Workshop im Rahmen der 63. Pflanzenschutztagung in Göttingen 2023: Bestimmung von nicht-heimischen Käfern an Importholzproben

PHID Coleo II

Identification of beetles in imported wood



Landwirtschaftliches Technologiezentrum Augustenberg

UNIVERSITÄT HOHENHEIM

Gefördert durch

Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft

aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages

Projektträger

Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung

PHID-Coleo II:
Bestimmung von nicht-heimischen Käfern an Importholzproben

Zielsetzung :

- wichtige Arten im Bereich der Pflanzengesundheit erkennen
- Hilfestellung zur selbstständigen Diagnose

Inhalt der Schulung :

- Nutzung von Bestimmungsschlüsseln bzw. vereinfachten Bestimmungshilfen
- Mikroskopie von Demo-Material
- Vergleich von Holzproben mit Schadbildern
- Hinweise zu molekularen Analysen von Insektenproben







Fotos: O. Zimmermann, LTZ

PHID-Coleo II:
Bestimmung von nicht-heimischen Käfern an Importholzproben

Kurze Vorstellung des BMEL-Projektes PHID-Coleo
Dr. Olaf Zimmermann, LTZ Augustenberg

Die Importholzproblematik und die wichtigsten Käferfamilien am Holz
Dr. Olaf Zimmermann, LTZ

Praktischer Teil mit Bestimmungsübungen - Insektenpräparaten und Holz.
Björn Lutsch & Dr. Olaf Zimmermann, LTZ Augustenberg

Molekularbiologische Analysen von Insekten - Probenqualität und Probenlagerung.
Iris Häussermann, Universität Hohenheim

Molekularbiologische Analysen von Insekten - Probenqualität und Probenlagerung

Iris Häussermann, Universität Hohenheim



Molekularbiologie in der Pflanzengesundheit

Prävention	– Häufigkeit und Anzahl der Individuen – Ursprungspopulationen
Identifizierung/ Monitoring	– Schnelle Identifizierung der Art
	– Entwicklung neuer Anwendungen (z.B. eDNA, innerartliche Unterschiede, nicht-invasive Probennahme, etc.)
Tilgung/ Eindämmung	– Evaluierung der Eindämmungs- und Tilgungsmaßnahmen

Molekularbiologische Methoden

PCR-basierte Methoden	– DNA-Marker zur Identifizierung/Charakterisierung mittels PCR (z.B. COI-Barcoding) oder qPCR – LAMP (=‘*loop-mediated isothermal amplification’*)
PCR-basierte Sequenzierung	– Sanger Sequenzierung von PCR Produkten – Amplikon Sequenzierung mittels Illumina-Sequenzierung (z.B. beim Metabarcoding)
Sequenzierung	– Genomsequenzierung (WGS= *‘whole genome sequencing’)* – Partielle Genomsequenzierung (GBS=‘*Genotype-by-sequencing’*, RADseq=‘*restriction site associated sequencing’*) – Transkriptomsequenzierung (RNAseq) – Illumina, PacBio, Nanopore

Zunehmender Informationsgehalt

Anforderungen an Probenqualität und Lagerung

PCR-basierte Methoden

Lagerung **getrocknet** bei **Raumtemperatur**
- PCR limitiert möglich für kurze Zeit
- Stark limitierte Lagerdauer, DNA degradiert

PCR-basierte Sequenzierung

Lagerung fixiert in **Ethanol** bei **Raumtemperatur**
- PCR (v.a. mtDNA) möglich
- Limitierte Lagerdauer (Monate), DNA degradiert

Sequenzierung

Lagerung bei **-20°C** (schockgefroren)
- PCR und Sequenzierung mit HMW (='*high molecular weight*') DNA
- Längere Lagerung (>10 Jahre)

Lagerung bei **-80°C** (schockgefroren)
- Sequenzierungen mit (U)HMW (='*(ultra) high molecular weight*') DNA und RNA möglich
- Längere Lagerung (Jahrzehnte)

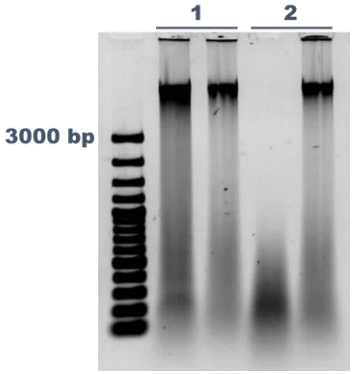
Steigende Anforderung

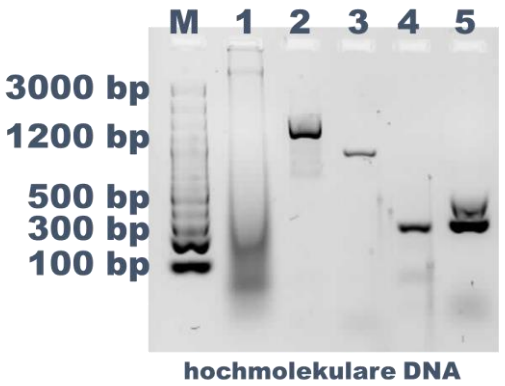
Anforderungen an Probenqualität und Lagerung

PCR-basierte Methoden

PCR-basierte Sequenzierung

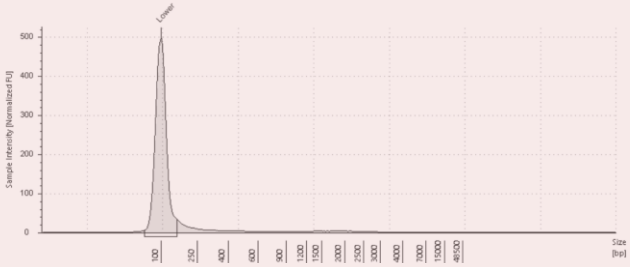
Sequenzierung



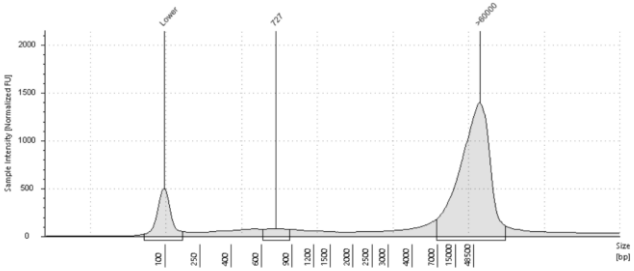




Lagerung fixiert in **Ethanol** bei **Raumtemperatur**



Lagerung bei **-20°C**



Steigende Anforderung

Methodendurchführung und Auswertung

PCR-basierte Methoden

PCR-basierte Sequenzierung

Sequenzierung

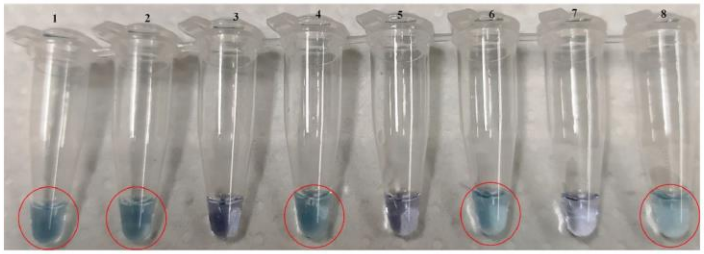
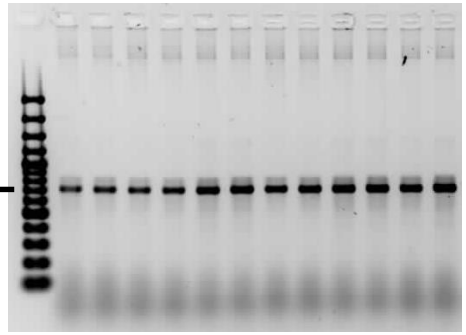


Fig. 4 Visual LAMP reaction tubes visualized by means of HNB (Hydroxynaphthol Blue) coloration. Positive samples are blue, and negative are purple. The assay was performed on DNA extracted from (left to right): tubes 1 and 2, *Aromia bungii* larvae; tube 3, *Anoplophora chinensis* frass; tube 4, *A. bungii* frass; tube 5, *An. glabripennis* frass; tube 6, *Aromia bungii* frass, tube 7, *C. cossus* frass and tube 8, *A. bungii* frass. The circles show the tubes containing *A. bungii* samples

Nachweis von *Aromia bungii* aus Fraß mit LAMP (Rizzo et al. 2021)



Nachweis von *Anoplophora glabripennis* mit COI-Barcoding (Primer aus Folmer et al. 1994)

Steigende Anforderung (und Kosten)

Zunehmender Output und Verwertbarkeit der Daten

Methodendurchführung und Auswertung

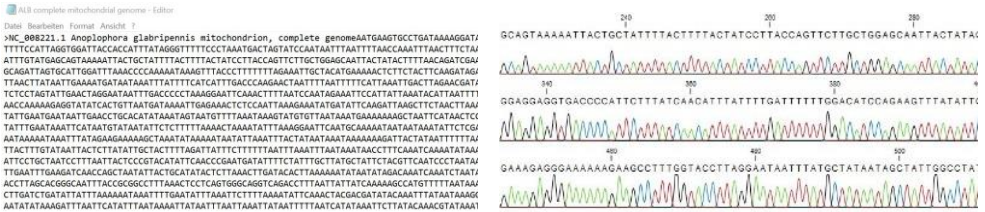
PCR-basierte Methoden

PCR-basierte Sequenzierung

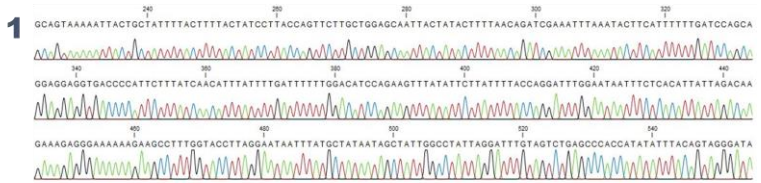
Sanger-Seq

Sequenzierung

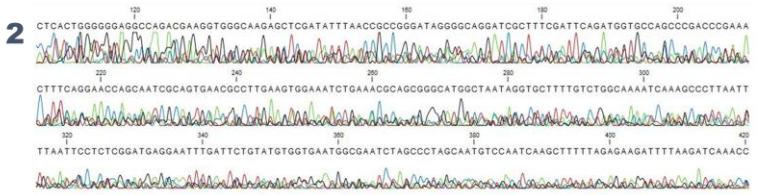
fasta



ab1



sehr gute Qualität



sehr schlechte Qualität



Fremd-DNA?

Steigende Anforderung (und Kosten)

Zunehmender Output und Verwertbarkeit der Daten

Rapide Methodenentwicklung

Kürzere Sequenzen

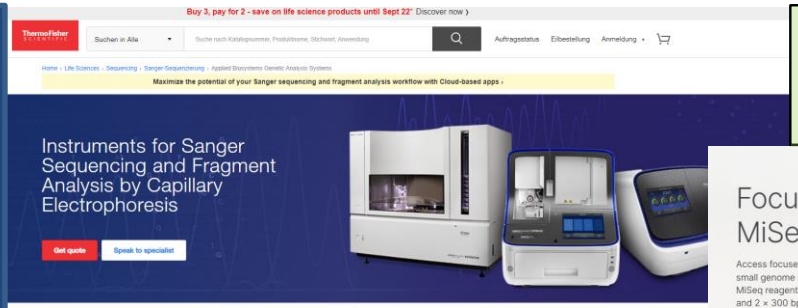
Lange Sequenzen

Sanger

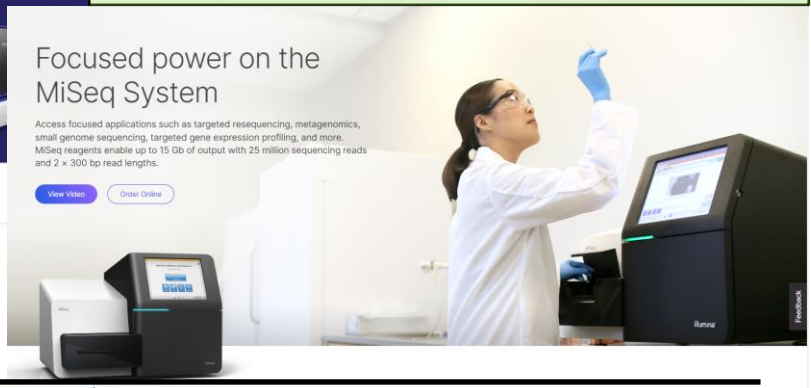
Illumina

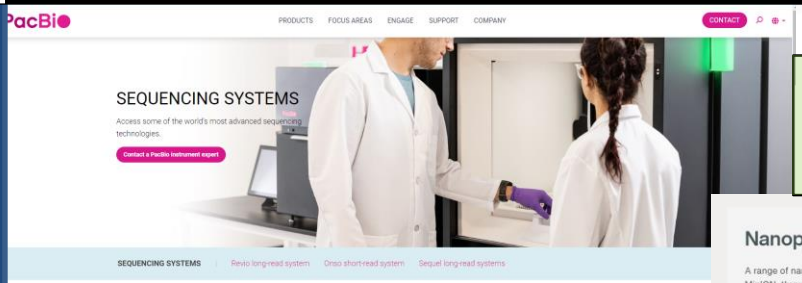
Pacbio

Nanopore



- Einfach, schnell, günstig
- Leichte Auswertung





- Anwendungsmöglichkeiten
- Zukunftsmarkt

