



PROGRAMMA DI RICERCA STM

Relazione scientifica sull'attività di ricerca svolta

FRUITORE: Massimo Giorgini **con qualifica** Ricercatore di **livello III**

ISTITUTO DI AFFERENZA: Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante, UOS di Portici (NA), CNR

DIPARTIMENTO DI AFFERENZA: Scienze Bioagroalimentari

ISTITUZIONE OSPITANTE: Instituto Valenciano des Investigaciones Agraria (IVIA) – Department of Entomology, Moncada (Valencia), Spagna. Referente scientifico: Dr. Francisco J. Beitia

TITOLO DEL PROGRAMMA: Batteri intracellulari come simbionti difensivi e loro impatto sul controllo biologico di *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) da parte di Imenotteri parassitoidi.

ATTIVITÀ SVOLTA E RISULTATI CONSEGUITI

Obiettivo della ricerca è quello di valutare l'effetto dell'endosimbionte facoltativo *Cardinium* sulla resistenza di *B. tabaci* all'attività di parassitizzazione di *Eretmocerus mundus*. In particolare, caratterizzare il fenotipo resistente (interferenza con il comportamento di riconoscimento dell'ospite e/o inibizione dello sviluppo larvale di *E. mundus*) e valutare l'impatto della diffusione di popolazioni infette da *Cardinium* sull'efficacia del controllo biologico e sulla dannosità di *B. tabaci*. L'attività svolta dal Dr. Giorgini nell'ambito del programma STM 2014 va ad integrarsi con l'attività svolta dal Dr. Beitia nell'ambito del progetto europeo SWIPE (Predicting whitefly population outbreaks in changing environments - Symbionts of Whiteflies as Indicators of Population outbrEaks) afferente al programma ERANET-ARIMNet.

L'attività di laboratorio programmata per il raggiungimento degli obiettivi prefissati consiste nel valutare l'attività riproduttiva di *E. mundus* su due strain di *B. tabaci* genotipo Q1 con diversa infezione di batteri endosimbionti: strain HC con *Hamiltonella* e *Cardinium* e strain H con solo *Hamiltonella*. In particolare, sono previsti tre esperimenti HC vs H in ciascuno dei quali sono saggiate 30 femmine di *E. mundus* per strain di *B. tabaci*: 1) parassitizzazione valutata in no-choice test: singole femmine ovideponenti per 24 h su foglia infestata da neanidi HC o H. 2) parassitizzazione valutata in choice test: singole femmine ovideponenti per 24 h su foglia infestata da neanidi HC e H in uguale proporzione. In 1) e in 2) sarà contato il n° di neanidi parassitizzate, i parassitoidi sfarfallati, le neanidi arrestate nello sviluppo e gli aleirodidi sfarfallati. 3) ovideposizione valutata in no-choice test: come esperimento 1) ma dopo 24 h di ovideposizione neanidi dissezionate al microscopio per valutare il n° di uova deposte dal parassitoide che sarà confrontato con il n° di adulti di *E. mundus* sfarfallati in 1).

Durante il soggiorno all'IVIA l'attività di ricerca è stata innanzitutto orientata a definire l'esatto protocollo sperimentale. E' stato inoltre condotto un esperimento preliminare avente come obiettivo una prima quantizzazione dell'attività di parassitizzazione di *E. mundus* su *B. tabaci* infetta o meno dal batterio endosimbionte *Cardinium*.

1- Valutazione dell'ovideposizione di *E. mundus* in risposta alla densità dell'ospite.

Essendo il potenziale riproduttivo di *E. mundus* probabilmente legato alla densità dell'ospite è stato realizzato un esperimento teso a valutare la densità ottimale di neanidi di *B. tabaci* da utilizzare per la valutazione del livello di parassitizzazione di *B. tabaci*. Dovendo comparare



l'attività riproduttiva di *E. mundus* su due strain diversi di *B. tabaci* (uno con *Cardinium* e l'altro senza), la femmina ovideponente deve essere posta nelle condizioni di deporre il massimo numero di uova. Sono state saggiate quattro diverse densità di *B. tabaci*, rispettivamente 25, 50, 75 e 100 neanidi di seconda e terza età. Allo scopo 100 adulti di *B. tabaci* strain HC (sex ratio 1:1) sono stati lasciati ovideporre per 24 h su foglie di cotone all'interno di clip cage (gabbietta di ovideposizione \approx 3,5 cm posta sulla pagina inferiore di una foglia) ed alla temperatura di 25°C. Al termine di questo periodo gli adulti sono stati allontanati. Successivamente le foglie così infestate sono state asportate allorquando le neanidi di *B. tabaci* avevano raggiunto lo stadio di seconda e terza età. Da ciascuna foglia è stato reciso un disco del diametro di 6 cm, posto immediatamente su un substrato agarizzato in una piastra Petri dello stesso diametro e dotata di foro di aerazione. Ciascun disco di foglia è stato osservato al microscopio binoculare 40X e l'eccesso di neanidi rimosso manualmente con l'ausilio di uno spillo. All'interno di ciascuna piastra Petri è stata introdotta una femmina fecondata e un maschio di *E. mundus*, entrambe dell'età di 1-2 giorni. Per ciascuna densità di neanidi ospiti sono state saggiate 10 femmine di *E. mundus* (1 femmina/area di saggio \approx 6 cm). Dopo 24 ore di ovideposizione gli adulti del parassitoide sono stati allontanati e si è proceduto a valutare il numero di uova deposte da ciascuna femmina. *Eretmocerus mundus* depone normalmente un singolo uovo per neanide di *B. tabaci* posizionandolo esternamente al corpo dell'ospite tra il ventre della neanide e la superficie fogliare. Al binoculare 40X ciascuna neanide è stata sollevata dalla foglia con l'ausilio di minuzie in modo da poter evidenziare la presenza o meno dell'uovo di *E. mundus*.

Questo esperimento ha consentito di valutare la risposta di *E. mundus*, in termini di uova deposte, al variare della densità delle neanidi di *B. tabaci* e di definire il numero ottimale di neanidi da utilizzare nell'esperimento di valutazione dell'attività di parassitizzazione di *E. mundus* su *B. tabaci* strain HC vs H.

2- Incremento dell'allevamento di laboratorio dello strain H di *B. tabaci*.

La realizzazione degli esperimenti previsti per il raggiungimento degli obiettivi del programma di ricerca necessita della disponibilità di allevamenti massali di laboratorio dei due strain di *B. tabaci*, che sono stati avviati presso i laboratori dell'IVIA. Per motivi tecnici, l'allevamento di *B. tabaci* strain H (senza infezione di *Cardinium*) risultava numericamente non sufficiente a sostenere la prova comparativa con lo strain HC. E' stata pertanto intrapresa un'azione volta ad incrementare la densità di popolazione dello strain H in allevamento presso l'IVIA. Da una popolazione di campo di *B. tabaci* genotipo Q1 mantenuta su pomodoro in serra sono state isolate femmine dell'aleirode ciascuna delle quali è stata posta ad ovideporre all'interno di clip cage per costituire delle isolinee. Al termine del periodo di ovideposizione (5-7 giorni) ciascuna femmina è stata analizzata per valutare la presenza di infezioni di batteri endosimbionti facoltativi. Il test è stato condotto mediante estrazione del DNA dai singoli insetti e successiva PCR diagnostica utilizzando 3 coppie di primer, rispettivamente specifiche per i batteri *Hamiltonella*, *Cardinium* e *Wolbachia*. Precedenti test avevano escluso la presenza dei batteri *Rickettsia* e *Arsenophonus* da questa popolazione di *B. tabaci*. E' stata mantenuta in allevamento la progenie di 50 femmine infette da sola *Hamiltonella* che è stata quindi utilizzata per incrementare la densità di popolazione dell'allevamento di laboratorio dello strain H.

3- Allevamento di *Eretmocerus mundus* su *B. tabaci* strain H.

La popolazione di *E. mundus* oggetto di studio è stata originariamente raccolta in campo su piante spontanee e coltivate infestate da una popolazione di *B. tabaci* caratterizzata dalla



presenza di individui con diversa composizione della comunità di endosimbionti facoltativi. In campo quindi *E. mundus* esercitava l'attività di parassitizzazione su ospiti con e senza *Cardinium*. Nei laboratori dell'IVIA l'allevamento di questa popolazione di *E. mundus* è stato avviato sullo strain HC di *B. tabaci*. L'ipotesi che una resistenza alla possibile azione protettiva del *Cardinium* potesse insorgere nella popolazione di *E. mundus* costantemente riprodotta su ospiti sempre infetti da *Cardinium* ha reso opportuno impiantare un secondo allevamento di *E. mundus* utilizzando come ospite lo strain H (senza *Cardinium*) di *B. tabaci*. Per la necessità di dover incrementare la densità di popolazione dello strain H in allevamento, la coltura del parassitoide in assenza di *Cardinium* è stata avviata solo al termine del periodo di soggiorno. L'impiego del parassitoide per la realizzazione dei test previsti dal programma di ricerca avverrà al termine della terza generazione sullo strain H.

4- Valutazione dell'azione protettiva di *Cardinium* in *B. tabaci* mediante no-choice test con *E. mundus*.

Durante il periodo della short term mobility è stato realizzato un esperimento preliminare utilizzando la popolazione di *E. mundus* allevata sullo strain HC di *B. tabaci*. L'attività di parassitizzazione di *E. mundus* è stata valutata su neanidi di seconda e terza età dello strain HC e dello strain H di *B. tabaci*. Le arene di saggio con l'opportuno numero di neanidi sono state allestite così come già descritto al punto 1. All'interno di ciascuna piastra Petri è stata introdotta una femmina fecondata e un maschio di *E. mundus* entrambi di 1-2 giorni d'età. Dopo 24 ore la coppia di parassitoidi è stata rimossa e le piastre Petri sono state poste in cella climatica alla temperatura di 25°C, 60-70% U.R. e fotoperiodo 14L:10D. Al completamento dello sviluppo preimmaginale del parassitoide, è stato contato il numero di pupari di *B. tabaci* contenenti la pupa di *E. mundus* ed il numero di adulti del parassitoide sfarfallati. Per ciascuno dei due strain di *B. tabaci* è stata valutata l'attività di parassitizzazione di cinque femmine di *E. mundus*. L'analisi dei dati ha evidenziato una minore attività di parassitizzazione sullo strain HC rispetto a quanto osservato sullo strain H, lasciando supporre una azione protettiva di *Cardinium* in *B. tabaci*.

Allo stato attuale, gli allevamenti degli strain HC e H di *B. tabaci* sono in piena efficienza e la terza generazione di *E. mundus* sullo strain H (non infetto da *Cardinium*) è prossima alla conclusione. A breve, pertanto, saranno avviati gli esperimenti previsti secondo il protocollo sperimentale sviluppato durante il periodo di short term mobility. I risultati attesi, che saranno ottenuti su un numero statisticamente significativo di repliche per ogni esperimento (30 femmine di *E. mundus*/strain di *B. tabaci*, suddivise in tre blocchi, ciascuno di 10 femmine), dovranno confermare l'azione protettiva dell'endosimbionte *Cardinium* in *B. tabaci*.