



Innovationstage 2020 – digital

Für eine starke Landwirtschaft und sichere Ernährung

20. und 21. Oktober auf www.innovationstage-digital.de

PHID-Coleo Projekthomepage

www.innovationstage-digital.de

www.ble.de/innovationen









Morphologisch-molekulare Identifikation von Käfern an Verpackungsholz

Förderbereich: Innovative Vorhaben für einen nachhaltigen Pflanzenschutz

FKZ 2814905615, Laufzeit: 15.06.2017 - 15.12.2020

Gefördert durch:





Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (Projektträger)

Projektbetreuung: Dr. Carmen Lübken

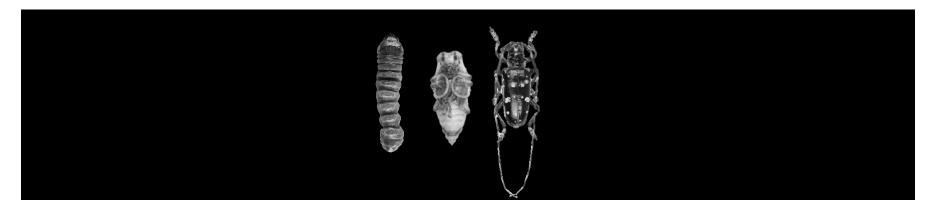
Ref. 321 – Innovationen

Ressourcenschonender Pflanzenbau Verbraucherschutz, Digitalisierung





PHID - Coleo Plant health identification of Coleoptera



Landwirtschaftliches Technologiezentrum Augustenberg, LTZ (Projektkoordination)
Dr. Olaf Zimmermann (Ref. 33, Zoologische Diagnostik)

Universität Hohenheim

Iris Häußermann, Prof. Martin Hasselmann (FG Populationsgenomik bei Nutztieren) Philipp Bauer, Prof. Claus P.W. Zebitz (FG Angewandte Entomologie)

AP 1: Morphologischmolekulare Identifikation von Verpackungsholzkäfern

AP 3: Netzwerkbildung, Internet-Datenbank, Kommunikation





© Hinweise zur Pflanzengesundheit, LTZ (2016) und v.Wuthenau, LTZ (2013)



Technologiezentrum Augustenberg

Landwirtschaftliches



Bundesministerium für Ernährung

und Landwirtschaft

Gefördert durch:



AP 2: Etablierung von Methoden zur innerartlichen Unterscheidung invasiver Arten am Beispiel des ALB

AP = Arbeitspaket ALB = Asiatischer Laubholzbockkäfer





Der Asiatische Laubholzbockkäfer (ALB) als Paradebeispiel

- Natürliche Verbreitung: China, Korea
- Wirtspflanzen: u.a. Ahorn, Rosskastanie, Weide, Pappel, Birke und Ulme
- Mit Verpackungsholz mehrfach nach Europa eingeschleppt
- ALB-Befall in Deutschland erstmals 2004
- Larven schädigen durch Fraß die physische Stabilität von Ästen und schränken den Saftfluss ein
- Eiablagestellen und Ausbohrlöcher sind Eintrittspforten für Fäulepilze
- Von der EU als Quarantäneschadorganismus eingestuft
- Tilgungsmaßnahmen: Baumfällungen und Verbrennung, Monitoring, Einrichtung von Quarantänezonen

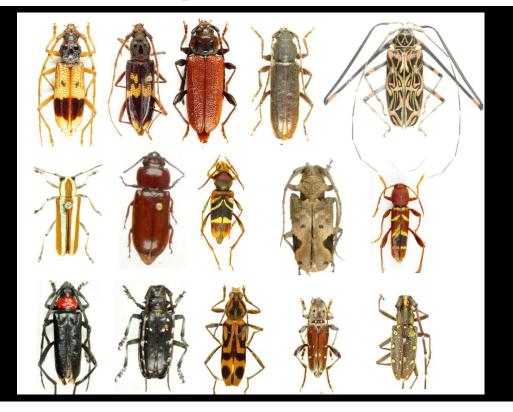


Anoplophora glabripennis (Motschulsky, 1853)





Weitere Beispiele für temporär oder dauerhaft eingebürgerte Bockkäferarten in Europa...



Phoracantha recurva

Phoracantha semipunctata

Callidiellum rufipenne

Acrocinus longimanus

Saperda candida

Neandra brunnea

Xylotrechus chinensis

Phryneta leprosa

... und viele mehr





> 90% der eingeschlepptenOrganismen sind Insekten

ca. 80% phytophage u. A. Fruchtfliegen, Mottenschildläuse, Blattminierer, Thrips...

ca. 15% xylophage Insekten



Nach Schätzungen der US-Landwirtschaftsbehörde (USDA 2003) stehen etwa 70% der im internationalen Handel transportierten Waren mit Holzverpackungsmaterial in Verbindung (HAACK et al. 2014).

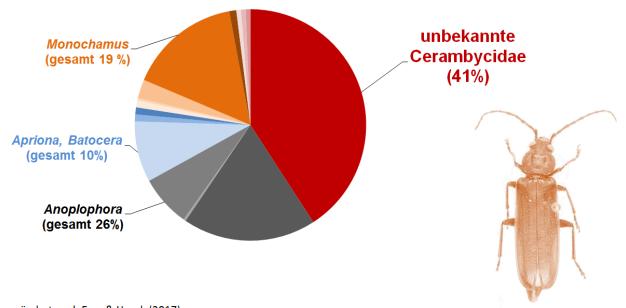




... lediglich 50% der eigeschleppten Organismen werden auf Artniveau bestimmt.

Beispiel Bockkäfer →

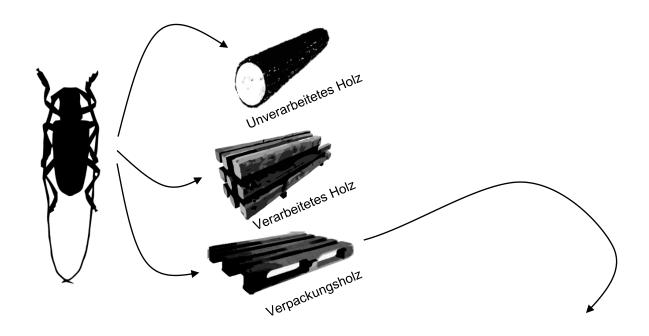
Anzahl der Beanstandungen mit Bockkäferfunden an Verpackungsholz bei Inspektionen in der Europäischen Union zwischen 1998 und 2013 (n = 306)







Laut Meurisse et al. (2019) werden Käfer gegenüber anderen Insektengruppen deutlich häufiger mit Holz verschleppt.



Speziell im Verpackungsholz-Bereich zählen **Bohr- und Splintholzkäfer** sowie **Bockkäfer** zu den wichtigsten Käfergruppen (Eyre et al. 2018).















Halsschild vorn kugelig-rund.

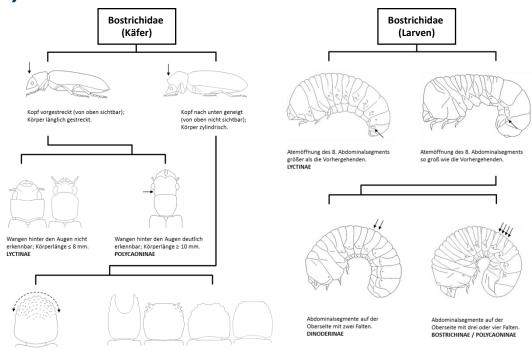
mit Raspelstruktur.

DINODERINAE

BOSTRICHIDAE (Bohr-und Splintholzkäfer)

vereinfachte Bestimmungshilfen zu ausgewählten Unterfamilien →

- kostenfreie
 Bestimmungshilfe
 gedruckt und als pdf
- geeignet als Arbeitsgrundlage für SOPs im Rahmen der Akkreditierung der Diagnose



Halsschild vorn nicht kugelig-rund.

Bostrichinae

z.T mit Zähnchen, Haken, Kerben, Hörnern.





CERAMBYCIDAE (Bockkäfer)

ca. 25.000 beschriebene Arten

ca. 4.000 Gattungen

8 Unterfamilien

xylophag, phytophag

monophag, polyphag

oft nur in bestimmten Pflanzenbereichen (Wurzel, Stammbereich, Äste oder Zweige)

Larven: in Rinde, zwischen Rinde und Splint, im Holz

Zustand des Substrats spielt eine Rolle (Nährstoffgehalt, Feuchtigkeit, Temperatur)





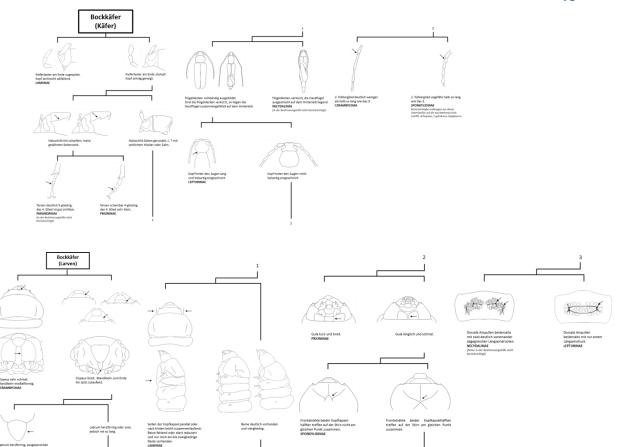




CERAMBYCIDAE (Bockkäfer)

vereinfachte Bestimmungshilfen zu ausgewählten Unterfamilien →

- kostenfreie
 Bestimmungshilfe
 gedruckt und als pdf
- geeignet als Arbeitsgrundlage für SOPs im Rahmen der Akkreditierung der Diagnose



AP 1: Morphologischmolekulare Identifikation von Verpackungsholzkäfern

AP 3: Netzwerkbildung, Internet-Datenbank, Kommunikation





© Hinweise zur Pflanzengesundheit, LTZ (2016) und v.Wuthenau, LTZ (2013)







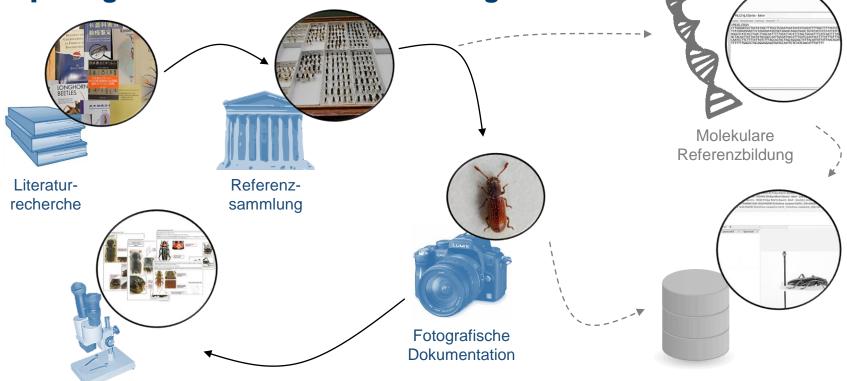


AP 2: Etablierung von Methoden zur innerartlichen Unterscheidung invasiver Arten am Beispiel des ALB





Morphologisch-molekulare Bestimmungshilfen



Bestimmungshilfen

Datenbank





Literatur

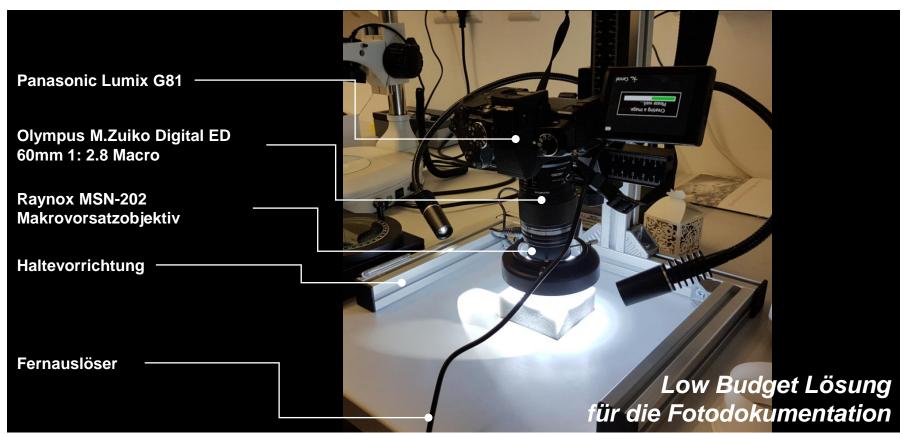
- Gegenbestimmung
- Identifikation von Bestimmungsmerkmalen
- Angaben über Wirtspflanzen und Verbreitung
- als Referenzbibliothek für die Pflanzenschutzdienste







Fotodokumentation





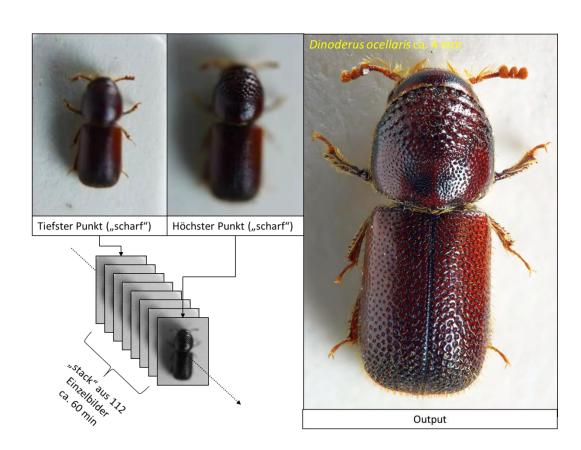


Fotodokumentation

Konvertierung aufgenommener Video-Files (.avi) in Einzelframes (.jpg) und anschließende Erstellung von Schichtbildaufnahmen.

Verwendete Software:

Free Video to JPG Converter CombineZP CZP Batch







Fotodokumentation







Dokumentation





AP 1: Morphologischmolekulare Identifikation von Verpackungsholzkäfern

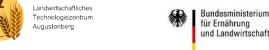
AP 3: Netzwerkbildung, Internet-Datenbank, Kommunikation





© Hinweise zur Pflanzengesundheit, LTZ (2016) und v.Wuthenau, LTZ (2013)







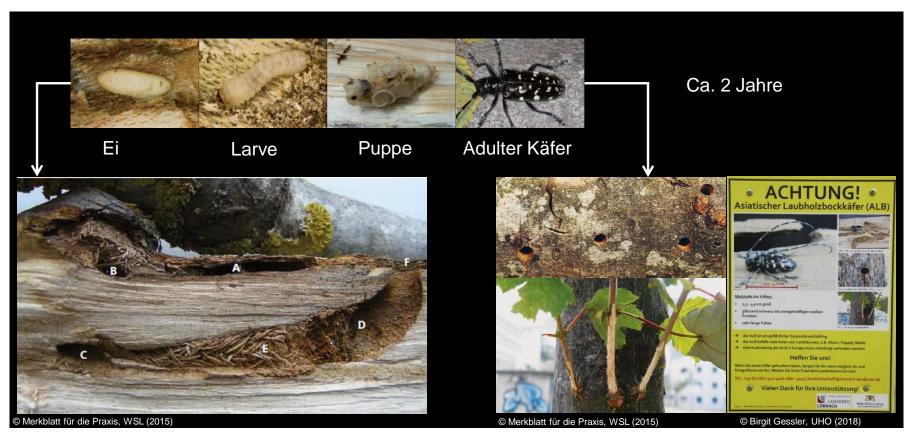


AP 2: Etablierung von Methoden zur innerartlichen Unterscheidung invasiver Arten am Beispiel des ALB





Lebenszyklus und Schäden an Laubbäumen durch Befall mit ALB

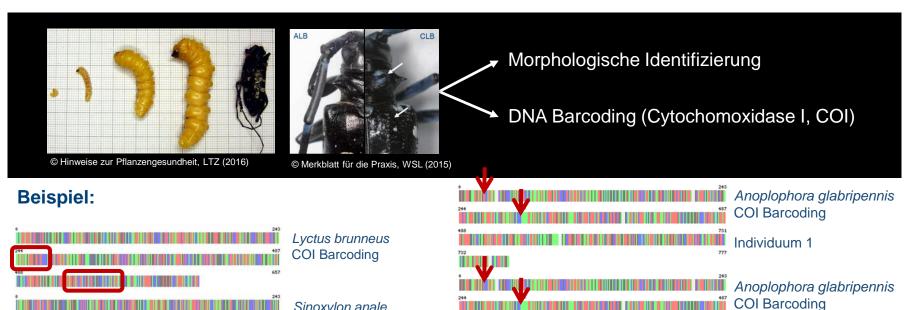






Artbestimmung vs. Innerartliche Differenzierung

Sinoxylon anale COI Barcoding



Größere Unterschiede/Polymorphismen

Zuordnung der Art

Kleinere innerartliche Unterschiede von Populationen **Zuordnung der Herkunft**

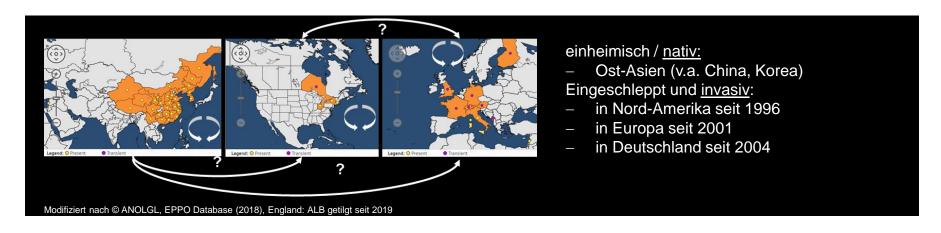
Individuum 2





Globale Ausbreitung von Anoplophora glabripennis

Der ALB wurde wahrscheinlich mehrfach über den globalen Handel mit China und Korea in Nord-Amerika und Europa eingeschleppt. Die Verbreitungswege und sekundären Verschleppungen sind bisher ungeklärt.



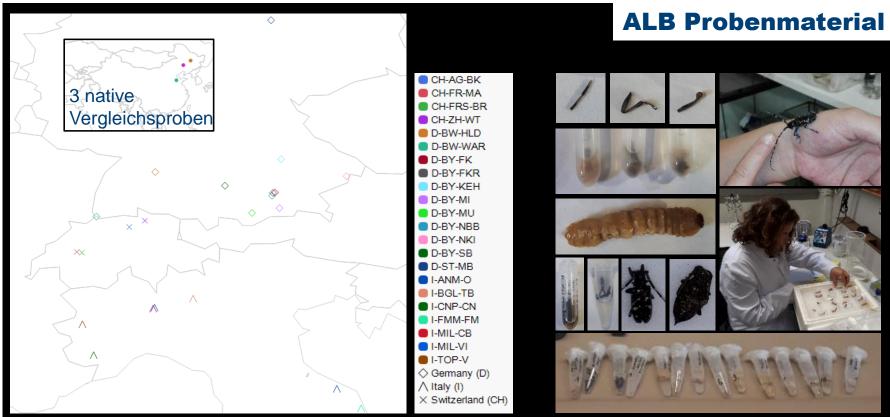


Aufklärung durch Identifizierung der innerartlichen Unterschiede und Populationsstrukturen

- 1. Mitochondriale Marker (Cytochromoxidase 1 und 2)
- 2. Genomische Marker/SNPs via Genotype-by-Sequencing (GBS)











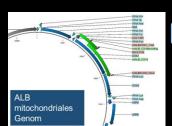
Versuchsüberblick











Sanger-Sequenzierung

mitochondrialer Marker

- Cytochomoxidase I und II
- COI-Barcoding





genomische Marker/SNPs via

Genotype-by-Sequencing

- NextSeq 500
- 2 x 150 bp paired-end

- Haplotypen-Analyse
- Vergleich mit BOLD- und NCBI-Datenbanken





- Bestimmung der genetischen Diversität und der Populationsstrukturen
- Verwandtschaftsanalysen







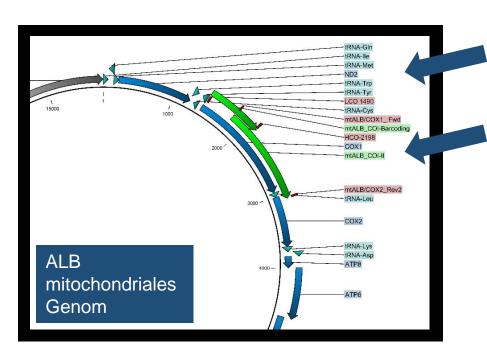
Effizientere Bekämpfungsstrategien





Mitochondriale Marker

- Datenlage: gut erforscht, etablierte Marker
- Genetische Eigenschaften: konservierte Gene, hohe Anzahl an Kopien, haploid (maternal)



COI-Barcoding

Molekulare Artbestimmung

Innerartliche Variationen

- Barcoding: Artbestimmung mittels der DNA-Sequenz eines Markergens.
- Arthropoden: meist verwendet ~700 bp großer Abschnitt der Cytochromoxidase I (COI) mit Universal-Primern (Folmer et al. 1994)

Cytochromoxidase I/II

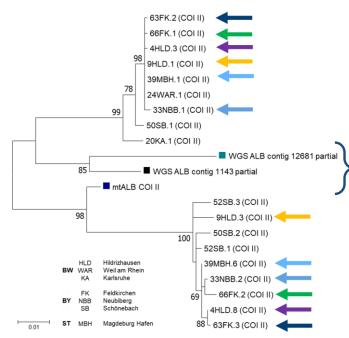
Innerartliche Variationen

- Größerer Abschnitt von COI zusammen mit Teilen einer weiteren Untereinheit (COII)
- Ähnliche Marker häufig in "Popsets" von ALB in NCBI vertreten
- Aufdecken von mehr Variationen trotz der konservierten Eigenschaften





Genetische Variation Cytochromoxidase I/II



Baum nach *Maximum Likelihood* Methode, T92 Modell, 500 bootstraps, farbige Pfeile stehen für dieselben Individuen

Zwei Haplotyp-Gruppen für COI/II

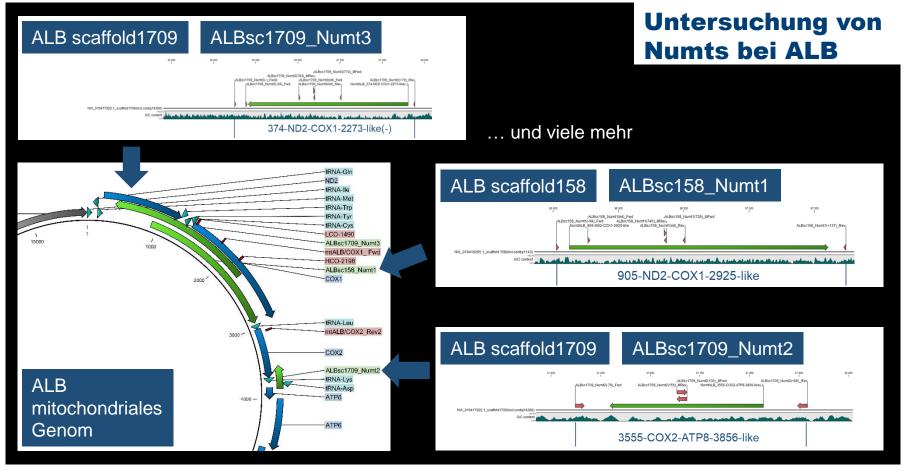
- Kopie ins nukleäre Genom (Numts, <u>Nu</u>clear
 <u>mit</u>ochondrial <u>s</u>equence) am wahrscheinlichsten
- Potentielle Störung des COI-Barcodings für den ALB
- Weitere Untersuchungen der Numts, verfolgen unterschiedlicher evolutionärer Hintergründe Testen ob COI-Barcoding bei ALB gestört ist

BLAST der mtALB-COI/II Sequenz gegen WGS contigs von ALB (2018)

- BLAST mitochondrialer Sequenzen zum Aufspüren weiterer Numts im Referenzgenom von ALB
- PCRs und Sanger-Sequenzierung von Numts
- COI-Barcoding
- PCRs und Sanger-Sequenzierung
- Auf mehrfache Haplotypen/Individuum überprüfen





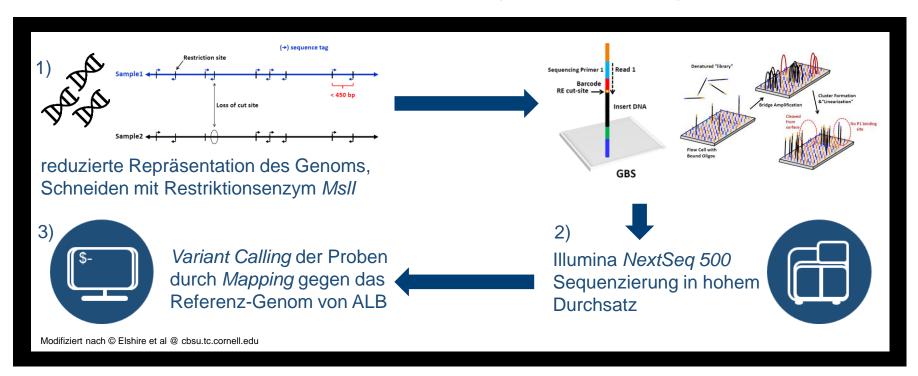






Genotype-by-Sequencing (GBS)

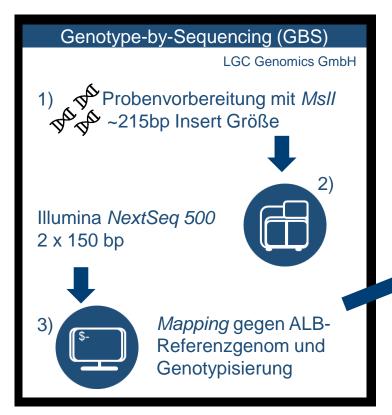
Effizientes und kostengünstiges genomweites Marker-Screening nach <u>Single Mucleotide Polymorphisms</u> (SNPs) durch simultane Hochdurchsatz-Sequenzierung und Genotypisierung

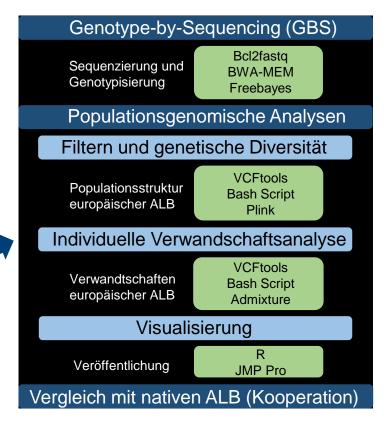






Genetische Variation und Populationsstruktur von ALB









Genomische Marker via GBS

3 Durchläufe von GBS mit insgesamt 178 ALB-Proben

- davon 3 CN Vergleichsproben
- davon 2x Interne Kontrolle (D-BY-SB-15-047)

10-tausende genomische Marker zur Bestimmung der innerartlichen genetischen Diversität und der Bestimmung der Verwandtschaften

	* nur Ortsname, mehrere Fundorte innerhalb möglich		
Filterkombination ("1%miss")	Anzahl SNPs/Marker	Anzahl Individuen	Anzahl Fundorte*
ALB-Proben insgesamt	10 317	178	25
CH + D-BW	9 237	38	6
D-BY	11 499	71	8
D-ST-MB	13 193	32	1
Italien	16 493	32	7

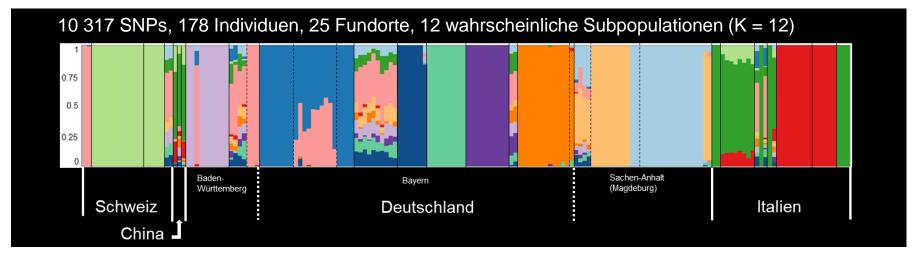
Filter: Qualität, Abdeckung, Allel-Frequenz und fehlende Daten ("miss")





Admixture Analyse – Verwandtschaft der ALB Funde in Europa

Modell-basierte Berechnung individueller Verwandtschaften und die wahrscheinlichste Anzahl der Subpopulationen (K) aus SNP-Datensätzen.

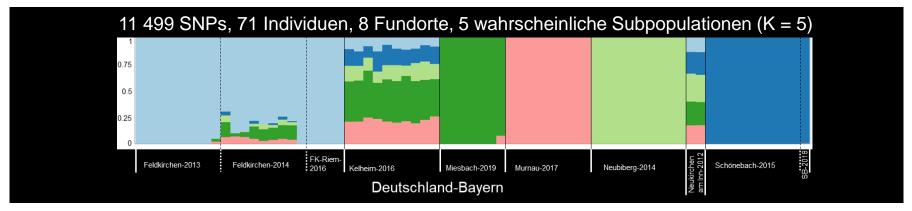


- Geringe genetische Diversität innerhalb vieler Fundorte (<u>Founder-Effekt</u>), teilweise auch benachbarter/nahe gelegener Fundorte
- Vielseitige Populationsstrukturen der invasiven europäischen Befallsgebiete und damit höchst wahrscheinlich auch eine komplexe Einschleppungs-Geschichte z.B. <u>mehrfache Einschleppung</u> und <u>sekundäre Verschleppung</u>





Admixture Analyse – Verwandtschaft der ALB Funde in Bayern

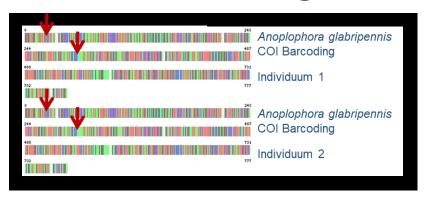


- In Orten wie Miesbach, Murnau, Neubiberg und Schönebach sind einzelne Einschleppungen (oder Verschleppungen) auf Grund der eindeutigen verwandtschaftlichen Abgrenzung sehr wahrscheinlich
- Mögliche sekundären Verschleppungen (z.B. Neukirchen am Inn, oder Kelheim zu anderen Fundorten) müssen geprüft werden
- Die "vermischten" Gruppen zeigen h\u00f6here genetische Diversit\u00e4t, was auf eine junge Einschleppung zum Fund-Zeitpunkt hindeuten k\u00f6nnte (Abgleich mit nativen Proben erforderlich)
- Beispiel zur Anwendung in der Praxis: 2019 konnte ein Einzelfund aus Pheromon-Fallen in Schönebach (2018) eindeutig mit früheren Funden (2015) verwandtschaftlich in Verbindung gebracht werden, was eine Anpassung der Bekämpfungsstrategie erforderlich machte.



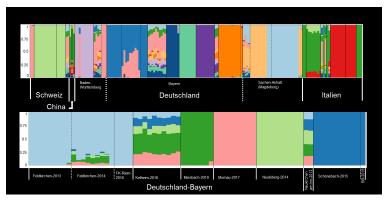


COI-Barcoding



- Hoch konservierte Region, daher eher wenige SNPs
- Gute Datenlage/Vergleichsmöglichkeiten mit weltweiten ALB Populationen
- Einfache Handhabung/schnelle Ergebnisse
- Geringe Auflösung kann zu verfälschten Darstellungen der Verbreitung führen

Genomische Marker/SNPs



- Sehr viele und je nach Filterkombinationen auch eher seltenere SNPs
- Bisher <u>einzigartig</u> für europäische ALB

VS

- Bisher hoher Aufwand und Knowhow nötig
- Sehr hohe Auflösung kann das Verständnis der Verbreitung nachhaltig verbessern und für effizientere Bekämpfungsstrategien genutzt werden

AP 1: Morphologischmolekulare Identifikation von Verpackungsholzkäfern

AP 3: Netzwerkbildung, Internet-Datenbank, Kommunikation





© Hinweise zur Pflanzengesundheit, LTZ (2016) und v.Wuthenau, LTZ (2013)



Landwirtschaftliches Technologiezentrum Augustenberg



Gefördert durch:



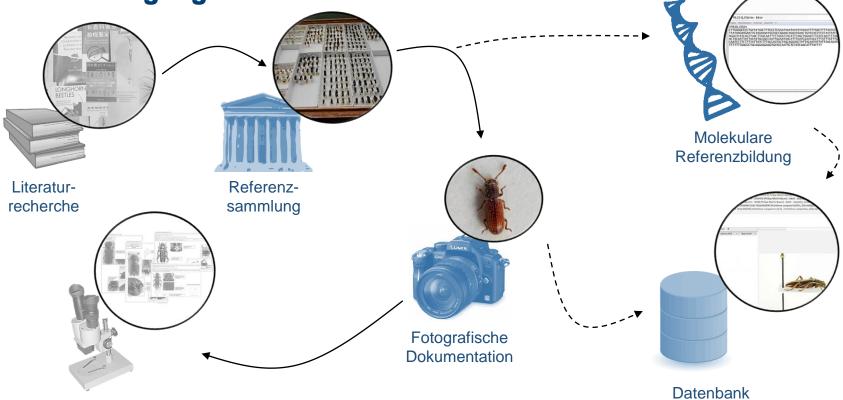


AP 2: Etablierung von Methoden zur innerartlichen Unterscheidung invasiver Arten am Beispiel des ALB





Öffentlich zugängliche Datenbank



Bestimmungshilfen



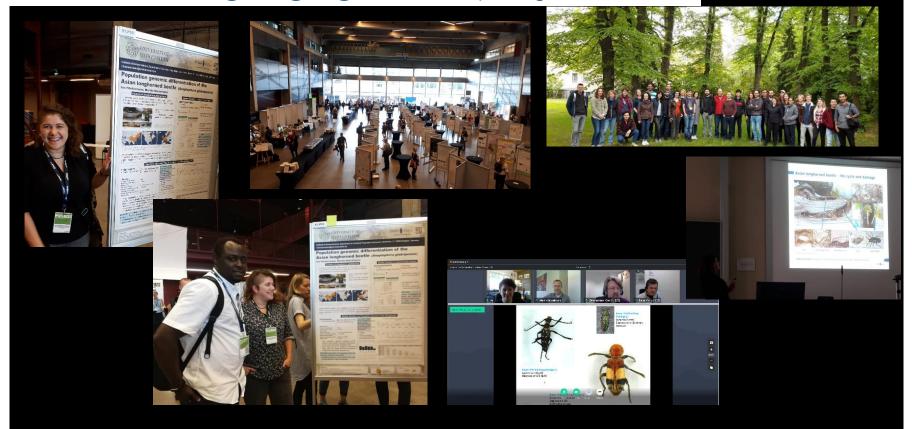








Netzwerkbildung: Tagungsbesuche, Projekttreffen







Netzwerkbildung: Tagungsbesuche, Workshop-Angebote







Ausblick: Beantragung von PHID-Coleo II

Erweiterung der Thematik um holzschädigende Käferfunde an lebenden Gehölzpflanzen-Importen in der Pflanzengesundheit

- Prachtkäfer (Buprestidae)
- Borkenkäfer (Scolytinae)

Digitale Bestimmung der Käfer mit Smartphone-Bilderkennung

Nutzung von Next Generation Sequencing (NGS)

Populationsgenetische Charakterisierung weiterer Bockkäfer-Arten

Chinesischer Laubholzbock *Anoplophora chinensis* (wiederholte Einschleppung nach Europa)

Asiatischer Moschusbock Aromia bungii (in Bayern, Italien nicht ausrottbar an Pflaume, Pfirsich)





Besuchen Sie unser Projekt!





© Hinweise zur Pflanzengesundheit, LTZ (2016) und v.Wuthenau, LTZ (2013)





Gefördert durch:







PHID-Coleo Homepage



PHID-Coleo Projekthomepage (LTZ)

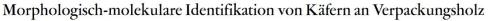
popgenomik.uni-hohenheim.de

Kontakt: PHID-Coleo@ltz.bwl.de















Innovationstage 2020 – digital

Für eine starke Landwirtschaft und sichere Ernährung

20. und 21. Oktober auf www.innovationstage-digital.de

www.innovationstage-digital.de

www.ble.de/innovationen