



Plantedirektoratet

Vedrørende etablering af diagnostik på mellus, *Bemisia*

Fakultetssekretariatet

Susanne Elmholt

Koordinator for
myndighedsrådgivning

Dato: 03. december 2010

Direkte tlf.: 8999 1858

E-mail:
Susanne.Elmholt@agrsci.dk

Afs. CVR-nr.: 57607556

Side 1/1

Vedlagte redegørelse er udarbejdet som led i "Aftale mellem Aarhus Universitet og Fødevareministeriet om udførelse af forskningsbaseret myndighedsbetjening m.v. på Det Jordbrugsvidenskabelige Fakultet 2010-2013" (Punkt 6.14 i aftalens Bilag 2).

Redegørelsen er udarbejdet af seniorforsker Mogens Nicolaisen, Institut for Plantebeskyttelse og Skadedyr, til hvem eventuelle uddybende spørgsmål kan rettes på 8999 3670.

Med venlig hilsen

Susanne Elmholt
Seniorforsker, koordinator for DJF's myndighedsrådgivning

3. december 2010

Rådgivningsopgave vedrørende etablering af diagnostik på mellus, Bemisia

Mogens Nicolaisen, AU-DJF, Institut for Plantebeskyttelse og Skadedyr, Forskningscenter Flakkebjerg

Nedenstående redegørelse er udarbejdet som led i ”Aftale mellem Aarhus Universitet og Fødevarerministeriet om udførelse af forskningsbaseret myndighedsbetjening m.v. på Det Jordbrugsvidenskabelige Fakultet 2010-2013” (Punkt 6.14 i aftalens Bilag 2).

Baggrund for bestillingen

Opgaven er bestilt af Plantedirektoratet (PD) 19/2 2010 med frist ultimo 2010. PD begrundet bestillingen således:

Det er afgørende at der sker en hurtig og sikker diagnosticering. Prøvetagningen vanskeliggøres af at der er tale om flyvende insekter. I dag sker identifikationen på grundlag af morfologisk karakterisering af insekter fanget på limplader eller efter lang tids dyrkning af inficeret materiale hvor insektet har færdigudviklet sig.

Der ønskes derfor en dels en protokol, som forlader sig på DNA ekstraktion og RT-PCR til identifikation af Bemisia, dels en identifikationsprocedure som er håndterbar i felten, så prøvetagningen sker på optimale vilkår – rette mængde og opbevaringsforhold for senere analyse i laboratoriet. En protokol som er umiddelbar implementerbar i laboratoriet og som kan danne grundlag for instruktion til kontrollørerne.

I efterfølgende mail af 30/3 2010 har PD præciseret, at der er tale om *B. tabaci*:

Vedr diagnostiske metoder til identifikation af alle stadier, så ønsker vi en diagnostisk metode, som kan bestemme Bemisia tabaci uanset, hvilket stadium i udvikling (larve, flue) skadegøreren er på. Det vil givetvis være meget relevant med både larve og fluestadium. For fluer, fordi vi oftest får prøver tilsendt som limplader og her kan imago blive beskadiget ved aftagning og derpå svært at identificere ud fra morfologiske kendetegn. For larver fordi de er morfologisk vanskelige at identificere sikkert.

Vedr specifikationen af protokol, så ønsker vi en Real Time PCR med specifikke primere for Bemisia tabaci. Det er væsentlig i vores svarafgivelse af påvise karantæneskadegørere eller ej. Er det ikke en karantæneskadegører er det ikke interessant, hvilken art, der er tale om.

Bemisia tabaci phylogeni

Phylogeni indenfor Bemisia og nærtbeslægtede arter er hovedsageligt baseret på det mitochondrielle gen cytochrome oxidase I (COI) (f.eks. Boykin et al. 2007; Maruthi et al. 2007; Dinsdale et al. 2010; Frohlich et al. 1999) mens det ribosomale internal transcribed spacer (ITS) kun er anvendt i begrænset omfang (f.eks. Li et al. 2006; Li et al. 2005). Dette understøttes af mængden af tilgængelige sekvenser i NCBI GenBank, en søgning giver ca. 1200 'hits' for COI og ca. 300 hits for ITS. De mest grundige studier er lavet af Boykin et al. 2007 samt Dinsdale et al. 2010. Begge disse studier finder, at *Bemisia tabaci* består af et artskompleks, Boykin skriver f.eks. ”The data presented here are the first steps in

defining multiple monophyletic species within the *B. tabaci* species complex based on genetic data". Dinsdale et al. (2010) finder, at *B. atriplex* grupperer indenfor *B. tabaci* og derfor sandsynligvis udgør én af disse arter i *B. tabaci* komplekset. Hvorvidt det samme gør sig gældende for andre *Bemisia* arter er uklart, men Boykin et al. (2007) har medtaget *B. afer*, *B. tuberculata* samt *Trialeurodes vaporariorum* som 'outgroups' i deres phylogenetiske analyse og finder at disse klart adskiller sig, men dette baserer sig kun på enkelte prøver af disse arter.

Molekylær diagnostik af *B. tabaci* med specifik PCR

Der er kun publiceret ganske få artikler som beskriver PCR baserede eller real-time PCR baserede metoder til adskillelse af *B. tabaci* fra andre arter af *Bemisia* samt *Trialeurodes*, væksthummellus, (Malumphy et al. 2009) mens der er beskrevet flere metoder til adskillelse af grupper indenfor *Bemisia* (Jones et al 2008, Li et al. 2005).

Malumphy et al. (2009) beskriver en real-time PCR metode som hævdes at kunne adskille *B. tabaci* fra andre nærtbeslægtede arter, dog er der kun medtaget få prøver af hver art (*B. tabaci*, *B. afer*, *T. ricini* samt *T. trialeurodes*) samtidig med at en alignment i det pågældende område viser, at der er en del nukleotidforskelle indenfor *B. tabaci* mens der kun er få til andre arter (f. eks. *B. afer*). Mere specifikt viser denne alignment, at der er en nucleotidforskel (T til C) på 3' positionen på forward primer som sandsynligvis gør, at dette assay ikke vil detektere disse *B. tabaci* individer (se også figur 1)

Trods de ovennævnte problemer med det publicerede real-time PCR assay, er metoden blevet afprøvet i vores laboratorium. Metoden blev afprøvet på flere prøver af *B. tabaci* men det var ikke muligt at opnå en sikker identifikation (intet signal), muligvis på grund af for store sekvensforskelle mellem de indsamlede individer ifht. de anvendte primere og probe.

I betragtning af *B. tabaci*'s store økonomiske betydning samt problemerne med at kunne foretage en sikker morfologisk identifikation kan det undre at der ikke er udviklet flere robuste PCR baserede identifikationsmetoder. Dette må skyldes de ovennævnte problemer med en veldefineret afgrænsning af *B. tabaci* som art samt at variationen på sekvensniveau indenfor 'arten' *B. tabaci* er af samme størrelsesorden som til nærtbeslægtede arter som f.eks. *B. afer* og *B. atriplex*.

Molekylær diagnostik baseret på DNA barcoding

Indenfor de senere år er DNA barcoding af især COI blevet populært som en sikker artsidentifikation indenfor de fleste dyregrupper, heriblandt også insekter (Hajibabaei et al. 2007). Metoden er også anvendt i de tidligere nævnte artikler (Boykin et al. 2007; Dinsdale et al. 2010). Metoden består af en PCR med universelle primere efterfulgt af sekventering af PCR produktet hvorefter sekvensen sammenlignes med allerede kendte COI sekvenser fra *B. tabaci* og nærtbeslægtede arter.

Der er udviklet generelle primers til amplificering af COI fra insekter (Simon et al. 1994), men iflg. Shatters et al. (2009) er disse ikke effektive for alle *B. tabaci* undergrupper. Shatters et al. (2009) har derfor udviklet et nyt sæt primere som amplificere nogenlunde det samme område, men med større effektivitet og alle undersøgte grupper indenfor *B. tabaci* og nærtbeslægtede kunne amplificeres dog på nær *T. abutilonea*.

Der er påbegyndt et EU projekt under 7. rammeprogram, QBOL, som udvikler metoder, og sekvenser, til barcoding af karantæneorganismer. Herunder er også *Bemisia tabaci* nævnt som et indsatsområde (<http://www.qbol.wur.nl/UK/Packages/WP3/>).

Forslag til molekylær diagnostik af *B. tabaci*

Grundet manglen på velegnede DNA områder vurderes det ikke muligt at udvikle et specifikt real-time baseret assay på det nuværende grundlag. I øvrigt ville også være vanskeligt at skaffe tilstrækkeligt materiale af nærtbeslægtede 'non-target' individer som f.eks. *B. afer* og *B. atriplex*. En mere farbar strategi vil være at anvende DNA barcoding. Her vil man kunne anvende primere udviklet specifikt til *Bemisia* (Shatters et al. 2009) og efterfølgende sende PCR produktet til sekventering. En efterfølgende sammenligning til referencesekvenser vil kunne give en sikker identifikation og vil ligeledes være 'fremtidssikret' da en opsplitning af *B. tabaci* i flere arter ikke vil give anledning til problemer. Indsamling af *Bemisia* kan være blade med *Bemisia* eller individer af *Bemisia*. Da PCR metoden er meget følsom er hurtig nedfrysning af materialet ikke kritisk så længe materialet ikke går i forrådnelse. DNA ekstraktionen kan foretages med et kommercielt kit som f.eks. Dneasy fra Qiagen.

Konklusion

B. tabaci er et artskompleks, som består af mange nærtbeslægtede 'arter'. Vores litteratursøgninger har ikke frembragt publicerede PCR-assays til påvisning af *B. tabaci*, som er tilstrækkeligt sikre. Det skønnes ikke muligt selv at udvikle et PCR-assay pga. den store genetiske variation og fordi det ikke er muligt at fremskaffe tilstrækkeligt mange nært beslægtede arter/underarter til at validere et assay. Det anbefales at benytte et barcoding-baseret assay, som er den mest sikre diagnostiske metode for *B. tabaci*, som findes i dag.

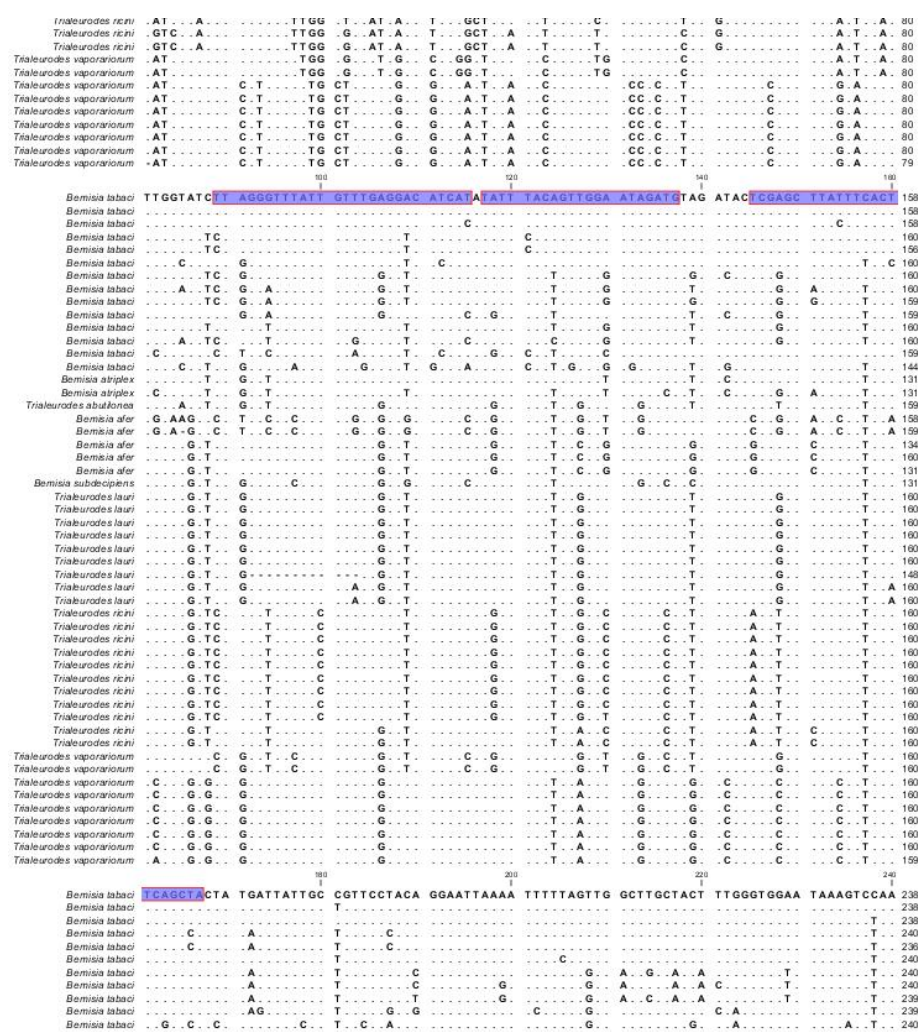
Litteratur

- Boykin, L.M., Shatters, R.G., Rosell, R.C., McKenzie, C.L., Bagnall, R.A., De Barro, P., Frohlich, D.R., 2007. Global relationships of *Bemisia tabaci* (Hemiptera : Aleyrodidae) revealed using Bayesian analysis of mitochondrial COI DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44, 1306-1319.
- Dinsdale, A., Cook, L., Riginos, C., Buckley, Y.M., De Barro, P., 2010. Refined Global Analysis of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aleyrodoidea: Aleyrodidae) Mitochondrial Cytochrome Oxidase 1 to Identify Species Level Genetic Boundaries. *Annals of the Entomological Society of America* 103, 196-208.
- Frohlich, D.R., Torres-Jerez, I., Bedford, I.D., Markham, P.G., Brown, J.K., 1999. A phylogeographical analysis of the *Bemisia tabaci* species complex based on mitochondrial DNA markers. *Molecular Ecology* 8, 1683-1691.
- Hajibabaei, M., Singer, G.A.C., Hebert, P.D.N., Hickey, D.A., 2007. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends in Genetics* 23, 167-172.
- Jones, C.M., Gorman, K., Denholm, I., Williamson, M.S., 2008. High-throughput allelic discrimination of B and Q biotypes of the whitefly, *Bemisia tabaci*, using TaqMan allele-selective PCR. *Pest Management Science* 64, 12-15.
- Li, Z.X., Hu, D.X., Song, Y., Shen, Z.R., 2005. Molecular differentiation of the B biotype from other biotypes of *Bemisia tabaci* (Hemiptera : Aleyrodidae), based on internally transcribed spacer 1 sequences. *European Journal of Entomology* 102, 293-297.
- Li, Z.X., 2006. Molecular phylogenetic analysis reveals at least five genetic races of *Bemisia tabaci* in China. *Phytoparasitica* 34, 431-440.
- Malumphy, C., Walsh, K., Suarez, M.B., Collins, D.W., Boonham, N., 2009. Morphological and molecular identification of all developmental stages of four whitefly species (Hemiptera: Aleyrodidae) commonly intercepted in quarantine. *Zootaxa* 1-29.

Maruthi, M.N., Rekha, A.R., Sseruwagi, P., Hillocks, R.J., 2007. Mitochondrial DNA variability and development of a PCR diagnostic test for populations of the whitefly *Bemisia afer* (Priesner and Hosny). *Molecular Biotechnology* 35, 31-40.

Shatters, R.G., Powell, C.A., Boykin, L.M., He, L.S., McKenzie, C.L., 2009. Improved UNA Barcoding Method for *Bemisia tabaci* and Related Aleyrodidae: Development of Universal and *Bemisia tabaci* Biotype-Specific Mitochondrial Cytochrome c Oxidase I Polymerase Chain Reaction Primers. *Journal of Economic Entomology* 102, 750-758.

Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., Flook, P., 1994. Evolution, Weighting, and Phylogenetic Utility of Mitochondrial Gene-Sequences and A Compilation of Conserved Polymerase Chain-Reaction Primers. *Annals of the Entomological Society of America* 87, 651-701.



Figur 1. Et udsnit af et alignement af udvalgte *B. tabaci* samt nærtbeslægtede arter. Med blå er markeret positionen af primere samt probe fra Malumphy et al. (2009).