

## The analysis of the rDNA sequence in populations of western flower thrips (*Frankliniella occidentalis* Pergande) from Wielkopolska

### Analiza sekwencji rDNA wielkopolskich populacji wciornastka zachodniego (*Frankliniella occidentalis* Pergande)

Arnika Jeszke, Żaneta Fiedler, Aleksandra Obrępańska-Stęplowska

#### Summary

Western flower thrips (*Frankliniella occidentalis* Pergande) is an economically important pest in greenhouse crops. Successful control of this pest is very difficult. Larvae of this pest are vectors of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) and *Tobacco streak virus* (TSV). The aim of this work was to analyze ribosomal DNA sequences of western flower thrips populations originating from different regions of the Wielkopolska province and to make phylogenetic studies based on those sequences. In this work new Polymerase Chain Reaction (PCR) primers were used which enable rDNA fragment amplification. PCR reaction was carried out and its products were sequenced, followed by bioinformatic analysis. The identity level of analyzed populations from Wielkopolska was 98.2–100% and identity between analyzed populations and reference population from the GeneBank database was about 98.7–99.7%. Phylogenetic studies were also made. The results of this work will be useful to develop new diagnostic methods to distinguish western flower thrips and other thrips species presenting a threat in Poland.

**Key words:** *Frankliniella occidentalis*, rDNA, PCR, phylogenesis

#### Streszczenie

Wciornastek zachodni (*Frankliniella occidentalis* Pergande) jest ważnym ekonomicznie szkodnikiem występującym zarówno na warzywach, jak i roślinach ozdobnych w uprawach szklarniowych. Większość gatunków wciornastków nie ma dużego znaczenia gospodarczego, ponieważ cały rozwój przechodzą na roślinie, głównie żerując gromadnie na liściach. Stąd są łatwe do zwalczania środkami chemicznymi. Inne zaś, takie jak wciornastek zachodni sprawiają duże problemy w ochronie, w uprawach szklarniowych ze względu na ukryty sposób bycia oraz na występowanie dużej oporności na insektycydy. Ponadto, larwy *F. occidentalis* są wektorami wirusa brunatnej plamistości pomidora (TSWV) i wirusa pasiastości tytoniu (TSV). Celem pracy była analiza fragmentów sekwencji rybosomalnego DNA wielkopolskich populacji wciornastka zachodniego oraz przeprowadzenie ich analiz filogenetycznych. W pracy zaproponowano parę starterów, umożliwiającą powielenie fragmentu rDNA. Przeprowadzono reakcje PCR, a uzyskane w nich produkty poddano sekwencjonowaniu. Wyniki analizowano przy pomocy narzędzi bioinformatycznych. Wykazano, że poziom identyczności pomiędzy poszczególnymi wielkopolskimi populacjami wynosił 98,2–100%, natomiast pomiędzy populacjami analizowanymi a sekwencją referencyjną pochodzącą z Banku Genów – 98,7–99,7%. Przeprowadzono także analizy filogenetyczne. Uzyskane wyniki posłużą do opracowania metod diagnostycznych, umożliwiających jednoznaczne odróżnienie wciornastka zachodniego od innych gatunków wciornastków stanowiących zagrożenie na terenie Polski.

**Słowa kluczowe:** *Frankliniella occidentalis*, wciornastek zachodni, rDNA, filogeneza, PCR

Institut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy  
Władysława Węgorka 20, 60-318 Poznań  
a.jeszke@iorpib.poznan.pl

## Wstęp / Introduction

Wciornastki (Thysanoptera: Thripidae) należą do jednych z najgroźniejszych szkodników roślin szklarniowych. Wśród nich szczególnie niebezpieczny jest wciornastek zachodni (*Frankliniella occidentalis* Pergande), który atakuje większość roślin ozdobnych oraz warzyw, powodując ogromne straty w plonach (Fiedler i Sosnowska 2008). Wciornastki zerują na kwiatach i liściach, wysysają soki roślinne, powodując odbarwienie i skorkowacenia na otwartych kwiatostanach i płatkach. w przypadku warzyw wciornastki ograniczają kwitnienie, powodują rozległe uszkodzenia kwiatów, uniemożliwiając w ten sposób zawiązywanie owoców. Oprócz strat bezpośrednich, duże zagrożenie ze strony wciornastka wynika z faktu, że larwy tego szkodnika są wektorami wirusów roślinnych m.in. wirusa brązowej plamistości pomidora (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) i wirusa pasiastości tytoniu (*Tobacco streak virus*, TSV) (Huang i wsp. 2010). Na terenie Polski wciornastka zachodniego odnotowano po raz pierwszy w roku 1987. Przypuszcza się, że został sprowadzony wraz z sadzonkami chryzantem pochodzącymi z Holandii (Kropczyńska i wsp. 1988). Do roku 2004 był szkodnikiem kwarantannowym. W warunkach Polski na uprawach warzywnych i roślinach ozdobnych może występować wiele gatunków wciornastków. Wśród nich najbardziej powszechnym gatunkiem jest wciornastek tytoniowiec (*Thrips tabaci*), który wyrządza szkody na roślinach zarówno w uprawach pod osłonami, jak i w uprawach polowych.

Bardzo ważnym elementem w zwalczaniu szkodników jest ich prawidłowa identyfikacja. Jednym ze sposobów diagnostyki jest detekcja z wykorzystaniem technik molekularnych, którą poprzedza analiza sekwencji DNA przydatnych do późniejszych celów diagnostycznych.

Celem pracy była analiza sekwencji populacji *F. occidentalis* Pergande, pochodzących z różnych części Wielkopolski, a także ich analiza filogenetyczna.

## Materiały i metody / Materials and methods

Materiałem do badań były różne stadia rozwojowe wciornastka zachodniego zebrane z ośmiu miejsc (szklarni produkcyjnych) na terenie Wielkopolski (tab. 1). Populacje stanowiły wszystkie osobniki z danej lokalizacji.

### Izolacja DNA, projektowanie starterów i przeprowadzenie łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR – Polymerase Chain Reaction)

Z każdej populacji wykorzystano po kilka lub kilkanaście osobników do izolacji kwasu deoksyrybonukleinoowego (DNA). Izolację wykonano za pomocą zestawu DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen). Na podstawie sekwencji zdeponowanych w bazie NCBI (National Center of Biotechnology Information) zaprojektowano pary starterów obejmujących możliwie najdłuższy fragment 18S-ITS1-5,8S-ITS2-28S rDNA, z których do dalszych badań wykorzystano parę umożliwiającą amplifikację fragmentu DNA o długości około 1410 pz (tab. 2).

Startery zostały przetestowane w reakcji PCR, wykorzystując DNA wyizolowane z osobników wszystkich analizowanych populacji.

### Klonowanie i sekwencjonowanie produktu

Produkty amplifikacji o pożądanej wielkości wycięto z żelu. DNA wyeluowano z wykorzystaniem zestawu Qiaex II Gel Extraction Kit (Qiagen), według zaleceń producenta, a następnie ligowano z wektorem p-GEM T-Easy (Promega). Zrekombinowanym wektorem transformowano komórki kompetentne *E. coli* (One Shot TOP10 Electrocompetent Cells, Invitrogen). Plazmidy wyizolowano z komórek bakterii za pomocą zestawu QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) i wysłano do sek-

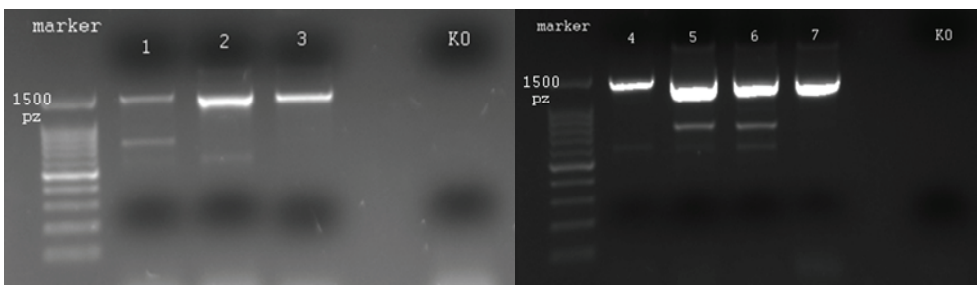
Tabela 1. Zestawienie miejscowości, z których pochodziły analizowane populacje *F. occidentalis*  
Table 1. List of analyzed *F. occidentalis* populations and origin places

Numer populacji Population number	0	1	2	3	4	5	6	7
Miejsce pochodzenia Origin place	Hodowla IOR – PIB*	Poladowo	Szamotuły	Śrem	Szosa Turecka	Kościelna Wieś	Kalisz	Pleszew

\*IOR – PIB – Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy – Institute of Plant Protection – National Research Institute

Tabela 2. Sekwencje starterów wykorzystanych do amplifikacji obszaru 18S-ITS1-5,8S-ITS2-28S rDNA wciornastka zachodniego  
Table 2. Primers used for PCR amplification of 18S-ITS1-5,8S-ITS2-28S of rDNA region in western flower thrips genome

Starter Primer	Sekwencja startera Primer sequence	Temperatura annealingu Annealing temperature	Region przyłączenia Target region
ThrUNI1	CGTACAAGGTTTCCGTAGG	54st	18S rDNA
ThrUNI2	CCTCSGCTTAKTRATAKGC	54st	28S rDNA



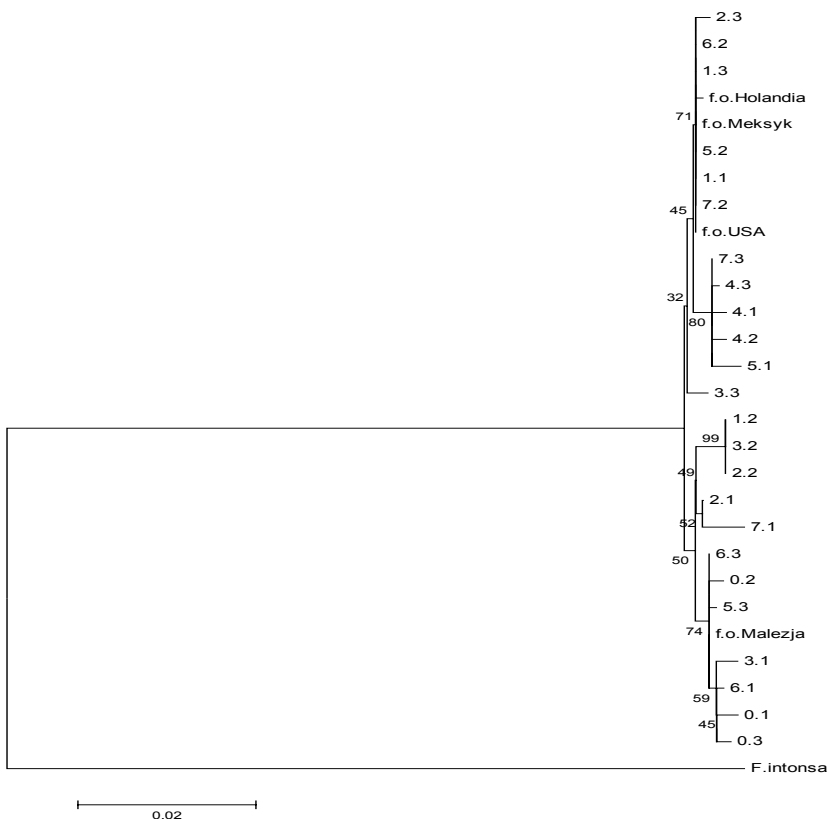
Rys. 1. Rozdział produktów reakcji PCR ze starterami ThrUNI1/2, na matrycy DNA uzyskanej z osobników wielkopolskich populacji *F. occidentalis* na żelu agarozowym barwionym Midori Green

Fig. 1. Visualization of electrophoretic separation of PCR reaction products obtained with ThrUNI1/2 primers applied to DNA isolated from *F. occidentalis*

Seq->	0.1 .	0.2 .	0.3 .	1.1 .	1.2 .	1.3 .	2.1 .	2.2 .	2.3 .	3.1 .	3.2 .	3.3 .	4.1 .	4.2 .	4.3 .	5.1 .	5.2 .	5.3 .	6.1 .	6.2 .	6.3 .	7.1 .	7.2 .	7.3 .	ref .
0.1 .	ID	0.999	0.994	0.989	0.985	0.988	0.988	0.985	0.987	0.994	0.985	0.984	0.982	0.984	0.984	0.983	0.989	0.987	0.995	0.989	0.988	0.984	0.989	0.986	0.987
0.2 .	0.989	ID	0.992	0.988	0.983	0.987	0.987	0.983	0.987	0.991	0.983	0.982	0.984	0.984	0.987	0.984	0.988	0.987	0.992	0.988	0.987	0.982	0.988	0.987	0.989
0.3 .	0.994	0.992	ID	0.989	0.986	0.989	0.989	0.986	0.989	0.986	0.986	0.985	0.984	0.986	0.987	0.985	0.989	0.988	0.997	0.989	0.989	0.985	0.989	0.988	0.989
1.1 .	0.989	0.988	0.989	ID	0.993	0.999	0.997	0.993	0.997	0.989	0.993	0.993	0.992	0.994	0.994	0.993	1.000	0.994	0.990	1.000	0.996	0.993	1.000	0.996	0.997
1.2 .	0.985	0.983	0.986	0.993	ID	0.992	0.992	1.000	0.991	0.985	1.000	0.988	0.986	0.987	0.988	0.987	0.993	0.988	0.987	0.997	0.989	0.988	0.995	0.989	0.991
1.3 .	0.980	0.987	0.989	0.989	0.992	ID	0.996	0.992	0.997	0.980	0.992	0.992	0.993	0.994	0.992	0.989	0.994	0.989	0.995	0.992	0.989	0.995	0.995	0.997	0.997
2.1 .	0.988	0.987	0.989	0.997	0.992	0.996	ID	0.992	0.994	0.988	0.992	0.993	0.991	0.992	0.993	0.992	0.997	0.993	0.989	0.997	0.993	0.994	0.997	0.994	0.996
2.2 .	0.985	0.983	0.986	0.993	1.000	0.992	0.992	ID	0.991	0.985	1.000	0.988	0.986	0.987	0.988	0.987	0.993	0.988	0.987	0.993	0.989	0.988	0.993	0.989	0.991
2.3 .	0.987	0.987	0.989	0.997	0.991	0.997	0.994	0.991	ID	0.988	0.991	0.991	0.992	0.993	0.994	0.992	0.997	0.997	0.997	0.994	0.991	0.992	0.997	0.995	0.997
3.1 .	0.994	0.991	0.996	0.989	0.985	0.988	0.988	0.985	0.988	ID	0.985	0.984	0.984	0.985	0.986	0.984	0.989	0.987	0.997	0.989	0.988	0.984	0.989	0.987	0.989
3.2 .	0.985	0.983	0.986	0.993	1.000	0.992	0.992	1.000	0.991	0.985	ID	0.988	0.986	0.987	0.988	0.987	0.993	0.988	0.987	0.993	0.989	0.993	0.989	0.991	0.992
3.3 .	0.984	0.982	0.985	0.993	0.988	0.992	0.993	0.988	0.991	0.984	0.988	ID	0.987	0.989	0.989	0.988	0.993	0.989	0.986	0.993	0.989	0.989	0.993	0.991	0.992
4.1 .	0.982	0.984	0.984	0.992	0.986	0.992	0.991	0.986	0.992	0.984	0.986	0.987	ID	0.994	0.996	0.993	0.992	0.989	0.985	0.992	0.989	0.987	0.992	0.996	0.994
4.2 .	0.984	0.984	0.986	0.994	0.987	0.993	0.992	0.987	0.993	0.985	0.987	0.989	0.994	ID	0.996	0.994	0.994	0.990	0.987	0.994	0.990	0.989	0.994	0.997	0.994
4.3 .	0.984	0.987	0.987	0.994	0.980	0.994	0.993	0.988	0.994	0.986	0.988	0.989	0.996	0.996	ID	0.995	0.994	0.991	0.987	0.994	0.991	0.989	0.994	0.996	0.997
5.1 .	0.983	0.984	0.985	0.993	0.987	0.992	0.992	0.987	0.992	0.984	0.987	0.988	0.993	0.994	0.995	ID	0.993	0.989	0.986	0.993	0.989	0.991	0.993	0.997	0.994
5.2 .	0.989	0.988	0.989	1.000	0.993	0.999	0.997	0.989	0.993	0.993	0.992	0.994	0.994	0.993	ID	0.994	0.990	1.000	0.996	0.993	1.000	0.996	0.997	0.997	0.997
5.3 .	0.987	0.987	0.988	0.994	0.988	0.994	0.993	0.988	0.992	0.987	0.988	0.989	0.989	0.990	0.991	0.989	0.994	ID	0.989	0.994	0.990	0.989	0.994	0.992	0.994
6.1 .	0.985	0.992	0.997	0.990	0.987	0.989	0.989	0.989	0.987	0.989	0.987	0.986	0.985	0.987	0.986	0.986	0.990	0.989	ID	0.990	0.989	0.986	0.990	0.989	0.990
6.2 .	0.989	0.988	0.989	1.000	0.993	0.999	0.997	0.993	0.997	0.989	0.993	0.993	0.992	0.994	0.994	0.993	1.000	0.994	0.990	ID	0.996	0.993	1.000	0.996	0.997
6.3 .	0.988	0.987	0.989	0.996	0.989	0.995	0.993	0.989	0.994	0.988	0.989	0.989	0.989	0.990	0.991	0.989	0.996	0.998	0.989	0.996	ID	0.989	0.996	0.992	0.994
7.1 .	0.984	0.982	0.985	0.993	0.988	0.992	0.994	0.988	0.991	0.984	0.988	0.989	0.987	0.989	0.989	0.993	0.989	0.986	0.993	0.989	ID	0.993	0.996	0.991	0.992
7.2 .	0.989	0.988	0.989	1.000	0.993	0.999	0.997	0.993	0.997	0.989	0.993	0.993	0.992	0.994	0.994	0.993	1.000	0.994	0.990	1.000	0.996	0.993	ID	0.996	0.997
7.3 .	0.988	0.987	0.988	0.996	0.989	0.995	0.994	0.989	0.993	0.987	0.989	0.991	0.996	0.997	0.996	0.997	0.996	0.992	0.998	0.996	0.992	0.991	0.996	ID	0.997
ref .	0.987	0.989	0.989	0.997	0.991	0.997	0.996	0.991	0.997	0.989	0.991	0.992	0.994	0.994	0.997	0.994	0.997	0.994	0.990	0.997	0.994	0.992	0.997	ID	0.997

Rys. 2. Podobieństwa między poszczególnymi sekwencjami wielkopolskich populacji *F. occidentalis*

Fig. 2. Identity between analyzed *F. occidentalis* sequences



Rys. 3. Wyniki analizy filogenetycznej badanych populacji *F. occidentalis* pochodzących z różnych części Wielkopolski, populacji pochodzących z innych krajów, zdeponowanych w bazie danych NCBI (National Center of Biotechnology Information) oraz *F. intonsa* (grupa odniesienia). Wykonano przy pomocy MEGA4. Poniżej zaznaczono dystans genetyczny

Fig. 3. Results of phylogenesis studies on populations *F. occidentalis* from different origin places in the Wielkopolska province, populations from different countries from NCBI resources, and *F. intonsa* as an outgroup. It was made with MEGA4. Genetic distance is shown below

wencjonowania z wykorzystaniem uniwersalnych starterów amplifikujących fragment wektora pGEM T-Easy: M13Fw i M13Rw.

### Analizy bioinformatyczne

Uzyskane sekwencje analizowano w programie GeneDoc (Nicholas i Nicholas 1997), wykonano przyrównanie wielosekwencyjne (MSA – Multiple Sequence Alignment), a następnie przeprowadzono analizę filogenetyczną z wykorzystaniem programów ClustalW (Thompson i wsp. 1994) i MEGA4 (Tamura i wsp. 2007).

### Wyniki i dyskusja / Result and discussion

W wyniku reakcji PCR ze starterami ThrUNI1/2 uzyskano produkt o pożądanej długości (rys. 1). Nie-wielkie różnice w rozdziale produktów PCR widoczne na rysunku 1. mogą wynikać z różnicy w ilości zampifikowanego produktu, która może mieć wpływ na szybkość migracji DNA w żelu. Sekwencjonowanie tego produktu jednoznacznie potwierdziło, że analizowane populacje wciornastka należą do gatunku *F. occidentalis*. Sekwencjonowanie przeprowadzono dla trzech prób z każdej populacji. Zestawienie uzyskanych sekwencji wykazało największą zmienność w regionie ITS1 rDNA, zarówno pomiędzy analizowanymi populacjami, jak i pomiędzy poszczególnymi osobnikami pochodzących z każdej z populacji.

Na podstawie wyników analizy sekwencji fragmentów genomu wielkopolskich populacji wciornastka wykazano, że

ich poziom podobieństwa wynosił 98,2–100%, natomiast pomiędzy populacjami analizowanymi a sekwencją referencyjną zdeponowaną w Banku Genów NCBI – 98,7–99,7% (rys. 2).

Analiza filogenetyczna populacji wielkopolskich oraz populacji pochodzących z innych państw (Malezja, USA, Meksyk i Holandia) wykazała wysoki poziom identyczności (rys. 3). Ze względu na duże zróżnicowanie międzyosobnicze analizowanych populacji, nie jest możliwe jednoznaczne wskazanie kraju, z którego pochodzi populacja wciornastka o największym podobieństwie analizowanej sekwencji DNA. Nie wykazano także związku pomiędzy zróżnicowaniem genetycznym populacji wciornastka, a lokalizacją z której pochodził.

### Wnioski / Conclusions

1. Uzyskane wyniki wskazują na duże podobieństwo między osobnikami wielkopolskich populacji oraz analizowanych w obecnych badaniach osobnikami pochodzącymi z innych części świata.
2. Regiony genomu, które są identyczne dla wszystkich populacji umożliwią w dalszych pracach opracowanie uniwersalnych metod diagnostyki molekularnej wciornastka zachodniego, które umożliwią odróżnienie *F. occidentalis* od *T. palmi* oraz innych popularnych gatunków wciornastka. Konieczne jest przeprowadzenie dalszych badań z wykorzystaniem innych wciornastków i odnalezienie regionu różnicującego te gatunki.

### Literatura / References

- Fiedler Ż., Sosnowska D. 2008. Wpływ różnych koncentracji zarodników grzybów owadobójczych w ograniczaniu populacji wciornastka zachodniego *Frankliniella occidentalis* oraz drapieżców: *Amblyseius cucumeris* i *Orius laevigatus*. Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Roślin 48 (4): 1285–1289.
- Huang K.S., Lee S.E., Yeh Y., Shen G.S., Mei E., Chang C.M. 2010. Taqman real-time quantitative PCR for identification of western flower thrip (*Frankliniella occidentalis*) for plant quarantine. Biol. Lett. 6 (4): 555–557.
- Kropczyńska D., Czajkowska B., Baranowski T. 1988. *Frankliniella occidentalis* (Pergande) – nowy szkodnik upraw szklarniowych w Polsce. Ochrona Roślin 9: 10–11.
- Nicholas K.B., Nicholas H.B. 1997. GeneDoc, a tool for editing and annotating multiply sequence alignments. Pittsburgh Supercomputing Center's National Resource for Biomedical Supercomputing. <http://www.nrbcs.org/downloads/>, dostęp: 02.03.2007.
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evol. 24: 1596–1599.
- Thompson D., Higgins D.G., Gibson T.J. 1994. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22: 4673–4680.