

Toepassingen van moleculaire technieken voor entomologisch onderzoek bij PPO-BBF

Khanh Pham
Miriam Lemmers
Maarten de Kock
Suzanne Lommen

(moleculaire biologie)
(insectenkweek- en monitoring & serologie)
(epidemiologie virussen en fytoplasma's)
(entomologie)



'Ziek en zeer' door insecten

- Bollenmijten/Stromijten
- Bamboemijten
- Bladluizen
- Mijten
- Perenbladlvlooiën
- Cicaden

- Roofmijten

Waarom

schade aan gewas

schade aan gewas

overdracht virussen

overdracht virussen

overdracht fytoplasma's

overdracht fytoplasma's

predator, biologische gewasbescherming

'Ziek en zeer' door insecten

- Bollenmijten/Stromijten
- Bamboemijten
- Bladluizen
- Mijten
- Perenbladlvlooiën
- Cicaden

- Roofmijten

Entomologische kennis nodig:

- herkenning
- levenscyclus
- biologische en chemische vijanden
- betrokkenheid als vector

Toepassingen van moleculaire technieken bij entomologisch onderzoek, *waarom?*

- Soortherkenning is vaak lastig: kennis van taxonomen is altijd nodig.
- Voor morfologische identificatie moeten vaak mannelijke en vrouwelijke exemplaren gebruikt worden.
- Identificeren op larven en eitjes is niet mogelijk.
- Ondersteunen de taxonomie en fylogenetische analyses.
- Snelle toetsen voor diagnostische doeleinden.
- (Bestuderen van epidemiologie)

Toepassingen van moleculaire technieken bij entomologisch onderzoek, *hoe*?

- Bepalen de genetische gegevens van beschikbare soorten (goed morfologisch gedetermineerd). DNA isoleren, PCR met generieke primers-targetgen (COI, COII, COIII, NADH, ITS, 16S...), sequencen.
- Bestuderen de genetische verschillen tussen de soorten. BLAST search (vergelijken met sequenties in de Genbank), alignment sequenties, fylogenetische boom.
- Ontwikkelen detectie primers voor verschillende soorten gebaseerd op de verschillen in de sequenties. Toepassen op DNA van eitjes en larven.



Bladluizen, *Stijger, Lemmers, De Kock, Piron*

Veel voorkomende soorten in tulpenvelden

- *Aphis spp.*
 - *Aphis fabae* groep
 - *Myzus persicae*
 - *Sitobion avenae*
 - *Acyrtosiphon pisum*
 - *Rhopalosiphum padi*
 - *Macrosiphum euphorbiae*
 - en...andere 37 soorten
-
- moleculaire karakterisatie te complex
 - wel... virusdetectie in bladluis (*risk assessment*)



Bollenmijten/Stromijten, *Conijn, Vink, Lommen, Pham*

- Bollenmijten
 - *Rhizoglyphus echinopus*, Tulpen
 - *Rhizoglyphus robini*, Lelie
 - *Rhizoglyphus* spp. Narcis/ Arisaema
- Stromijten
 - *Tyrophagus* spp., *T. putrescentiae*...?
 - (*T. longior*,)
 - (*T. neisewanderi*,)
- Tulpengalmijt
 - *Aceria tulipae*
 - *Aceria tosichella* (wheat curl mite)
- Toetsontwikkeling voor specifiek detectie

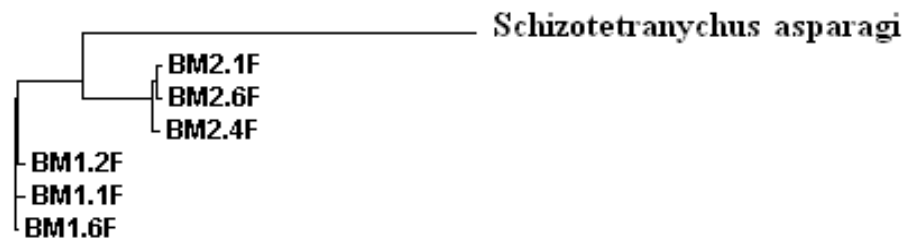


Bamboemijten, *de Blok, Vierbergen, Van Kuik, Pham*

- *Stigmaeopsis celarius (BM1)*
- *Stigmaeopsis nanjingensis (BM2)*
- *Schizotetranychus bambusae*
- *Schizotetranychus approximatus*



Phylogram



1 2 3 4 5 6 7 8 9



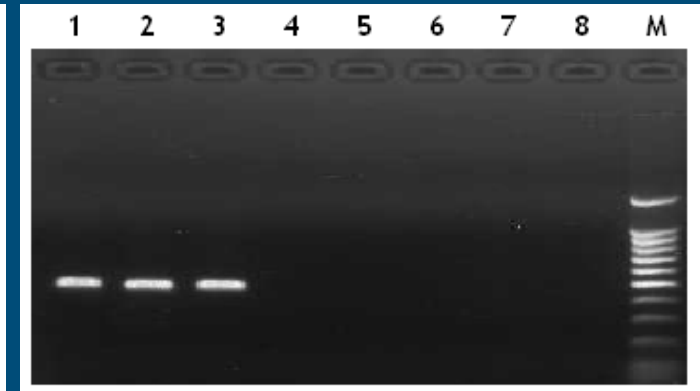
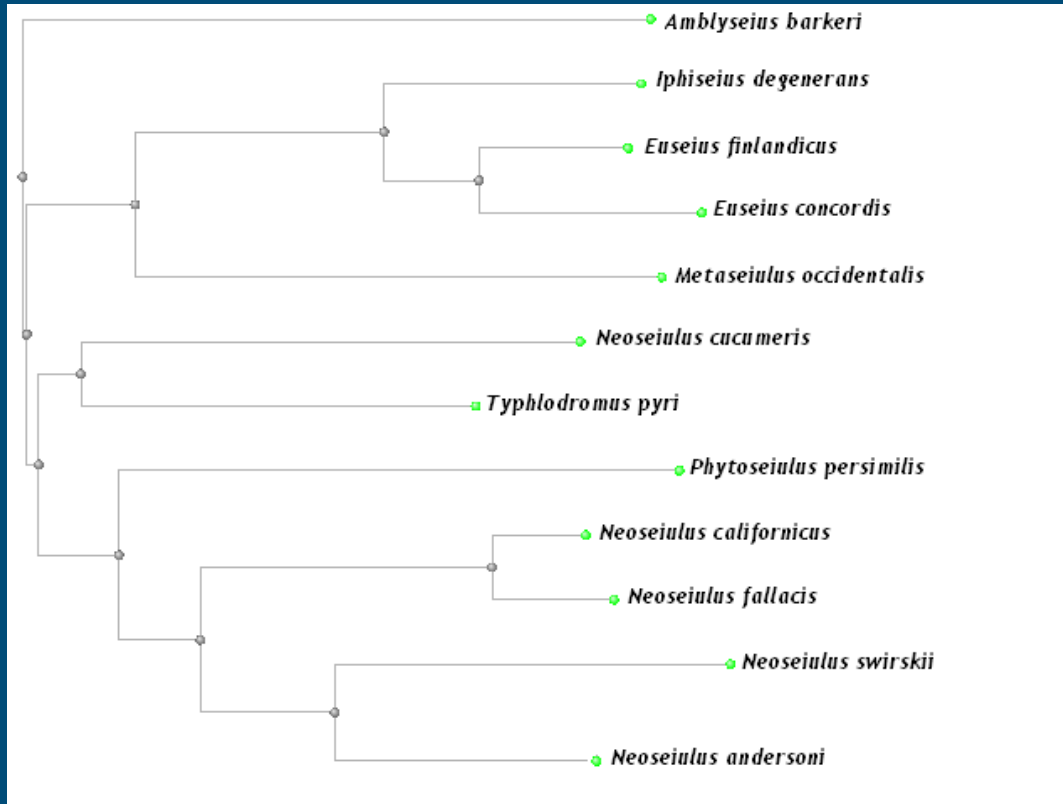
Roofmijten (family *Phytoseiidae*), van der Linden, Ramakers, Pham

- *Neoseiulus californicus*, **N.** *cucumeris*, **N.** *fallacis* ; (A.)
- *Amblyseius* (N.) *andersoni*, *Typhlodromips* (A.) (N.) *swirskii*,
- *A.* (N.) *alpinus*, **N.** (A.) *barkeri*, **N.** (A.) *reductus*
- *Euseius ovalis*, *Typhlodromips montdorensis*, *T. limonicus*
- ITS-sequencing ondersteunt taxonomie



Roofmijten (family Phytoseiidae)

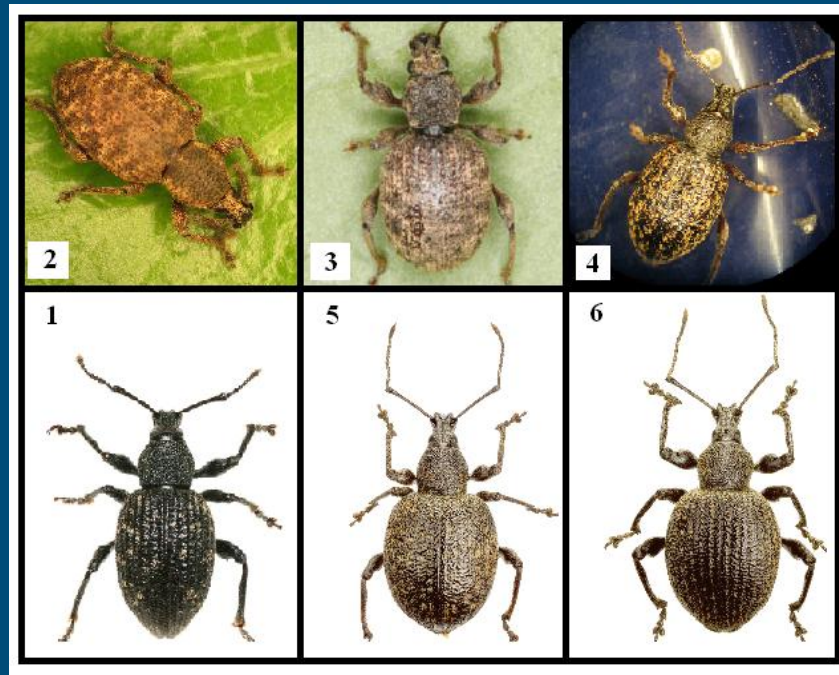
Detectieprimers voor *N. andersoni* en *N. swirskii*



Otiorhynchus, Hellingman, Gkotsi, Elberse, Pham

in Nederland

- Several *Otiorhynchus* spp., 1: *Otiorhynchus sulcatus*, 2: *O. singularis*, 3: *O. crataegi*, 4: *O. aurifer*, 5: *O. armadillo* and 6: *O. salicicola* (source 5, 6: T. Heijerman).



Otiorhynchus in Nederland

Detectietoetsen voor verschillende soorten

CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

```

O.salicicola1      ACTCCAAGAGAGAGCATCCCCACTTATAGAACAACTTATATTCTTCCATG 50
O.salicicola2      ACTCCAAGATAGAGCATCCCCACTTATAGAACAACTTATATTCTTCCATG 50
O.aurifer1        ACTTCAGGATAGAGCATCCCCITTAATAGAAGCTAATAATTTTTTCACG 50
O.aurifer2        ACTTCAGGATAGAGCATCCCCITTAATAGAAGCTAATAATTTTTTCACG 50
O.armadillo1      ACTACAAGATAGAGCTTCTCCTCTTATAGAACAACTTACATTCTTTTCACG 50
O.armadillo2      ACTACAAGATAGAGCTTCTCCTCTTATAGAACAACTTACATTCTTTTCATG 50
O.singularis1     ACTCCTGGATAGTACTTCCCCITTAATAGAACAACTTACATTTTTTCACG 50
O.singularis2     ACTCCTGGATAGTACTTCCCCITTAATAGAACAACTTACATTTTTTCACG 50
O.cribicolis_EF583370_
O.vaucheri_EF583371_
ACTCCAAGATAGAACTTCACCTTTAATAGAACAATTGAATTTTTTCACG 50
O.sulcatus1       CCTTCAAGATAGAAGCTCATCCTTAATAGAGCAACTTATAATTCTTTTCACG 50
O.sulcatus2       TCTCCATGATAGAAGCTCACCAACTTATGGAACAACTTACATTTTTTCATG 50
O.crataegi1       ACTCCA-GACAGGGCCTCTCCACTCATAGAGCAACTTTTTATTCTTTTCATG 49
O.crataegi2       ACTCCA-GACAGGGCCTCTCCACTCATAGAGCAACTTTTTATTCTTTTCATG 49

```

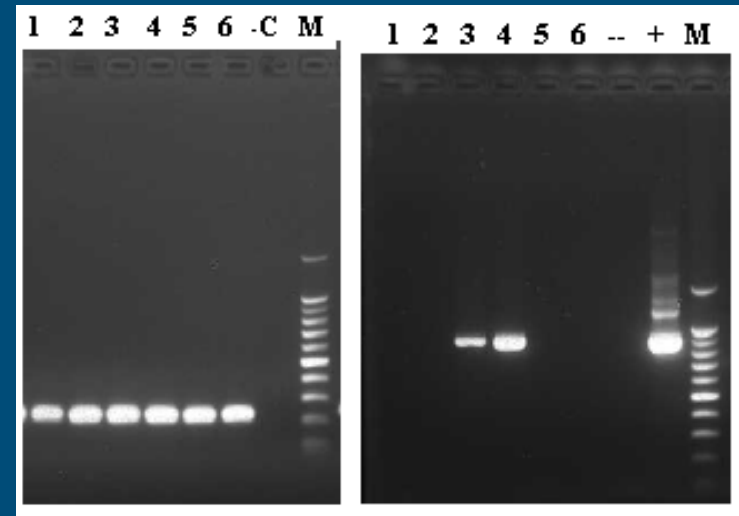


- Alignment of nucleotide sequences of (partial) **COII** gene for several *Otiorhynchus* species. *O. cribicolis* and *O. vaucheri* are not yet reported in The Netherlands. Underlined nucleotides indicate *O. salicicola* specific sequence.

Perenbladvlooien, vectoren van fytoplasma in peer

- Pear Decline fytoplasma
 - Q-organisme
 - Afsterven van bomen
- *Cacopsylla pyri* (Linnaeus)
- *Cacopsylla pyricola* (Forster)
- *Cacopsylla pyrisuga* (Forster)

- Moleculaire detectie en identificatie
- *Risk assessment*: detectie van fytoplasma in vector



Cicaden, *Lemmers, De Kock, Pham, Chen*

- Aster Yellows fytoplasma
 - zeer brede waardplantenreeks
 - verspreiding door cicaden
 - recent schade in hyacint, muscari, hortensia, primula
- Weinig/geen kennis beschikbaar over
 - primaire infectiebron
 - welke cicade(n) is/zijn de vector
 - cicadenpopulatie dynamica in NL.
- Participatie in EU-COST actie



Cicaden, *Lemmers, De Kock, Pham, Chen*

Sommigen zijn vectoren van fytoplasma's

- *Dalbulus maidis*
- (*Dalbulus elimatus*)
- *Macrosteles quadrilineatus* ; JIC

- *Empoasca decipiens* (1, 2)
- *Arthaldeus pascuellus*
- *Eurhadina pulchella*
- *Zyginidia scutellaris*

- *Eupteryx aurata* (4, 5)
- *Eupteryx urticae*

- *Macrosteles sexnotatus* (13, 14)
- *Macrosteles ossiannilssoni* (9, 10)



Empoasca decipiens, 1&2

COI sequentie analyse

```
Ci1F TAGCTCAGCCTGGCGCTTTTTCAATAATGATCAGATGTATAATGTTATTGTCACATCTC 119
Ci2F TAGCTCAGCCTGGCGCTTTTTCAATAATGATCAGATGTATAATGTTATTGTCACATCTC 119
*****

Ci1F ATGCTTTTATTATAAATTTTCTTTATAGTTATACCTATTATAAATTGGTGGATTGGTAATT 179
Ci2F ATGCTTTTATTATAAATTTTCTTTATAGTTATACCTATTATAAATTGGTGGATTGGTAATT 179
*****

Ci1F GACTTTTACCTTAATAAATTGGTGCCCGAGACATGGCCTTCCCCCGCCTCAATAATATAA 239
Ci2F GACTTTTACCTTAATAAATTGGTGCCCGAGATAIGGCCTTCCCCCGCCTCAATAATATAA 239
*****

Ci1F GATTTTGGTTATTAATTCCTTCTTTATTTTTATTAACTTTAAGTTCCTTTGTTGAAGTTG 299
Ci2F GATTTTGGTTATTAATTCCTTCTTTATTTTTATTAACTTTAAGTTCCTTTGTTGAAGTTG 299
*****

Ci1F GTGCTGGTACAGGTTGAACTGTTTATCCCCCCTTTCTTCAAACATTGCACATTCAGGAT 359
Ci2F GTGCTGGTACAGGTTGAACTGTTTATCCCCCCTTTCTTCAAACATTGCACATTCAGGAT 359
*****

Ci1F CTAGTGTAGATTAGCTATTTTTCTCTTCATTTAGCCGGNATTTCACTATTTTAGGAG 419
Ci2F CTAGTGTAGATTAGCTATTTTTCTCTTCATTTAGCCGGTATTTCACTATTTTAGGAG 419
*****
```

■ *Empoasca decipiens* (eiwit sequentie)

VYLDWSACWYNIKMLIRVELAQPGAFFNNDQMYNVVITSHAFIMIFFMVMPIMIGGFGNWLLPLMIGAPDMAFPRLNNM
SFWLLIPSLFLLTLSSFVEVGAGTGWTVYPPLSSNIAHSGSSVDLAIFSLHLAGISSILGAVNFITTVFNMRCIGMTFDKIP
LFWWSVLITAVLLLLSLPVLAGAITMLLTDRNLNTSFFDPSSGGDPILYQHLFWFFGHQKV

Eupteryx aurata, 4&5

COI (eiwit) sequentie analyse

```
>lcl|35497 unnamed protein product
Length=216

Score = 274 bits (701), Expect = 8e-79, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 146/209 (69%), Positives = 178/209 (85%), Gaps = 0/209 (0%)

Query 9 SMVVRMELSQPGSFIYHDHVYNVVFVTS HAFIMIFFVVM PVL MGGF GNWLL PLMLGCHDMH 68
SM++R+EL+QPG+F+ +D +YNV VTSHAFIMIFF+VMP+++GGF GNWLL PLM+G DM
sbjct 6 SMLIRIELAQPGAFLNNDQMYNVIVTSHAFIMIFFMVM PIMIGGF GNWLL PLMIGAPDMA 65

Query 69 FPRMNNLSFWLLF PAMTF LILSSFI SIGAGTGWTVYPPLSSI SFHTDF SVDL AIFSLHLG 128
FPRMNN+SFWLL P++T L++SS I +GAGTGWTVYPPL+S H+ SVDL IFS LH+
sbjct 66 FPRMNNMSFWLLPPSLTLLLMS SVIEMGAGTGWTVYPPLASNIAHSGVSVDLTIFSLHMA 125

Query 129 GVSSILSSINFITTI FSMRFAGFKLERMTLFVW SMMVT SFLLLFSLPVLGAI TMLLTDR 188
GVSSIL ++NFITT+ +MR + L+ LFVWS+ +T+ LLL SLPVLGAI TMLLTDR
sbjct 126 GVSSILGAVNFITTVINMRT SLMTLDST PLEFVW SVEITAI LLLL SLPVLGAI TMLLTDR 185

Query 189 NLNTSFFDPLGGDPILYQHLEWFFGHPE 217
N+NTSFFDP GGGDPILYQHLEWFFGH E
sbjct 186 NINTSFFDPSGGDPILYQHLEWFFGHLE 214
```

- 4 en 5 zijn 2 verschillende *Eupteryx* species. De *Eupteryx* groep is moeilijk te determineren zonder de mannetjes te analyseren. *E. urticae* of andere spp.

Eupteryx Spp. (19 soorten geregistreerd in NL)



E. aurata



E. urticae



E. atropunctata



E. melissae



Macrosteles ossiannilssoni, 9&10; sexnotatus, 13&14

COI sequentie analyse

Ci9F	AGCACAAACCAGGATCATTAAATCAATAATGATCAAGCTTACAATGTTATTGTTACTTCTCA	119
Ci13F	AGCACAAACCAGGATCATTAAATCAATAATGATCAAGCTTACAATGTTATTGTTACTTCTCA	117
Ci10F	AGCACAAACCAGGATCATTAAATCAATAATGATCAAGCTTACAATGTTATTGTTACTTCTCA	97
Ci14F	GGCACAGCCAGGCTCATTAAATCAACAATGACCAAGCATATAATGTTATTGTTACATCACA	120

Ci9F	CGCATTATTATAATTTTCTTTATAGTTATACCAATTATAAATTGGAGGTTTTGGAAACTG	179
Ci13F	CGCATTATTATAATTTTCTTTATAGTTATACCAATTATAAATTGGGGTTTTGGAAACTG	177
Ci10F	CGCATTATTATAATTTTCTTTATAGTTATACCAATTATAAATTGGAGGATTGGAAACTG	157
Ci14F	CGCATTCATTATAATTTTCTTTATAGTTATACCAATCATAAATTGGGGATTGGTAATTG	180

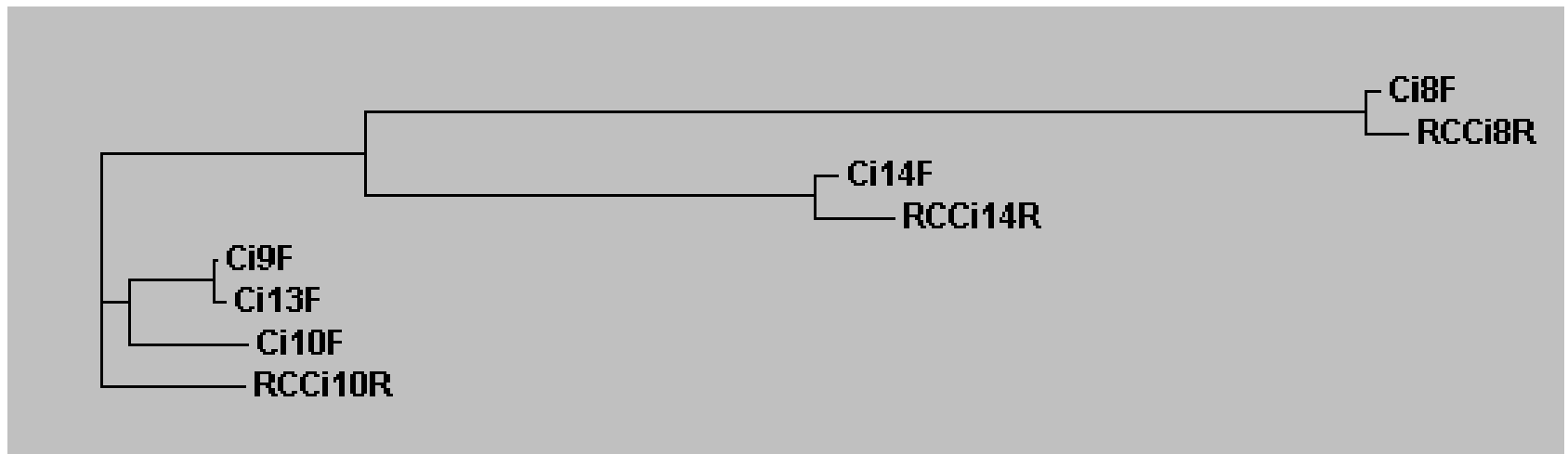
Ci9F	ACTTTTACCTCTAATAATCGGGGCACCTGACATAGCATTCCCACGACTTAATAATATAAG	239
Ci13F	ACTTTTACCTCTAATAATCGGGGCACCTGACATAGCATTCCCACGACTTAATAATATAAG	237
Ci10F	ACTTTTACCTCTTATAATCGGAGCACCTGACATAGCATTCCCACGACTTAATAATATAAG	217
Ci14F	ACTACTCCCTCTTATAATCGGAGCTCCCGACATAGCATTCCCCGACTAATAATATAAG	240
	*** * *****	
Ci9F	ATTTTGACTTCTACCAACCATCCCTAACATTGTTAATATTAAGATCAATAGTAGAAATGGG	299
Ci13F	ATTTTGACTTCTACCAACCATCCCTAACATTGTTAATATTAAGATCAATAGTAGAAATGGG	297
Ci10F	ATTTTGACTTCTACCAACCATCCCTAACATTGTTAATATTAAGATCAATAGTAGAAATGGG	277
Ci14F	ATTTTGACTTCTACCTCCGTCATTAACTATTAATATTAAGATCAATAGTAGAAATGGG	300

- 13 lijkt meer op 9 en 10 dan op 14; 13 is *M. ossiannilssoni*
- 10 is niet 100% identiek aan 9 en 13, is misschien een andere *M. spp.?*
- *Macrosteles spp.* is moeilijk te determineren zonder de mannetjes te analyseren. Het is moeilijk om de cicaden uit de lijmplaten te determineren.

Macrosteles ossiannilssoni, 9&10; *sexnotatus* (13)&14

COI sequentie analyse

Phylogram



- Ci8 is *Zyginidia scutellaris*, als Outgroup



Cicaden, *Lemmers, De Kock, Pham, Chen*

- *Empoasca decipens* komt het hele jaar voor.
- Andere *Empoasca* spp. (*Empoasca papayae* en *E. decedens*) zijn beschreven als vector van fytoplasma .
- *Empoasca decipens* is moleculair gekarakteriseerd.

- *Macrosteles* spp. (*Macrosteles ossiannilssoni*, *M. sexnotatus*) zijn morfologisch gedetecteerd.
- Diverse *Macrosteles* spp. zijn beschreven als vector van fytoplasma.
- Herhaling van morfologische/moleculaire identificatie is nodig.

- *Eupteryx aurata* is morfologisch gedetecteerd.
- Of *Eupteryx* spp. vector van fytoplasma is onbekend. Idem voor *Arthaldeus pascuellus*, *Eurhadina pulchella*, *Zyginidia scutellaris*.
- Herhaling van morfologische/moleculaire identificatie van *Eupteryx aurata* is nodig.

Samenvatting

- *Moleculaire diagnostiek van insecten* ondersteunt:
 - Determinatie en taxonomie
 - Detectie van specifieke organismen
 - Detectie van pathogeen in vector (*risk assessment* en epidemiologie)

Samenwerking ?

- Samenwerking PPO en P.P. Chen 2010 (?)
 - Ondersteuning determinatie van cicaden t.b.v. fytoplasma-onderzoek (ook t.b.v moleculaire karakterisatie)
 - Training in basisdeterminatie cicaden
 - Onder de zelfde condities als in 2009 (?)
- Op welk gebied kan PPO werkzaamheden LNV-PD ondersteunen?
 - Wantsen?
 - Buxus moth
 - ???

Afsluiting

© Wageningen UR

