

Van Boktor naar barcode:

hoe een combinatie van morfologische en moleculaire kenmerken onze kennis van plagen kan versterken

Antoon Loomans
en Roel Potting

Divisie Plant, nieuwe
Voedsel en Waren Autoriteit,
Wageningen

Inleiding

In aantal en in diversiteit vormen insecten veruit de grootste groep organismen ter wereld: 60% van de biodiversiteit in de wereld wordt gevormd door insecten. Naar schatting zijn er meer dan 10 miljoen soorten insecten in de wereld, waarvan er 1 miljoen zijn beschreven. In Nederland zijn ruim 19.000 soorten bekend. Van deze soorten is slechts een relatief klein aantal schadelijk voor plant en/of mens: ongeveer 1200 insectensoorten kunnen op een of andere wijze schadelijk zijn voor land-, tuin- en/of bosbouw. Plaagsoorten van buiten Europa, waarvan we op basis van een risicoanalyse inschatten dat deze in belangrijke mate schade zouden kunnen toebrengen aan land- en, tuinbouwgewassen en bomen, staan op een zogenaamde quarantainelijst. Zowel de Europese Unie als de European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) kennen hun eigen quarantainelijsten (Fytorichtlijn 2000/29/EC en EPPO A1/A2-lijsten), welke voor een deel overlapten. In totaal staan op deze lijsten meer dan 227

verschillende soorten insecten en mijten. Voor deze zogenaamde Quarantaine-organismen zijn, in het geval van vondsten bij import-inspecties of in een teelt, officiële maatregelen vastgelegd die vestiging en verdere verspreiding moeten voorkomen.

Inspecties

Nederland is een belangrijke spil in de internationale handel in planten, snijbloemen, voortkweekingsmateriaal, en boomkwekerijgewassen. Jaarlijks inspecteren nVWA en Keuringsdiensten meer dan 110.000 zendingen van overal uit de wereld. Regelmatig worden er Q-organismen aangetroffen. Zes van de top tien van intercepties van Q-organismen in de EU betreffen insecten: *Bemisia tabaci*, *Liriomyza* spp., *Thrips palmi*, niet-Europese Tephritidae, *Spodoptera littoralis* en *Rhynchophorus ferrugineus*. Identificatie van soorten na een interceptie vindt vooral plaats met behulp van sleutels en tabellen

op basis van morfologische kenmerken van volwassen stadia. In veel gevallen echter wordt in planten en hun producten die in het handelscircuit worden gebracht, het onvolwassen stadium van Q-organismen aangetroffen. Morfologische sleutels en tabellen zijn voor deze stadia vaak niet beschikbaar of ontoereikend. Hierdoor kunnen soorten niet altijd, of slechts moeizaam op naam worden gebracht. Daarnaast zijn gevalideerde moleculaire identificatiemethoden slechts sporadisch voor handen.

Consortium Insecten

Het Consortium Insecten binnen het FES-Programma Versterking Infrastructuur Plantgezondheid was samengesteld uit de nieuwe Voedsel en Waren Autoriteit - divisie Plant (nVWA, de voormalige PD), Nederlands Centrum voor Biodiversiteit (NCB) Naturalis - Afdeling Entomologie, Zoölogisch Museum Amsterdam (ZMA, onderdeel van de Universiteit van Amsterdam), Wageningen University (WU) het Laboratorium voor Entomologie en de leerstoelgroep Biosystematiek. Doel van het project was:

1. Nederlandse insectencollecties te ontsluiten voor fyto-sanitair belangrijke insectensoorten, ontbrekende quarantaine organismen te verzamelen, waarborgen van de kwaliteitsgarantie van identificaties en het maken van een informatiesysteem voor fyto-sanitair belangrijke insectensoorten
2. morfologische en moleculaire knelpuntgroepen te inventariseren, vervolgens voor een aantal belangrijke

groepen sequenties te genereren en praktische moleculaire identificatietoetsen voor belangrijke knelpuntsoorten te ontwikkelen.

3. Daarnaast, in de loop van het project, enkele pilots uit te voeren om te toetsen of in museumexemplaren voldoende genetisch materiaal aanwezig is om als referentiemateriaal te kunnen dienen de voor ontwikkeling van nieuwe identificatiemethoden.

1. Collecties en Database

Collecties

Na inventarisatie van de Nederlandse collecties van ZMA (8 miljoen exemplaren), NCB Naturalis (6 miljoen exemplaren), Wageningen University (570.000 exemplaren) en nVWA – Nationaal Referentie Centrum (NRC, 120.000 exemplaren), bleek dat in Nederlandse collecties slechts 100 van de 227 Q-soorten aanwezig waren. Voor een groot deel van de Q-soorten was dus geen referentiemateriaal beschikbaar. Op zich is dat niet verwonderlijk, omdat de eerste drie collecties vooral tot stand zijn gekomen als resultaat van taxonomisch en faunistisch onderzoek en alleen de nVWA-collectie vanuit een fyto-sanitair perspectief. Insecten en mijten in Nederlandse collecties worden op verschillende manieren opgeslagen, afhankelijk van de grootte en kwaliteit van het materiaal: 1) opgespeld (droge exemplaren; zie afbeelding *Spodoptera*), 2) in de vorm van een microscopisch preparaat (kleine, zachte insecten en mijten) en 3) een collectie op een conserveringsvloeistof zoals alcohol (zachte

Tabel 1. Overzicht van het aantal exemplaren (specimens) van target-groepen (Q en look-alikes), waarvan in de collectie gegevens beschikbaar zijn, en welke reeds in Q-bank zijn ingevoerd.

Groep	Collectie				
	WU-Entomologie	nVWA NRC	ZMA	NCB Naturalis	Totaal
<i>Coleoptera</i>	105	463	97	2077	2742
<i>Diptera</i>	128	466	2015	1370	3979
<i>Hemiptera</i>	2			73	75
<i>Hymenoptera</i>	35			97	132
<i>Lepidoptera</i>	34	127	345	484	990
Eindtotaal	304	1056	2457	4101	7918



Figuur 1. De boorvlieg *Rhagoletis cingulata* (foto Bastian Reijnen, NCB Naturalis 2010).

stadia en soorten, voor moleculaire opslag). De collectie van Wageningen University is medio 2010 naar NCB Naturalis verhuisd.

Uit onderzoek bleek dat veel van het aanwezige materiaal niet geschikt (meer) was voor DNA-isolatie en gen-sequentie: alleen van opgespeld materiaal jonger dan 5 jaar kon zonder problemen een gen-sequentie worden bepaald. Het verzamelen van quarantaine insecten en hun *look-alikes* - via het eigen netwerk en door zelf het veld in te gaan - gaf wisselende resultaten: binnen Europa konden bv. van 108 (van de 237) soorten boorvliegen 512 exemplaren worden verzameld, buiten Europa

Tabel 2. Overzicht van het aantal verzamelde soorten en exemplaren boorvliegen (Tephritidae)

Land	Organisatie	Aantal soorten	Aantal exemplaren
Vietnam	nVWA	3	90
Thailand	nVWA	6	> 250
Burkina Faso	nVWA	4-5	~150
Gambia	nVWA	> 3	>2000
Papoea	ZMA	6 a 7	~ 50
Australië	ZMA	3	~100
Frankrijk	Naturalis	47	210
Servië	Naturalis	48	155
Spanje	Naturalis	37	169
Oekraïne	Naturalis	57	211

werden meer dan 2600 exemplaren verzameld, van een beperkt aantal (ongeveer 25) soorten.

Database

In samenwerking met BioAware is een database ontwikkeld die voor specialisten binnen het consortium toegankelijk is en beheerd kan worden en die sinds 22 juni 2010 voor externen online als Q-bank beschikbaar is via www.q-bank.eu. De insectendatabase geeft toegang tot informatie op het niveau van de soort, en ontsluit de informatie over exemplaren van deze soorten die in Nederlandse collecties aanwezig zijn. Tot op heden zijn gegevens van 1369 taxa en 7918 exemplaren van 233 soorten insecten in Q-bank ingevoerd (Tabel 1).

2. Moeilijk identificeerbare insectengroepen

Morfologische en moleculaire identificatie van knelpuntgroepen

Een doelstelling van het project was het faciliteren van kennisontwikkeling voor het verrichten van identificaties van groepen fyto-sanitair belangrijke insecten, die moeilijk of niet te identificeren zijn op basis van morfologische kenmerken alleen. Bij importinspecties worden vooral onvolwassen stadia gevonden, waarvoor veelal geen gedetailleerde morfologische sleutels bestaan. Hierdoor is identificatie op uiterlijke kenmerken vaak onmogelijk. Ook op (onder)soortniveau zijn identificaties soms lastig op basis van uiterlijke kenmerken alleen. Moleculaire identificatie van deze knelpuntgroepen zou dit probleem kunnen oplossen. Aan de hand van DNA-barcoding verwachten we, met ondersteuning van morfologische kenmerken, het niveau van de identificaties te kunnen verbeteren. Aan de hand van een analyse van het aantal notificaties van onderscheppingen door EU - lidstaten en Nederland, in combinatie met de beschikbaarheid van praktische identificatiemethodieken, zijn de volgende vier groepen gekozen:

- Boorvliegen (Diptera: Tephritidae)
- Uiltjes, geslacht *Spodoptera* (Lepidoptera: Noctuidae)
- Wittevlies, geslacht *Bemisia* (Hemiptera: Aleyrodidae)
- Boktorren (Coleoptera: Cerambycidae)

Boorvliegen (Diptera: Tephritidae)

Wereldwijd zijn meer dan 4000 soorten boorvliegen bekend; 23 daarvan zijn met name



Figuur 2. Een exemplaar van het uiltje *Spodoptera litura* (foto Ernst Neering, copyright nVWA-NRC).

genoemd in Fytorichtlijn 2000/29/EC. Het betreft niet-Europese soorten die behoren tot de geslachten *Anastrepha*, *Bactrocera*, *Ceratitis*, *Dacus* en *Rhagoletis*. Voor het aanvullen van soortinformatie en collecties en het verkrijgen van vers materiaal zijn twee wegen bewandeld: door ZMA is contact gelegd met deelnemers in het International Barcode of Life (BOLD, www.barcodeoflife.org), door diverse partners in het consortium zijn verzamelreizen georganiseerd in Europa, Vietnam, China, Thailand, Gambia, Burkina Faso, Papoea en Australië (Tabel 2).

In het BOLD-demonstratieproject Tephritidae Barcode Initiative (TBI) werken diverse boorvlieg-experts samen om een de identificatie van boorvliegen met behulp van barcodes operationeel te maken. Echter, alleen samenwerking met TBI-partner in Tervuren (B) leverde concrete resultaten op; contacten met andere experts leverde geen uitwisseling van data op. Tijdens verzamelreizen buiten Europa zijn veel exemplaren van een beperkt aantal soorten verzameld. Meest vruchtbaar bleek het verzamelen in Europa zelf (Tabel 2). Van

de 237 Tephritidae-soorten die in Europa voorkomen, zijn nu 197 soorten aanwezig in Nederlandse collecties. Van 173 soorten is barcode-informatie gepubliceerd in BOLD (www.boldsystems.org). Informatie op soortniveau over schadelijke Tephritidae en hun verwanten is via Q-bank beschikbaar. Het bestand bevat naast taxonomische gegevens ook informatie over de aanwezigheid van DNA-barcodes van de betreffende soorten, vermelding van de aanwezigheid van collectiemateriaal bij consortiumpartners, verwijzingen naar recente literatuur over de soorten, en verwijzingen naar identificatiesleutels. Uitgaande van Tephritidae is materiaal van verschillende leeftijden verzameld, geprepareerd en bewaard onder uiteenlopende omstandigheden. We vonden onder andere dat:

- vijf jaar oud materiaal PCR-amplificeerbaar DNA bevat;
- materiaal ouder dan tien jaar niet meer bruikbaar is voor DNA-analyse.

Spodoptera (Lepidoptera: Noctuidae)

Het geslacht *Spodoptera* kent wereldwijd dertig soorten. Op de EU-quarantainelijst staan vier soorten vermeld: *S. littoralis* (herkomst Afrika), *S. litura* (Azië), *S. frugiperda* en *S. eridania* (Noord- en Zuid-Amerika). Door hun grote reproductievermogen (tot 2000 eieren per vrouwtje), korte generatieduur (20-40 dagen), brede waardplantkeuze en het vermogen om snel resistentie te ontwikkelen tegen verschillende groepen gewasbeschermingsmiddelen, vormen deze organismen een reële bedreiging voor de Nederlandse en Europese (glas)tuinbouw. Een snelle en correcte identificatie van deze organismen bij importinspecties is van groot belang. Morfologische identificatie van volwassen vlinders is voor specialisten relatief eenvoudig, maar bij import worden vaak larven en eieren aangetroffen, waarvoor identificatie veel lastiger is. Ontwikkeling van een moleculaire identificatietoets (of commercieel beschikbare kit) voor de vier Q-*Spodoptera*-soorten kan de identificatie aanzienlijk bespoedigen.

Van vier genoemde *Spodoptera*-soorten en dertien verwanten zijn 81 exemplaren verzameld, waaronder zes van de acht Afrikaanse en de meest algemeen voorkomende Amerikaanse soorten (Tabel 3). Van deze exemplaren is de identiteit vastgesteld op basis van externe morfologie en/of geverifieerd door middel van een genitaal-preparaat. Van de 81 exemplaren bleken er 51 geschikt om gensequenties te genereren, zoals *cytochrome oxidase 1* (CO1) en *Elongation Factor 1* (EF). Daarmee is voldoende

moleculaire informatie beschikbaar gekomen om op basis van de sequentieverschillen een voor de nVWA-praktijk bruikbare toets voor de vier quarantainesoorten te ontwikkelen. Het in dit project geïnitieerde onderzoek wordt in vervolgonderzoek in FES-verband verder uitgewerkt, zodat assays ook op inspectielocatie (*on-site*) kunnen worden uitgevoerd om zo sneller en adequater te kunnen detecteren. Met deze nieuwe sequenties, en CO1-data gedeponerd op Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/), is tevens een fylogenetische reconstructie van het geslacht *Spodoptera* uitgevoerd, welke aanleiding geeft tot aanpassingen in de onderlinge verwantschap van soorten. Van de 30 *Spodoptera*-soorten, zijn nu negentien soorten aanwezig in Nederlandse collecties, en zijn exemplaren van zeventien soorten gebarcodeerd. De gegevens zijn opvraagbaar in Q-bank en gepubliceerd in BOLD.

Tabel 3. Overzicht van aantal verzamelde *Spodoptera*-soorten en specimen.

Spodoptera-soort	Specimens				
	Import	Verzamel-reis	Netwerk	Collecties	Totaal
<i>albula</i>	2				2
<i>androgea</i>					
<i>cilium</i>			1	2	3
<i>dolichos</i>	1		1		2
<i>eridania</i>	1		2		3
<i>exempta</i>		1			1
<i>exigua</i>	9			1	10
<i>frugiperda</i>	2		1		3
<i>latifascia</i>	2		4		6
<i>littoralis</i>	12				12
<i>litura</i>	4	1		1	6
<i>malagasy</i>			1		1
<i>mauritica</i>		4	1	3	8
<i>ochrea</i>	2				2
<i>ornithogalli</i>			1		1
<i>pecten</i>				3	3
<i>pectinicornis</i>				1	1
<i>picta</i>	1		1		2
<i>pulchella</i>			1		1
<i>triturrata</i>	1		1	3	5
19 soorten	37	6	15	14	72

Bemisia tabaci (Hemiptera: Aleyrodidae)

Naast de kas-wittevlieg, *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood, 1856) is de tabakswittevlieg, *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889) in Europa schadelijk in kas-teelten. *B. tabaci* is vooral belangrijk als vector van veel plantenvirussen. Vanwege de mogelijke aanwezigheid van virussen in het insect of het plantenmateriaal zijn partijen waarin *B. tabaci* wordt aangetroffen in de EU gereguleerd (Directive 2000/29/EC, Annex IAI). Partijen plantmateriaal van niet-Europese herkomst worden tegengehouden wanneer *Bemisia* aanwezig is. Daarnaast zijn van *B. tabaci* een brede reeks aan biotypen bekend, die kunnen verschillen in waardplantreeks en virulentie. Welke biotypen in Nederland voorkomen was bij aanvang onbekend.

B. tabaci bleek lastig te verzamelen: slechts een tiental monsters kon door NRC worden aangeleverd. Door WU-Entomologie en WU-Biosystematiek is een PCR-identificatiekit voor *B. tabaci* ontwikkeld, op basis van materiaal uit Azië (China, Maleisië). Hiermee kan de identiteit van wittevliegsoorten, *B. tabaci* resp. *T. vaporariorum*, in een importpartij worden vastgesteld. Daarnaast is door beide partners een TaqMan PCR-methode ontwikkeld om verschillende biotypes (B, Q) van *B. tabaci* te identificeren. Vervolgens heeft Plant Research International toetsen ontwikkeld om vast te stellen of in het *B. tabaci*-materiaal virussen aanwezig zijn en welke virussen dit eventueel betreft.

Boktorren (Coleoptera; Cerambycidae)

Boktorren zijn vanwege hun bedreiging als schadelijk organisme in de groene ruimte (*Anoplophora* spp.) of als vector van het dennenhoutaaltje (*Monochamus* spp.) aan het programma toegevoegd. Diagnostische protocollen zijn opgesteld voor de Oost-Aziatische boktor, *Anoplophora chinensis* en de Aziatische boktor *A. glabripennis* voor een adequate morfologische identificatie van adulten en larven. Gedurende het project zijn van 35 verschillende economisch belangrijke boktorsoorten exemplaren verzameld of aangekocht, ter completering van de collecties en als ondersteuning voor de ontwikkeling van moleculaire toetsen. Van alle exemplaren is barcode-informatie gegenereerd waarbij ze tot op soort zijn geïdentificeerd, de collectiegegevens zijn gecompleteerd. Van elk exemplaar is tissue geïsoleerd, sequenties hiervan moeten nog worden gegenereerd. Alle beschikbare informatie, inclusief fotomateriaal (zie afbeeldingen) is in Q-bank terug te vinden.



Figuur 3. Vrouwtje van de boktor *Anoplophora amoena* (foto Theodoor Heijerman, copyright nVWA-NRC).

Dankwoord

Een woord van dank aan de diverse partners binnen het Uitvoeringsconsortium Insecten van het FES-Programma Versterking Infrastructuur Plantgezondheid is hier op zijn plaats:

Jan van Tol, Bastian Reijnen, John Smit en Frank Stokvis (NCB Naturalis, Afdeling Entomologie)
 Herman de Jong en Pasquale Cilberti (Zoologisch Museum Amsterdam, Universiteit van Amsterdam)
 Marcel Dicke, Patrick Verbaarschot en Yde Jongema (Wageningen University, Laboratorium voor Entomologie)
 Freek Bakker en Theodoor Heijerman (Wageningen University, Leerstoelgroep Biosystematiek)
 Ping-ping Chen, Eddy Dijkstra, Joke Fransen, Maurice Jansen, Nico Mentink, Marja van der Straten, Brigitta Wessels-Berk en Bart van den Vossenbergh (nVWA, divisie Plant, Nationaal Referentie Centrum) Ernst Neering en Barend Mechielsen

Pilots

Het verkrijgen van vers materiaal dat geschikt is voor sequencing blijkt vaak een bottleneck voor ontwikkeling en validatie van moleculaire identificatiemethoden. In collecties is veel oud materiaal aanwezig van soorten die als bron zouden kunnen dienen. Onduidelijk is echter of het genetisch materiaal van deze exemplaren in voldoende mate aanwezig of geschikt is om als referentiemateriaal te worden gebruikt. Vaak is het DNA gefragmenteerd en moeten nieuwe methodes worden ontwikkeld om dit materiaal eventueel te kunnen gebruiken. Tijdens het project is nieuwe technologie beschikbaar gekomen die ons in staat stelt om DNA van steeds ouder museummateriaal beschikbaar te maken als referentiemateriaal voor nieuw te ontwikkelen identificatiemethoden. Twee protocollen zijn

getest op aanwezigheid en bruikbaarheid van zogenaamd 'ancient DNA', het PHIRE-protocol en Next Generation Sequencing.

In een eerste pilot experiment is door WU-Biosystematiek het *Phire*-procedé getest op het dijbeen van 23 oude exemplaren van *Spodoptera* en *Cymothoe* (Nymphalidae) verzameld uit de collecties van ZMA, WU-Entomologie, WU-Biosystematiek en Naturalis. Uiteindelijk konden mtDNA COI-fragmenten uit dit materiaal niet worden geamplificeerd en gesequenced, en bleek het *Phire*-protocol voor het bepalen van de COI-barcode niet succesvol.

Een tweede pilot is gericht op Next-Generation Sequencing, waarbij het hele genoom wordt geamplificeerd. *Ceratitis capitata* (Medfly) is als target gekozen en materiaal is wereldwijd verzameld, maar we hopen de resultaten van deze pilot medio 2011 te kunnen publiceren.

Samenvatting van resultaten van het Consortium

- Vijftig fytosanitair belangrijke soorten zijn toegevoegd aan Nederlandse collecties; van de 227 soorten zijn nu 150 soorten beschikbaar.
- De Nederlandse insectencollecties zijn gekoppeld in een publiek toegankelijke database: Q-bank.
- Toetsen op basis van DNA-barcodes zijn ontwikkeld voor de vier *Spodoptera*-soorten en voor *Bemisia tabaci*.
- Verder is er een goede basis gelegd voor verdere samenwerking binnen nationale (FES biodiversiteit) en internationale projecten, zoals het EU-KP7project Quarantine Barcode of Life (QBOL). Het QBOL project is in belangrijke mate complementair aan het FES-project en resultaten van beide projecten worden gezamenlijk in Q-bank opgenomen.