

Atti del Convegno / Abstract Book

**VI Incontro Nazionale sui
Fitoplasmi
e le Malattie da Fitoplasmi**

VI Italian Meeting on Phytoplasmas
and Phytoplasma Diseases

Bologna, 17-19 Giugno / June, 2013

A cura di / Edited by Assunta Bertaccini

COLONIZZAZIONE E TRASMISSIONE DEL BATTERIO ACETICO *ASAIA* IN *SCAPHOIDEUS TITANUS* BALL, VETTORE DEL FITOPLASMA DELLA FLAVESCENZA DORATA DELLA VITE

E. Gonella¹, E. Crotti², M. Mandrioli³, D. Daffonchio², A. Alma¹

¹DISAFA, Università degli Studi di Torino – via L. da Vinci 44, 10095 Grugliasco, Torino

²DeFENS, Università degli Studi di Milano – via Celoria 2, 20133 Milano

³Dipartimento di Scienze della vita, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia - via Campi 213/D, 41125 Modena
elena.gonella@unito.it

Introduzione

I batteri simbiotici degli artropodi vettori di microrganismi patogeni sono stati proposti come agenti di controllo della trasmissione delle malattie causate da questi (Beard *et al.*, 1998; Crotti *et al.*, 2012). Tra i simbiotici di *Scaphoideus titanus* Ball, il vettore del fitoplasma responsabile della flavescenza dorata (FD) della vite, un microrganismo dominante è il batterio acetico *Asaia* sp. (Marzorati *et al.*, 2006). Questo simbiotico è un buon candidato per l'applicazione di protocolli di biocontrollo in quanto coltivabile, facilmente manipolabile e associato a diversi vettori di agenti di malattia, tra cui le zanzare dei generi *Anopheles* e *Aedes*, vettori di virus e protozoi patogeni per l'uomo (Favia *et al.*, 2007). Lo studio delle interazioni tra *Asaia* e *S. titanus* rappresenta un passo fondamentale verso lo sviluppo di approcci di lotta alla FD della vite basati sull'uso di simbiotici.

Materiali e metodi

Individui adulti di *S. titanus*, raccolti in vigneti con presenza di sintomi di FD in diverse aree del Piemonte, sono stati impiegati per lo studio della colonizzazione e della trasmissione di *Asaia* nella cicalina. Un primo gruppo di esemplari è stato utilizzato per identificare i distretti corporei dell'insetto colonizzati da *Asaia*, tramite ibridazione *in situ* in fluorescenza come descritto da Crotti *et al.* (2009).

I rimanenti individui di *S. titanus* sono stati sottoposti a prove di trasmissione orizzontale di *Asaia* condotte impiegando il ceppo SF2.1(cGfp), trasformato per la produzione della proteina fluorescente Gfp e strettamente correlato con i ceppi precedentemente dimostrati colonizzare con successo il corpo della cicalina (Crotti *et al.*, 2009). Cellule batteriche sono state somministrate insieme a una soluzione

zuccherina per 48 ore a una prima parte di esemplari, impiegati come donatori. Successivamente gli stessi esemplari sono stati sottoposti a prove di trasmissione mediante l'alimentazione o tramite l'accoppiamento unitamente a un egual numero di insetti, non precedentemente colonizzati dal ceppo fluorescente di *Asaia*, utilizzati come riceventi, come descritto in Gonella *et al.* (2012). Al termine delle prove di trasmissione, tutti gli individui donatori e riceventi e le rispettive diete zuccherine sono stati sottoposti a estrazione degli acidi nucleici (Raddadi *et al.*, 2011), seguita da PCR Real Time quantitativa con primer Gfp-specifici (Gonella *et al.*, 2012).

Risultati e discussione

Le analisi di microscopia confocale condotte sugli organi di *S. titanus* sottoposti a ibridazione *in situ* in fluorescenza con sonde specifiche per *Asaia* hanno evidenziato la presenza del batterio acetico in diversi organi della cicalina, incluse le gonadi maschili e femminili e le ghiandole salivari.

Sulla base di questi risultati, individui di *S. titanus* sono stati sottoposti a prove di trasmissione tramite condivisione del substrato alimentare o mediante l'accoppiamento. I risultati di tali prove hanno confermato in primo luogo la capacità del simbionte di colonizzare il corpo degli esemplari donatori, in seguito all'assunzione con l'alimentazione, come emerso dalle analisi di PCR quantitativa svolte su questo gruppo di esemplari. Le prove di condivisione della dieta hanno evidenziato che *Asaia* è regolarmente trasferita da donatore a ricevente, con un picco di frequenza di trasmissione dopo 72 ore di condivisione della dieta. Inoltre, la concentrazione di cellule del simbionte negli individui riceventi è crescente nel tempo.

Le prove di trasmissione venerea sono state condotte in primo luogo accoppiando maschi infettati da *Asaia* Gfp con femmine non infette. Le femmine riceventi hanno efficacemente acquisito *Asaia*, con i più elevati tassi di infezione riscontrati 72-96 ore dopo l'accoppiamento con i maschi donatori, e con densità del simbionte crescente nel tempo. Ulteriori esperimenti sono stati effettuati accoppiando femmine infettate da *Asaia* Gfp con maschi non infetti. In questo caso, solo occasionalmente è stata osservata una trasmissione, probabilmente legata a trasferimenti casuali.

Nel complesso, i risultati ottenuti hanno fornito una delle poche dimostrazioni dirette di trasmissione orizzontale negli emittenti, riscontrata sia tramite l'alimentazione sia mediante l'accoppiamento. Questo studio fornisce un sostanziale contributo alla comprensione dell'ecologia microbica in *S. titanus*, e sottolinea le potenzialità legate allo sviluppo di protocolli di controllo simbiotico della FD basati sull'uso di *Asaia*.

Parole chiave: simbionti microbici, giallumi della vite, cicaline, trasmissione orizzontale, controllo simbiotico

Colonization and transmission pathways of the acetic acid bacterium *Asaia* in *Scaphoideus titanus* Ball, vector of “flavescence dorée” phytoplasma to grapevine

The use of bacterial symbionts of vectors of pathogenic agents has been proposed to contain the transmission of vector-borne diseases. An important symbiont of *Scaphoideus titanus* Ball, vector of “flavescence dorée” (FD) phytoplasma to grapevine, is the acetic acid bacterium *Asaia* sp., which is considered as a good candidate control agent against the spread of FD. To study the interaction between *Asaia* and *S. titanus*, fluorescent in situ hybridization essays were carried out on dissected organs of adult individuals with *Asaia*-specific probes, to assess the colonization patterns of the acetic acid bacterium in the body of the leafhopper. The symbiont was observed in different organs of *S. titanus*, including male and female gonads and salivary glands. Based on such evidences, *S. titanus* specimens were subjected to horizontal transmission trials through co-feeding or mating, by using the fluorescent *Asaia* strain SF2.1(cGfp). The results of co-feeding experiments underlined that *Asaia* is transferred from donor *S. titanus* (previously fed with the fluorescent *Asaia* strain) to recipient specimens, with a peak after 72 hours of diet sharing.

Venereal transmission trials were firstly carried out by mating Gfp *Asaia*-infected males with uninfected females. Recipient females were successfully colonized by the symbiont, with the highest infection rates 72-96 hours after mating. Further experiments were performed by mating Gfp *Asaia*-infected females with uninfected males, but only few samples showed a real transfer. Overall results provide one of the few direct demonstrations of horizontal transmission occurring in Hemiptera. Such aspects of the association between *Asaia* and *S. titanus* represent an important requirement to develop *Asaia*-based symbiotic control programs for FD.

Key words: microbial symbionts, grapevine yellows, leafhoppers, horizontal transmission, symbiotic control

Ringraziamenti / Acknowledgements

Questo lavoro è stato condotto nell’ambito del progetto PRIN 2009 “Interazioni tra insetti vettori e microrganismi simbiotici: nuove prospettive per il biocontrollo dei patogeni trasmessi alle piante, agli animali e all’uomo” finanziato dal MIUR. / Financial contribution from the Italian Ministry for Research (MIUR), within the project PRIN 2009 “Interazioni tra insetti vettori e microrganismi simbiotici: nuove prospettive per il biocontrollo dei patogeni trasmessi alle piante, agli animali e all’uomo”.

Lavori citati / References

- BEARD C.B., R.V. DURVASULA, F.F. RICHARDS, 1998. Bacterial symbiosis in arthropods and the control of disease transmission. *Emerging Infectious Diseases*, **4**, 581-589.
- CROTTI E., A. BALLOI, C. HAMDI, L. SANSONNO, M. MARZORATI, E. GONELLA, G. FAVIA, A. CHERIF, C. BANDI, A. ALMA, D. DAFFONCHIO, 2012. Microbial symbionts: a resource for the management of insect-related problems. *Microbial Biotechnology*, **5**, 307-317.
- CROTTI E., C. DAMIANI, M. PAJORO, E. GONELLA, A. RIZZI, I. RICCI, I. NEGRI, P. SCUPPA, P. ROSSI, P. BALLARIN, N. RADDADI, M. MARZORATI, L. SACCHI, E. CLEMENTI, M. GENCHI, M. MANDRIOLI, C. BANDI, G. FAVIA, A. ALMA, D. DAFFONCHIO, 2009. *Asaia*, a versatile acetic acid bacterial symbiont, capable of cross-colonizing insect of phylogenetically distant genera and orders. *Environmental Microbiology*, **11**(12), 3252-3264.
- MARZORATI M., A. ALMA, L. SACCHI, M. PAJORO, S. PALERMO, L. BRUSETTI, N. RADDADI, A. BALLOI, R. TEDESCHI, E. CLEMENTI, S. CORONA, F. QUAGLINO, P.A. BIANCO, T. BENINATI, C. BANDI, D. DAFFONCHIO, 2006. A novel *Bacteroides* symbiont is localized in *Scaphoideus titanus*, the insect vector of Flavescence Dorée in *Vitis vinifera*. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**(2), 1467-1475.
- FAVIA G., I. RICCI, C. DAMIANI, N. RADDADI, E. CROTTI, M. MARZORATI, A. RIZZI, R. URSO, L. BRUSETTI, S. BORIN, D. MORA, P. SCUPPA, L. PASQUALINI, E. CLEMENTI, M. GENCHI, S. CORONA, I. NEGRI, G. GRANDI, A. ALMA, L. KRAMER, F. ESPOSITO, C. BANDI, L. SACCHI, D. DAFFONCHIO, 2007. Bacteria of the genus *Asaia* stably associate with *Anopheles stephensi*, an Asian malarial mosquito vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA-PNAS*, **104**, 9047-9051.
- GONELLA E., E. CROTTI, A. RIZZI, M. MANDRIOLI, G. FAVIA, D. DAFFONCHIO, A. ALMA, 2012. Horizontal transmission of the symbiotic bacterium *Asaia* sp. in the leafhopper *Scaphoideus titanus* Ball (Hemiptera: Cicadellidae). *BMC Microbiology*, **12**(Suppl 1), S4.
- RADDADI N., E. GONELLA, C. CAMEROTA, A. PIZZINAT, R. TEDESCHI, E. CROTTI, M. MANDRIOLI, P.A. BIANCO, D. DAFFONCHIO, A. ALMA, 2011. '*Candidatus Liberibacter europaeus*' sp. nov. that is associated with and transmitted by the psyllid *Cacopsylla pyri* apparently behaves as an endophyte rather than a pathogen. *Environmental Microbiology*, **13**(2), 414-426.