



SHORT TERM MOBILITY 2016
PROF. DOMENICO BOSCO
RELAZIONE SCIENTIFICA

26 maggio 2016

La STM concessa al sottoscritto è stata utilizzata per una visita di lavoro presso l'unità mista di ricerca (UMR) "Biologie du Fruit et Pathologie" dell'INRA e Università di Bordeaux, sotto la responsabilità della dr.ssa Nathalie Bouvery. Il periodo di ricerca è durato 25 giorni (dall'11 aprile al 5 maggio 2016).

Il sottoscritto ha partecipato, in accordo col programma di ricerca, all'analisi di ceppi ricombinanti del mollicute *Spiroplasma citri* mediante western blot e analisi di sequenza per la loro capacità e stabilità di espressione della proteina VmpA (proteina codificata dal fitoplasma della flavescenza dorata della vite e coinvolta nel processo di trasmissione mediante insetto vettore). La maggior parte dei ceppi analizzati ha mostrato di subire mutazioni (delezioni in una regione di sequenze ripetute) che hanno portato all'espressione di una proteina di diverso peso molecolare e potenzialmente non biologicamente attiva. Un ceppo, G6/pBSTVA e G6/pSTVA, ha però mostrato di esprimere VmpA con corretto peso molecolare ed è stato selezionato per gli studi.

Inoltre il sottoscritto ha svolto due ripetizioni di un esperimento in cui microbiglie di 1 μ m di diametro, legate covalentemente con VmpA e, come controllo, a una proteina aspecifica (BSA) sono state fatte ingerire in saggi di nutrizione artificiale al vettore di laboratorio *Euscelidius variegatus*, e successivamente il numero di biglie ritenute nell'intestino medio dell'insetto sono state conteggiate previa dissezione dell'intestino, osservazione al microscopio a fluorescenza e conteggio mediante il programma ImageJ. Le biglie covalentemente legate a VmpA hanno sono state ritenute nell'intestino medio in numero significativamente superiore a quello delle biglie di controllo, anche se in osservazioni condotte al microscopio elettronico non è stato possibile evidenziare biglie internalizzate nelle cellule dell'epitelio intestinale o adese alla membrana microvillare delle stesse.

Infine il sottoscritto ha condotto un esperimento biologico di acquisizione del fitoplasma FDP e del fitoplasma Palatinate Grapevine Yellows (PGY), che differiscono nel loro profilo di VmpA di membrana, per validare l'ipotesi del ruolo di VmpA nella trasmissione. A questo fine 150 neo-adulti di *E. variegatus* sono stati isolati su una vinca infetta con FDP e altrettanti su vinca infetta con PGY per 3 giorni di nutrizione e, dopo opportuna latenza, sono stati dissezionati in modo da separare le ghiandole salivari e l'intestino e sottoposti ad estrazione di DNA e PCR quantitativa. A causa della lunghezza dell'esperimento il sottoscritto ha potuto svolgere la prova di acquisizione, la dissezione e l'estrazione del DNA ma i risultati della PCR saranno acquisiti a breve nel laboratorio ospitante.

Inoltre, durante lo stage, la studentessa Michela Monticone del corso di laurea magistrale in Biotecnologie vegetali dell'Università di Torino, di cui il sottoscritto è tutore, ha cooperato all'attività in oggetto nell'ambito della sua attività di tesi di laurea, e completerà entro l'inizio di settembre, sempre sotto la direzione della dr.ssa Nathalie Bouvery, gli esperimenti descritti di analisi dei ceppi ricombinati di *S. citri*, di ingestione di microbiglie e di acquisizione del fitoplasma in saggi biologici. Durante la visita il sottoscritto ha concordato dettagliatamente il lavoro della tesista italiana con la dr.ssa Bouvery del laboratorio ospitante che sarà correlatrice della tesi.



In conclusione la visita scientifica ha permesso:

- a) di acquisire nuove tecniche di indagine non applicate nel laboratorio dell'IPSP-CNR presso cui il sottoscritto è associato, né nel dipartimento universitario di afferenza
- b) di progredire nell'ottenimento di risultati sull'attività biologica della proteina VmpA, che saranno successivamente completati nel laboratorio ospitante
- c) di programmare una collaborazione scientifica tra l'IPSP-CNR e il DISAFA dell'Università di Torino da una parte e il laboratorio francese ospitante dall'altra in ordine all'analisi dell'attivazione/disattivazione del sistema immunitario dell'insetto *E. variegatus* infetto da FDP, attività che è già iniziata negli ultimi giorni della visita e che si gioverà dei dati ottenuti a Torino con RNAseq del vettore infetto e sano
- d) di avviare proficuamente l'attività di tesi della studentessa in Biotecnologie vegetali dell'Università di Torino che rafforzerà la collaborazione tra i laboratori

Durante la visita il sottoscritto ha partecipato alle riunioni settimanali del laboratorio ospitante, ha presentato le sue principali linee di ricerca condotte a Torino e ha condiviso i dati più recenti acquisiti a Torino e a Bordeaux nelle ricerche su FDP e ancora non pubblicati, permettendo ad entrambi i partner di meglio programmare e coordinare le ricerche future su questo tema di grande interesse nella viticoltura dei due paesi. Il sottoscritto ha anche partecipato ad una escursione in vigneto con prelevamento di materiale biologico, che ha permesso di conoscere nella realtà di campo la problematica della flavescenza dorata nella regione bordolese e scambiare opinioni sulle strategie in atto in Francia e in Italia per il controllo della fitoplasmosi.

Domenico Bosco