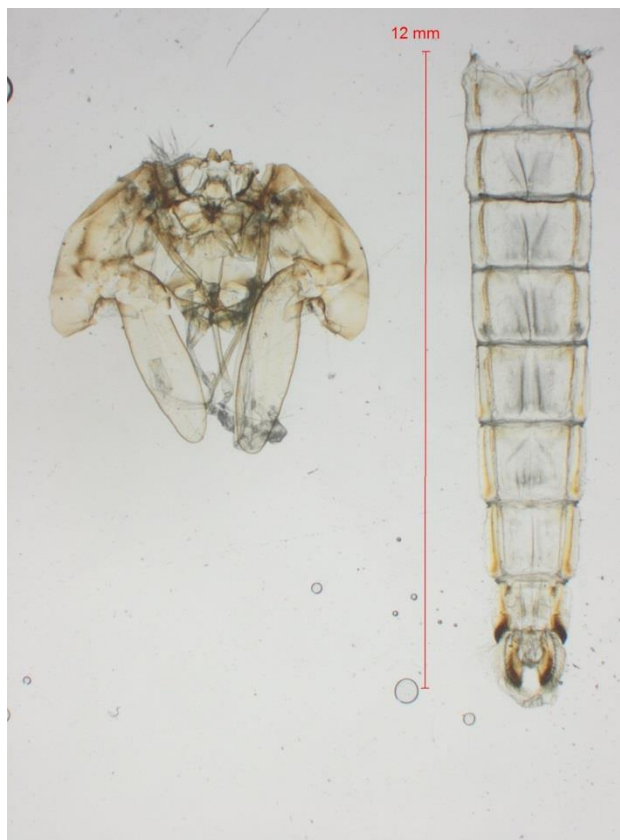


# DNA barcoding, enige ervaringen met Chironomidae



Exuviae van *Chironomus balatonicus*



## **DNA barcoding, enige ervaringen met Chironomidae**

Alexander Klink

**Hydrobiologisch Adviesburo Klink rapporten en mededelingen nr. 124. November 2013 (HAK Project 391)**  
**In opdracht van Naturalis**  
**Contactpersoon Bram Koese**

# Inhoudsopgave

|   |           |
|---|-----------|
| <b>INHOUDSOPGAVE .....</b>                          | <b>I</b>  |
| <b>1. INLEIDING .....</b>                           | <b>2</b>  |
| <b>2. RESULTATEN .....</b>                          | <b>3</b>  |
| <b>3. VOORLOPIGE CONCLUSIES .....</b>               | <b>9</b>  |
| <b>4. AANBEVELINGEN .....</b>                       | <b>10</b> |
| <b>5. LITERATUUR.....</b>                           | <b>11</b> |
| <b>6. SELECTIE VAN VOUCHERS MET SEQUENTIE .....</b> | <b>12</b> |

---

# 1. Inleiding

In het kader van het DNA barcoding project van Naturalis, zijn in 2012 en 2013 actief Chironomidae verzameld en zijn enkele bijzondere soorten uit de referentiecollectie van Hydrobiologisch Adviesburo Klink aangeboden ter amplificatie van het DNA. Het COI gen is gesequenced en sequenties van 600+ baseparen (BP) zijn geïdentificeerd met de BOLD database ([http://www.boldsystems.org/index.php/IDS\\_OpenIdEngine](http://www.boldsystems.org/index.php/IDS_OpenIdEngine)).

Op basis van een aantal praktische voordelen is ervoor gekozen om eerst ervaring op te doen met exuviae (lege poppehuidjes) van Chironomidae. Deze voordelen waren of zijn:

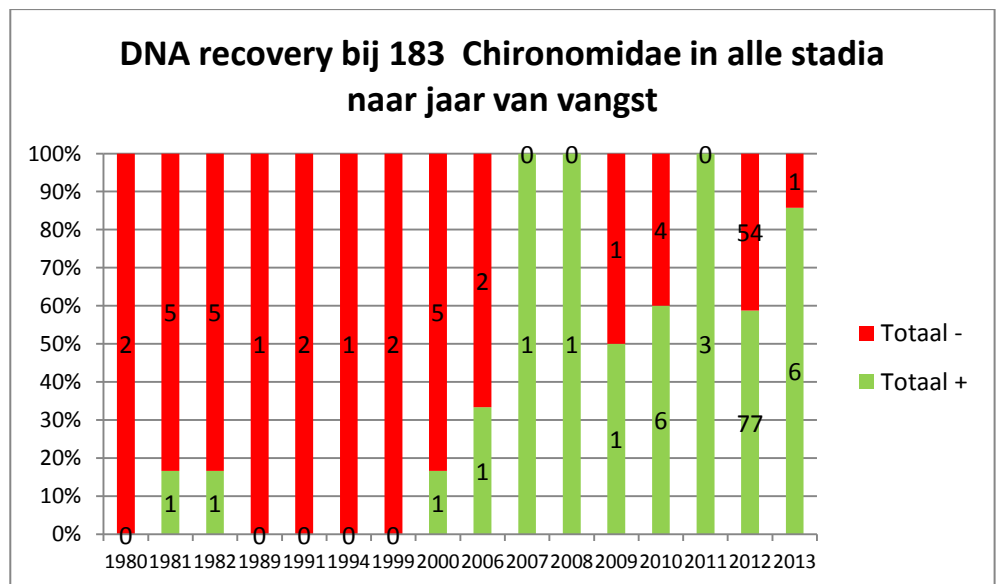
- Een hoge recovery (70%) van amplificeerbaar DNA (Krosch en Cranston, in prep)
- Exuviae zijn vrijwel allemaal tot op soort te determineren in tegenstelling tot ander stadia
- Exuviae zijn eenvoudig te verzamelen in grotere wateren (meren, beken en rivieren)
- Uitzoeken van exuviae-monsters is veel minder tijdrovend dan de andere stadia

In deze mededeling worden de ervaringen gedeeld die een 3 tal platen (ieder 95 wells), voorzien van adulten, larven, poppen en exuviae tot dusver hebben opgeleverd.

## 2. Resultaten

### 2.1. Bruikbaar DNA in relatie tot de leeftijd van het monster

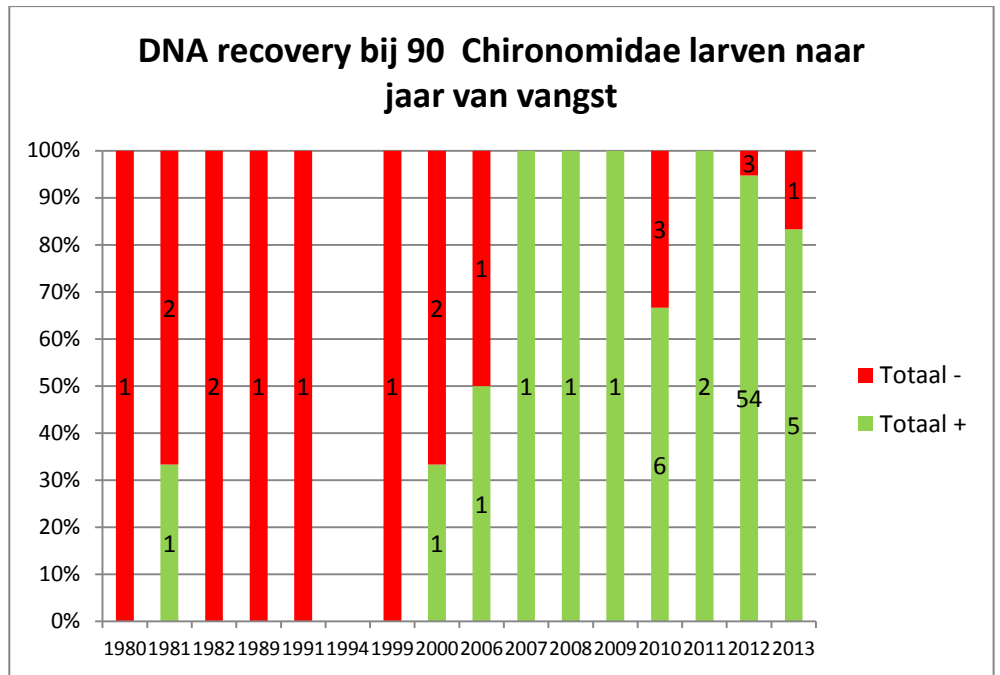
In 2012 en in 2013 zijn actief bemonsteringen uitgevoerd ten behoeve van dit project. In voorgaande jaren zijn specimens van bijzondere soorten van de HAK referentiecollectie toegevoegd. In figuur 1-4 worden de bevindingen besproken van de eerste 2 platen (BCP0061-21 en -30) waarvan het merendeel van het materiaal in 2012 is verzameld.



Figuur 1. DNA recovery van 183 Chironomidae in alle stadia

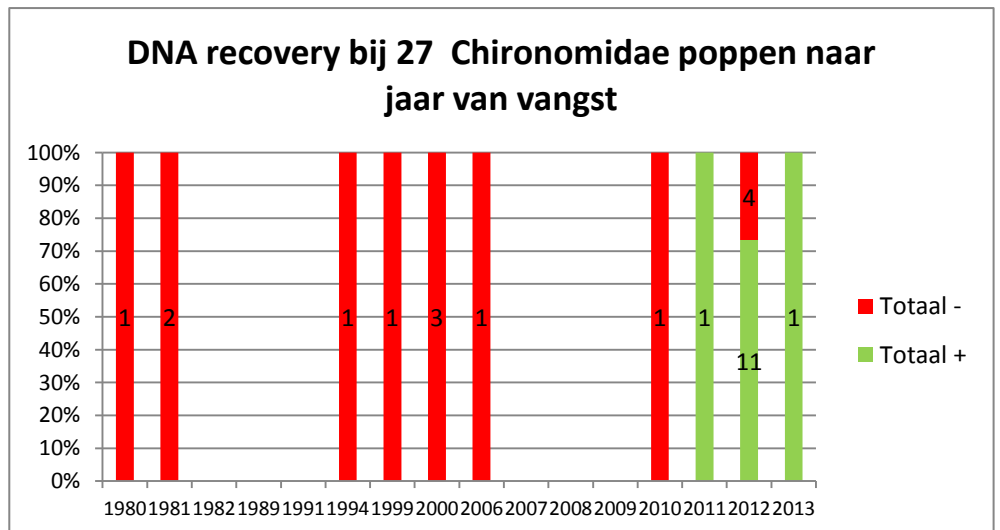
Uit figuur 1 komt naar voren wat al bekend was, “nieuwer is beter”. Recente monsters hebben een recovery van 50% of meer.

De DNA recovery in Chironomidae in alle stadia loopt van 7 naar 13 jaar terug van grofweg 33% naar 20%. Het lijkt toeval dat er nog bruikbaar DNA gevonden is in dieren die > 30 jaar in de ethanol hebben gelegen. In beide soorten betrof het grote aantallen (26 ♂♂ en 54 larven). Mogelijk hecht DNA zich na verloop van tijd over de aanwezige specimen (zie 2.2.2 Spook DNA).



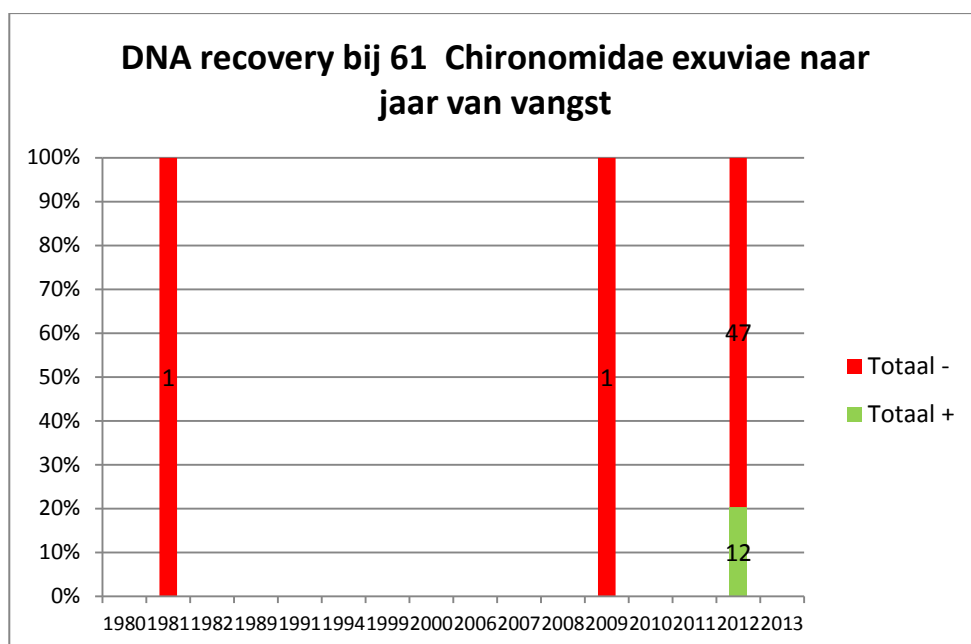
Figuur 2. DNA recovery van 90 Chironomidae larven

De DNA recovery bij larven is ook bij zeer recent verzameld materiaal zeker niet voor 100% gegarandeerd. De recovery van materiaal uit 2012 bedroeg 95% en de 3 specimen die geen signaal hebben afgegeven, behoren tot de kleinste larven. Na 13 jaar is het percentage gedaald naar < 50%.



Figuur 3. DNA recovery van 27 Chironomidae poppen

Bij de poppen zijn er te weinig exemplaren geëxtraheerd om vooral over de recente periode conclusies te trekken. In 2012 lijkt de DNA recovery aanzienlijk geringer dan bij de larven (resp. 73 en 95%). Alles van 2006 en daarvoor bleek niet meer geschikt.



Figuur 4. DNA recovery van 61 Chironomidae exuvia naar jaar van vangst. Bij de exuvia is in de meest recente monsters slechts 20% geschikt gebleken voor sequentie. Dit waren monsters die vanaf 30 april tot 18 mei 2012 zijn verzameld. In 1.2. wordt ook aandacht besteed aan DNA recovery van monsters eerder in het jaar genomen.

## 2.2. Analyse van exuvia in maart 2013 verzameld in de Heelsumse Beek

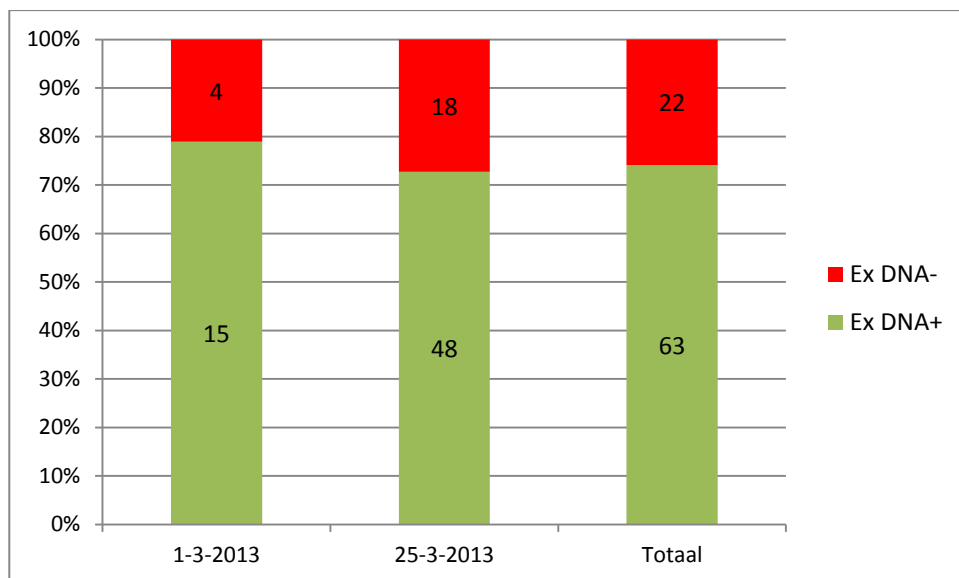
### 2.2.1. DNA opbrengst

Op 1 en 25 maart is een exuvia bemonstering uitgevoerd in de benedenloop van de Heelsumse Beek in Renkum. Een plaat (BCP0061-21) is gevuld met 4 volwassen Chironomidae, 85 exuvia en 6 poppen. De recovery bedroeg respectievelijk 75%, 74% en 83%.

Tabel 1. Verdeling van het al dan niet extraheerbare DNA in de adulten, exuvia en poppen.

| Heelsumse beek | ♂ DNA+   | ♀ DNA-   | Ex DNA+   | Ex DNA-   | P DNA+   | P DNA-   |
|----------------|----------|----------|-----------|-----------|----------|----------|
| 1-3-2013       |          |          | 15        | 4         |          |          |
| 25-3-2013      | 3        | 1        | 48        | 18        | 5        | 1        |
| <b>Totaal</b>  | <b>3</b> | <b>1</b> | <b>63</b> | <b>22</b> | <b>5</b> | <b>1</b> |

Uit figuur 5 blijkt dat de opbrengst van het DNA van de exuvia op beide data vergelijkbaar is (79% en 73%) op 1 en 25 maart.



Figuur 5. Aanwezigheid van bruikbaar DNA in de exuviae van de Heelsumse beek.

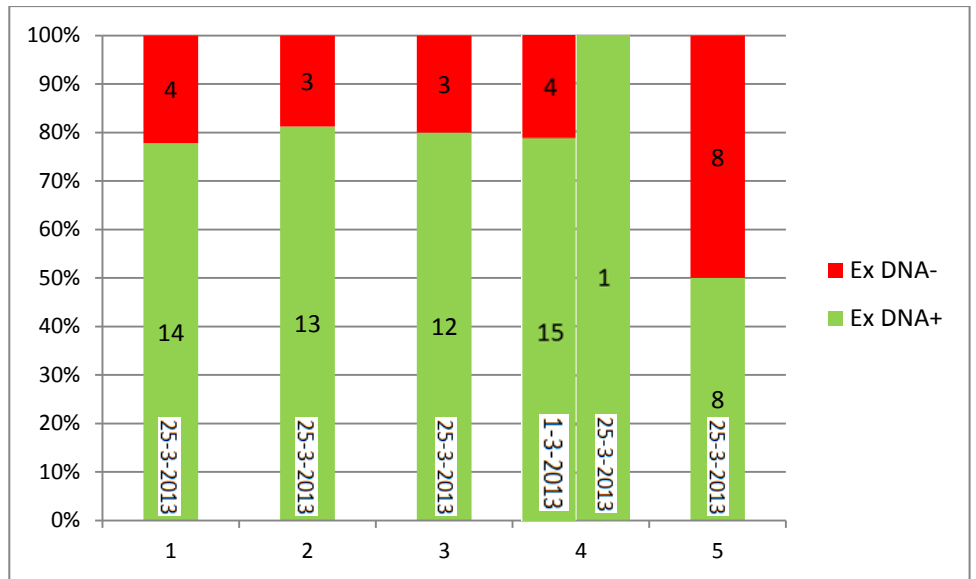
De monsters werden op 5 verschillende manieren behandeld (tabel 2).. Bij behandeling 1 – 3 werd het monster in het veld geconserveerd en binnen 24 uur gezeefd en uitgezocht. Bij behandeling 4 en 5 zijn de monsters direct uitgezocht, geconserveerd en al dan niet in de diepvries bewaard.

Bij het monster van 1-3-2013 is zeer weinig materiaal verzameld, waardoor het monster niet gezeefd behoefde te worden. De monsters op 25-3-2013 bevatten veel materiaal en zijn eerst gezeefd voor het uitzoeken.

Tabel 2. Overzicht van de verschillende behandelingen van de monsters

|   |
|---|
| 1 Veld conserveren 96% goede ethanol, uitzoeken na 18-24 uur en geconserveerd in 96% ethanol            |
| 2 Veld conserveren 96% ethanol gedenateerd, uitzoeken na 18-24 uur en in 96% ethanol                    |
| 3 Veld conserveren 85% spiritus en uitzoeken na 18-24 uur in 96% ethanol                                |
| 4 Naar lab en binnen 4 uur uitgezocht (niet gezeefd) en 24 dagen diepvries geconserveerd in 96% ethanol |
| 5 Naar lab en binnen 4 uur gezeefd, uitgezocht en geconserveerd in 96% ethanol                          |

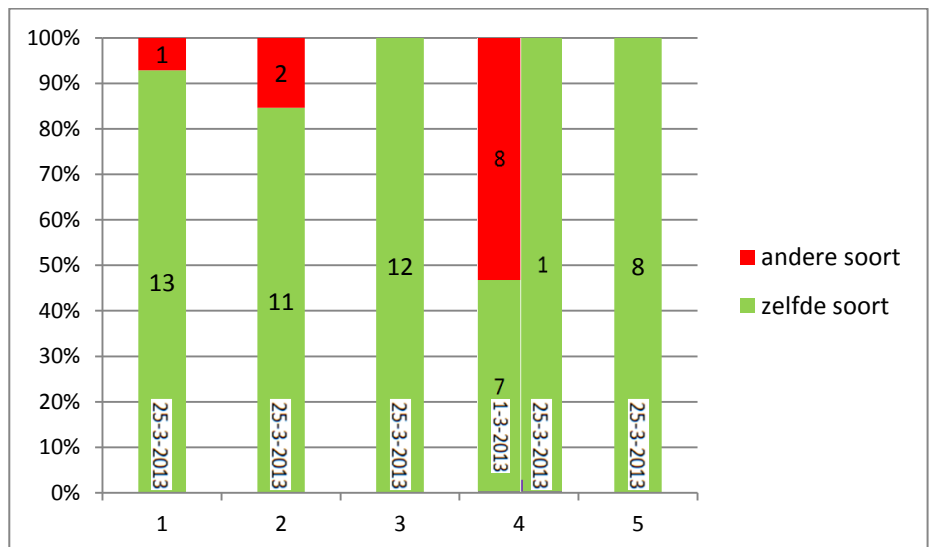




Figuur 6. Opbrengst van de exuvia per behandeling (1-5) op de X-as. Alle behandelingen hebben betrekking op 25-3-2013, behalve de linker kolom op "4" met daarin de resultaten van 1-3-2013. Laten we behandeling 4 op 25-3-2013 buiten beschouwing (slechts 1 exuviae), dan hebben behandelingen 1 – 4 een vergelijkbare opbrengst van ca. 80%. Opvallend lager is de opbrengst bij behandeling 5 (50%). Het lijkt er op dat op 25-3-2013 (onder dezelfde omstandigheden) het DNA al na enkele uren in kwaliteit achteruit gaat. Verder lijkt het niet uit te maken of een monster in het veld geconserveerd wordt met niet-gedenatureerde 96% ethanol (1), gedenatureerde 96% ethanol (2) of spiritus 83% (3).

### 2.2.2. Spook DNA

In de exuvia monsters blijkt "Spook DNA" voor te komen. Dit is DNA van een andere soort dan degene die in de betreffende well is geconserveerd.



Figuur 7. Mismatch tussen de geconserveerde soort en het vermeerderde DNA

Normaal gesproken is dit een vergissing van degene die het materiaal heeft geconserveerd. Hier is echter sprake van een andere situatie. Op beide data domineren exuviae van *Micropsectra contracta* (BOLD database), die als *Micropsectra* zijn gelabeld in de platen. In onderstaande tabel is te een overzicht gegeven van de naam tijdens conservering en de “Bold naam” bij de verschillende behandelingen.

Tabel 3. Verschil tussen geconserveerde soorten en het vermeerderde DNA

| Behandeling                 | 1            | 2            | 3 | 4            | 5 |
|-----------------------------|--------------|--------------|---|--------------|---|
| <i>Eukiefferiella</i>       | <i>M. c.</i> |              |   |              |   |
| <i>Prodiamesa olivacea</i>  |              | <i>M. c.</i> |   |              |   |
| <i>Cricotopus</i>           |              | <i>M. c.</i> |   |              |   |
| <i>Cricotopus</i>           |              |              |   | <i>M. c.</i> |   |
| <i>Prodiamesa olivacea</i>  |              |              |   | <i>M. c.</i> |   |
| <i>Prodiamesa olivacea</i>  |              |              |   | <i>M. c.</i> |   |
| <i>Prodiamesa olivacea</i>  |              |              |   | <i>M. c.</i> |   |
| <i>Eukiefferiella groot</i> |              |              |   | <i>M. c.</i> |   |
| <i>Eukiefferiella klein</i> |              |              |   | <i>M. c.</i> |   |
| <i>Limnophyes</i>           |              |              |   | <i>M. c.</i> |   |
| <i>Limnophyes</i>           |              |              |   | <i>M. c.</i> |   |

In de linker kolom staat de naam waaronder de taxa in de wells zijn geplaatst. In de overige kolommen staat de naam (*M. c.* = *Micropsectra contracta*) waaronder de sequentie in BOLD wordt geïdentificeerd.

Hieruit blijkt dat vooral in het monster van 1-3-2013, dat binnen enkele uren is uitgezocht (behandeling 4 niet geconserveerd en niet gezeefd), meer dan de helft (8 van de 15) van het totaal aan exuviae het DNA van de dominante soort heeft geamplificeerd (*M. contracta*) en niet het eigen DNA. In behandelingen 1 en 2 komt dit ook voor, maar dan “slechts” bij ca. 10% van de exuviae. In dit geval komt het spook DNA uit andere subfamilies en is het eenvoudig te traceren. Het optreden ervan vereist een zeer kritische vergelijking tussen de optische determinatie en de match van de DNA sequentie. Het is zeer wel mogelijk dat een verwante *Micropsectra* soort in deze monsters weggedrukt is door het DNA van de dominante *M. contracta*. Er wordt hier dan ook voor gepleit om de vouchers na de DNA extractie goed te prepareren en de optische determinatie uiterst kritisch uit te voeren.

### 3. Voorlopige conclusies

- Materiaal recenter dan 5 jaar heeft de voorkeur en hoe verser hoe beter.
- Ondanks positieve berichten, blijkt uit dit onderzoek dat DNA van exuviae, dat is verzameld tussen eind april en eind mei 2012, slechts in 20% van de soorten een bruikbaar signaal af te geven.
- Exuviae verzameld in maart 2013 geven in ca. 80% van de soorten een (vaak) bruikbaar signaal af.
- Uit vorige twee punten blijkt DNA langer intact te blijven bij lagere water temperatuur.
- Het verdient aanbeveling om vooral poppen te gebruiken voor DNA extractie, omdat deze wel en larven vaak niet tot op soort te determineren zijn. Dit is een groot nadeel omdat poppen maar in een beperkte periode gevangen kunnen worden en de larven in grote delen van het jaar beschikbaar zijn.
- Materiaal dat na > 30 jaar nog een goed DNA signaal afgeeft is uitzonderlijk en vermoedelijk het gevolg van grote aantallen specimens in de monsterpotjes.
- Het lijkt niet uit te maken of materiaal direct in het veld wordt geconserveerd met al dan niet gedenatureerde ethanol (96% of spiritus (83%).
- Monsters direct in het veld geconserveerd blijken in ca. 10% van de gevallen “spook DNA” te bevatten van de dominante soort in het monster. Dit ondanks het feit dat de monsters gezeefd waren.
- Een monster dat niet is geconserveerd en ook niet is gezeefd voor het uitzoeken, blijkt voor > 50% spook DNA van de dominante soort te bevatten.

## 4. Aanbevelingen

- Op basis van de opgedane ervaringen lijkt het weinig zinvol om materiaal in onderzoek te nemen dat ouder is dan 5-6 jaar.
- Ook exuviae, verzameld in het late voorjaar en zomer leveren te weinig opbrengst.
- Poppen geven wel een goede opbrengst en zijn evenals exuviae meestal tot op de soort te determineren. Het bezwaar dat ze moeilijk te verzamelen zijn kan als volgt worden ondervangen:

Naar de waterschappen een verzoek uit te laten gaan om de al dan niet gedetermineerde Chironomidae poppen van 6 jaar oud en jonger naar Naturalis te sturen voor DNA barcoding, referentiemateriaal en fotocollectie.

- Er dient nog nadere informatie te worden achterhaald naar de omstandigheden waarbij Krosch en Cranston (in prep) wel een hoge opbrengst (70%) realiseren bij exuviae. Relevante vragen zijn:
  - Hebben ze een efficiëntere methode om DNA te verzamelen?
  - Hebben zij in koudere seizoenen materiaal verzameld?
  - Hebben ze ook veel spook DNA in hun resultaten?

## 5. Literatuur

Krosch, M.N., Cranston, P.S., 2012 Non-destructive DNA extraction from Chironomidae of fragile pupal exuviae, extends analysable collections and enhances vouchering. *Chironomus* 25: 22-27

# 6. Selectie van vouchers met sequentie

Op 1 oktober 2013 zijn er 3 platen met Chironomidae ingeleverd, waarvan in totaal 106 taxa zijn geselecteerd als vouchers en deze zijn weergegeven in onderstaande tabel.

| 303DNA | RMNH nr. definite | Plate        | Well | Sequentie Zie ook 391 Sequenties | Match                        |
|--------|-------------------|--------------|------|----------------------------------|------------------------------|
| 513    | RMNH.INS.557420   | BCP0061-21   | A-02 | Trissopelopia longimana          | Trissopelopia longimana      |
| 517    | RMNH.INS.557423   | BCP0061-21   | A-05 | Procladius choreus               | no match                     |
| 518    | RMNH.INS.557424   | BCP0061-21   | A-06 | Cladopelma bicarinata            | no match                     |
| 519    | RMNH.INS.557425   | BCP0061-21   | A-07 | Endochironomus albipennis        | Endochironomus albipennis    |
| 528    | RMNH.INS.557434   | BCP0061-21   | B-04 | Chironomus poss. piger           | Chironomus balatonicus       |
| 529    | RMNH.INS.557435   | BCP0061-21   | B-05 | Parachironomus frequens          | Parachironomus frequens      |
| 532    | RMNH.INS.557438   | BCP0061-21   | B-08 | Phaenopsectra flavipes           | Phaenopsectra flavipes       |
| 536    | RMNH.INS.557442   | BCP0061-21   | B-12 | Harnischia curtilamellata        | Harnischia curtilamellata    |
| 544    | RMNH.INS.557450   | BCP0061-21   | C-08 | Procladius choreus               | Procladius choreus agg.      |
| 549    | RMNH.INS.557455   | BCP0061-21   | D-01 | Psectrocladius oxyura            | Psectrocladius sp. 4TE       |
| 550    | RMNH.INS.557456   | BCP0061-21   | D-02 | Cricotopus sylvestris            | Cricotopus sylvestris        |
| 558    | RMNH.INS.557464   | BCP0061-21   | D-10 | Chironomus melanescens           | Chironomus melanescens       |
| 559    | RMNH.INS.557465   | BCP0061-21   | D-11 | Glyptotendipes pallens           | no match                     |
| 560    | RMNH.INS.557466   | BCP0061-21   | D-12 | Phaenopsectra flavipes           | Phaenopsectra flavipes       |
| 561    | RMNH.INS.557467   | BCP0061-21   | E-01 | Paratendipes albimanus           | Paratendipes albimanus       |
| 562    | RMNH.INS.557468   | BCP0061-21   | E-02 | Cricotopus sylvestris            | Cricotopus sylvestris        |
| 563    | RMNH.INS.557469   | BCP0061-21   | E-03 | Cricotopus bicinctus             | Cricotopus bicinctus         |
| 564    | RMNH.INS.557470   | BCP0061-21   | E-04 | Phaenopsectra flavipes           | Phaenopsectra flavipes       |
| 565    | RMNH.INS.557471   | BCP0061-21   | E-05 | Paratendipes albimanus           | Paratendipes albimanus       |
| 566    | RMNH.INS.557472   | BCP0061-21   | E-06 | Orthocladus oblidens             | no match                     |
| 567    | RMNH.INS.557473   | BCP0061-21   | E-07 | Ablabesmyia longistyla           | Ablabesmyia longistyla       |
| 568    | RMNH.INS.557474   | BCP0061-21   | E-08 | Conchapelopia agg.               | Conchapelopia melanops       |
| 569    | RMNH.INS.557475   | BCP0061-21   | E-09 | Cricotopus bicinctus             | Cricotopus bicinctus         |
| 570    | RMNH.INS.557476   | BCP0061-21   | E-10 | Metricnemus hirticollis agg.     | no match                     |
| 571    | RMNH.INS.557477   | BCP0061-21   | E-11 | Cricotopus albiforceps           | Cricotopus albiforceps       |
| 572    | RMNH.INS.557478   | BCP0061-21   | E-12 | Psectrocladius gr. sordidellus   | Psectrocladius limbatellus   |
| 573    | RMNH.INS.557479   | BCP0061-21   | F-01 | Paratrichocladus rufiventris     | Paratrichocladus rufiventris |
| 574    | RMNH.INS.557480   | BCP0061-21   | F-02 | Thienemanniella flaviforceps agg | Thienemanniella sp.3TE       |
| 575    | RMNH.INS.557481   | BCP0061-21   | F-03 | Cladotanytarsus mancus           | Cladotanytarsus mancus       |
| 576    | RMNH.INS.557482   | BCP0061-21   | F-04 | Rheotanytarsus photophilus       | no match                     |
| 577    | RMNH.INS.557483   | BCP0061-21   | F-05 | Polypedilum sordens              | no match                     |
| 578    | RMNH.INS.557484   | BCP0061-21   | F-06 | Polypedilum scalaenum            | Polypedilum quadriguttatum   |
| 579    | RMNH.INS.557485   | BCP0061-21   | F-07 | Dicrotendipes nervosus           | Dicrotendipes nervosus       |
| 581    | RMNH.INS.557487   | BCP0061-21   | F-09 | Glyptotendipes glaucus/pallens   | no match                     |
| 582    | RMNH.INS.557488   | BCP0061-21   | F-10 | Potthastia longimana             | no match                     |
| 583    | RMNH.INS.557489   | BCP0061-21   | F-11 | Glyptotendipes paripes           | no match                     |
| 584    | RMNH.INS.557490   | BCP0061-21   | F-12 | Parachironomus frequens          | Parachironomus frequens      |
| 585    | RMNH.INS.557491   | BCP0061-21   | G-01 | Parachironomus arcuatus          | Parachironomus arcuatus      |
| 586    | RMNH.INS.557492   | BCP0061-21   | G-02 | Corynoneura scutellata agg       | no match                     |
| 587    | RMNH.INS.557493   | BCP0061-21   | G-03 | Micropsectra lindrothi           | Micropsectra lindrothi       |
| 588    | RMNH.INS.557494   | BCP0061-21   | G-04 | Polypedilum cultellatum          | no match                     |
| 596    | RMNH.INS.557497   | BCP0061-21   | G-07 | Cryptochironomus rostratus       | no match                     |
| 598    | RMNH.INS.557499   | BCP0061-21   | G-09 | Tanytarsus brundini              | no match                     |
| 603    | RMNH.INS.557504   | BCP0061-21   | H-02 | Polypedilum scalaenum            | no match                     |
| 604    | RMNH.INS.557505   | BCP0061-21   | H-03 | Polypedilum nubeculosum          | Polypedilum nubeculosum      |
| 608    | RMNH.INS.557509   | BCP0061-21   | H-07 | Paratanytarsus dissimilis        | Paratanytarsus grimmii       |
| 813    | RMNH.INS.557147   | BCP0081-1KRW | B-02 | Stempellinella                   | Stempellinella brevis        |
| 818    | RMNH.INS.557152   | BCP0081-1KRW | B-07 | Micropsectra                     | no match                     |
| 832    | RMNH.INS.557166   | BCP0081-1KRW | C-09 | Cricotopus                       | Orthocladus dentifer         |
| 856    | RMNH.INS.557190   | BCP0081-1KRW | E-09 | Orthoclaadiinae                  | no match                     |
| 893    | RMNH.INS.557227   | BCP0081-1KRW | H-10 | Rheocricotopus                   | Heterotanytarsus apicalis    |
| 870    | RMNH.INS.557204   | BCP0081-1KRW | F-11 | Micropsectra                     | no match                     |
| 894    | RMNH.INS.557228   | BCP0081-1KRW | H-11 | Micropsectra                     | no match                     |

## DNA barcoding, enige ervaringen met Chironomidae

| 303DNA | RMNH nr. definite | Plate      | Well | Sequentie Zie ook 391 Sequenties  | Match                                |
|--------|-------------------|------------|------|-----------------------------------|--------------------------------------|
| 652    | RMNH.INS.557324   | BCP0061-30 | A1   | Macropelopia adauca               | no match                             |
| 653    | RMNH.INS.557325   | BCP0061-30 | A2   | Prodiamesa olivacea               | Prodiamesa_olivacea 98,91%           |
| 654    | RMNH.INS.557326   | BCP0061-30 | A3   | Odontomesa fulva                  | no match                             |
| 655    | RMNH.INS.557327   | BCP0061-30 | A4   | Heterotrissocladius marcidus      | Heterotrissocladius_marcidus 99,39%  |
| 656    | RMNH.INS.557328   | BCP0061-30 | A5   | Brillia bifida                    | Brillia_bifida 99,33%                |
| 657    | RMNH.INS.557329   | BCP0061-30 | A6   | Conchapelopia melanops            | Conchapelopia_melanops 100%          |
| 659    | RMNH.INS.557331   | BCP0061-30 | A8   | Macropelopia nebulosa             | Macropelopia spec. 99,85%            |
| 661    | RMNH.INS.557332   | BCP0061-30 | A9   | Paracladopelma laminatum          | no match                             |
| 662    | RMNH.INS.557333   | BCP0061-30 | A10  | Phaenopsectra flavipes            | Phaenopsectra_flavipes 99,85%        |
| 663    | RMNH.INS.557334   | BCP0061-30 | A11  | Polypedilum scalaenum             | Polypedilum_pullum (99,85%)          |
| 674    | RMNH.INS.557337   | BCP0061-30 | B2   | Micropsectra notescens            | Micropsectra_notescens 100%          |
| 675    | RMNH.INS.557338   | BCP0061-30 | B3   | Micropsectra apposita             | Micropsectra_contracta 99,69%        |
| 683    | RMNH.INS.557339   | BCP0061-30 | B4   | Tanytarsus pallidicornis          | no match                             |
| 686    | RMNH.INS.557340   | BCP0061-30 | B5   | Paracladopelma laminatum          | no match                             |
| 688    | RMNH.INS.557341   | BCP0061-30 | B6   | Polepedilum pedestre              | Polepedilum_pedestre 99,54%          |
| 690    | RMNH.INS.557342   | BCP0061-30 | B7   | Stempellinella brevis             | Stempellinella_brevis 99,85%         |
| 694    | RMNH.INS.557344   | BCP0061-30 | B9   | Orthocladius dentifer             | Orthocladius_dentifer 99,69%         |
| 695    | RMNH.INS.557345   | BCP0061-30 | B10  | Micropsectra klinki               | Micropsectra_recurvata 99,67%        |
| 696    | RMNH.INS.557346   | BCP0061-30 | B11  | Tanytarsus eminus                 | Tanytarsus_eminus 99,85%             |
| 698    | RMNH.INS.557347   | BCP0061-30 | B12  | Paracladopelma campitolabis       | no match                             |
| 699    | RMNH.INS.557348   | BCP0061-30 | C-01 | Tanytarsus eunucius               | Tanytarsus_eminus 99,85%             |
| 702    | RMNH.INS.557349   | BCP0061-30 | C-02 | Paratanytarsus dissimilis agg     | Paratanytarsus_dissimilis 99,39%     |
| 706    | RMNH.INS.557352   | BCP0061-30 | C-05 | Eukiefferiella claripennis        | Eukiefferiella_claripennis 100%      |
| 767    | RMNH.INS.557354   | BCP0061-30 | C-07 | Demicytichironomus vulneratus     | no match                             |
| 768    | RMNH.INS.557355   | BCP0061-30 | C-08 | Cryptochironomus defectus         | no match                             |
| 769    | RMNH.INS.557356   | BCP0061-30 | C-09 | Polypedilum nubeculosum           | Polypedilum_nubeculosum 99,39%       |
| 770    | RMNH.INS.557357   | BCP0061-30 | C-10 | Polypedilum pullum                | no match                             |
| 774    | RMNH.INS.557358   | BCP0061-30 | C-11 | Thienemanniella spec. A. Cranston | no match                             |
| 775    | RMNH.INS.557359   | BCP0061-30 | C-12 | Corynoneura coronata agg.         | Thienemanniella sp. 3TE 99,39%       |
| 786    | RMNH.INS.557360   | BCP0061-30 | D-01 | Acricotopus lucens                | no match                             |
| 793    | RMNH.INS.557361   | BCP0061-30 | D-02 | Psectrocladius obvius             | Psectrocladius_platypus 99,69%       |
| 794    | RMNH.INS.557362   | BCP0061-30 | D-03 | Psectrocladius gr sordidellus     | Psectrocladius_limbatellus 99,24%    |
| 796    | RMNH.INS.557364   | BCP0061-30 | D-05 | Acricotopus lucens                | no match                             |
| 797    | RMNH.INS.557365   | BCP0061-30 | D-06 | Dasyhelea spec.                   | Dasyhelea_modesta 98,01%             |
| 798    | RMNH.INS.557366   | BCP0061-30 | D-07 | Paratendipes nudisquama           | no match                             |
| 799    | RMNH.INS.557367   | BCP0061-30 | D-08 | Xenopelopia                       | no match                             |
| 915    | RMNH.INS.557371   | BCP0061-30 | D-12 | Polypedilum scalaenum             | Polypedilum_quadriguttatum 99,54%    |
| 916    | RMNH.INS.557372   | BCP0061-30 | E-01 | Polypedilum scalaenum             | Polypedilum_quadriguttatum 99,54%    |
| 917    | RMNH.INS.557373   | BCP0061-30 | E-02 | Polypedilum pullum                | Polypedilum_pullum 99,85%            |
| 926    | RMNH.INS.557382   | BCP0061-30 | E-11 | Orthocladius fuscimanus           | no match                             |
| 928    | RMNH.INS.557384   | BCP0061-30 | F-01 | Orthocladius rhyacobius           | no match                             |
| 929    | RMNH.INS.557385   | BCP0061-30 | F-02 | Orthocladius dentifer             | Orthocladius_dentifer 99,69%         |
| 932    | RMNH.INS.557388   | BCP0061-30 | F-05 | Cricotopus intersectus            | no match                             |
| 934    | RMNH.INS.557390   | BCP0061-30 | F-07 | Cricotopus cf. annulator          | Cricotopus_annulator 99,39%          |
| 937    | RMNH.INS.557393   | BCP0061-30 | F-10 | Cricotopus bosbeek ter Apel       | no match                             |
| 942    | RMNH.INS.557398   | BCP0061-30 | G-03 | Cladotanytarsus lepidocalcar?     | no match                             |
| 943    | RMNH.INS.557399   | BCP0061-30 | G-04 | Cladotanytarsus lepidocalcar?     | no match                             |
| 944    | RMNH.INS.557400   | BCP0061-30 | G-05 | Cladotanytarsus spec.             | Cladotanytarsus_mancus agg. 99,67%   |
| 957    | RMNH.INS.557413   | BCP0061-30 | H-06 | Tanytarsus debilis                | Tanytarsus_veralli 97,09% T. debilis |
| 958    | RMNH.INS.557414   | BCP0061-30 | H-07 | Tanytarsus sylvaticus             | Tanytarsus_sylvaticus 99,54%         |
| 959    | RMNH.INS.557415   | BCP0061-30 | H-08 | Tanytarsus eunucius               | Tanytarsus_eunucius 99,39%           |
| 960    | RMNH.INS.557416   | BCP0061-30 | H-09 | Tanytarsus volgensis              | Tanytarsus spec. 98,46%              |
| 962    | RMNH.INS.557418   | BCP0061-30 | H-11 | Tanytarsus dibranchius            | no match                             |