

Moleculaire identificatie en detectie van roofmijten van de familie Phytoseiidae

Khanh Pham, Anton van der Linden, Pierre Ramakers



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

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

Waarom

schade aan gewas/overdracht virussen

schade aan gewas

overdracht virussen

overdracht fytoplasma's

overdracht fytoplasma's

- **Roofmijten**

predator, biologische gewasbescherming

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. Q-PCR (Kwantitatieve PCR)

Phytoseiidae, morfologie



- *Swirskii*, *Montdorensis*, *Limonicus*, *Fallacis*, *Californicus*, *Andersoni*

Phytoseiidae, taxonomie (1) GenBank

■ Amblyseiinae

● Amblyseius

- Amblyseius alpinus
- Amblyseius andersoni
- Amblyseius eharai
- Amblyseius orientalis
- Amblyseius tsugawai
- Amblyseius sp. APGD-2010

● Euseius

- Euseius concordis
- Euseius finlandicus
- Euseius nicholsi
- Euseius ovalis
- Euseius stipulatus

● Iphiseius

- Iphiseius degenerans

● Kampimodromus

- Kampimodromus aberrans
- Kampimodromus corylosus

- Kampimodromus ericinus
- Kampimodromus hmiminai
- Kampimodromus langei

● Neoseiulus

- Neoseiulus barkeri
- Neoseiulus californicus
- Neoseiulus cucumeris
- Neoseiulus fallacis
- Neoseiulus reductus
- Neoseiulus womersleyi

● Phytoseiulus

- Phytoseiulus fragariae
- Phytoseiulus longipes
- Phytoseiulus macropilis
- Phytoseiulus persimilis

● Typhlodromalus

- Typhlodromalus deleoni
- Typhlodromalus limonicus



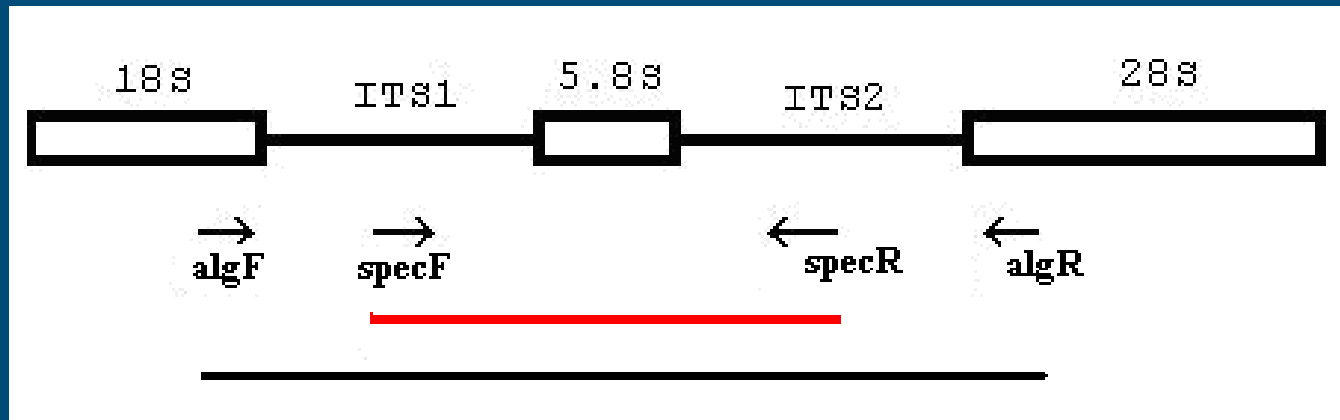
Phytoseiidae, taxonomie (2) GenBank

- Typhlodrominae
 - Metaseiulus
 - Metaseiulus occidentalis
 - Neoseiulella
 - Neoseiulella aceri
 - Neoseiulella litoralis
 - Neoseiulella tiliarum
 - Typhlodromus
 - Typhlodromus pyri
- Typhlodromips
 - Typhlodromips montdorensis
 - Typhlodromips swirskii

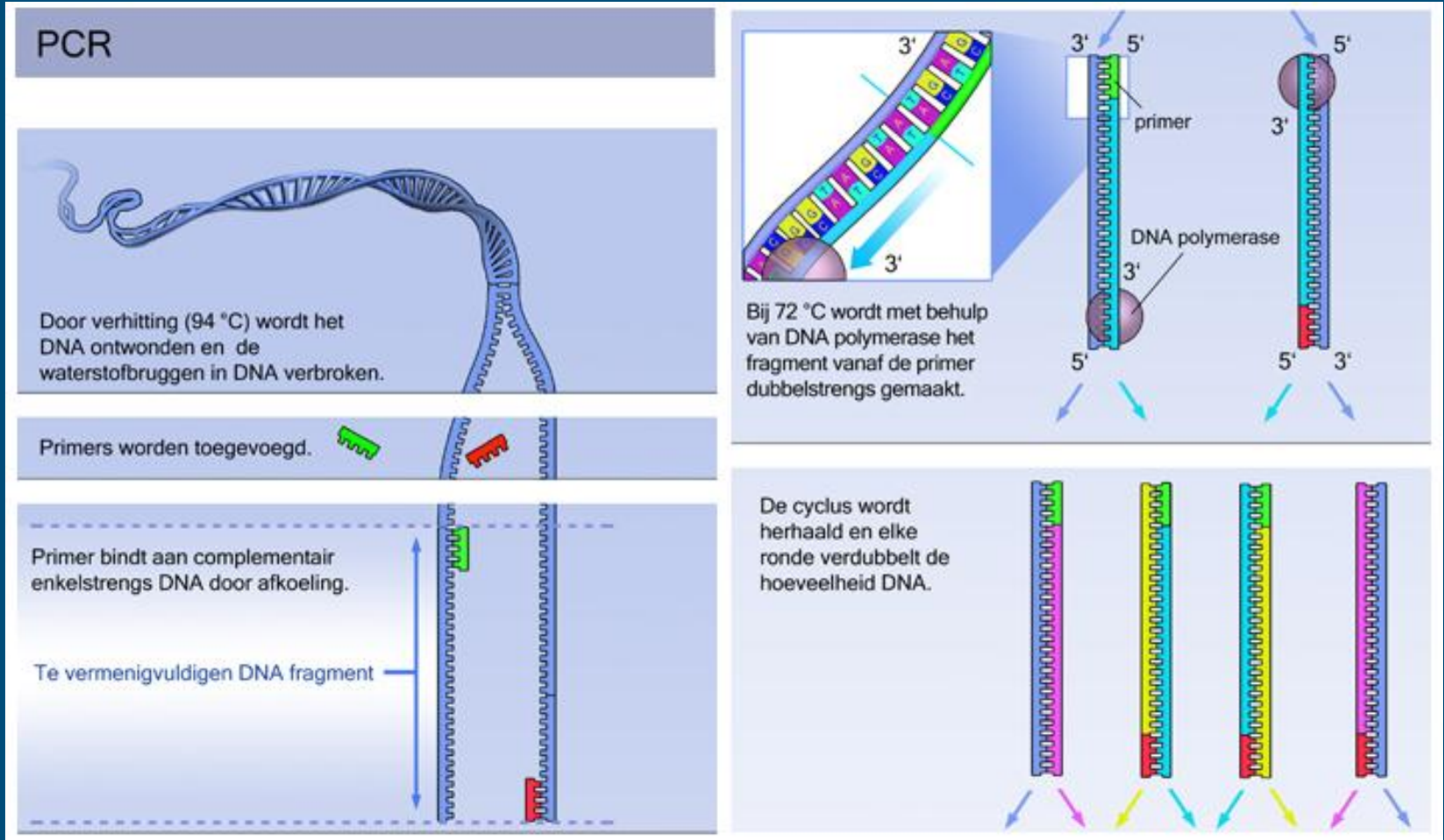
Phytoseiidae,

Identificatie & karakterisatie & detectie

- DNA isolatie uit roofmijten (1-5 individuen)
- Karakterisatie van het ITS-gebied met algemene primers en sequentie analyse (BLASTn search)
- Ontwerp van specifieke PCR- toetsen voor detectie van verschillende soorten



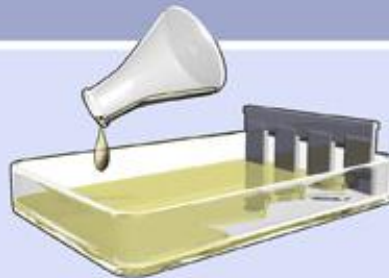
PCR, Polymerase Chain Reaction



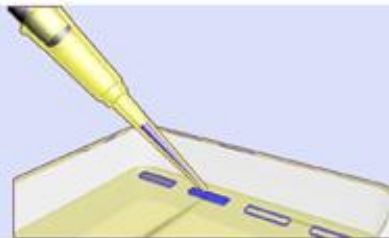
Gelektroforese

Gelelectroforese

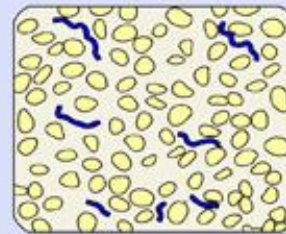
Gel wordt gemaakt door poeder en water te mengen en te verwarmen en deze oplossing te laten stollen in een bakje. In de gel zit een kleurstof dat aan het DNA bindt en het zichtbaar maakt.



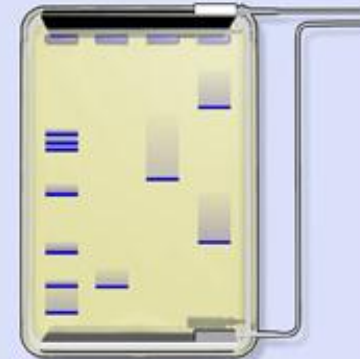
Oplossing met DNA-fragmenten van bekende grootte (linker laantje) en DNA-monsters worden in de gel geïnjecteerd.



Over de gel wordt een spanningsverschil aangebracht: het negatief geladen DNA begint te 'lopen'. Kleine DNA-fragmenten bewegen sneller dan grote.



Spanningsverschil wordt opgeheven en DNA verloop is zichtbaar geworden.

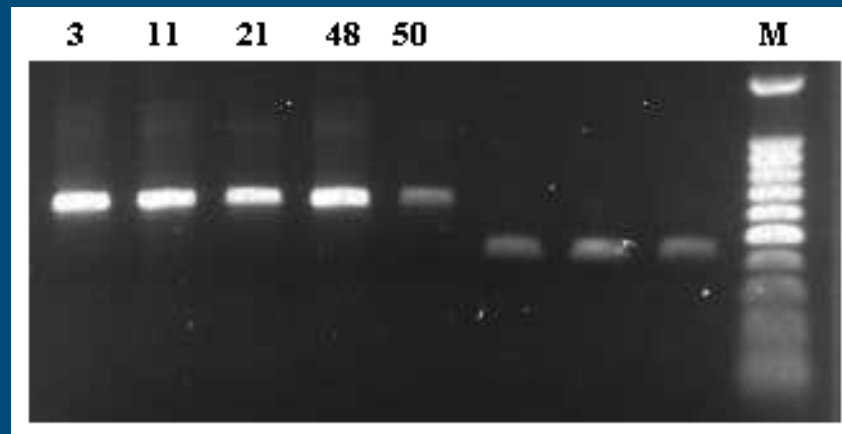


Gel met gescheiden fragmenten kan gefotografeerd worden voor vergelijkend onderzoek.



Identificatie (1)

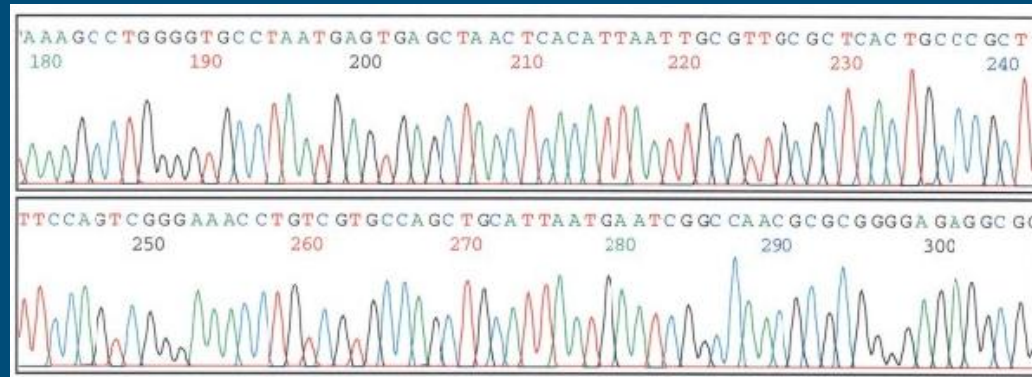
PCR resultaten met roofmijt-algemene primers



- **3:** *Amblyseius andersoni*
- **11:** *Neoseiulus californicus*
- **21:** *Neoseiulus fallacis*
- **48 en 50:** *Amblyseius andersoni*?
- **M:** 100bp ladder; *N. cucumeris* en *A. swirskii* enz. later geanalyseerd

Identificatie (2)

Sequentie bepaling, BLAST search analyse



```
1 gctctgcatg tgtaatgttt goatgaagat caaacttgat catttagagg aagtaaaagt
61 cgtacaagg ttccgtagt gaacctgogg aaggatcatt actgatttaa aaccattccc
121 tattccatag gtgatgggtc togtatgatg ttctatctta gcctcgtgcg cgtcaccagc
181 ctgctggcgc tcgtacgttg gcttcgagag gcatgaaaaa aacctgtat tctaaatagc
241 tattgctct catttgcct ttggcacacc gctccattgc ggtgttaccg tccttaggct
301 acgggtgagg cgtgagtcgg taaccattcc gacaacattt tcaactcttc atgaagtctg
361 ttgtgctatt gagaagaaaa aaaccaagac tcaatatggg ggatcaacta gtccttaaat
421 cgatgaaaaa catagtaatt tgtggaaatt gatgtgagt gtgaaattdt gtgagcattg
481 tgttttgaa tgaaaattdt agcatggaca ottctgtgtc tgtgctacat ttgtttoagt
541 atataaacgc tatcatacgt atttaccttd gctgcagccc ttgtcggcaa cgctatgcaa
601 tggataaat tttcttgggt cacaagagtg ataccaaac aaaccttdat gacgtgtatc
661 atcaagtgtg acg
```



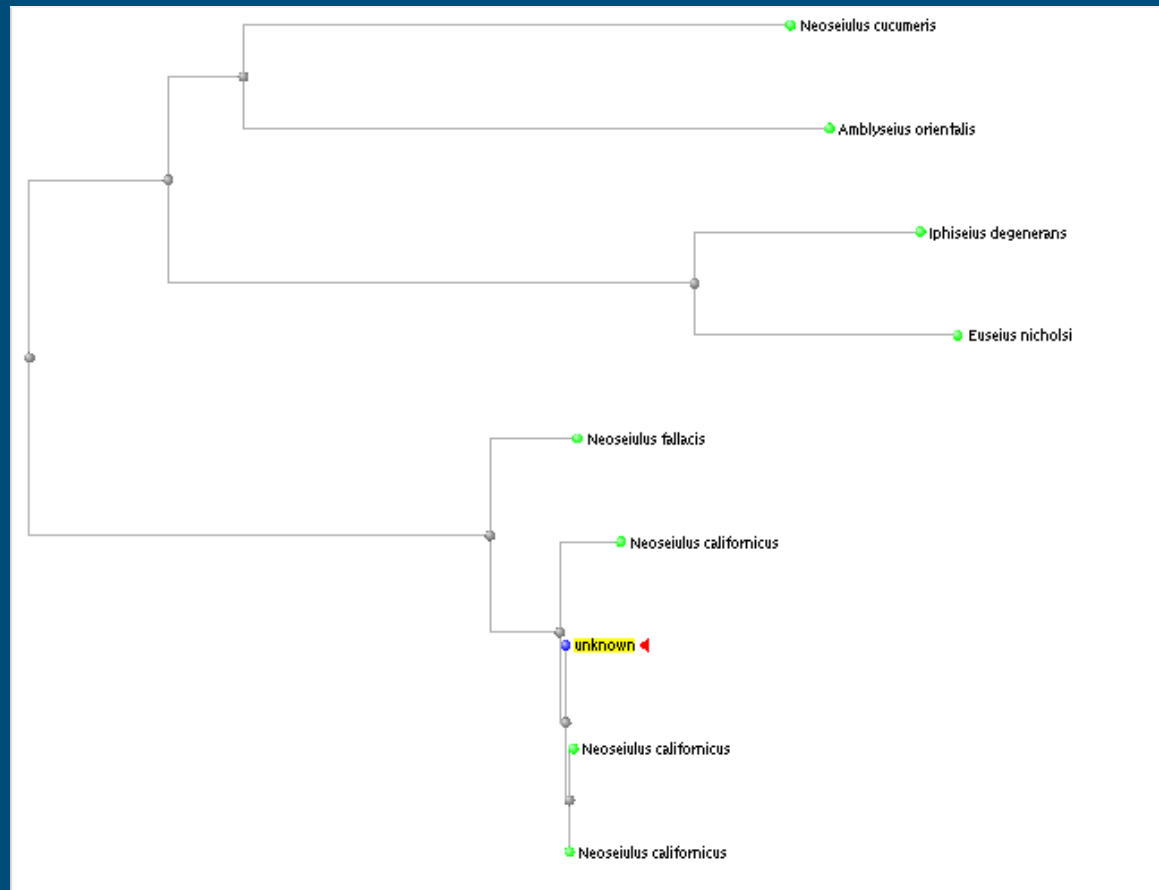
Identificatie (3)

Identificatie van isolaat nr. 11 en 21 via sequentie analyse

	isolaat nr. 11	isolaat nr. 21
<i>N. californicus</i>	>99%	97%
<i>N. fallacis</i>	96%	>99%
<i>N. cucumersis</i>	87%	87%
<i>Iphiseius degenerans</i>	85%	86%
<i>Euseius finlandicus</i>	85%	85%
<i>Phytoseiulus persimilis</i>	85%	85%
<i>Euseius concordis</i>	82%	82%

Identificatie (4)

Identificatie van isolaat nr. 11: *N. californicus*



Identificatie (5)

Identificatie van isolaat nr. 3 (48,50) en SW via sequentie analyse

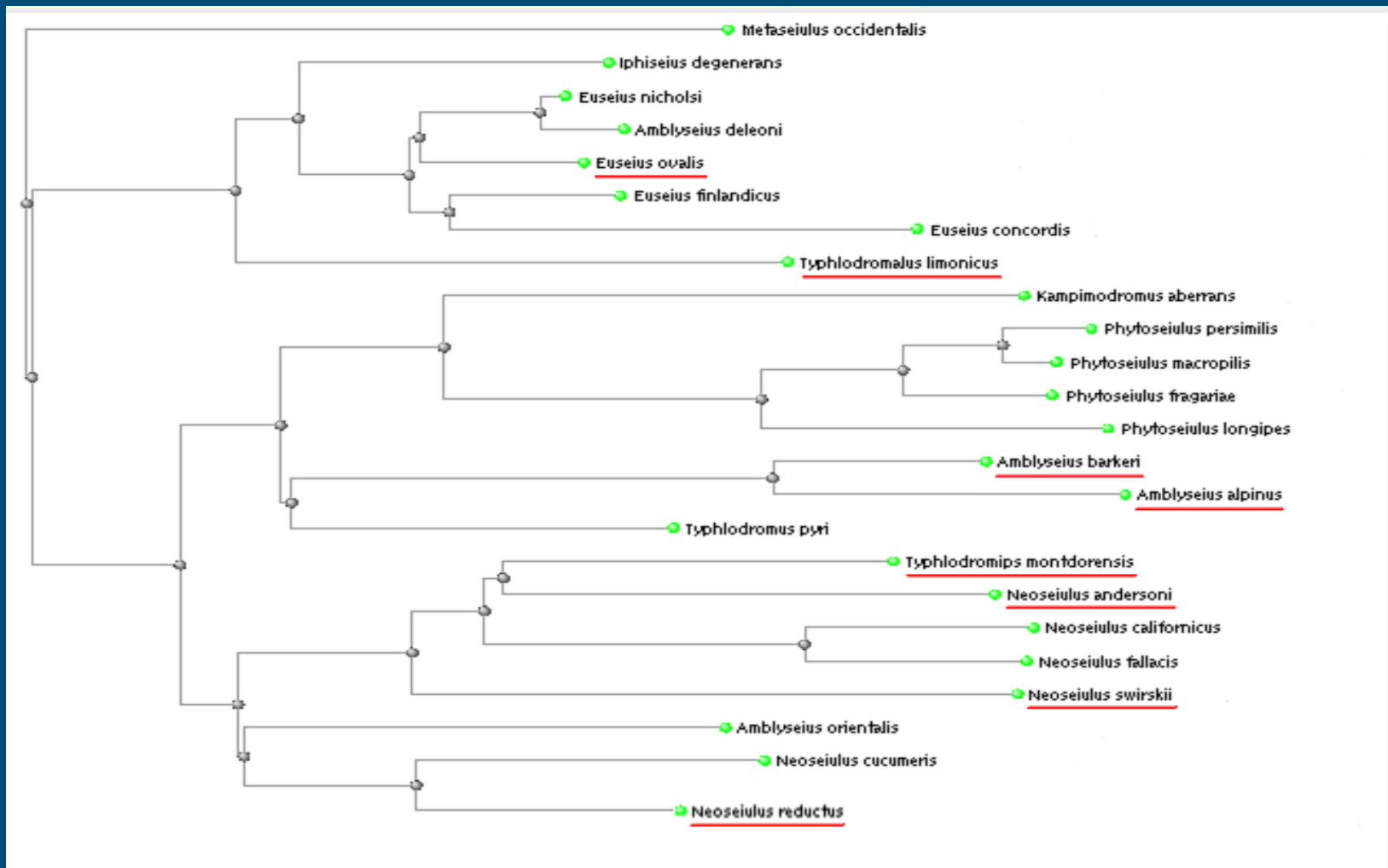
	isolaat nr. 3 , (48,50)	isolaat SW
<i>N. californicus</i>	91%	87%
<i>N. fallacis</i>	90%	87%
<i>N. cucumersis</i>	89%	87%
<i>Iphiseius degenerans</i>	88%	85%
<i>Euseius finlandicus</i>	88%	85%
<i>Phytoseiulus persimilis</i>	86%	84%
<i>Euseius concordis</i>	84%	82%

- Sequenties van 3 (*A. andersoni*) en 48 en 50 zijn identiek
- SW: *A. swirskii*

Karakterisatie (1), ITS sequentie bepaling

- *Amblyseius alpinus*
- *Amblyseius andersoni*
- *Euseius ovalis*
- *Neoseiulus barkeri*
- *Neoseiulus reductus*
- *Typhlodromalus limonicus*
- *Typhlodromips montdorensis*
- *Typhlodromips swirskii*

Karakterisatie (2), verwantschapsanalyse



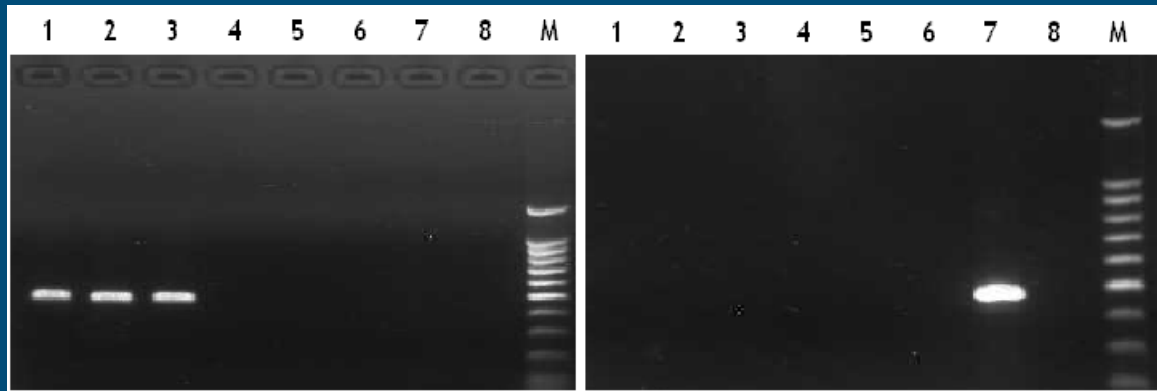
Detectie (1)

Sequenties alignment, specifieke primers ontwerpen

EU310504	236	CCGACAACCCTTTCACCTTCCTTGT-GAAGTTGTT-T-GTGCTATCGAGAAGAAAAAACCC	292
GU966583	290T.....T.C.-.....-.....T.	346
GU591680	253AT.....T.CA.-.....C.-.....T.	309
Y18269	329AT.....T.CA.-.....C.-.....T.	385
Y18271	253AT.--.....T.A.-.....C.-.....	307
AY121985	279A.C.....TG.AA-.....C.-.....T.....T.	335
GU966582	279A.C.....TG.AA-.....C.-.....CT.	335
EU310505	244T.....TG-.....AAG.-.....	300
HQ290322	277-.....TG-.....C.-.....A.....	332
FJ515685	229AA.....AACT.-.....-C.....A.....T.	286
GU591682	248AA.C.....-.....C.....-T.....A.....T.	305
FJ515686	282TAT..C.....AACT.-.....-T.....A.....T.	339
AF209437	206A.C..T....G.CAA-.....C..C.-.....	263
FJ515687	269A.C..T....G.CAA-.....-T.....	326
GU591665	253TA.C.....AACT.-.....C..A.-.....TG.....A.	310
GU591660	253TA.C.....AACT.-.....C..A.-.....TG.....A.	310
GU591673	256TA.C.....AACT.-.....C..A.-.....TG.....A.	313
GU591678	252AA.C.....TA.T.-.....C..A.-.....TG.....A.	309
Y18270	236C.ATC..T....G.CA.-.....C.-.....G---	288

Detectie (2)

Detectieprimers voor *A. andersoni* en *A. swirskii*



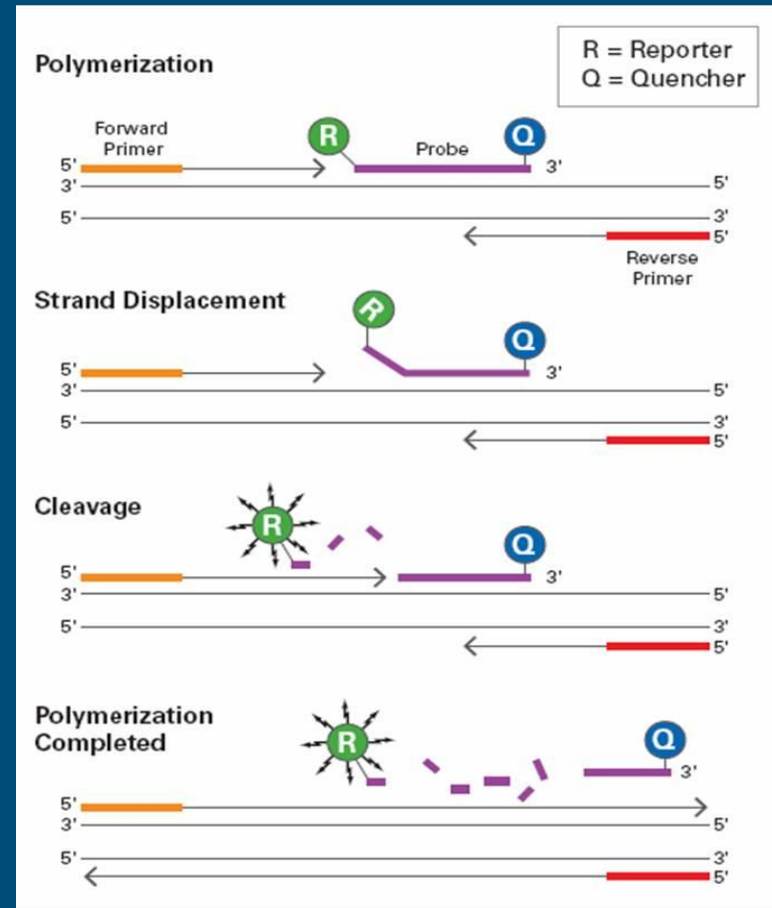
- **1, 2, 3** : *A. andersoni*
- **4, 5, 6** : *N. californicus*, *N. fallacis*, *N. cucumeris*
- **7**: *A. swirskii*, **8**: Water (Neg.C), **M**: 100bp ladder.

De mogelijkheden

- Ontwikkelen van specifieke primers voor andere soorten en toepassen bij verschillende experimenten.
- (Nieuwe) soorten karakteriseren via andere technieken (RAPD) of sequenties van andere genen analyseren (i.v.m isolaten karakterisatie).
- Ontwikkelen van kwantitatieve PCR (Real-time PCR) i.v.m kwaliteit controle (verontreinigingen).

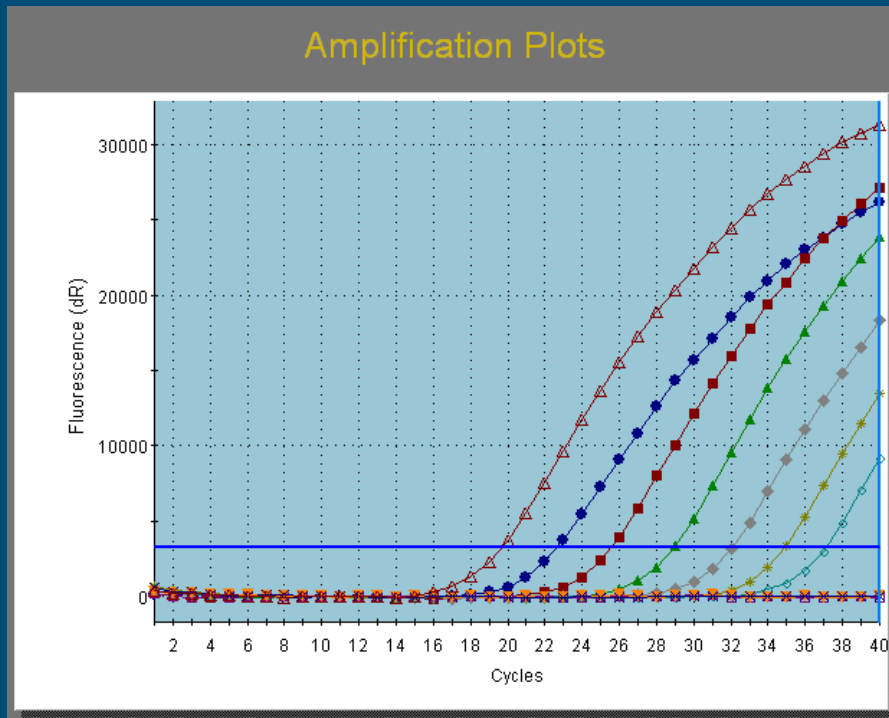
Kwantitatieve PCR (Real-time PCR) (1)

Principe



Kwantitatieve PCR (Real-time PCR) (2)

Voorbeeld 1



Nr.	DNA conc. (ng/ul)	Ct (dR)
1	33.10 ⁰	22.73
2	.10 ⁻¹	25.64
3	.10 ⁻²	28.94
4	.10 ⁻³	32.08
5	.10 ⁻⁴	34.95
6	.10 ⁻⁵	37.16
7	.10 ⁻⁶	No Ct
8	.10 ⁻⁷	No Ct
18	Neg C (NTC)	No Ct
20	Pos C (PD 5674)	19.71

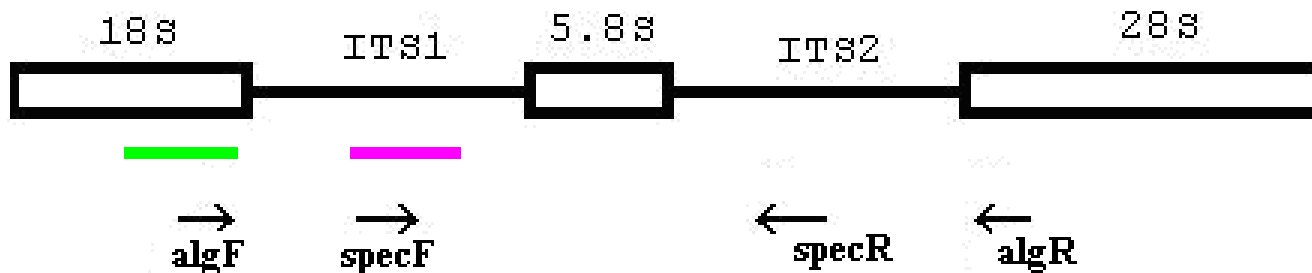
Kwantitatieve PCR (Real-time PCR) (3)

Voorbeeld 2

Table 1: Detection of INSV in *thrips*

Code	Sample	Assay	Ct- <i>thrips</i>	Assay	Ct-INSV	Ratio
T1+I	1 <i>thrips</i> +INSV	HEX	25.80	FAM	26.62	0,96
T2+Iv	2 <i>thrips</i> +INSV 1/10	HEX	25.32	FAM	29.44	0.86
T4+Ivv	4 <i>thrips</i> +INSV 1/100	HEX	23.39	FAM	32.94	0.71
T8+Ivvv	8 <i>thrips</i> +INSV 1/1000	HEX	24.64	FAM	34.95	0.70

Toepassing voor kwantificeren van mijten ?



Vragen?



PRAKTIJKONDERZOEK
PLANT & OMGEVING

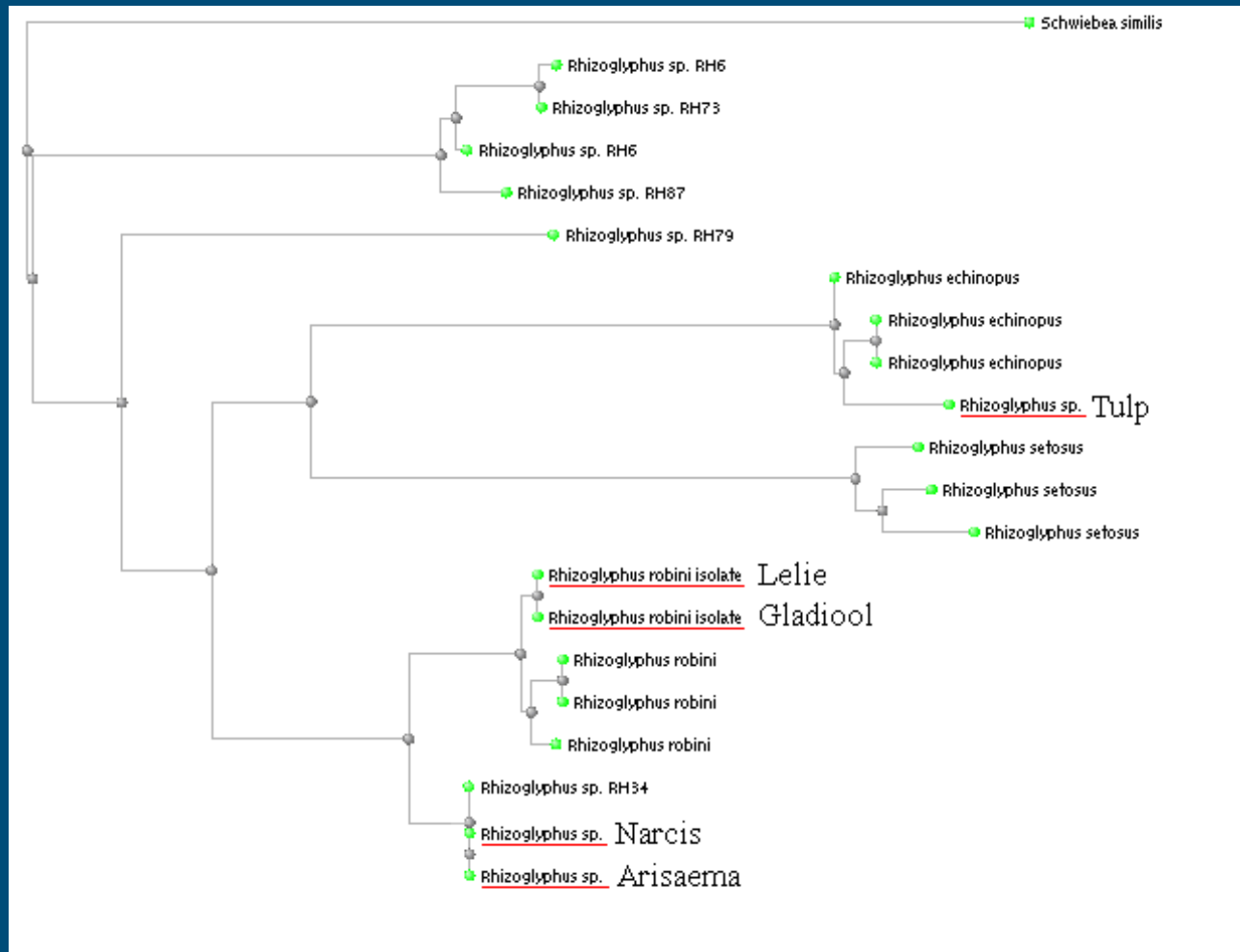
WAGENINGEN **UR**

Bollenmijten/Stromijten,

- 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



Rhizoglyphus spp.



Tyrophagus spp.

	STROMIJTEN UIT BEWAARRUIMTE	
Tyrophagus1	TTGCCGCAGACCAA	TTCTGCGGTAGTCTAATGTAGGGGGCTTCTGACACT
Tyrophagus9	TTGCCGCAGACCAA	TTCTGCGGTAGTCTAATGTAGGGGGCTTCTGACACT
Tyrophagus5	TTGCCGCAGACCAA	TTCTGCGGTAGTCTAATGTAGGGGGCTTCTGACACT
Tyrophagus3	TTGCCGCAGACCAA	TTCTGCGGTAGTCTAATGTAGGGGGCTTCTGACACT
Tyrophagus10	TTGCCGCAGACCAA	TTCTGCGGTAGTCTAATGTAGGGGGCTTCTGACACT
Tyrophagus6	TTGCCGCAGACCAA	TTCTGCGGTAGTCTAATGTAGGGGGCTTCTGACACT
Tyrophagus7	TTGCCGCAGACCAA	TTCTGCGGTAGTCTAATGTAGGGGGCTTCTGACACT
Tyrophagus2	TTGCCGCAGACCAA	TTCTGCGGTAGTCTAATGTAGGGGGCTTCTGACACT
Tyrophagus8	TTGCCGCAGACCAA	TTCTGCGGTAGTCTAATGTAGGGGGCTTCTGACACT
Tyrophagus4	TTGCCGCAGACCAA	TTCTGCGGTAGTCTAATGTAGGGGGCTTCTGACACT
Tyrophagus-putrescentiae2	TTGCCGCA--CT--	TGCTGTGGTAGTCTAATGTAGGGGGCTTCTGACACT
Tyrophagus-putrescentiae5	TTGCCGCA--CT--	TGCTGTGGTAGTCTAATGTAGGGGGCTTCTGACACT
Tyrophagus-putrescentiae3	TTGCCGCA--CT--	TGCTGTGGTAGTCTAATGTAGGGGGCTTCTGACACT
Tyrophagus-putrescentiae4	TTGCCGCA--CT--	TGCTGTGGTAGTCTAATGTAGGGGGCTTCTGACACT
Tyrophagus-putrescentiae6	TTGCCGCA--CT--	TGCTGTGGTAGTCTAATGTAGGGGGCTTCTGACACT
Tyrophagus-putrescentiae1	TTGCCGCA--CT--	TGTTGTGGTAGTCTAATGTAGGGGGCTTCTGACACT
Tyrophagus-putrescentiae7	TTGCCGCA--CT--	TGCTGTGGTAGTCTAATGTAGGGGGCTTCTGACACT
Tyrophagus-neiswanderi1	TTGCCGCA--CT--	TGCTGTGGTAGTCTAATGTAGGGGGCTTCTGACACT
Tyrophagus-neiswanderi2	TTGCCGCA--CT--	TGCTGTGGTAGTCTAATGTAGGGGGCTTCTGACACT
Tyrophagus-similis	TTGCCACCAC----	TGAGTGGTAGTCTAATGTAGGGGGCTTTTGACACT
Tyrophagus-longior	TTGCCACCTC----	TGTGTGGTAGTCTAATGTAGGGGGCTTTTGACACT
Tyroborus-lini2	TTGCCACCACCC--	TTGTGTGGTAGTCTAATGTAGGGGGCTTTTGACACT
Tyroborus-lini3	TTGCCACCACCC--	TTGTGTGGTAGTCTAATGTAGGGGGCTTTTGACACT
Tyroborus-lini1	TTGCCACCACCC--	TTGTGTGGTAGTCTAATGTAGGGGGCTTTTGACACT
	***** *	* *****

Bamboemijten,

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



Phylogram

