. Utföras vid NGI.
2c) Förbrukningsvaror för molekylärgenetik
Kostnad för DNA-extraktion och rening kit och andra lab förbrukningsvaror (rör, pipettspetsar etc.).
2d) Datoranvändning
Datorutrustning för forskningsassistent och postdok, som behövs för projektledning och dataanalys.
2e) Fältarbete
Expeditioner till de svenska fjällen för projektmedlemmar, fältassistenter och för andra samarbetspartners för att samla in humleprover.

3) Lokalkostnader
Kostnader kopplade med att anställa en postdoktor och labbassistent på IMBIM, UU.

4) Indirekta kostnader
23% indirekta kostnader.

2) Analys av genetisk variation i museiprover.

Vi föreslår att analyserar genetisk variation i museiprover från alla sju arter som studeras här samlade vid flera tidpunkter, för att avgöra om de samtida proverna visar en minskning av genetisk variation. En inventering av museiprover av två vanliga fjällarter från större samlingar i Skandinavien presenteras i figur A1 nedan. Vi föreslår att samla in prover från minst 3 olika tidpunkter: >100 år, 50-100 år och 20-50 år. Vi kommer att sträva efter att använda prover som samlats in så nära de samtida insamlingsplatserna som möjligt.

DNA-extraktion från historiska prover kommer att göras i samarbete med Ancient DNA Facility vid SciLifeLab, med icke-destruktiva metoder. Ett enda ben kommer att användas från varje prov för att minimera skador på museiprovet. En bioinformatisk pipeline GenErode finns tillgänglig på SciLifeLab speciellt utformad för analys av genetisk variation i sekvens från historiska prover och jämförelse av prover i olika åldrar. Totalt strävar vi efter att sekvensera minst 10 prover från varje ort och tidpunkt. Eftersom DNA-extraktionen och

bioinformatisk analys är mer utmanande än för moderna prover har vi budgeterat för ett 2-årigt postdok-kontrakt.

Date/Location	*B. balteatus*	*B. lapponicus*
University Museum of Bergen		
pre 1900	7	15
1900-1950	197	272
1950-1980	343	1180
All samples	559	1503
Natural History Museum, Oslo		
pre 1900	5	39
1900-1950	7	56
1950-1980	1	27
All samples	65	261
The Arctic University Museum, Tromsø		
pre 1900	64	107
1900-1950	72	236
1950-1980	0	0
All samples	149	448
Museum of Natural History, Stockholm		
pre 1900	3	5
1900-1950	45	22
1950-1980	88	28
All samples	170	108

Figur A1 – Inventering av historiska humleprover i Skandinavien

Nedan ger vi en potentiell budget för en studie av genetisk variation i museiprover

	Kostnader	**SEK**
1	Löner inklusive sociala kostnader	
	Postdoktor 24 månader	1 320 600
	Labbassistent 6 månader	330 150
2	Totala driftskostnader	530 600
3	Lokalkostnader	146 000
4	**Delsumma**	2 326 750
5	Indirekta kostnader	535 153
6	**Total projektkostnad**	**2 861 903**
	Specifikation av löpande kostnader	
1	Biblioteksförberedelse av populationsprover	252 000
2	Illumina DNA-sekvensering	168 000
3	Molekylärgenetik förbrukningsvaror	40 000
4	Datorer	20 000
5	Resor	50 000
6	**Totala driftskostnader**	530 000

Budgetposter:
1) Löner inklusive sociala kostnader
En postdoktor i 24 månader, vars ansvar inkluderar a) provinsamling från museiprover b) projektledning c) sekvensdataanalys d) utarbetande av rapport.
En labbassistent i 6 månader, vars ansvar kommer att omfatta a) provorganisation b) DNA-extraktioner c) samordning med sekvenseringsplattform: National Genomics Infrastructure (NGI), SciLifeLab.

2) Löpande kostnader
2a) Biblioteksförberedelse av prover
I budgeten ingår sekvensering av sekvenseringsbibliotek för 210 prover till en kostnad av 1200 kronor per prov. Detta använder SMARTer ThruPLEX DNA-seq-biblioteksförberedelsemetoden som är lämplig för analys av historiska prover.
2b) Illumina DNA-sekvensering
Sekvensering av prover på 4 banor av Illumina NovaSeq med en S4-flödescell. Utföras på NGI.
2c) Förbrukningsvaror för molekylärgenetik
Kostnad för DNA-extraktion och rening kit och andra lab förbrukningsvaror (rör, pipettspetsar etc.).
2d) Datoranvändning
Datorutrustning för forskningsassistent och postdok, som behövs för projektledning och dataanalys.
2e) Resor

Postdoktorn kommer att behöva resa till museer för att samla in prover för sekvensering

3) Lokalkostnader
Kostnader kopplade med att anställa en postdoktor och labbassistent på IMBIM, UU.

4) Indirekta kostnader
23% indirekta kostnader.