

PETRIA 18 (2), 141-419 (2008) - 4° INCONTRO NAZIONALE SULLE MALATTIE DA FITOPLASMI

COMUNITÀ MICROBICA ASSOCIATA A *HYALESTHES OBSOLETUS* SIGNORET, VETTORE DEL LEGNO NERO DELLA VITE

E. Gonella¹, I. Negri¹, M. Marzorati², M. Mandrioli³, L. Sacchi⁴,
D. Daffonchio², A. Alma¹

¹ Di.Va.P.R.A. Entomologia e Zoologia applicate all'Ambiente "Carlo Vidano",
Università degli Studi di Torino, Via L. da Vinci 44, I-10095 Grugliasco (TO)

²DISTAM, Università degli Studi di Milano, Via Celoria 2, I-20133 (MI)

³DBA, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia,
Via Campi, 213/D I-41100 (MO)

⁴DBA, Università degli Studi di Pavia, Piazza Botta 9, I-27100 (PV)

E-mail: elena.gonella@unito.it

Nell'ambito della lotta alle malattie trasmesse da artropodi, il controllo simbiotico assume rilievo crescente. Questa tecnica si avvale dell'impiego di microrganismi simbiotici del vettore per contrastare la trasmissione del patogeno attraverso l'espressione di fattori antagonisti (Beard *et al.*, 1998, Rio *et al.*, 2004). Applicato con successo in campo medico, questo modello è stato proposto nell'ambito della lotta alla malattia di Pierce della vite e al suo agente eziologico, il batterio xilematico *Xylella fastidiosa*, trasmesso dalla cicalina *Homalodisca vitripennis* Germar, attraverso paratransgenesi per bloccare la trasmissione del patogeno da parte dell'insetto vettore (Bextine *et al.*, 2004).

Al fine di individuare microrganismi utilizzabili come agenti di controllo simbiotico, la comunità microbica associata a *Hyalesthes obsoletus* Signoret (Hemiptera: Cixiidae), vettore del fitoplasma agente del Legno Nero (LN) della vite (Stolbur 16Sr-XII, sottogruppo A), è stata caratterizzata con analisi molecolari indipendenti dalla coltivazione. La diversità batterica è stata studiata mediante *Length Heterogeneity-PCR* (LH-PCR) e *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* (DGGE) del gene codificante per l'rRNA 16S batterico amplificato dal DNA totale estratto da insetti prelevati in aree viticole piemontesi colpite dal LN. Le analisi hanno evidenziato la presenza, accanto al fitoplasma, di una comunità microbica complessa, composta da diverse specie batteriche. Tra i batteri prevalenti nella popolazione di insetti saggiata sono stati osservati, attraverso sequenziamento dei frammenti di DNA separati mediante DGGE, i generi dei manipolatori riproduttivi già descritti in numerose specie di artropodi, *Wolbachia* (alfa-Proteobacteria) e *Cardinium* (Bacteroidetes). Quest'ultimo è stato recentemente associato anche a *Scaphoideus titanus* Ball, vettore della Flavescenza dorata della vite (Marzorati *et al.* 2006). Il batterio con la più alta prevalenza in *H. obsoletus* presentava il 92% d'identità di

sequenza con il Bacteroidetes '*Candidatus Sulcia muelleri*', simbiote di molte cicaline. La distribuzione di tali microrganismi nei distretti corporei dell'insetto è stata esaminata tramite ibridazione *in situ* fluorescente effettuata con sonde specifiche, e mediante microscopia elettronica a trasmissione. Questi microrganismi erano localizzati in diversi organi e tessuti dell'ospite. La presenza nelle cellule uovo indicava la trasmissione verticale alla progenie di tali batteri e non ha permesso di escludere un possibile ruolo nella manipolazione del comportamento riproduttivo dell'insetto. Queste osservazioni rappresentano la base per un'approfondita analisi delle funzioni e delle interazioni di questi organismi, con potenziali implicazioni per il biocontrollo della fitoplasmosi.

Parole chiave: Legno nero, Vettore, Microflora, Controllo simbiotico.

Microbial community associated to the Bois Noir vector *Hyalesthes obsoletus* Signoret

Among the control strategies of arthropod-borne diseases, symbiotic control is assuming increasing relevance. This technique employs microbial symbionts of the vector for pathogen transmission restraint, through the expression of antagonistic factors (Beard *et al.*, 1998, Rio *et al.*, 2004). This model, successfully applied in medical field, was proposed for the control of Pierce's disease of grapevine against its etiological agent, the xylematic bacterium *Xylella fastidiosa*, transmitted by the sharpshooter *Homalodisca vitripennis* Germar, with promising control perspectives through a paratransgenic approach that impair the pathogen transmission by the insect vector (Bextine *et al.*, 2004).

In order to detect bacteria useful as potential symbiotic control agents, the microbial community associated to *Hyalesthes obsoletus* Signoret (Hemiptera: Cixiidae), the vector of the phytoplasma agent of Bois Noir (BN) of grapevine (Stolbur 16Sr-XII, subgroup A), was studied through a cultivation-independent molecular characterization. A screening of bacterial diversity was performed by mean of Length Heterogeneity-PCR (LH-PCR) and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) and sequencing of bacterial 16S rRNA gene amplified from the total DNA extracted from whole insect samples collected in wine-growing areas of Piedmont region affected by BN. These analyses showed the occurrence, beside the phytoplasma, of a complex bacterial community. Among the prevalent bacteria, reproductive manipulators of the genera *Wolbachia* (alpha-Proteobacteria) and *Cardinium* (Bacteroidetes), the latter recently associated to *Scaphoideus titanus* Ball, vector of the Flavescence dorée

phytoplasma (Marzorati *et al.*, 2006), were found. However the most prevalent bacterium had a 92% of sequence identity with ‘*Candidatus Sulcia muelleri*’, a Bacteroidetes symbiont of many leafhoppers. The distribution of these bacteria in the organs of the insect host was examined through fluorescence in situ hybridization with specific probes, and through transmission electron microscopy. A localization of these organisms in several organs and tissues of the host was observed, particularly in key districts such as eggs, indicating the occurrence of a vertical transmission to the progeny. Such an observation does not allow excluding possible roles in sexual manipulation of the host. These results provide a baseline for the investigation of function of and interaction between these microorganisms, with potential implications for phytoplasma control.

Key words: Bois noir, Vector, Symbiotic control, Microbiota.

Lavori citati/References

- BEARD CB., RV. DURVASULA, F. FRANK, FF. RICHARDS, 1998. Bacterial symbiosis in arthropods and the control of disease transmission. *Emerging Infectious Diseases*, **4**, 581–591.
- BEXTINE B., C. LAUZON, S. POTTER, D. LAMPE, T.A. MILLER, 2004. Delivery of a genetically marked *Alcaligenes* sp. to the glassy-winged sharpshooter for use in a paratransgenic control strategy. *Current Microbiology*, **48**, 327–331.
- MARZORATI M., A. ALMA, L. SACCHI, M. PAJORO, S. PALERMO, L. BRUSETTI, N. RADDADI, A. BALLOI, R. TEDESCHI, E. CLEMENTI, S. CORONA, F. QUAGLINO, PA. BIANCO, T. BENNATI, C. BANDI, D. DAFFONCHIO, 2006. A novel *Bacteroidetes* symbiont is localized in *Scaphoideus titanus*, the insect vector of Flavescence Dorée in *Vitis vinifera*. *Applied and environmental microbiology*, **72**, 1467-1475.
- RIO RVM., Y. HU, S. AKSOY, 2004. Strategies of the home-team: symbioses exploited for vector-borne disease control. *Trends in Microbiology*, **12**, 325-336.