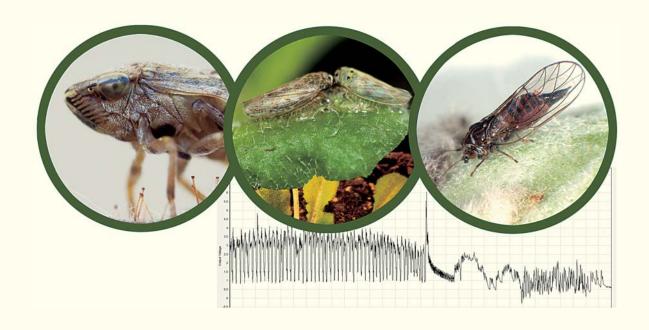


Tavole Rotonde sui maggiori problemi riguardanti l'Entomologia Agraria in Italia

Sotto gli auspici del MIPAAF

XXXVIII. INSETTI VETTORI DI AGENTI FITOPATOGENI: MECCANISMI ED ECOLOGIA DELLA TRASMISSIONE DI VIRUS E BATTERI



Estratto da:
ATTI DELLA
ACCADEMIA NAZIONALE
ITALIANA DI ENTOMOLOGIA
Anno LXVIII - 2020



Tavole Rotonde sui maggiori problemi riguardanti l'Entomologia Agraria in Italia Sotto gli auspici del MIPAAF

XXXVIII. INSETTI VETTORI DI AGENTI FITOPATOGENI: MECCANISMI ED ECOLOGIA DELLA TRASMISSIONE DI VIRUS E BATTERI

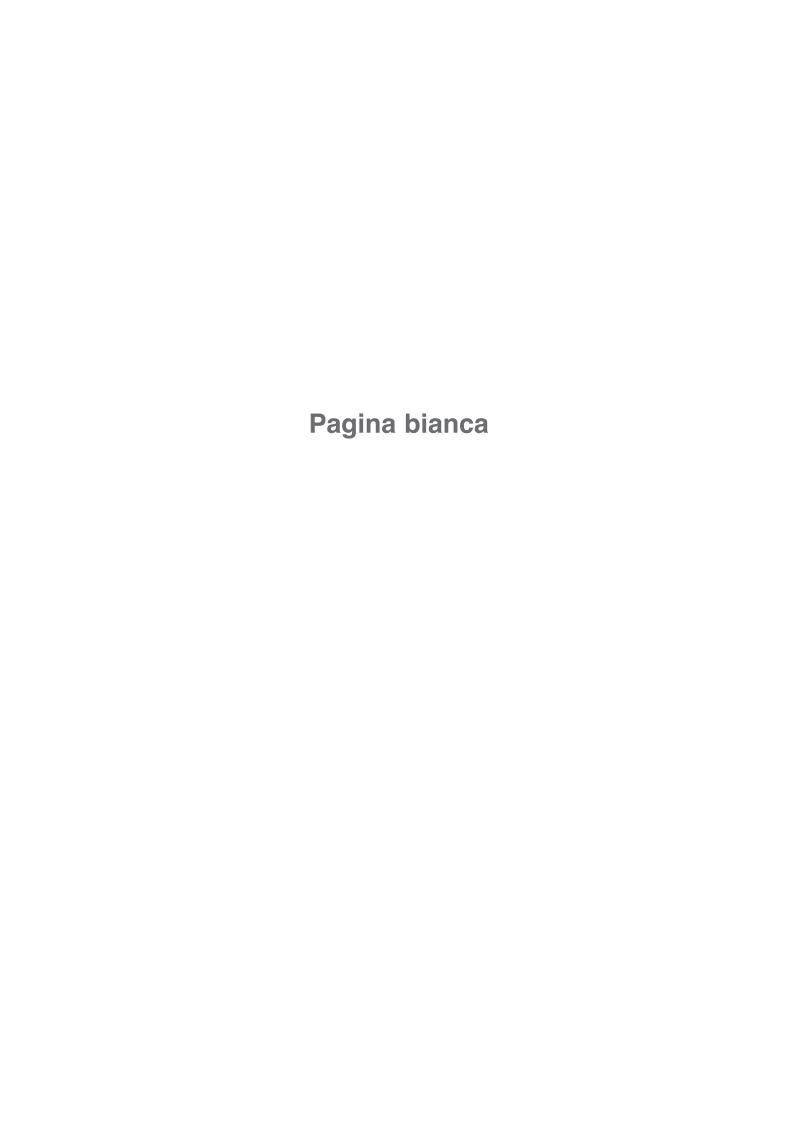
Estratto da: ATTI DELLA ACCADEMIA NAZIONALE ITALIANA DI ENTOMOLOGIA Anno LXVIII - 2020

INDICE

Tavola Rotonda su:

INSETTI VETTORI DI AGENTI FITOPATOGENI: MECCANISMI ED ECOLOGIA
DELLA TRASMISSIONE DI VIRUS E BATTERI

Marilyne Uzest – Non-circulative virus transmission by aphids: current knowledge on virus-vector interactions	Pag.	115
	_	
Luciana Galetto – Fitoplasmi e cicadellidi vettori: interazioni molecolari e specificità di trasmissione	>>	119
Rosemarie Tedeschi – Ecologia della trasmissione di batteri ('Ca. Liberibacter spp.' e fitoplasmi)		
da parte di emitteri psilloidei	>>	129
NICOLA BODINO – Vettori di Xylella fastidiosa in Europa: una prospettiva ecologica su trasmissione		
ed epidemiologia	>>	137
ALBERTO FERERES – Behavioural aspects influencing plant pathogen transmission by hemipteran insects	>>	145

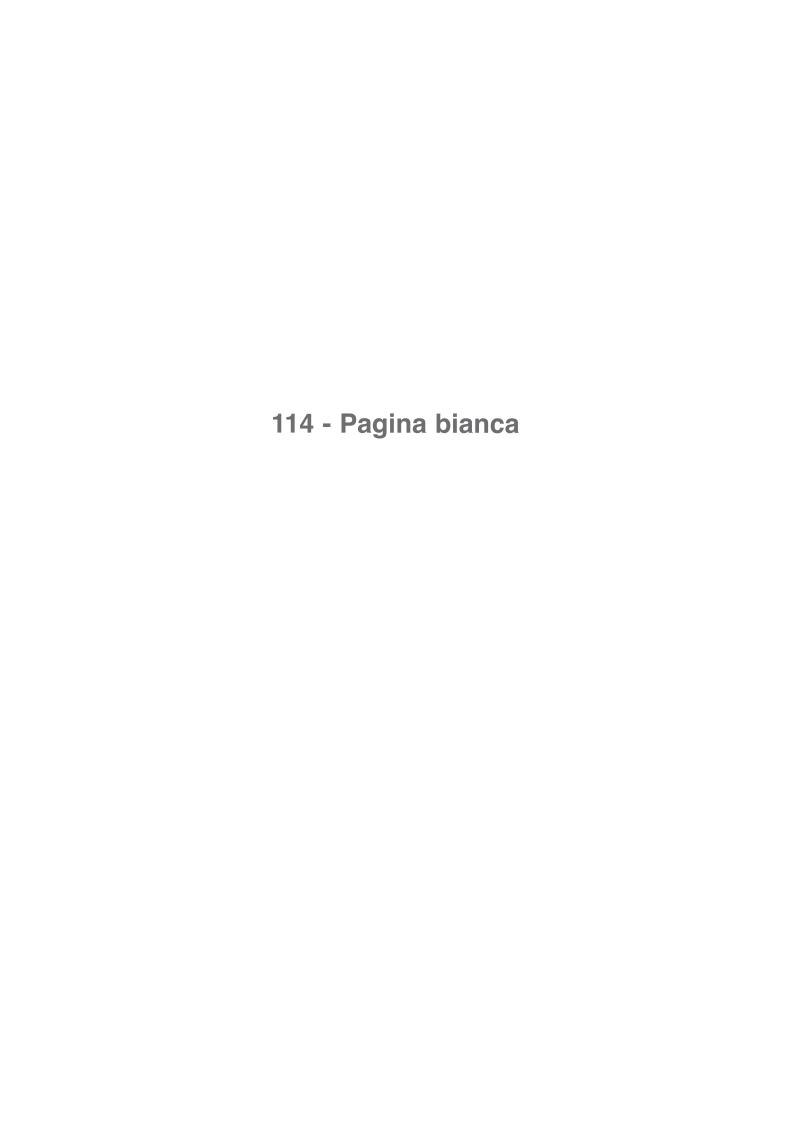


Seduta pubblica, Firenze 21 febbraio 2020

Tavola Rotonda su:

INSETTI VETTORI DI AGENTI FITOPATOGENI: MECCANISMI ED ECOLOGIA DELLA TRASMISSIONE DI VIRUS E BATTERI

Coordinatore:
Domenico Bosco, Accademico



NON-CIRCULATIVE VIRUS TRANSMISSION BY APHIDS: CURRENT KNOWLEDGE ON VIRUS-VECTOR INTERACTIONS

MARILYNE UZEST^a

^aBGPI, INRAE, CIRAD, Montpellier SupAgro, Univ. Montpellier, Montpellier, France.

Email: marilyne.uzest@inrae.fr

Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Insetti vettori di agenti fitopatogeni: meccanismi ed ecologia della trasmissione di virus e batteri". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 21 febbraio 2020.

Non-circulative virus transmission by aphids: current knowledge on virus-vector interactions

Plant viruses cause each year tremendous damages to important crops worldwide, with dramatic consequences on agriculture, food resources and economy. They are mainly propagated from plant to plant by vectors, among which transmission by aphids represents a major mode of dissemination. Aphids transmit hundreds of virus species, sometimes within short probing events they make while to test the plant for suitability. In the so-called non-circulative transmission mode, most virus species are retained onto specific receptors emerging from the inner surface of the cuticle of aphid stylets. Identification of receptors in vector species has long been left aside because of difficulties to work with stylets or extract information from the cuticle. Their characterization is awaited to fully understand non-circulative virus-vector interactions and to develop alternative control strategies based on virus-vector interference. The most recent advances that led to the discovery of an organ involved in virus retention in aphid stylets – the acrostyle – and to the identification of the first receptor of a plant virus in insect mouthparts will be presented.

KEY WORDS: non-circulative virus, transmission, aphid, virus-vector interactions

Modes of transmission of aphid-borne plant viruses

Transmission is a key step of plant virus life cycle, ensuring the sustainability and propagation of viruses in the environment. Most plant viruses are transmitted from host to host by insects with piercing-sucking mouthparts. These mouthparts, resembling long flexible needles, seem particularly adapted to ensure efficient uptake of pathogens from contaminated sap or plant cells and their subsequent release into plant tissues. The mechanisms underlying the transmission of plant viruses have long been studied and are now well characterized. These intimate relationships between viruses and their vectors have been classified according to the route of viruses within the vector or to the duration of virus-vector interactions. Circulative virus transmission designates viruses which are internalized within the insect body passing through gut and salivary barriers and which are finally injected together with vector saliva into the receptor plant. These viruses are also categorized as "persistent", vectors being generally able to transmit circulative viruses the rest of their life. By contrast, non-circulative virus (NCV) transmission relies on virus-vector interactions occurring in the vector mouthparts, viruses being

retained and released from retention sites located on the cuticle of the foregut (foregut-borne viruses) or the stylets (stylet-borne viruses). These viruses are considered "semi-persistently" or "non-persistently" transmitted, whether they are retained for longer time within the vector before their release (minutes to hours) or during very short time for the second category (seconds to minutes) (see Table 1) (HARRIS, 1977) (KENNEDY *et al.*, 1962) (WATSON and ROBERTS, 1939).

NON-CIRCULATIVE VIRUS TRANSMISSION

Non-circulative transmission mode is fast, efficient and particularly difficult to control. Acquisition, retention and inoculation phases last each several seconds to minutes. Most of NCV can be acquired or inoculated within a single puncture in a plant cell. Stylet-borne viruses account for hundreds of virus species and are quasi-exclusively transmitted by aphids (Hogenhout *et al.*, 2008) (Stafford *et al.*, 2012). This category includes species in the genera Cucumovirus and Potyvirus, renowned for their impact on important crops worldwide, or Caulimovirus for which receptors in aphid stylets are best characterized (Uzest *et al.*, 2007) (Uzest *et al.*, 2010) (Webster *et al.*, 2018).

These viruses can bind to aphid maxillary stylets directly through their capsid or through a viral encoded protein called the helper that interacts with the viral capsid and the receptors and transiently links the two partners (see Table 1 and Fig. 1) (PIRONE and BLANC, 1996).

Deciphering virus-vector interactions at the molecular scale may help defining interfering molecules that would specifically disrupt or impair these interactions, and subsequently reduce virus transport from plant to plant. Viral determinants have been described in details for most agronomic important viruses. Studies of mutants or re-assortants of transmissible and non-transmissible strains helped characterizing the domains or motifs mandatory for efficient transmission by their insect vectors. All these studies highlighted the high specificity of virus-vector interactions. It is exemplified by the fact that changing a single amino acid in the viral partner can totally abolish vector transmission or change the spectrum of transmitting vector species (MORENO et al., 2005) (PERRY et al., 1994). Several high-resolution three-dimensional structures of capsid proteins, whole particles, or viral-associated proteins have been released in the literature (CUESTA et al., 2019) (Guo et al., 2011) (HOH et al., 2010) (SMITH et al., 2000). These structural studies point to key amino acids involved in the integrity of viral particles or involved in receptor binding (PERRY and BRICAULT, 2013). However, detailed atomic structures of entire helper proteins including the receptor binding domains are still lacking for Potyviruses or Caulimoviruses.

TOWARDS THE IDENTIFICATION OF PLANT VIRUS RECEPTORS IN APHID STYLETS USING THE CAULIFLOWER MOSAIC VIRUS (CAMV) AS VIRUS MODEL

Receptors in vector mouthparts represent key molecules to target to negatively impact virus transmission. However, these molecules were totally uncharacterized until recently, mainly due to difficulties of working with insect cuticle. Stylets are cuticular cell-free structure synthesized by specific glands – the retort organs (Guschinskaya *et al.*, 2020) (Ponsen, 2006). Stylets are composed of entangled chitin fibers and cuticular proteins. The stylet bundle comprises two external mandibular stylets and two internal maxillary stylets, the latest enclosing the food and salivary canals that merge at

Table 1 – Classification of non-circulative viruses.

Non-circulative plant viruses have been classified according to the location of their retention sites in their vector, to the duration of the transmission phases, and/or to the viral determinant involved in virus-vector interactions.

Transmission Mode	Location of retention sites	Duration of Acquisition, Retention and Inoculation phases	Viral determinant in- volved in virus-vector interaction	Example of virus species (Genus) / vector
Non-circulative	Foregut-borne	Semi-persistent	Capsid	Lettuce infectious Yellows Virus (Crinivirus) / Whiteflies
	Stylet-borne	Semi-persistent	Helper protein	Cauliflower mosaic virus (Caulimovirus) / Aphids
		Non-persistent	Capsid	Cucumber mosaic virus (Cucumovirus) / Aphids
		Non-persistent	Helper protein	Turnip mosaic virus (Potyvirus) / Aphids

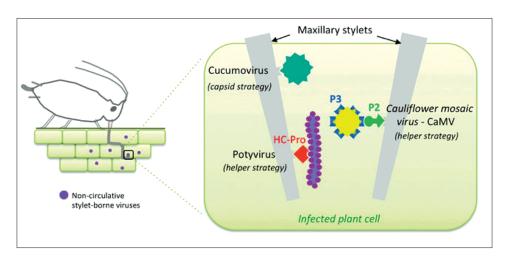


Fig. 1 – Schematic representation of non-circulative virus retention in aphid maxillary stylets. Some plant viruses attach directly to their receptor in aphid stylets (capsid strategy), while others use a viral-encoded protein to ensure their binding (helper strategy).

the tip in a single common canal, and displaying virus receptors at their inner surface. Novel approaches and techniques implemented to identify the receptors of *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) have recently revived their thorough characterization.

The CaMV was used as virus model to characterize receptors in aphid stylets. This virus has been classified as semi-persistent. It is transmitted by numerous aphid species according to the helper strategy (Fig. 1), the viral protein P2 being the ligand protein that interacts with the aphid receptor via its N-terminal domain and with the viral associated protein P3 present at the surface of the capsid via its C-terminal domain (Leh et al., 1999) (Moreno et al., 2005). The development of interaction assays between dissected individualized stylets and the viral protein P2 fused to the Green Fluorescent Protein (GFP) directly observable under epifluorescence microscopy (Fig. 2A) was a key step towards the identification of CaMV receptors (UZEST et al., 2007). These receptors are exclusively located in the common canal, exposed at the surface of a structure or organ named "acrostyle" (Fig. 2B) (UZEST et al., 2010). This structure appears different from the rest of the cuticle, visible as a thin dark line under transmission electron microscopy (Fig. 2C), and as a swelling of the cuticle under high-resolution scanning electron microscopy (Fig. 2B).

The identification of cuticular proteins (CPs) of aphid stylets by "omics"—based approaches and their immunodetection *in situ* with a library of specific antibodies allowed defining the minimal repertoire of the CPs of the acrostyle. The transcriptome of the retort organs, which represent the most exhaustive repertoire of CPs potentially present in aphid stylets was first established (Guschinskaya *et al.*, 2020). Peptides detected in stylets by proteomics analysis narrow down this list to a few dozens of CPs identified (Deshoux *et al.*, 2020). Finally, nine CPs were specifically detected in the acrostyle,

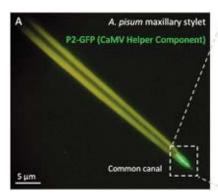
among which five emerge at the surface of the cuticle where they are directly accessible to specific antibodies. These five proteins named Stylins are all receptor candidates (DESHOUX *et al.*, 2020).

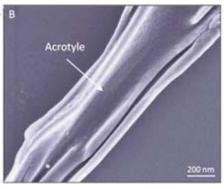
Complementary in vitro competition and in vivo silencing experiments designated Sylin-01 as prime receptor candidate of CaMV (WEBSTER et al., 2018). In a first series of experiments, the CaMV helper protein P2 and antibodies targeting the surface-exposed domain of Stylin-01 and Stylin-02 proteins were shown to compete for binding to the acrostyle. In addition, knockdown of Stylin-01 transcripts through oral ingestion of small interfering RNA impacted the ability of the vector species Myzus persicae to transmit the virus. The CaMV transmission efficiency was reduced by 40% for Stylin-01 silenced aphids. Stylin-01 is the first cuticular protein shown to play a key role in the transmission of a non-circulative virus. The role of Stylin-01 (or other stylins) in the transmission of other NCV has not yet been evaluated.

Recently, the CRISPR-Cas9 technology was implemented for the first time in the pea aphid *Acyrthosiphon pisum* to edit its genome. Using this editing approach, Stylin-01 knockout mutant lineages were successfully generated (LE TRIONNAIRE *et al.* 2019). This novel tool will help elucidating the role of cuticular proteins in virus transmission. Beyond the role of the acrostyle, such targeted mutagenesis approach will more generally benefit the aphidologist scientific community for functional studies.

CONCLUSIONS

Over the past 15 years, complementary approaches developed to identify plant virus receptors in their insect vectors led to the discovery of the acrostyle, a singular organ in aphid stylets located





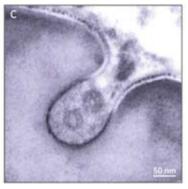


Fig. 2 – The acrostyle in aphid maxillary stylets contains receptors of *Cauliflower mosaic virus* (CaMV). A) The viral ligand P2-CaMV fused to GFP exclusively binds the common canal at the tip of aphid maxillary stylets (observation under epifluorescence microscopy). B) The acrostyle is an organ located in the common canal of maxillary stylet (observed under high-resolution scanning electron microscopy). C) Detail of the acrostyle (thin dark line in the gutter of the tip of maxillary stylet t) with two bound virus particles (CaMV) visualized under transmission electron microscopy. (The approximate location of this cross-section is shown with a white asterisk in B).

at the virus-vector interface. This outcome represents a major progress in this field of research. The acrostyle is partly composed of cuticular proteins, some of which have been diverted from their intrinsic function to ensure CaMV binding during its journey from plant to plant. This unique structure in maxillary stylets likely displays the receptors of distinct non-circulative viruses over its surface. Future research directions should provide molecular details of virus-receptors interaction. They should also bring information on the role of the acrostyle in the aphid feeding process if any. All these data will be the basis to further design blocking molecules that will impair drastically the acrostyle functions. Targeting this organ and its surface-exposed proteins now represents a reachable objective that could lead to the development of alternative control strategies.

ACKNOWLEDGMENTS

I would like to thank the Academia Nazionale Italiana di Entomologia, and Professor Domenico Bosco and the organizers of the Round Table on Insect vectors of plant pathogens: Mechanisms and ecology of transmission of bacteries and viruses held in Florence in February 2020.

REFERENCES

- BRICAULT C.A., PERRY K.L., 2013 Alteration of intersubunit acid-base pair interactions at the quasi-threefold axis of symmetry of Cucumber mosaic virus disrupts aphid vector transmission. Virology, 440(2), 160–170.
- Cuesta R., Yuste-Calvo C., Gil-Carton D., Sanchez F., Ponz F., Valle M, 2019 *Structure of Turnip Mosaic virus and its viral-like particles*. Sci. Rep. 2019 Oct 28; 9(1):15396.
- DESHOUX M., MASSON V., ARAFAH K., VOISIN S., GUSCHINSKAYA N., VAN MUNSTER M., CAYROL B., WEBSTER C.G., RAHBE Y., BLANC S., BULET P., UZEST M., 2020 Cuticular Structure Proteomics in the Pea Aphid Acyrthosiphon pisum Reveals New Plant Virus Receptor Candidates at the Tip of Maxillary Stylets. J. Proteome Res., 2020 Mar 6: 19(3): 1319-1337.
- Guschinskaya N., Ressnikoff D., Arafah K., Voisin S., Bulet P., Uzest M., Rahbe Y., 2020 Insect mouthpart transcriptome unveils extension of cuticular protein repertoire and complex organization. iScience 2020, 23: 100828.
- HARRIS K.F., 1977 An ingestion-egestion hypothesis of non-circulative virus transmission. In: Aphids as Virus Vectors. K. F. Harris and K. Maramorosch, eds. Academic Press, New York. Pp. 166-208.
- HOGENHOUT S.A., AMMAR E.-D., WHITFIELD A.E.,

- Redinbaugh M.G., 2008 Insect Vector Interactions with Persistently Transmitted Viruses. Annu. Rev. Phytopathol., 46(1): 327–359.
- HOH F, UZEST M., DRUCKER M., PLISSON-CHASTANG C., BRON P., BLANC S., DUMAS C., 2010 Structural insights into the molecular mechanisms of Cauliflower mosaic virus transmission by its insect vector. J. Virol., 84: 4706-4713.
- Kennedy J.S., Day M.F., Eastop V.F., 1962 A Conspectus of Aphids as Vectors of Plant Viruses. Commonwealth Institute of Entomology, London.
- Leh V., Jacquot E., Geldreich A., Hermann T., Leclerc D., Cerutti M., Yot P., Keller M., Blanc S., 1999 Aphid transmission of cauliflower mosaic virus requires the viral PIII protein. EMBO J., 18:7077-7085.
- Le Trionnaire G., Tanguy S., Hudaverdian S., Gleonnec F., Richard G., Cayrol B., Monsion B., Pichon E., Deshoux M., Webster C.G., Uzest M., Herpin A., Tagu D., 2019 *An Integrated Protocol for Targeted Mutagenesis With CRISPR-Cas9 System in the Pea Aphid.* Insect Biochem. Mol. Biol. 2019 Jul, 110: 34-44.
- Moreno A., Hebrard E., Uzest M., Blanc S., Fereres A., 2005 A single amino acid position in the helper component of Cauliflower mosaic virus can change the spectrum of transmitting vector species. J. Virol., 79: 13587-13593.
- Perry K.L., Zhang L., Shintaku M.H., Palukaitis P., 1994 Mapping determinants in cucumber mosaic virus for transmission by Aphis gossypii. Virology, 205: 591-595.
- PIRONE T.P., BLANC S., 1996 Helper-dependent vector transmission of plant viruses. Annu. Rev. Phytopathol., 34: 227-247.
- Ponsen M. B., 2006 A histological description of the alimentary tract and related organs of Adelgidae (Homoptera, Aphidoidea). Wageningen Agricultural University, Papers:103p.
- SMITH T.J., CHASE E., SCHMIDT T., PERRY K.L., 2000 The structure of cucumber mosaic virus and comparison to cowpea chlorotic mottle virus. J. Virol., 74: 7578-7586.
- STAFFORD C.A., WALKER G.P., ULLMAN D.E., 2012 *Hitching a ride*. Communicative & Integrative Biology, 5: 43-49.
- UZEST M., GARGANI D., DRUCKER M., HEBRARD E., GARZO E., CANDRESSE T., FERERES A., BLANC S., 2007 A protein key to plant virus transmission at the tip of the insect vector stylet. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 104: 17959-17964.
- UZEST M., GARGANI D., DOMBROVSKY A., CAZEVIEILLE C., COT D. BLANC S., 2010 The "acrostyle": A newly described anatomical structure in aphid stylets.-Arthropod Struct. Dev., 39: 221-229.
- WATSON M.A., ROBERTS F.M., 1939 A comparative study of the transmission of hyocyamus virus 3, potato virus Y and cucumber virus by the vector Myzus persicae (Sulz), M. circumflexus (Buckton) and Macrosiphum gei (Koch). Proc. R. Soc. London, Ser. B, 127: 543-576.
- Webster C.G., Pichon E., Van Munster M., Monsion B., Deshoux M., Gargani D., Calevro F., Jimenez J., Moreno A., Krenz B., Thompson J.R., Perry K.L., Fereres A., Blanc S., Uzest M., 2018 *Identification of Plant Virus Receptor Candidates in the Stylets of Their Aphid Vectors.* J. Virol., 92(14): e00432-18.

FITOPLASMI E CICADELLIDI VETTORI: INTERAZIONI MOLECOLARI E SPECIFICITÀ DI TRASMISSIONE

LUCIANA GALETTO^a

^aIstituto per la Protezione Sostenibile delle Piante, CNR, Strada delle Cacce 73, 10135 Torino, Italy.

Email: luciana.galetto@ipsp.cnr.it

Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Insetti vettori di agenti fitopatogeni: meccanismi ed ecologia della trasmissione di virus e batteri". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 21 febbraio 2020.

Phytoplasmas and leafhopper vectors: molecular interactions and transmission specificity

Insect-borne plant pathogens are viruses, bacteria and mollicutes (spiroplasmas and phytoplasmas) as well as some fungi. Vectors of these pathogens are mainly pierce-sucking insects (orders Hemiptera and Thysanoptera) and some species of Coleoptera. Phytoplasmas are wall-less bacteria, inhabiting phloem elements of infected plants. They cause hundreds of plant diseases with huge economic losses. Phytoplasmas are transmitted in a persistent propagative manner by some species of phloem-sucker hemipteran insects, largely belonging to *Deltocephalinae* subfamily. The control of phytoplasma diseases is based on containment of vector populations, mainly through spraying of insecticides. Here, the molecular recognitions between pathogen and vector are explored. These mechanisms allow the overcoming of the two main barriers encountered by phytoplasma cells during the colonization of the vector body: penetration of the gut epithelium and entry into the salivary glands. In particular, we focused on studies on the onion yellows (OY) and chrysanthemum yellows (CY) strains of 'Candidatus Phytoplasma asteris' and on the grapevine Flavescence dorée (FD) phytoplasma. Phytoplasma membrane proteins are in direct contact with host cells and are the molecular partners mainly involved in the interaction with vectors. The immunodominant membrane proteins (Amp and Imp) and the variable membrane protein (VmpA) are the main protagonists of these relationships with different species of leafhopper vectors. The activation of the immune response in the insect following phytoplasma infection is also briefly treated. A gap of knowledge on pathogen/vector relationships still remains and needs to be filled, especially to develop new and more sustainable control tools to cope with phytoplasma diseases.

KEY WORDS: Hemiptera: Cicadellidae, insect vector, 'Candidatus Phytoplasma asteris', Flavescence dorée phytoplasma, host-pathogen recognition

Introduzione

Le malattie delle piante trasmesse da insetti vettori hanno un significativo impatto ecologico ed economico che influisce sulla redditività del settore agricolo e sulla composizione vegetale selvatica a livello mondiale (Huang et al., 2020). L'epidemiologia dei patogeni vegetali trasmessi da insetti, tra cui si annoverano virus, batteri e mollicuti (fitoplasmi e spiroplasmi) e in misura minore alcuni funghi, dipende in larga misura dall'abbondanza e dal comportamento dei loro vettori. In particolare, la dinamica di popolazione, la dispersione, il comportamento di selezione dell'ospite e il comportamento di alimentazione degli insetti vettori rivestono un ruolo cruciale nella diffusione dei patogeni da essi trasmessi (EIGENBRODE et al., 2018). I vettori di agenti fitopatogeni sono rappresentati in massima parte da insetti con apparato boccale pungentesucchiante appartenenti agli ordini degli emitteri e dei tisanotteri; alcuni coleotteri dotati di apparato boccale masticatore sono in grado di trasmettere virus fitopatogeni, mediante il comportamento trofico del rigurgito (Bosco, 2014).

Restringendo il campo ai mollicuti e ancor più nello

specifico focalizzandosi sui fitoplasmi, è interessante notare come gli unici vettori conosciuti di questi procarioti siano insetti emitteri appartenenti ai subordini Auchenorrhyncha (Fulgoromorpha e Cicadomorpha) e Sternorrhyncha (famiglia Psyllidae) (WEINTRAUB and Beanland, 2006; Trivellone, 2019). Inoltre, la distribuzione delle specie di auchenorrinchi in grado di trasmettere fitoplasmi non è per nulla omogenea tra i diversi gruppi filetici, dal momento che oltre il 75% di tutte le specie di vettori si trova nella sottofamiglia dei deltocefalini. I fitoplasmi sono procarioti privi di parete cellulare appartenente alla classe Mollicutes e presentano un genoma di piccole dimensioni (530-2220 kb) (MARCONE, 2014). Essi sono parassiti obbligati, risiedono nel tessuto floematico delle piante infette e sono trasmessi da pianta a pianta da insetti vettori floemomizzi, appartenenti, come detto, all'ordine Hemiptera. I fitoplasmi sono gli agenti eziologici di centinaia di malattie delle piante in tutto il mondo e causano gravissimi e ingenti danni ad una innumerevole varietà di specie vegetali, sia coltivate che selvatiche (FOISSAC and WILSON, 2010). La sintomatologia indotta dalle infezioni di fitoplasmi include manifestazioni evidenti a carico della parte aerea, come ingiallimenti

e arrossamenti fogliari e fillodia, e a carico della struttura dell'intera pianta, come nanismo e scopazzi, e spesso conduce alla morte delle piante colpite. La classificazione tassonomica si basa su tecniche molecolari e sfrutta l'analisi filogenetica *in primis* del gene codificante per la subunità 16S dell'RNA ribosomale, al quale si affiancano diversi altri geni utilizzati per la differenziazione più fine dei diversi ceppi di fitoplasmi (IRPCM, 2004; MARCONE, 2014). Attualmente, 33 gruppi e oltre 120 sottogruppi sono stati riconosciuti sulla base dei tratti genetici del 16Sr e a 44 taxa è stato assegnato lo status tassonomico provvisorio di 'Candidatus', che denota batteri per cui la coltivazione in purezza non è ancora verificata (MIYAZAKI et al., 2018).

I fitoplasmi sono trasmessi in maniera persistente propagativa nell'ambito di specifiche e limitate combinazioni di patogeno/specie di insetto vettore/pianta ospite. Il fitoplasma, una volta acquisito dall'insetto durante una nutrizione su pianta infetta, deve superare due barriere principali nel suo percorso all'interno del corpo del vettore: il primo ostacolo è rappresentato dal passaggio attraverso l'epitelio intestinale, che permette il raggiungimento dell'emolinfa, mentre la seconda barriera consta nella colonizzazione delle ghiandole salivari, per raggiungere la saliva e permettere la successiva introduzione nel floema di un'altra pianta, concludendo il meccanismo di trasmissione. Il tempo di latenza necessario ad una determinata specie di insetto vettore per diventare infettivo e trasmettere il fitoplasma acquisito può variare da specie a specie (Bosco et al., 2007), ma in linea generale l'intero processo di trasmissione necessita di all'incirca 3-5 settimane. A titolo di esempio, una recente analisi spazio-temporale molto dettagliata della colonizzazione della cicalina vettrice *Macrosteles striifrons* da parte di un ceppo del '*Ca*. P. asteris' ha indicato che sono necessari sette giorni per il passaggio dell'epitelio intestinale e da 21 a 28 giorni per la completa colonizzazione delle ghiandole salivari (KOINUMA *et al.*, 2020).

Tenendo in considerazione la specificità dei fitoplasmi per il tessuto floematico, la nutrizione floematica delle specie di insetti potenzialmente in grado di trasmetterli è ovviamente una condizione necessaria, ma tuttavia non sufficiente per la loro trasmissione. A dimostrazione di ciò, è interessante rimarcare il fatto che i vettori di fitoplasmi si collocano in una cerchia molto ristretta rispetto al restante gran numero di insetti floemomizi, quali afidi, aleurodidi, coccidi e pseudococcidi, che non includono alcuna specie in grado di trasmettere fitoplasmi. Quali altri fattori determinano la specificità di trasmissione? Il tentativo di dare risposta a tale quesito è il presupposto alla base dei lavori che saranno qui di seguito trattati. Diversi studi indicano infatti che siano alcuni meccanismi di riconoscimento molecolare a regolare la capacità vettoriale di determinate specie di insetti floemomizi, soprattutto per il superamento delle barriere intestinale e delle ghiandole salivari.

Patosistemi oggetto di studio

Saranno qui approfonditi in particolare il '*Ca*. P. asteris' e il fitoplasma della Flavescenza dorata della vite con specifico riferimento alle interazioni molecolari tra i patogeni e i loro cicadellidi vettori (Fig. 1). Tale

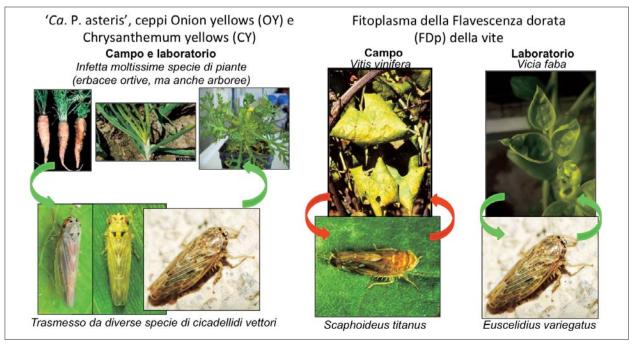


Fig. 1 – Rappresentazione schematica dei patosistemi oggetto di studio.

scelta è stata dettata dal fatto che questi patosistemi sono tra quelli più largamente studiati in termini di interazioni fitoplasma/insetto e altresì considerando l'elevato impatto che le malattie associate a questi patogeni hanno sul settore agricolo a livello europeo e mondiale.

Il 'Ca. P. asteris' include isolati associati a oltre 100 malattie delle piante economicamente rilevanti in tutto il mondo ed è il più diversificato e diffuso gruppo di fitoplasmi (LEE et al., 2004). I ceppi afferenti al 'Ca. P. asteris' maggiormente studiati per quanto riguarda le interazioni con gli insetti vettori sono i fitoplasmi associati all'onion yellows (OYp) e al chrysanthemum yellows (CYp), entrambi appartenenti al sottogruppo ribosomale 16SrI-B. Il ceppo OYp è stato isolato da piante di cipolla raccolte nella prefettura di Saga, Giappone (SHIOMI et al., 1996) e poi mantenuto in crisantemo (Chrysanthemum coronarium) tramite cicli di trasmissione successivi con l'insetto vettore M. striifrons (OSHIMA et al., 2001). L'isolato OYp è stato il primo fitoplasma di cui sia stato interamente sequenziato il genoma (OSHIMA et al., 2004) ed è stato sfruttato come organismo modello per ottenere molte delle conoscenze di base fin qui raggiunte sul meccanismo di patogenesi dei fitoplasmi. In particolare, si pensi agli studi su: effettori del patogeno che mediano il processo infettivo (Hoshi et al., 2009; IWABUCHI et al., 2019), meccanismi di regolazione dell'hostswitching tra pianta e insetto e caratterizzazione dei fattori di trascrizione (OSHIMA et al., 2011; ISHII et al., 2013; MIURA et al., 2015; NIJO et al., 2017), effetto mediato da elementi extracromosomali (plasmidi) del patogeno nel determinarne la trasmissibilità (ISHII et al., 2009). L'isolato CYp è associato a una malattia di piante ornamentali nell'Italia nordoccidentale (CONTI et al., 1988). Le cicaline Euscelidius variegatus, Macrosteles quadripunctulatus ed Euscelis incisus sono vettori efficienti di CYp, sia in condizioni di campo sia di laboratorio (CONTI et al., 1988; Bosco et al., 2007). Analogamente al ceppo OYp, l'isolato CYp è stato utilizzato come organismo modello per alcuni studi di base delle fitoplasmosi, quali ad esempio la traslocazione del patogeno in pianta (SARACCO et al., 2006), la risposta della pianta al trattamento con elicitori di resistenza per prevenire e contrastare l'infezione (D'AMELIO et al., 2010, 2011), e infine alcune interazioni biologiche tra fitoplasma e vettore (PALERMO et al., 2001; D'AMELIO et al., 2008).

La Flavescenza dorata (FD) è una malattia della vite con un impatto economicamente molto rilevante sulla viticultura Europea, causata da un fitoplasma, classificato come patogeno da quarantena (EFSA PLH *et al.*, 2014, 2016). I fitoplasmi associati alla FD appartengono ai sottogruppi tassonomici 16SrV-C e -D, inclusi nella specie proposta '*Ca.* P. vitis' ancora formalmente non descritta (IRPCM, 2004). *Scaphoideus*

titanus è il principale vettore responsabile della trasmissione di FD in vigneto, anche se sono stati documentati cicli epidemiologici alternativi a carico di altri vettori, che hanno però un impatto decisamente minore rispetto alla diffusione della malattia in campo (MALEMBIC-MAHER et al., 2020). Le principali strategie preventive per il controllo della malattia sono i trattamenti insetticidi obbligatori contro S. titanus nonché la rimozione di viti infette e la loro sostituzione con piante sane (EFSA PLH et al., 2016). C'è quindi un'urgente necessità di nuovi e più sostenibili strumenti di controllo per far fronte alla malattia. A tal fine, le lacune di conoscenza sui meccanismi sfruttati dai fitoplasmi per colonizzare i vettori devono essere colmate. È stato quindi messo a punto e sfruttato un modello di laboratorio per mantenere il ciclo di infezione da FDp in condizioni controllate che utilizza la piante erbacea Vicia faba come ospite vegetale e la cicalina polivoltina E. variegatus come vettore di laboratorio (CAUDWELL et al., 1972) (Fig. 1), superando così le difficoltà nel lavorare con un ospite arboreo pluriennale (Vitis vinifera) e un vettore monovoltino e monofago (S. titanus), che rappresentano invece il patosistema in campo.

PROTEINE DI MEMBRANA DEI FITOPLASMI

I fitoplasmi non presentano parete cellulare e le proteine di membrana sono a diretto contatto con le cellule di insetti vettori e piante ospiti. Le proteine più abbondanti sulla superficie cellulare di questi patogeni vegetali sono le proteine immunodominanti di membrana, una tra le classi proteiche più studiate e caratterizzate in diversi isolati di fitoplasmi (KAKIZAWA et al., 2006a; KONNERTH et al., 2016). Anche altre famiglie di proteine di membrana, come proteine variabili di membrana (Vmps), adesine, AAA + ATPasi e diversi trasportatori, sono state tuttavia identificate come partners molecolari di interazione con gli ospiti, coinvolte nell'adattamento dei patogeni a diversi ambienti e come utili marcatori molecolari per la genotipizzazione dei ceppi (Rossi et al., 2019).

La Fig. 2 rappresenta schematicamente le tre proteine di membrana di fitoplasma che verranno qui maggiormente descritte per la loro capacità di interazione con i cicadellidi vettori, vale a dire le proteine Amp (Antigenic Membrane Protein), Imp (Immunodominant Membrane Protein), e VmpA (Variable Membrane Protein A). La Tabella 1 riassume schematicamente le principali conoscenze finora ottenute su tali proteine, in termini di interazione con gli ospiti.

Le proteine Amp e Imp appartengono alla classe delle proteine immunodominanti di membrana (IDP), nella quale se ne annovera anche una terza non omo-

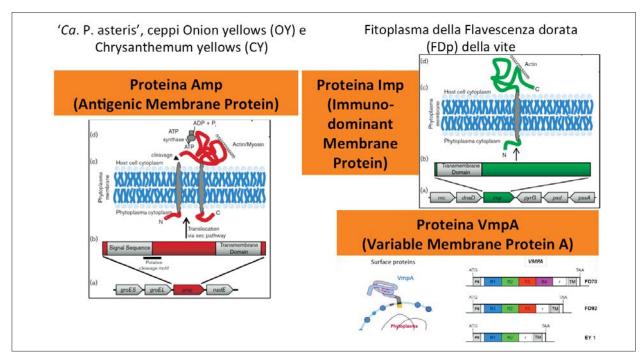


Fig. 2 – Rappresentazione schematica dei partner molecolari oggetto di studio.

loga, IdpA (Immunodominant membrane protein A). Questa classe proteica è tra le più altamente rappresentate sulla membrana dei fitoplasmi e presenta spiccate caratteristiche antigeniche. I tre tipi di IDP identificati nei fitoplasmi condividono una regione idrofila centrale, con un orientamento extracellulare, e uno o due domini transmembrana; l'organizzazione complessiva dei diversi domini tuttavia non è conservata, poiché in Imp è presente solo un dominio transmembrana N-terminale, mentre IdpA e Amp ne hanno due rispettivamente all'N- e al C-terminale (Konnerth et al., 2016) (Fig. 2). Il dominio transmembrana N-terminale di Amp inoltre viene staccato dal resto della catena polipeptidica dopo l'inserimento della proteina nella membrana plasmatica (Fig. 2). I geni codificanti per le tre proteine Amp, Imp e IdpA sono variamente rappresentate nei genomi dei diversi fitoplasmi: la proteina Amp si trova in 'Ca. P. solani', e in diversi isolati del 'Ca. P. asteris'; IdpA è presente in 'Ca. P. pruni'; Imp si trova in 'Ca. P. asteris', 'Ca. P. mali', 'Ca. P. prunorum', 'Ca. P. pyri', nel fitoplasma associato a FD e in diversi isolati del 'Ca. P. aurantifolia' (Rossi et al., 2019). In alcuni casi lo stesso fitoplasma può possedere differenti geni che codificano per diverse IDP, uno dei quali è però generalmente più espresso, come nel caso di 'Ca. P. asteris', che oltre ad amp esprime in misura minore anche imp (KAKIZAWA et al., 2009). Le sequenze geniche codificanti per IDP sono altamente variabili tra ceppi di fitoplasmi strettamente correlati filogeneticamente, anche all'interno dello stesso gruppo ribosomale (Morton et al., 2003; Galetto et al., 2008; Neriya et al., 2011; SIAMPOUR et al., 2013) e questa variabilità è maggiore rispetto a quella registrata per altri geni metabolici adiacenti o per sequenze non codificanti. A carico dei geni *amp* e *imp* è stata infatti dimostrata una forte pressione selettiva (KAKIZAWA *et al.*, 2006b, 2009; FABRE *et al.*, 2011; SIAMPOUR *et al.*, 2013), indicando un possibile ruolo di entrambe queste proteine nell'adattamento evolutivo dei fitoplasmi.

I geni di fitoplasmi che codificano per le proteine di membrana note come VmpA, VmpB e Vmp1 mostrano somiglianza con le proteine variabili di superficie dei micoplasmi animali. In linea generale, una proteina Vmp possiede una sequenza segnale per traslocazione in membrana all'N-terminale, ampie sequenze ripetute nella zona centrale e un dominio transmembrana al C-terminale (Fig. 2). Questa organizzazione è condivisa con alcune proteine di superficie batteriche come le adesine (RENAUDIN et al., 2015). Tra i fitoplasmi, i geni vmp sono stati studiati per la prima volta in 'Ca. P. solani' (CIMERMAN et al., 2009) e nel fitoplasma associato a FD (RENAUDIN et al., 2015). In 'Ca. P. solani' è stato rivelato che il gene *vmp*1 che codifica per una proteina di circa 500 amminoacidi nella regione uvrA-vmp1-lig, potrebbe avere diversi omologhi di sequenza nello stesso genoma (CIMERMAN et al., 2009). Più nel dettaglio, il gene *vmp* 1 ha dimensioni sorprendentemente variabili, con domini ripetuti da 80 a 84 amminoacidi nelle forme più grandi del gene e variazioni nelle ripetizioni di 11 paia di basi che portano alla distruzione del gene in alcuni dei ceppi. Pertanto il gene *vmp*1, è ampiamente utilizzato come marker di diversità e discriminante per l'epidemiologia molecolare di 'Ca. P. solani' (CIMERMAN et al., 2009).

Tabella 1 – Attuali conoscenze sulle interazioni tra proteine di membrana di fitoplasmi e insetti vettori.

Denominazione proteine di membrana di fitoplasma	'Candidatus Phytoplasma species'	Isolato di fitoplasma	Breve descrizione dell'interazione	Riferimenti bibliografici salienti
Amp	'Ca. P. asteris'	OYp	Amp interagisce specificamente <i>in vitro</i> con l'actina e la miosina dei vettori e si co-localizza con i microfilamenti di actina nei tessuti intestinali di insetti infetti.	Suzuki <i>et al.</i> , 2006
			Amp interagisce specificamente <i>in vitro</i> con actina e subunità alfa e beta dell'ATP sintasi dei vettori. Nei vettori ATP sintasi beta è espressa oltre che nei mitocondri anche sulla superficie dell'epitelio intestinale e sula membrana plasmatica delle cellule delle ghiandole salivare.	Galetto <i>et al.</i> , 2011
		СҮр	La moltiplicazione dei fitoplasmi è rallentata negli insetti in cui viene silenziato il gene dell'ATP sintasi beta.	Galetto <i>et al.</i> , 2021
			Amp è coinvolta <i>in vivo</i> nell'attraversamento dell'epitelio intestinale del vettore da parte del fitoplasma e nella colonizzazione delle ghiandole salivari.	Rashidi et al., 2015
Imp	Flavescence dorée	FDp	Imp interagisce specificamente <i>in vi-tro</i> con estratti proteici delle specie vettrici, in particolare con la porzione di proteine di membrana ottenuta da intestini di insetti vettori.	Trivellone et al., 2019
	'Ca. P. aurantifolia'	WBDLp	Imp interagisce specificamente <i>in vi-tro</i> con estratti proteici delle specie vettrici.	SIAMPOUR et al., 2011
VmpA	pA Flavescence dorée	FDp	VmpA si lega alla membrana perimi- crovillare dell'intestino dei vettori e promuove l'adesione del patogeno alle cellule del vettore.	Arricau-Beauvery et al., 2018
			Le varianti geniche di VmpA determinano la capacità di trasmissione di diversi isolati del patogeno da parte di varie specie di vettori.	Malembic-Maher <i>et al.</i> , 2020

Interazioni tra Amp di ' C_A . P. asteris' e cicadellidi vettori

Il ruolo di Amp nell'interazione con gli insetti vettori è stato studiato nei ceppi OYp e CYp (SUZUKI et al., 2006; GALETTO et al., 2011; RASHIDI et al., 2015). Nel caso di OYp la formazione di un complesso tra Amp e microfilamenti di actina di insetto è stata correlata con la capacità di trasmissione del fitoplasma da parte delle cicaline vettrici (M. striifrons, Hishimonus sellatus e Hishimonoides sellatiformis), suggerendo che l'interazione tra Amp e il citoscheletro delle cellule ospiti abbia un ruolo cruciale nella trasmissibilità del fitoplasma (SUZUKI et al., 2006). Oltre all'actina, anche le catene pesanti e leggere della miosina d'insetto hanno dimostrato di interagire in vitro con Amp di OYp, confermando che il citoscheletro del vettore è

coinvolto nella mediazione della relazione con le cellule batteriche (SUZUKI *et al.*, 2006).

Sfruttando tecniche d'interazione proteica *in vitro* è stato possibile dimostrare la presenza di uno specifico legame tra Amp di CYp e alcune proteine di diverse specie vettrici (*E. variegatus*, *M. quadripunctulatus*, *S. titanus* ed *Empoasca decipiens*), tra cui actina e subunità alfa e beta dell'ATP sintasi (GALETTO *et al.*, 2011). Inoltre, è stato dimostrato che la subunità beta dell'ATP sintasi è presente oltre che, come atteso, nei mitocondri anche sulla superficie esterna microvillare delle cellule epiteliali intestinali e sulla membrana plasmatica delle cellule delle ghiandole salivari di *E. variegatus*, entrambi organi cruciali per il processo di infezione (GALETTO *et al.*, 2011). Recentemente si è poi osservato come esemplari di *E. variegatus*, in cui era stato silenziato il gene codificante per la subunità

beta dell'ATP sintasi, presentavano un tasso di moltiplicazione di fitoplasmi significativamente inferiore rispetto a quello registrato negli insetti di controllo, dando prova anche in vivo del coinvolgimento di questa proteina nel mediare il processo di infezione nell'insetto (GALETTO et al., 2021). È interessante notare come anche in altri patosistemi l'ATP sintasi beta abbia la funzione di recettore di patogeni (LIANG et al., 2010, 2015) e sia coinvolta nell'adesione e nell'ingresso di particelle virali nelle cellule di artropodi ospiti (FONGSARAN et al., 2014). Va inoltre sottolineato che i fitoplasmi difettano di geni funzionali per la produzione di ATP (OSHIMA et al., 2004). L'interazione Amp / ATP sintasi potrebbe combinare il riconoscimento specifico del patogeno e lo sfruttamento dell'energia metabolica dell'ospite durante il processo di colonizzazione. L'aumento del metabolismo energetico degli insetti indotto in E. variegatus dall'infezione con CYp (GALETTO et al., 2018) potrebbe rientrare nel quadro dello sfruttamento da parte del fitoplasma dell'energia potenziale dell'ospite.

Il ruolo della proteina Amp di CYp nel mediare il superamento delle due barriere principali alla colonizzazione del vettore è stato dimostrato anche in vivo in maniera indiretta (RASHIDI et al., 2015). Mascherando la proteina Amp nativa sulle cellule del fitoplasma con uno specifico anticorpo anti-Amp, sono state infatti registrate riduzioni significative dell'efficienza di acquisizione e trasmissione del fitoplasma sia in E. variegatus che in M. quadripunctulatus. È stata inoltre verificata la co-localizzazione a livello intestinale dell'anticorpo anti-Amp e delle cellule di fitoplasma durante le prime fasi della colonizzazione dell'epitelio intestinale. Un saggio di internalizzazione del fitoplasma nelle ghiandole salivari, ottimizzato per osservare le prime fasi della colonizzazione di tale organo, ha mostrato una ridotta presenza di cellule CYp quando la proteina Amp nativa era mascherata dal suo anticorpo specifico (RASHIDI et al., 2015).

Interazioni tra Imp di FDP e cicadellidi vettori

La proteina Imp di FDp, espressa come proteina di fusione e utilizzata per la produzione di un anticorpo specifico, interagisce *in vitro* in maniera selettiva con le proteine totali e di membrana di insetti vettori (*S. titanus* ed *E. variegatus*) (TRIVELLONE *et al.*, 2019). Tale interazione si è rivelata particolarmente specifica nel caso di estratti proteici ottenuti da intestini dissezionati da esemplari delle due specie vettrici. Si è inoltre osservata una sorta di gradiente di interazione, correlato alla capacità vettoriale delle sei specie di insetto in studio, dal momento che i segnali di interazione maggiormente evidenti erano quelli generati dalle specie in grado di trasmettere il patogeno con maggior

efficienza (TRIVELLONE et al., 2019). È interessante notare come simili risultati preliminari siano stati ottenuti anche con la proteina Imp di 'Ca. P. aurantifolia', agente eziologico del witches' broom disease of lime (WBDL). In saggi di interazione in vitro infatti, una proteina Imp ricombinante (SIAMPOUR et al., 2013) ha interagito specificamente con estratti di insetti vettori, ma non con proteine di specie non vettrici, suggerendo anche per Imp un ruolo nel determinare la trasmissibilità degli insetti (SIAMPOUR et al., 2011).

Interazioni tra VmpA di FDp e cicadellidi vettori

Al fine di determinare il ruolo della VmpA di FDp nell'interazione con gli ospiti e per superare la difficoltà della coltivazione dei fitoplasmi, è stata ingegnerizzata una linea mutante di Spiroplasma citri, un mollicute fitopatogeno coltivabile, per esprimere VmpA sulla membrana plasmatica (RENAUDIN et al., 2015). È stato poi osservato come sia le cellule mutanti di S. citri che esprimono VmpA di FDp sulla loro superficie sia micro-biglie sintetiche rivestite con VmpA ricombinante aderiscono in modo specifico a colture cellulari di E. variegatus, dimostrando per questa proteina un ruolo nel processo di adesione del patogeno alle cellule d'insetto (Arricau-Bouvery et al., 2018). Inoltre, è stata confermata l'espressione di VmpA sia nell'intestino medio che nelle ghiandole salivari di insetti naturalmente infetti con FDp. Sfruttando le micro-biglie rivestite di VmpA ricombinante si è visto come esse venivano trattenute principalmente nella membrana perimicrovillare dell'epitelio del mesointestino dissezionato da esemplari di *E. variegatus* che si erano nutriti su una dieta artificiale addizionata con tali micro-biglie, confermando la funzione cruciale di VmpA nell'interazione con i vettori (ARRICAU-BOUVERY et al., 2018). È stato inoltre dimostrato che le varianti delle proteine VmpA e VmpB si correlano con la capacità di trasmissione di FDp da parte di diverse specie di insetti vettori; è stato possibile classificare gli isolati di FDp reperiti in diverse piante ospiti e insetti vettori raccolti in varie località europee in "vectotypes", sulla base appunto delle sequenze dei geni vmpA, vmpB e map (MALEMBIC-MAHER et al., 2020). In particolare, il cosiddetto "vectotype I" è presente in isolati di FDp trasmissibili solo dalla cicalina Oncopsis alni, mentre i "vectotype II e III" sono reperiti in isolati trasmissibili solo da vettori deltocefalini, quali S. titanus, Orientus ishidae e Allygus spp.. Tali risultati di inferenza molecolare sono stati confermati inoltre sfruttando la tecnologia delle micro-biglie sintetiche rivestite con le diverse varianti ricombinanti di VmpA: le biglie rivestite con VmpA della tipologia "vectotype II" erano trattenute negli intestini di E. variegatus e di

S. titanus in misura maggiore rispetto a quelle del "vectotype I" (MALEMBIC-MAHER et al., 2020).

RISPOSTA IMMUNITARIA INNESCATA DA FITOPLASMI IN CICADELLIDI VETTORI

La risposta immunitaria negli insetti è un processo cruciale nelle interazioni tra ospite e microrganismi e la presenza di batteri può innescare diverse reazioni di difesa a seconda che essi siano patogeni, commensali o benefici (Login et al., 2011; Eleftherianos et al., 2013). Negli emitteri vettori di fitoplasmi, gli insetti infetti supportano elevate quantità di fitopatogeni che hanno sviluppato diverse strategie di immunomodulazione e adattamento all'ospite. Nel caso di E. variegatus, che è vettore naturale del co-evoluto isolato CYp e vettore forzato in laboratorio del non co-evoluto ceppo FDp, si è visto come l'infezione con quest'ultimo attivi una risposta immune di lunga durata, sia in termini di regolazione genica che di risposta biochimica (attività fenoloossidasica, immunocompetenza e attivazione della cascata di melanizzazione) (GALETTO et al., 2018). FDp viene quindi percepito come potenziale patogeno dall'insetto, come infatti confermato dalla riduzione di prolificità e longevità dell'insetto in seguito all'infezione (Bressan et al., 2005). D'altro canto, l'infezione di E. variegatus con CYp, che ne aumenta leggermente la fitness (D'AMELIO et al., 2008), attiva le risposte di adattamento dell'insetto allo stress, sia in termini di regolazione genica che di attivazione metabolica (GALETTO et al., 2018). Sempre in E. variegatus, si è osservata un'attivazione specifica del pathway immunitario Raf nell'intestino in seguito a doppia infezione con l'endosimbionte Asaia e con FDp (GONELLA et al., 2019). È interessante notare come la localizzazione tissutale e la tempistica di attivazione di Raf siano coerenti con il ruolo svolto da Asaia nel limitare l'acquisizione del fitoplasma, supportando il coinvolgimento di questo gene nell'attività dimostrata dall'endosimbionte nei confronti di FDp (GONELLA et al., 2018).

CONCLUSIONI

I fitoplasmi sono procarioti fitopatogeni, privi di parete, a localizzazione floematica e sono trasmessi da insetti che si nutrono nel floema, condizione necessaria ma non sufficiente per la loro trasmissione. Relativamente poche specie di insetti emitteri floemomizzi sono in grado di trasmettere tali fitopatogeni: si tratta in larga misura di cicadellidi deltocefalini. Il riconoscimento e l'adesione del fitoplasma all'epitelio intestinale sono necessari per l'ingresso nel corpo del vettore e sono mediati da specifici meccanismi

molecolari nei quali sono coinvolte le proteine di membrana del patogeno. Il patogeno deve essere in grado di moltiplicarsi e colonizzare i diversi organi dell'insetto, che a sua volta deve essere permissivo e in grado di supportare tale invasione batterica senza innescare una risposta immunitaria eccessiva. Meccanismi di riconoscimento molecolare sono poi necessari anche per l'adesione e la colonizzazione delle ghiandole salivari, il raggiungimento della saliva e la conclusione del processo di trasmissione. Nella realtà del pieno campo, altri fattori oltre alle interazioni molecolari influiscono ovviamente sulle combinazioni fitoplasma/insetto, come ad esempio il comportamento nutrizionale su gamme di piante ospiti compatibili a patogeno e vettore e l'opportunità ecologica di condivisione stagionale dello stesso areale. L'ampliamento delle conoscenze, purtroppo ancora limitate, nell'ambito delle relazioni patogeno/vettore rappresenta un trampolino di lancio fondamentale per lo sviluppo di tecniche innovative e sostenibili per la gestione agronomica delle fitoplasmosi, che si basa in primis sul contenimento dei loro vettori.

RIASSUNTO

I patogeni vegetali trasmessi da insetti sono virus, batteri e mollicuti (fitoplasmi e spiroplasmi), e in misura minore alcuni funghi. I vettori di agenti fitopatogeni sono prevalentemente insetti con apparato boccale pungente-succhiante (ordini Hemiptera e Thysanoptera) e alcuni coleotteri con apparato boccale masticatore. I fitoplasmi sono procarioti fitopatogeni, privi di parete, che si localizzano nel floema delle piante infette. Essi causano innumerevoli malattie delle piante producendo ingenti danni economici ai sistemi produttivi. I fitoplasmi sono trasmessi in maniera persistente propagativa da alcune specie di insetti emitteri floemomizzi, in larga misura cicadellidi deltocefalini. Il controllo e la gestione delle malattie da fitoplasmi si basano su strategie di contenimento delle popolazioni di vettori, mediante l'uso prevalente di insetticidi. Vengono qui approfonditi i meccanismi di riconoscimento molecolare tra patogeno e vettore che permettono il superamento delle due principali barriere incontrate dal fitoplasma nella colonizzazione del corpo del vettore: l'attraversamento dell'epitelio intestinale e l'ingresso nelle ghiandole salivari. In particolare, si fa riferimento agli studi compiuti sui ceppi onion yellows (OY) e chrysanthemum yellows (CY) del 'Candidatus Phytoplasma asteris' e sul fitoplasma della Flavescenza dorata (FD) della vite. Le proteine di membrana dei fitoplasmi sono in diretto contatto con le cellule ospiti e sono i partners molecolari prevalentemente coinvolti nell'interazione con i vettori. Le proteine immunodominanti di membrana (Amp e Imp) e la proteina variabile di membrana (VmpA) sono le principali protagoniste di queste relazioni con diverse specie di cicadellidi vettori. Vengono fatti altresì brevi cenni sull'attivazione della risposta immune nell'insetto in seguito all'infezione da fitoplasmi. Molto resta da conoscere sulle relazioni tra patogeno e vettore, soprattutto per soddisfare la necessità di nuovi e più sostenibili strumenti di controllo per far fronte alle malattie da fitoplasmi.

BIBLIOGRAFIA

- ARRICAU-BOUVERY N., DURET S., DUBRANA M.-P., BATAILLER B., DESQUE D., BEVEN L., DANET J.-L., MONTICONE M., BOSCO D., MALEMBIC-MAHER S., FOISSAC X., 2018 Variable membrane protein A of flavescence dorée phytoplasma binds the midgut perimicrovillar membrane of Euscelidius variegatus and promotes adhesion to its epithelial cells. Appl. Environ. Microbiol., 84, 8-17.
- Bosco D., 2014 *Insetti vettori di agenti fitopatogeni*. In: Pennacchio F., Mancini D. (Eds.), Gli insetti e il loro controllo. Liguori Editore, Napoli, Italy, 425-448.
- Bosco D., Galetto L., Leoncini P., Saracco P., Raccah B., Marzachì C., 2007 Interrelationships between "Candidatus Phytoplasma asteris" and its leafhopper vectors (Homoptera: Cicadellidae). J. Econom. Entomol., 100: 1504-1511.
- Bressan A., Clair D., Semetey O., Boudon-Padieu E., 2005 Effect of two strains of Flavescence dorée phytoplasma on the survival and fecundity of the experimental leafhopper vector Euscelidius variegatus Kirschbaum. J. Invert. Pathol., 89: 144-149.
- CAUDWELL A., KUSZALA C., LARRUE J., BACHELIER J., 1972 Transmission de la Flavescence dorée de la fève à la fève par des cicadelles des genres Euscelis et Euscelidius. Ann. Phytopathol., No. hors série: 181-189.
- CIMERMAN A., PACIFICO D., SALAR P., MARZACHÌ C., FOISSAC X., 2009 Striking diversity of vmp1, a variable gene encoding a putative membrane protein of the stolbur phytoplasma. Appl. Environ. Microbiol., 75: 2951-2957.
- CONTI M., D'AGOSTINO G., CASETTA A., MELA L., 1988 Some characteristics of chrysanthemum yellows disease. Acta Horticult., 234: 129-136.
- D'AMELIO R., BERTA G., GAMALERO E., MASSA N., AVIDANO L., CANTAMESSA S., D'AGOSTINO G., BOSCO D., MARZACHÌ C., 2011 Increased plant tolerance against chrysanthemum yellows phytoplasma ('Candidatus Phytoplasma asteris') following double inoculation with Glomus mosseae BEG12 and Pseudomonas putida S1Pf1Rif: Effects of AM fungus and a pseudomonad on phytoplasmosis. Plant Pathol., 60: 1014-1022.
- D'AMELIO R., MARZACHÌ C., BOSCO D., 2010 Activity of benzothiadiazole on chrysanthemum yellows phytoplasma ('Candidatus Phytoplasma asteris') infection in daisy plants. Crop Protect., 29: 1094-1099.
- D'AMELIO R., PALERMO S., MARZACHÌ C., BOSCO D., 2008 Influence of Chrysanthemum yellows phytoplasma on the fitness of two of its leafhopper vectors, Macrosteles quadripunctulatus and Euscelidius variegatus. Bullett. Insectol., 61: 349 354.
- EFSA Panel on Plant Health PLH, et al., 2014 Scientific opinion on pest categorisation of grapevine Flavescence

- dorée: grapevine Flavescence dorée pest categorisation. EFSA J., 12: 3851.
- EFSA Panel on Plant Health PLH, et al., 2016 Risk to plant health of Flavescence dorée for the EU territory. EFSA J., 14: 4603.
- EIGENBRODE S.D., BOSQUE-PEREZ N.A., DAVIS T.S., 2018 Insect-borne plant pathogens and their vectors: ecology, evolution, and complex interactions. - Annu. Rev. Entomol., 63: 169-191.
- Eleftherianos I., Atri J., Accetta J., Castillo J.C., 2013 Endosymbiotic bacteria in insects: guardians of the immune system? Front. Physiol., 4.
- Fabre A., Danet J.-L., Foissac X., 2011 The stolbur phytoplasma antigenic membrane protein gene stamp is submitted to diversifying positive selection. Gene, 472: 37-41.
- Foissac X, Wilson M.R., 2010 Current and possible future distributions of phytoplasma diseases and their vectors. In: Weintraub, P.G., Jones, P. (Eds.), Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts, and Vectors. CABI, Wallingford, UK, 309 324.
- Fongsaran C., Jirakanwisal K., Kuadkitkan A., Wikan N., Wintachai P., Thepparit C., Ubol S., Phaonakrop N., Roytrakul S., Smith D.R., 2014 *Involvement of ATP synthase* β *subunit in chikungunya virus entry into insect cells.* Arch. Virol., 159: 3353-3364.
- Galetto L., Abbà S., Rossi M., Ripamonti M., Palmano S., Bosco D., Marzachì C., 2021 Silencing of ATP synthase β reduces phytoplasma multiplication in a leafhopper vector. J. Insect Physiology, 125: 104107.
- GALETTO L., ABBÀ S., ROSSI M., VALLINO M., PESANDO M., ARRICAU-BOUVERY N., DUBRANA M.-P., CHITARRA W., PEGORARO M., BOSCO D., MARZACHÌ C., 2018 Two phytoplasmas elicit different responses in the insect vector Euscelidius variegatus Kirschbaum. Infect. Immun., 86, IAI.00042-18.
- GALETTO L., BOSCO D., BALESTRINI R., GENRE A., FLETCHER J., MARZACHÌ C., 2011- The major antigenic membrane protein of "Candidatus Phytoplasma asteris" selectively interacts with ATP synthase and actin of leafhopper vectors. PLoS ONE, 6: e22571.
- GALETTO L., FLETCHER J., BOSCO D., TURINA M., WAYADANDE A., MARZACHÌ C., 2008 Characterization of putative membrane protein genes of the 'Candidatus Phytoplasma asteris', chrysanthemum yellows isolate. Can. J. Microbiol., 54: 341-351.
- GONELLA E., CROTTI E., MANDRIOLI M., DAFFONCHIO D., ALMA A., 2018 Asaia symbionts interfere with infection by Flavescence dorée phytoplasma in leafhoppers. J. Pest Sci., 91: 1033-1046.
- GONELLA E., MANDRIOLI M., TEDESCHI R., CROTTI E., PONTINI M., ALMA A., 2019 Activation of immune genes in leafhoppers by phytoplasmas and symbiotic bacteria. Front. Physiol., 10: 795.
- HOSHI A., OSHIMA K., KAKIZAWA S., ISHII Y., OZEKI J., HASHIMOTO M., KOMATSU K., KAGIWADA S., YAMAJI Y., NAMBA S., 2009 A unique virulence factor for proliferation and dwarfism in plants identified from a phytopathogenic bacterium. PNAS, 106: 6416-6421.
- Huang W., Reyes-Caldas P., Mann M., Seifbarghi S., Kahn A., Almeida R.P.P., Beven L., Heck M., Hogenhout S.A., Coaker G., 2020 Bacterial vectorborne plant diseases: unanswered questions and future directions. Mol. Plant, 13: 1379-1393.
- IRPCM, Phytoplasma/Spiroplasma Working Team Phytoplasma Taxonomy Group, 200 'Candidatus Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical

- prokaryotes that colonize plant phloem and insects. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 54: 1243-1255.
- ISHII Y., KAKIZAWA S., HOSHI A., MAEJIMA K., KAGIWADA S., YAMAJI Y., OSHIMA K., NAMBA S., 2009 In the non-insect-transmissible line of onion yellows phytoplasma (OY-NIM), the plasmid-encoded transmembrane protein ORF3 lacks the major promoter region. Microbiology, 155: 2058-2067.
- ISHII Y., KAKIZAWA S., OSHIMA K., 2013 New ex vivo reporter assay system reveals that σ factors of an unculturable pathogen control gene regulation involved in the host switching between insects and plants. MicrobiologyOpen, 2: 553-565.
- IWABUCHI N., MAEJIMA K., KITAZAWA Y., MIYATAKE H., NISHIKAWA M., TOKUDA R., KOINUMA H., MIYAZAKI A., NIJO T., OSHIMA K., YAMAJI Y., NAMBA S., 2019 Crystal structure of phyllogen, a phyllody-inducing effector protein of phytoplasma. Biochem. Biophys. Res. Commun., 513: 952-957.
- Kakizawa S., Oshima K., Namba S., 2006a Diversity and functional importance of phytoplasma membrane proteins. Trends Microbiol., 14: 254-256.
- KAKIZAWA S., OSHIMA K., JUNG H.-Y., SUZUKI S., NISHIGAWA H., ARASHIDA R., MIYATA S.-I., UGAKI M., KISHINO H., NAMBA S., 2006b Positive selection acting on a surface membrane protein of the plant-pathogenic phytoplasmas. J. Bacteriol., 188: 3424-3428.
- KAKIZAWA S., OSHIMA K., ISHII Y., HOSHI A., MAEJIMA K., JUNG H.-Y., YAMAJI Y., NAMBA S., 2009 Cloning of immunodominant membrane protein genes of phytoplasmas and their in planta expression. FEMS Microbiol. Lett., 293: 92-101.
- Koinuma H., Maejima K., Tokuda R., Kitazawa Y., Nijo T., Wei W., Kumita K., Miyazaki A., Namba S., Yamaji Y., 2020 Spatiotemporal dynamics and quantitative analysis of phytoplasmas in insect vectors. Sci. Rep., 10: 4291.
- Konnerth A., Krczal G., Boonrod K., 2016 *Immunodominant membrane proteins of phytoplasmas.* Microbiology, 162: 1267-1273.
- Lee I.-M., Gundersen-Rindal D.E., Davis R.E., Bottner K.D., Marcone C., Seemüller E., 2004 'Candidatus Phytoplasma asteris', a novel phytoplasma taxon associated with aster yellows and related diseases. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 54: 1037-1048.
- LIANG G.-F., LIANG Y., XUE Q., LU J.-F., CHENG J.-J., HUANG J., 2015 Astakine LvAST binds to the β subunit of F1-ATP synthase and likely plays a role in white shrimp Litopeneaus vannamei defense against white spot syndrome virus. Fish Shell. Immunol., 43: 75-81.
- LIANG Y., CHENG J.-J., YANG B., HUANG J., 2010 The role of F1 ATP synthase beta subunit in WSSV infection in the shrimp, Litopenaeus vannamei. Virol J., 7: 144.
- Login F.H., Balmand S., Vallier A., Vincent-Monegat C., Vigneron A., Weiss-Gayet M., Rochat D., Heddi A., 2011 Antimicrobial peptides keep insect endosymbionts under control. Science, 334: 362-365.
- MALEMBIC-MAHER S., DESQUE D., KHALIL D., SALAR P., BERGEY B., DANET J.-L., DURET S., DUBRANA-OURABAH M.-P., BEVEN L., EMBER I., ACS Z., DELLA BARTOLA M., MATERAZZI A., FILIPPIN L., KRNJAJIC S., KRSTIC O., TOSEVSKI I., LANG F., JARAUSCH B., KÖLBER M., JOVIC J., ANGELINI E., ARRICAU-BOUVERY N., MAIXNER M., FOISSAC X., 2020 When a palearctic bacterium meets a nearctic insect vector: genetic and ecological insights into the emergence of the grapevine Flavescence dorée epidemics in Europe. PLoS Pathog., 16: e1007967.

- MARCONE C., 2014 Molecular biology and pathogenicity of phytoplasmas. Ann. Appl. Biol., 165: 199-221.
- MIURA C., KOMATSU K., MAEJIMA K., NIJO T., KITAZAWA Y., TOMOMITSU T., YUSA A., HIMENO M., OSHIMA K., NAMBA S., 2015 Functional characterization of the principal sigma factor RpoD of phytoplasmas via an in vitro transcription assay. Sci. Rep., 5: 11893.
- MIYAZAKI A., SHIGAKI T., KOINUMA H., IWABUCHI N., RAUKA G.B., KEMBU A., SAUL J., WATANABE K., NIJO T., MAEJIMA K., YAMAJI Y., NAMBA S., 2018 'Candidatus Phytoplasma noviguineense', a novel taxon associated with Bogia coconut syndrome and banana wilt disease on the island of New Guinea. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 68: 170-175.
- MORTON A., DAVIES D.L., BLOMQUIST C.L., BARBARA D.J., 2003 Characterization of homologues of the apple proliferation immunodominant membrane protein gene from three related phytoplasmas. Mol. Plant Pathol., 4: 109-114.
- NERIYA Y., SUGAWARA K., MAEJIMA K., HASHIMOTO M., KOMATSU K., MINATO N., MIURA C., KAKIZAWA S., YAMAJI Y., OSHIMA K., NAMBA S., 2011- Cloning, expression analysis, and sequence diversity of genes encoding two different immunodominant membrane proteins in poinsettia branch-inducing phytoplasma (PoiBI). FEMS Microbiol. Lett., 324: 38-47.
- NIJO T., NERIYA Y., KOINUMA H., IWABUCHI N., KITAZAWA Y., TANNO K., OKANO Y., MAEJIMA K., YAMAJI Y., OSHIMA K., NAMBA S., 2017 Genome-wide analysis of the transcription start sites and promoter motifs of phytoplasmas. DNA and Cell Biology, 36: 1081-1092.
- OSHIMA K., ISHII Y., KAKIZAWA S., SUGAWARA K., NERIYA Y., HIMENO M., MINATO N., MIURA C., SHIRAISHI T., YAMAJI Y., NAMBA S., 2011 Dramatic transcriptional changes in an intracellular parasite enable host switching between plant and insect. PLoS ONE, 6: e23242.
- OSHIMA K., KAKIZAWA S., NISHIGAWA H., JUNG H.-Y., WEI W., SUZUKI S., ARASHIDA R., NAKATA D., MIYATA S., UGAKI M., NAMBA S., 2004 Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. Nat. Genet., 36: 27-29.
- OSHIMA K., SHIOMI T., KUBOYAMA T., SAWAYANAGI T., NISHIGAWA H., KAKIZAWA S., MIYATA S., UGAKI M., NAMBA S., 2001 Isolation and characterization of derivative lines of the onion yellows phytoplasma that do not cause stunting or phloem hyperplasia. Phytopathol., 91: 1024-1029.
- Palermo S., Arzone A., Bosco D., 2001 Vector-pathogen-host plant relationships of chrysanthemum yellows (CY) phytoplasma and the vector leafhoppers Macrosteles quadripunctulatus and Euscelidius variegatus. Ent. Exp. Appl., 99: 347-354.
- RASHIDI M., GALETTO L., BOSCO D., BULGARELLI A., VALLINO M., VERATTI F., MARZACHÌ C., 2015 Role of the major antigenic membrane protein in phytoplasma transmission by two insect vector species. BMC Microbiol., 15: 193.
- Renaudin J., Beven L., Batailler B., Duret S., Desque D., Arricau-Bouvery N., Malembic-Maher S., Foissac X., 2015 Heterologous expression and processing of the flavescence dorée phytoplasma variable membrane protein VmpA in Spiroplasma citri. BMC Microbiol., 15: 82.
- Rossi M., Samarzija I., Seruga-Music M., Galetto L., 2019 Diversity and functional importance of phytoplasma membrane proteins. In: Bertaccini, A., Oshima, K., Kube, M., Rao, G.P. (Eds.), Phytoplasmas:

- Plant Pathogenic Bacteria III. Springer Singapore, Singapore, 69-88.
- Saracco P., Bosco D., Veratti F., Marzachì C., 2006 Quantification over time of chrysanthemum yellows phytoplasma (16Sr-I) in leaves and roots of the host plant Chrysanthemum carinatum (Schousboe) following inoculation with its insect vector. Physiol. Molec. Plant Pathol., 67: 212-219.
- Shiomi T., Tanaka M., Wakiya H., Zenbayashi R., 1996 Occurrence of Welsh Onion Yellows. Jpn. J. Phytopathol., 62: 258-260.
- SIAMPOUR M., GALETTO L., BOSCO D., IZADPANAH K., MARZACHÌ C., 201 In vitro interactions between immunodominant membrane protein of lime witches' broom phytoplasma and leafhopper vector proteins. Bull. Insectol., 64: S149-S150.
- SIAMPOUR M., IZADPANAH K., GALETTO L., SALEHI M., MARZACHÌ C., 2013 - Molecular characterization, phylogenetic comparison and serological relationship of

- the Imp protein of several 'Candidatus Phytoplasma aurantifolia' strains: imp gene in 'Candidatus Phytoplasma aurantifolia'. Plant Pathol., 62: 452-459.
- Suzuki S., Oshima K., Kakizawa S., Arashida R., Jung H.-Y., Yamaji Y., Nishigawa H., Ugaki M., Namba S., 2006 Interaction between the membrane protein of a pathogen and insect microfilament complex determines insect-vector specificity. PNAS, 103: 4252-4257.
- TRIVELLONE V., RIPAMONTI M., ANGELINI E., FILIPPIN L., ROSSI M., MARZACHI' C., GALETTO L., 2019 Evidence suggesting interactions between immunodominant membrane protein Imp of Flavescence dorée phytoplasma and protein extracts from distantly related insect species. J. Appl. Microbiol., 127: 1801-1813.
- TRIVELLONE V., 2019 An online global database of Hemiptera -Phytoplasma-Plant biological interactions. Biodiv. Data J., 7: e32910.
- Weintraub P.G., Beanland L., 2006 *Insect vectors of phytoplasmas*. Ann. Rev. Entomol., 51: 91-111.

ECOLOGIA DELLA TRASMISSIONE DI BATTERI ('CA. LIBERIBACTER SPP.' E FITOPLASMI) DA PARTE DI EMITTERI PSILLOIDEI

ROSEMARIE TEDESCHI^a

^a Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari (DISAFA), Università degli Studi di Torino, Largo Paolo Braccini, 2 - 10095 Grugliasco

Email: rosemarie.tedeschi@unito.it

Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Insetti vettori di agenti fitopatogeni: meccanismi ed ecologia della trasmissione di virus e batteri". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 21 febbraio 2020.

Ecology of bacterial transmission ('Ca. Liberibacter spp.' and phytoplasmas) by psyllids

Psyllids (Hemiptera: Psylloidea) are phloem feeding insects known as vectors of several bacteria belonging to the Classes Mollicutes (fitoplasmi) and Alphaproteobacteria ('Ca. Liberibacter spp.') and causing serious crop diseases. These pathogens are transmitted in a persistent-propagative manner and this process is regulated by intricate interplays among the plant, the vector and the pathogen. Several factors regulate these interactions depicting very different epidemiological scenarios.

Among all, the range of the host plants on which the vector can develop, or only sporadically feed, is crucial, in particular when wild plants are involved due to the fact that they can act as inoculum source of both the vector and the pathogen.

Moreover, the dispersal behaviour of the vector on short or long distances, in turn regulated by several biotic and abiotic factors, has an important role in the spreading of the diseases.

Finally, the occurrence of different populations of the vector, of different strains/haplotypes of the pathogen, but also of different combinations of psyllid populations and pathogen strains/haplotypes determines variable transmission efficiency at both geographical and host plant scale.

The knowledge of all these variables has important implications for phytosanitary measures facilitating a timelier and targeted management, reducing the impact of bacterial diseases where they are already endemic and preventing their spread to new areas.

KEY WORDS: piante ospiti, dispersione, patogenicità, epidemiologia.

Introduzione

Le psille (Hemiptera; Psylloidea) sono insetti floemomizi noti per essere vettori di diversi batteri fitopatogeni appartenenti alle classi Mollicutes (fitoplasmi) e Alphaproteobacteria ('Ca. Liberibacter spp.') i quali causano gravi malattie alle piante coltivate (Tab. 1).

Per quanto riguarda le specie vettrici accertate di fitoplasmi, esse appartengono tutte al genere *Cacopsylla* (Fam. Psyllidae) e sono tipicamente infeudate a piante della famiglia Rosaceae alle quali trasmettono 3 fitoplasmi del gruppo 16SrX (Apple proliferation), ovvero '*Candidatus* Phytoplasma mali', '*Ca*. Phytoplasma pyri' e '*Ca*. Phytoplasma prunorum', che causano, rispettivamente, tre importanti malattie ai fruttiferi ovvero gli scopazzi del melo (Apple proliferation, AP), la moria del pero (Pear decline, PD) e i giallumi delle drupacee (European stone fruit yellows, ESFY).

'Ca. Phytoplasma mali' è trasmesso da *Cacopsylla melanoneura* (Förster) e *C. picta* (Löw) (TEDESCHI et al., 2003; TEDESCHI e ALMA 2004; JARAUSCH et al., 2007), *'Ca.* phytoplasma pyri' da *C. pyri* (L.) e *C. pyricola* (Förster) (DAVIES et al., 1992, CARRARO et al., 1998a) mentre *C. pruni* (Scopoli) è il vettore di *'Ca.* Phytoplasma prunorum' (CARRARO et al., 1998b,

2001, 2004; Thebaud *et al.*, 2009). Tutte queste specie sono di origine paleartica e la loro diffusione così come quella del fitoplasma che veicolano è ancora ristretta a tale area geografica, fatta eccezione per *C. pyricola*, e di conseguenza del fitoplasma della moria del pero che sono stati introdotti in Nord America all'inizio del 1800 (HORTON, 1999).

Il coinvolgimento di psille nella trasmissione di altri fitoplasmi non associati a fruttiferi non è da escludere, alla luce anche di recenti ricerche che hanno dimostrato evidenze in tal senso, anche se non ancora supportate da prove di trasmissione. È il caso, ad esempio, della specie *Livilla spectabilis* (Flor) (Fam. Psyllidae) che sembrerebbe fortemente implicata nella trasmissione di '*Ca.* Phytoplasma spartii' e di fitoplasmi 16RrV-C a *Spartium junceum* L. (RIZZA *et al.*, 2020).

Per quanto riguarda invece le specie vettrici di '*Ca*. Liberibacter spp.', lo scenario è più variegato (HAAPA-LAINEN, 2014).

La malattia degli agrumi Huanglongbing o Citrus greening è causata, a seconda delle aree geografiche, dalle tre diverse specie 'Ca. Liberibacter asiaticus', 'Ca. Liberibacter americanus' e 'Ca. Liberibacter africanus', trasmesse rispettivamente da Diaphorina citri Kuwayama (Fam. Lividae), le prime due, e Trioza

Tabella 1 – Fitoplasmi e 'Ca. Liberibacter spp.' trasmessi da psille, relativi vettori, piante ospiti e distribuzione geografica.

Patogeno Malattia		Vettore	Pianta ospite	Distribuzione	
Fitoplasmi					
'Ca. Phytoplasma mali'	Apple Proliferation (AP)	Cacopsylla picta C. melanoneura	Melo Melo, biancospino	Europa	
'Ca. Phytoplasma pyri'	Pear Decline (PD)	Cacopsylla pyri Cacopsylla pyricola	Pero Pero	Europa, Nord America	
'Ca. Phytoplasma prunorum'			Prunus spp.	Europa	
Liberibacter					
'Ca. Liberibacter asiaticus'	Huanglongbing o Citrus greening	Diaphorina citri	Rutaceae	Asia	
'Ca. Liberibacter africanus'	Huanglongbing o Citrus greening	Trioza erytreae	Rutaceae	Africa	
'Ca. Liberibacter americanus'	Huanglongbing o Citrus greening	Diaphorina citri	Rutaceae	Nord e Sud America	
<i>'Ca.</i> Liberibacter solanacearum'.					
AplotipoA Zebra chip		Bactericera cockerelli	Solanaceae	Nord e Centro America, Nuova Zelanda	
Aplotipo B	Aplotipo B Zebra chip		Solanaceae	Nord e Centro America	
Aplotipo C		Trioza apicalis	Apiaceae (carota)	Europa settentrionale	
Aplotipo D ed E		Bactericera trigonica	Apiaceae (carota)	Spagna, Francia, Marocco, Israele	
'Ca. Liberibacter europaeus'		Cacopsylla pyri Arytainilla spartiophila	Rosaceae Cytisus scoparius	Europa Nuova Zelanda, Regno Unito	

erytreae Del Guercio (Fam. Triozidae) la terza (Сароок *et al.*, 1967; YAMAMOTO *et al.*, 2006; VAN DEN BERG *et al.*, 1992).

'Ca. Liberibacter solanacearum è invece trasmesso da Bactericera cockerelli (Šulc) a colture appartenenti alla famiglia Solanaceae quali patata, pomodoro, peperone e tabacco (Munyaneza et al., 2007) e da Trioza apicalis Förster (Munyaneza et al., 2010, 2015), Bactericera trigonica Hodkinson (Alfaro-Fernández et al., 2012; Teresani et al., 2015) e presumibilmente Bactericera nigricornis (Förster) a piante della famiglia Apiaceae quali carota e sedano (Ben Othmen et al., 2019; Teresani et al., 2015). Tutte queste ultime psille appartengono alla Famiglia Triozidae.

Infine 'Ca. Liberibacter europaeus', segnalato per la prima volta in Italia come endofita di diverse specie di Rosaceae e trasmesso da C. pyri (RADDADI et al., 2009; CAMEROTA et al. 2012), è stato successivamente segnalato in Nuova Zelanda e nel Regno Unito come patogeno della ginestra dei carbonai Cytisus scoparius L. & Link e associato alla psilla Arytainilla spartiophila (Förster) (Fam. Psyllidae) (THOMPSON et al., 2013; TENNIÈRES et al., 2020).

Sono state inoltre segnalate infezioni miste di fitoplasmi e '*Ca*. Liberibacter solanacearum' come nel caso di individui di *B. cockerelli* infette anche da fitoplasmi dei sottogruppi 16SrVI-A e 16SrI-A (SWISHER *et al.*, 2018) che richiederebbero ulteriori approfon-

dimenti per le ovvie implicazioni dal punto di vista epidemiologico.

La trasmissione di questi batteri, che è di tipo persistente-propagativo, è regolata da complesse interazioni tra vettore, patogeno e pianta, nonché da fattori ambientali e azioni antropiche. La conoscenza degli aspetti ecologici che intervengono nei vari patosistemi è di fondamentale importanza per poter limitare l'impatto delle relative malattie, dove queste sono già presenti, ed evitare il rischio della loro diffusione in altri areali al momento ancora indenni.

PIANTE OSPITI

Uno degli aspetti chiave del triangolo psilla-patogeno-pianta è dato dalle possibili associazioni insetto vettore-pianta che portano a diversi scenari epidemiolgici. In generale le psille sono insetti floemomizi altamente specializzati, ovvero il numero di piante ospiti (= piante sulle quali si completa lo sviluppo degli stadi giovanili fino allo sfarfallamento) è ristretto a una o poche specie affini, anche se esistono alcune eccezioni (HODKINSON, 2009; BURCKHARDT *et al.*, 2014).

Nel caso delle psille vettrici di fitoplasmi, vi sono sia specie prettamente monofaghe, come *C. pyri* e *C. pyricola* che vivono quasi esclusivamente su pero, dove svolgono 4-5 generazioni all'anno, sia specie oligofaghe tipicamente monovoltine. Tra queste, *C.*

pruni ha come piante ospiti diverse specie del genere *Prunus*, ed è in grado di trasmettere il fitoplasma 'Ca. Phytoplasma prunorum' sia a specie coltivate (es. albicocco, pesco e susino), sia a specie spontanee (es. *P. spinosa e P. cerasifera*), sulle quali, tra l'altro, vengono anche osservate maggiori densità del vettore. Le piante di *Prunus* spp. spontanee rappresentano dunque una forte criticità dal punto di vista epidemiologico in quanto fungono da serbatoio sia per il vettore che per il patogeno risultando tra l'altro quasi sempre asintomatiche (Burckhardt, 1994; Carraro *et al.*, 2002; Sabaté *et al.*, 2016)

Analogamente *C. melanoneura*, vettore di '*Ca.* Phytoplasma mali' si nutre e si sviluppa sia su melo che su biancospino che a sua volta può fungere da serbatoio sia del vettore che del patogeno (TEDESCHI *et al.*, 2009), anche se si ipotizza l'esistenza di popolazioni distinte in funzioni della pianta ospite (MALAGNINI *et al.*, 2013)

Il ciclo biologico di C. pruni, C. melanoneura e C. picta prevede anche, a fine primavera, la migrazione su conifere per l'estivazione e lo svernamento (CERMÁK e Lauterer, 2008; Tedeschi et al., 2002; Thébaud et al., 2009; Pizzinat et al., 2011; Jarausch et al., 2019) per poi tornare sulle loro piante ospiti a fine inverno. Le conifere fungono quindi da piante rifugio in particolari momenti dell'anno in cui le condizioni sulle piante ospiti non sono più ottimali. È stata dimostrata un'attività trofica delle psille sulle conifere, mentre gli accoppiamenti avvengono solo dopo il ritorno sulle piante ospiti a fine inverno, probabilmente perché le piante rifugio non rappresentano un substrato idoneo per lo sviluppo degli stadi giovanili (Pizzinat et al., 2011; GALLIGER e GROSS, 2018). La differente composizione chimica della linfa delle piante ospiti e delle conifere avrebbe un ruolo importante nel regolare questi eventi. La gran parte delle piante appartenenti alla famiglia delle Rosacee sono ricche di sorbitolo, che invece risulta assente nelle conifere; per contro, le conifere contengono elevate quantità di acido quinico e pinitolo, assenti nelle Rosacee (GALLIGER e Gross, 2018). Mentre il pinitolo potrebbe avere un ruolo importante nella protezione degli adulti contro il congelamento (BALE, 2002), l'assenza di sorbitolo o la diversa composizione di acidi organici potrebbero impedire lo sviluppo di neanidi e ninfe sulle conifere (GALLIGER e GROSS, 2018).

Analogamente, la linfa elaborata delle conifere non sembrerebbe un ambiente idoneo per 'Ca. Phytoplasma prunorum' e 'Ca. Phytoplasma mali'. Infatti, nonostante l'evidenza di un'attività trofica sulle conifere e del permanere nei rispettivi vettori della carica fitoplasmatica, che anzi aumenta durante l'estivazione e lo svernamento (Thébaud et al., 2009; Candian et al., 2020; Oppedisano et al., 2020), le conifere non sembrerebbero avere alcun ruolo come sorgente d'inoculo per questi fitoplasmi.

Anche nel caso delle psille vettrici di 'Ca. Liberibacter spp.' le diverse associazioni vettore-pianta ospite delineano diversi scenari epidemiologici. Per esempio, per quanto riguarda i vettori di 'Ca. Liberibacter solanacearum', B. trigonica, B. nigricornis e T. apicalis hanno come pianta ospite sia specie coltivate, come la carota e il sedano, che specie spontanee sempre appartenenti alla famiglia delle Apiacee e migrano allo stadio di adulto neosfarfallato su conifere per l'estivazione e lo svernamento. (Kristoffersen e Anderbrant, 2005, 2007; HODKINSON 2009), al contrario B. cockerelli è più strettamente infeudata alle solanacee, nutrendosi a spese di numerose specie coltivate e spontanee (MUNYANEZA, 2016), anche se è in grado di riprodursi e svilupparsi anche su alcune convolvulacee come Ipomaes batatas L. e Convolvulus arvensis L..

Eventuali preoccupazioni legate a possibili trasmissioni crociate dovute alla frequente vicinanza dei campi di patate e di carote e ad occasionale attività trofica al di fuori del *range* delle rispettive piante ospiti sono state di fatto smentite. Infatti, grazie anche a studi fatti con elettropenetrografo (EPG), è stato dimostrato come *B. cockerelli* faccia difficoltà a raggiungere il floema delle piante di carota e, analogamente, come *B. trigonica* non presenti né emissione di saliva, né ingestione di floema se posta a nutrirsi su piante di patata (MUNYANEZA *et al.*, 2016; ANTOLINEZ *et al.*, 2017).

Diaphorina citri è sempre stata considerata una specie oligofaga su numerose piante della famiglia Rutacee ed in particolare su quelle appartenenti alla sottofamiglia Aurantioideae, ma più recentemente è stata dimostrata un'attività trofica su ospiti alternativi quali *Ficus carica* L. e *Celtis* spp. ma anche su piante erbacee come *Bidens alba* (L.) ed *Eupatorium capillifolium* (Lam.) Small comunemente presenti negli agrumeti (JOHNSTON *et al.*, 2019).

In generale, anche se alcuni di questi ospiti alternativi non sono idonei per la riproduzione, possono fungere da substrato di nutrizione per gli adulti, prolungando la loro sopravvivenza in assenza degli ospiti per la riproduzione con ovvie ripercussioni dal punto di vista epidemiologico (STELINSKY, 2019; COOPER *et al.*, 2019). In particolare le specie perenni rappresentano una seria minaccia come serbatoio precoce di *B. cockerelli*, perché sono presenti in primavera, prima dell'emergenza della patata e di altre solanacee annuali e in autunno dopo la raccolta delle patate (HORTON *et al.*, 2015)

DISPERSIONE

Un altro fattore cruciale nella trasmissione dei batteri da parte delle psille è la dispersione dei vettori che può avvenire in misura e modalità variabili in funzione delle diverse specie.

Alcune psille, come già visto, presentano, intrinseche nel loro ciclo biologico, delle migrazioni stagionali che hanno lo scopo di raggiungere fonti di cibo più favorevoli o piante rifugio per il superamento di periodi particolari, quali l'estivazione o lo svernamento. La ricerca di conifere per l'estivazione e lo svernamento porta a compiere distanze anche notevoli e a raggiungere quote altitudinali elevate (1300 – 1600 m s.l.m), ben diverse rispetto a quelle delle piante ospiti (CARRARO et al., 2001, 2004; THÉBAUD et al., 2009). Questi spostamenti sono favoriti dalle correnti calde ascensionali che permettono di raggiungere le piante rifugio site in altura, mentre il ritorno sulle piante ospiti, a conclusione del periodo invernale, è favorito dalle correnti fredde discendenti (CERMÁK e LAUTERER, 2008; PIZZINAT *et al.*, 2011).

In altri casi la dispersione è legata a una continua ricerca di cibo favorevole, come avviene nel caso di *D. citri* che si sposta frequentemente tra diverse piante del genere *Citrus* alla continua ricerca di giovani germogli ricchi di linfa necessari anche per l'ovideposizione. Durante i mesi più caldi *D. citri* può percorrere almeno 300 m nell'arco di 4 giorni dalle file più interne dei frutteti abbandonati alle file più interne degli agrumeti in coltivazione (LEWIS-ROSENBLUM *et al.*, 2015). In assenza di vento la specie può percorrere fino a 2,4 km in assenza di vento, ma tali distanze possono incrementare parecchio in presenza di vento favorevole, con percorrenza di distanze maggiori su terreni incolti (LEWIS-ROSENBLUM *et al.*, 2015; BOINA *et al.*, 2009).

Diversi fattori biotici influenzano questi spostamenti.

Per alcune psille, come *D. citri*, è stata osservata un'attrazione nei confronti di alcune lunghezze d'onda particolari come l'ultravioletto (390 nm), il verde (525 nm) e il giallo (590 nm) che si traduce in una maggiore attività durante il primo e il tardo pomeriggio (Paris *et al.*, 2015). Inoltre, sempre per questa specie, gli spostamenti sono anche regolati da riferimenti meccanici (come le comunicazioni vibrazionali tra maschi e femmine) che regolano gli spostamenti su brevi distanze (Wenninger *et al.*, 2009).

Maggiormente studiati risultano i riferimenti olfattivi che derivano sia da volatili emessi dalle piante che da volatili emessi da individui conspecifici.

Per quanto riguarda l'influenza delle sostanze volatili emesse dalle piante, nel caso di C. picta è stato dimostrato che gli individui della nuova generazione, sia maschi che femmine, sono particolarmente attratti dal β -carioffilene, sostanza prodotta prevalentemente dalle piante infette da 'Ca. Phytoplasma mali', come strategia per incrementare le probabilità di acquisizione del fitoplasma e quindi di diffusione dello stesso, mentre le femmine reimmigranti, ossia quelle che tornano su melo a fine inverno, prediligono le piante sane come substrato per l'ovideposizione, perché

queste garantiscono un miglior sviluppo degli stadi giovanili (Mayer *et al.*, 2011).

Anche *D. citri* è attratta da diverse sostanze volatili emesse dagli agrumi (STELINSKI, 2015). Di particolare interesse è l'attrattività esercitata nei confronti delle femmine da parte dell'acido metil salicilico che viene emesso dalle piante danneggiate dall'attività trofica di altri individui conspecifici (MANN *et al.*, 2012). Si ipotizza che il beneficio ecologico derivante dall'attrazione verso tali piante possa essere legato alla necessità di accoppiamenti multipli per mantenere una fertilità e una fecondità ottimale (WENNINGER e Hall, 2008).

La dispersione può essere però anche influenzata da sostanze volatili emesse da individui conspecifici, come osservato, sempre in *D. citri*, le cui femmine sono in grado di percepire e quindi evitare foglie o germogli precedentemente infestati da altre femmine della stessa specie, attuando una sorta di strategia per evitare il sovraffollamento (MARTINI *et al.*, 2014).

L'ecologia della trasmissione di fitopatogeni da parte dei vettori può infine essere influenzata da fenomeni di dispersione legati ad azioni antropiche. Un esempio molto significativo è dato dalla psilla della ginestra A. spartiofila, che era stata introdotta in Nuova Zelanda nel 1993 come agente di biocontrollo della ginestra dei carbonai (C. scoparius), specie invasiva originaria dell'Europa occidentale. Alla fine del 2011 però vennero osservati, sulle piante di C. scoparius fortemente infestate dalla psilla, anche sintomi quali crescita stentata dei germogli, internodi raccorciati, foglie piccole e punte delle foglie ingiallite che vennero associati alla presenza del batterio 'Ca. Liberibacter europaeus'., rilevato sia nelle piante sintomatiche sia nelle psille (THOMPSON et al., 2013). L'introduzione, quindi, di A. spartiofila in Nuova Zelanda ha dato origine a una nuova associazione, sconosciuta prima del 1993, tra il batterio e la psilla, e a un nuovo patosistema, in quanto 'Ca. Liberibacter europaeus' in Europa veniva considerato più come un endofita che come un patogeno (RADDADI et al., 2009).

Infine, la dispersione può anche essere fortemente influenzata da fattori abiotici quali la temperatura, la pressione barometrica e il vento. Temperature più elevate tendono a favorire maggiori movimenti degli insetti e quindi maggiori spostamenti delle psille, mentre cali di pressione atmosferica di solito ne rallentano i movimenti (MARTINI e STELINKY, 2017).

EFFICIENZA DI TRASMISSIONE E PATOGENICITÀ

L'epidemiologia delle malattie causate dai batteri trasmessi dalle psille è strettamente legata all'efficienza di trasmissione che le diverse specie o i diversi stadi di sviluppo possono avere. Solitamente neanidi e ninfe sono considerati gli stadi cruciali per l'acquisizione sia dei fitoplasmi sia delle diverse specie di Liberibacter; al contrario gli adulti sono i maggiori responsabili della trasmissione vera e propria, avendo completato appieno il periodo di latenza, e della diffusione delle malattie, grazie anche alla loro maggiore dispersione.

Nella realtà però le interazioni vettore-piantapatogeno che regolano l'efficienza di trasmissione sono ben più complesse. Ci possono essere, infatti, notevoli differenze sia su base geografica che in funzione delle piante ospiti. Numerose ricerche hanno messo in luce la possibile esistenza di più popolazioni di una stessa specie di vettore o di vari ceppi/aplotipi del patogeno, o ancora differenti combinazioni tra popolazioni di vettori e ceppi/aplotipi del patogeno che si traducono in diverse efficienze di trasmissione.

Per esempio, C. melanoneura è considerata l'unica psilla vettrice di 'Ca. Phytoplasma mali' presente nell'Italia nord-occidentale e in Norvegia (TEDESCHI et al., 2002; Brede, 2017). In queste aree, dove l'insetto è equamente presente sulle due piante ospiti riconosciute, ovvero melo e biancospino, C. melanoneura è un vettore efficiente. Al contrario, nell'Italia nord orientale e in Germania, dove è generalmente presente simpatricamente con la congenere C. picta, C. melanoneura vive prevalentemente su biancospino e, soprattutto, risulta un vettore poco o per niente efficiente (JARAUSCH et al., 2003, 2004, 2007, 2019; MAYER et al., 2009). C'è però da dire che, sia in Norvegia che nell'Italia nord occidentale, vi è una predominanza del ceppo AT-1 del fitoplasma, mentre nell'Italia nord-orientale e in Germania predominano i ceppi AT-2 e AP (CAINELLI et al., 2004; Jarausch et al., 2000, 2004; Martini et al., 2008; CASATI et al., 2010; BARIC et al., 2011). Si presume dunque che queste differenze possano essere dovute a diverse "razze" del vettore o più probabilmente a diverse combinazioni vettore-ceppo del fitoplasma (JARAUSCH et al., 2019).

Nel caso invece del patosistema A. spartiofila – 'Ca. Libebacter europaeus' - C. scoparius presente in Nuova Zelanda, nel 2014 è stato descritto, per il batterio, un aplotipo (Aplotipo B) che si differenzia da quello presente in Europa (Aplotipo A) su pero e C. pyri, non solo su base geografica e in funzione delle piante/psille ospiti, ma anche su base genetica (Nelson et al., 2015). Recentemente però 'Ca. Liberibacter europaeus' è stato segnalato in A. spartiophila e C. scoparius nel Regno Unito, paese di origine delle psille introdotte in Nuova Zelanda come agente di biocontrollo della ginestra dei carbonai. La similarità delle sequenze nucleotidiche del batterio del Regno Unito con quelle della Nuova Zelanda conferma la teoria di una introduzione accidentale di 'Ca. Liberibacter europaeus' in Nuova Zelanda in occasione dell'introduzione programmata di *A. spartiophila* (Tannières *et al.*, 2020).

Più articolata invece è la situazione relativa 'Ca. Liberibacter solanacearum' per il quale sono stati descritti diversi aplotipi con diverse distribuzioni geografiche e diverse piante ospiti che rispecchiano la distribuzione e le specializzazioni trofiche dei rispettivi vettori. B. cockerelli è stata riconosciuta come vettore dell'aplotipo A in America e Nuova Zelanda e dell'aplotipo B in America a solanacee (WEN et al., 2009). T. apicalis è invece risultata essere vettrice dell'aplotipo C ad Apiacee in Nord Europa (MUNYANEZA et al., 2010), mentre B. trigonica trasmette l'aplotipo D a carota (Nelson et al., 2013) e l'aplotipo E a carota e sedano nell'Europa meridionale e nel sud del Mediterraneo (TERESANI et al., 2014). Infine T. urticae è stata recentemente descritta come possibile vettore dell'aplotipo U a Urtica dioica L. in Finlandia (HAAPALAINEN, 2017). Queste diverse combinazioni tra patogeno, vettore e pianta ospite permettono di identificare dei patosistemi ben definiti e separati, ma la possibilità di punture di suzione, anche occasionali, su piante ospiti alternative potrebbero diffondere il patogeno o alcuni aplotipi a nuove colture con gravi ripercussioni dal punto di vista fitosanitario.

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Considerata la capacità delle psille di trasmettere numerosi batteri di interesse economico per molte colture, la comprensione delle interazioni che regolano questi fenomeni è di importanza fondamentale per una corretta ed efficace gestione delle malattie connesse. Il ciclo biologico a volte complesso di alcune specie e l'ampio *host range* di altre non sempre rendono facile lo studio dettagliato dei vari patosistemi. Una delle maggiori criticità è forse data dalle piante spontanee, ospiti sia del patogeno che del vettore, che possono fungere da sorgente d'inoculo.

Questi ospiti, spesso presenti nei bordi degli appezzamenti o tra le file delle colture, richiedono una particolare attenzione per il forte impatto che possono avere dal punto di vista epidemiologico anche su base stagionale.

RIASSUNTO

Le psille (Hemiptera: Psylloidea) sono insetti floemomizi noti come vettori di diversi batteri fitopatogeni della Classe Mollicutes (fitoplasmi) e Alphaproteobacteria ('Ca. Liberibacter spp.') che causano gravi malattie alle colture. La trasmissione è di tipo persistente propagativo ed è regolata da complesse interazioni che intercorrono tra pianta, vettore e patogeno. Numerosi fattori regolano queste interazioni andando a delineare diversi scenari riguardo l'epidemiologia delle relative fitopatie.

Tra tutti, il *range* delle piante ospiti, sulle quali il vettore si sviluppa o può anche solo nutrirsi sporadicamente, è un fattore cruciale, soprattutto quando sono coinvolte anche piante spontanee che fungono da serbatoio non solo per il vettore, ma anche per il patogeno.

La dispersione del vettore, su distanze più o meno ampie, ha un ruolo fondamentale nella diffusione delle malattie ed è a sua volta regolata da diversi fattori biotici e abiotici.

Infine la presenza di più popolazioni del medesimo vettore o di più ceppi/aplotipi del patogeno, o ancora, di diverse combinazioni tra ceppi/aplotipi del patogeno e popolazioni del vettore determinano efficienze di trasmissione variabili anche su base geografica.

La conoscenza di tutte queste variabili ha importanti implicazioni per quanto riguarda la gestione fitosanitaria perché permette di intervenite in modo più mirato e tempestivo riducendo l'impatto delle malattie causate da fitoplasmi e 'Ca. Liberibacter spp.' dove queste sono già presenti e ridurre il rischio della loro diffusione in altri areali al momento ancora indenni.

BIBLIOGRAFIA

- ALFARO-FERNÁNDEZ A., SIVERIO F., CEBRIÁN M.C., VILLAESCUSA F.J., FONT M.I., 2012 'Candidatus *Liberibacter solanacearum'* associated with Bactericera trigonica-affected carrots in the Canary Islands. Plant Dis., 96: 581.
- Antolinez C.A., Fereres A., Moreno A., 2017 Risk assessment of 'Candidatus Liberibacter solanacearum'transmission by the psyllids Bactericera trigonica and B. tremblayi from Apiaceae crops to potato. Scientific Reports, 7: 45534.
- Bale J.S., 2002 Insects and low temperatures: from molecular biology to distributions and abundance. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B, 357: 849-862.
- Baric S., Berger J., Cainelli C., Kerschbamer C., Dalla Via J., 2011 *Molecular typing of 'Candidatus Phytoplasma mali 'and epidemic history tracing by a combined T-RFLP/VNTR analysis approach.* Eur. J. Plant Pathol., 131(4): 573.
- BEN OTHMEN S., ABBES K., EL IMEM M., OUVRARD D., RAPISARDA C., CHERMITI B., 2019 Bactericera trigonica and B. nigricomis (Hemiptera: Psylloidea) in Tunisia as potential vectors of 'Candidatus Liberibacter solanacearum' on Apiaceae. Oriental Insects, 53(4): 497-509.
- Boina D.R., Meyer W.L., Onagbola E.O., Stelinski L.L., 2009 *Quantifying dispersal of* Diaphorina citri (*Hemiptera: Psyllidae*) by immunomarking and potential impact of unmanaged orchards on commercial citrus management. Environ. Entomol., 38: 1250-1258.
- Brede Å.V., 2017 Phenology and Spatial Dynamics of Cacopsylla melanoneura (Homoptera: Psyllidae) in Western Norway, an Insect Vector for Apple Proliferation. Master's thesis, The University of Bergen. http://hdl.handle.net/1956/16036
- BURCKHARDT D., 1994 Psylloid pests of temperate and sub-

- tropical crop and ornamental plants (Hemiptera, Psylloidea): a review. Trends in Agril. Sci., Entomol., 2: 173-186.
- Burckhardt D., Ouvrard D., Queiroz D., Percy D., 2014 Psyllid host-plants (Hemiptera: Psylloidea): resolving a semantic problem. Fla. Entomol., 97(1): 242-246.
- Cainelli C., Bisognin C., Vindimian M.E., Grando M.S., 2004 Genetic variability of AP phytoplasmas detected in the apple growing area of Trentino (North Italy). Acta Hort., 657: 425-430.
- CAMEROTA C., RADDADI N., PIZZINAT A., GONELLA E., CROTTI E., TEDESCHI R., MOZES-DAUBE N., EMBER I., ACS Z., KOLBERM., ZCHORI-FEIN E., DAFFONCHIO D., ALMAA., 2012 Incidence of 'Candidatus Liberibacter europaeus' and phyto-plasmas in Cacopsylla species (Hemiptera: Psyllidae) andtheir host/shelter plants. Phytoparasitica, 40: 213-221.
- CANDIAN V., MONTI M., TEDESCHI R., 2020 *Temporal Dynamics of 'Ca. Phytoplasma mali 'Load in the Insect Vector Cacopsylla melanoneura. Insects*, 11(9): 592.
- CAPOOR S.P., RAO D.B., VISWANATH S.M., 1967 Diaphorina citri, *a vector of the greening disease of citrus in India.* Indian J. Agric. Sci., 37: 572-576.
- Carraro L., Ferrini F., Ermacora P., Loi N., 2002 Role of wild Prunus species in the epidemiology of European stone fruit yellows. Plant Pathol., 51: 513-517.
- Carraro L., Ferrini F., Labonne G., Ermacora P., Loi N., 2004 Seasonal infectivity of Cacopsylla pruni, the vector of European stone fruit yellows phytoplasma. Ann. Appl. Biol., 144: 191-195.
- CARRARO L., LOI N., ERMACORA P., 2001 Transmission characteristics of the European stone fruit yellows phytoplasma and its vector Cacopsylla pruni. Eur. J. Plant Pathol., 107: 695-700.
- CARRARO L., LOI N., ERMACORA P., GREGORIS A., OSLER R., 1998a *Transmission of pear decline by using naturally infected* Cacopsylla pyri *L.* In: A. Hadidi (ed.), 17th International Symposium on Virus and Virus-Like Diseases of Temperate Fruit Crops: Fruit Tree Diseases, Vols 1 and 2; pp. 665-668.
- CARRARO L., OSLER R., LOI N., ERMACORA P., REFATTI E., 1998b
 Transmission of European stone fruit yellows phytoplasma by Cacopsylla pruni. - J. Plant Pathol., 80: 233-239.
- CASATI P., QUAGLINO F., TEDESCHI R., SPIGA F.M., ALMA A., SPADONE P., BIANCO P.A., 2010 *Identification and Molecular Characterization of 'Candidatus Phytoplasma mali'Isolates in North western Italy.* J. Phytopathol., 158(2): 81-87.
- ČERMÁK V., LAUTERER P., 2008. Overwintering of psyllids in South Moravia (Czech Republic) with respect to the vectors of the apple proliferation cluster phytoplasmas. Bull. Insectology, 61(1): 147-148.
- COOPER W.R., HORTON D.R., MILICZKY E., WOHLEB C.H., WATERS T.D., 2019 The weed link in zebra chip epidemiology: Suitability of non-crop Solanaceae and Convolvulaceae to potato psyllid and "Candidatus Liberibacter solanacearum".— Am. J. Potato Res., 96(3): 262-271.
- Davies D.L., Guise C.M., Clark M.F., Adams A.N., 1992 Parrys disease of pears is similar to pear decline and is associated with mycoplasma-like organisms transmitted by Cacopsylla pyricola. - Plant Pathol., 41: 195-203.
- Gallinger J., Gross J., 2018 Unraveling the host plant alternation of Cacopsylla pruni—adults but not nymphs can survive on conifers due to phloem/xylem composition. Front. Plant Sci., 9: 484.
- Haapalainen M, 2014 Biology and epidemics of Candidatus Liberibacter species, psyllid-transmitted plant-pathogenic bacteria. Ann. Appl. Biol., 165: 172-198.
- Haapalainen M., Wang J., Latvala S., Lehtonen M.T., Pirhonen M., Nissinen A.I., 2018 - *Genetic variation of* 'Candidatus *Liberibacter solanacearum' haplotype C and*

- characterization of a novel haplotype from Trioza urticae and stinging nettle. Phytopathology, 108(8): 925-934.
- HODKINSON I.D., 2009 Life cycle variation and adaptation in jumping plant lice (Insecta: Hemiptera: Psylloidea): a global synthesis. J. Nat. Hist., 43: 65-179.
- HORTON D.R., 1999 Monitoring of pear psylla for pest management decisions and research. Integrated Pest Manage. Rev., 4: 1-20.
- HORTON D.R., COOPER W.R., MUNYANEZA J.E., SWISHER K.D., ECHEGARAY E.R., MURPHY A.F., RONDON S.I., WOHLEB C.H., WATERS T.D., JENSEN A.S., 2015 *A new problem and old questions: potato psyllid in the Pacific Northwest.* Am. Entomol., 61(4): 234-244.
- Jarausch W., Saillard C., Helliot B., Garnier M., Dosba F., 2000 Genetic variability of apple proliferation phytoplasmas as determined by PCR-RFLP and sequencing of a non-ribosomal fragment. Mol. Cell. Probes, 14(1): 17-24.
- JARAUSCH B., FUCHS A., SCHWIND N., KRCZAL G., JARAUSCH W., 2007 Cacopsylla picta as most important vector for "Candidatus Phytoplasma mali" in Germany and neighbouring regions. Bull. Insectology, 60(2): 189-190.
- JARAUSCH B., SCHWIND N., JARAUSCH W., KRCZAL G., 2004 -Overwintering adults and springtime generation of Cacopsylla picta (synonym C. costalis) can transmit apple proliferation phytoplasmas. - Acta Hortic., 657: 409-413.
- JARAUSCH B., SCHWIND N., JARAUSCH W., KRCZAL G., SEEMÜLLER E., DICKLER E., 2007 - First report of Cacopsylla picta as a vector for apple proliferation phytoplasma in Germany. - Plant Dis., 87: 101.
- JARAUSCH B., TEDESCHI R., SAUVION N., GROSS J., JARAUSCH W., 2019 *Psyllid vectors*. In: Phytoplasmas: plant pathogenic Bacteria-II (pp. 53-78). Springer, Singapore.
- JOHNSTON N., STANSLY P.A., STELINSKI L.L., 2019 Secondary hosts of the Asian citrus psyllid, Diaphorina citri Kuwayama: survivorship and preference. - J. Appl. Entomol., 143(9): 921-928.
- Kristoffersen L., Anderbrant O., 2005 Winter host ecology of the carrot psyllid (Trioza apicalis). Comptes Redus de la Réunion, 28(4): 129-132.
- Kristoffersen L., Anderbrant O., 2007 Carrot psyllid (Trioza apicalis) winter habitats—insights in shelter plant preference and migratory capacity. J. Appl. Entomol., 131(3): 174-178.
- Lewis-Rosenblum H., Martini X., Tiwari S., Stelinski L.L., 2015 Seasonal movement patterns and long-range dispersal of Asian citrus psyllid in Florida citrus. J. Econ. Entomol., 208: 3-10.
- MALAGNINI V., PEDRAZZOLI F., PAPETTI C., CAINELLI C., ZASSO R., GUALANDRI V., POZZEBON A., IORIATTI C., 2013 Ecological and genetic differences between Cacopsylla melanoneura (Hemiptera, Psyllidae) populations reveal species host plant preference. PloS ONE, 8(7): e69663.
- MANN R.S., ALI J.G., HERMANN S.L., TIWARI S., PELZ-STELINSKI K.S., ALBORN H.T., STELINSKI L.L., 2012 Induced release of a plant-defense volatile 'deceptively' attracts insect vectors to plants infected with a bacterial pathogen. PLoS Pathog., 8: e1002610.
- Martini M., Ermacora P., Falginella L., Loi N., Carraro L., 2008 Molecular differentiation of 'Candidatus Phytoplasma mali' and its spreading in Friuli Venezia Giulia Region (North-East Italy). Acta Horticulturae, 781: 395-402.
- Martini X., Hoyte A., Stelinski L.L., 2014 *Abdominal color of the Asian citrus psyllid (Hemiptera: Leviidae) is associated with flight capabilities.* Ann. Entomol. Soc. Am., 107: 842-847.
- MARTINI X., KUHNS E.H., HOYTE A., STELINSKI L.L., 2014 -

- Plant volatiles and density-dependent conspecific female odors are used by Asian citrus psyllid to evaluate host suitability on a spatial scale. Arthropod-Plant Interact., 8(5): 453-460.
- MARTINI X., STELINSKI L.L., 2017 Influence of abiotic factors on flight initiation by Asian citrus psyllid (Hemiptera: Liviidae). Environ. Entomol., 46: 369-375.
- MAYER C.J., JARAUSCH B., JARAUSCH W., JELKMANN W., VILCINSKAS A., GROSS J., 2009 Cacopsylla melanoneura has no relevance as vector of apple proliferation in Germany. Phytopathology, 99(6):729-738.
- MAYER C.J., VILCINSKAS A., GROSS J., 2011 Chemically mediated multitrophic interactions in a plant-insect vector phytoplasma system compared with a partially nonvector species. Agric. Forest Entomol., 13(1): 25-35.
- Munyaneza J.E., Crosslin J.M., Upton J.E., 2007 Association of Bactericera cockerelli (Homoptera: Psyllidae) with "zebrachip", a new potato disease in southwestern United States and Mexico. J. Econ. Entomol., 100: 656-663.
- Munyaneza J.E., Fisher T., Sengoda V.G., Garczynski S., Nissi-Nen A., Lemmetty A., 2010 *Association of* "Candidatus *Liberibacter solanacearum*" with the *Psyllid*, Trioza apicalis (*Hemiptera: Triozidae*) in *Europe*. J. Econ. Entomol., 103: 1060-1070.
- Munyaneza J.E., Mustafa T., Fisher T.W., Sengoda V.G., Horton D.R., 2016 Assessing the Likelihood of Transmission of Candidatus Liberibacter solanacearum to Carrot by Potato Psyllid, Bactericera cockerelli (Hemiptera: Triozidae). PLoS ONE 11(8): e0161016.
- Munyaneza J.E., Swisher K.D., Hommes M., Willhauck A., Buck H., Meadow R., 2015 First report of 'Candidatus Liberibacter solanacearum' associated with psyllid-infested carrots in Germany. Plant Dis., 99(9): 1269.
- Nelson W.R., 2015 Haplotypes of "Candidatus Liberibacter europaeus" also separate by geography and host species. PeerJ PrePrints 3: e649v2
- Nelson W.R., Sengoda V.G., Alfaro-Fernandez A.O., Font M.I., Crosslin J.M., Munyaneza J.E., 2013 *A new haplotype of "Candidatus Liberibacter solanacearum" identified in the Mediterranean region.* Eur. J. Plant Pathol., 135(4): 633-639.
- Oppedisano T., Panassiti B., Pedrazzoli F., Mittelberger C., Bianchedi P.L., Angeli G., De Cristofaro A., Janik K., Anfora G., Ioriatti C., 2020 Importance of psyllids' life stage in the epidemiology of apple proliferation phytoplasma. J. Pest Sci., 93(1): 49-61.
- PIZZINAT A., TEDESCHI R., ALMA A., 2011 Cacopsylla melanoneura (Foerster): aestivation and overwintering habitats in Northwest Italy. Bull. Insectology, 64 (Supplement): S135-S136.
- RADDADI N., GONELLA E., CAMEROTA C., PIZZINAT A., TEDESCHI R., CROTTI E., MANDRIOLI M., BIANCO P.A., DAFFONCHIO D., ALMA A., 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. Environ. Microbiol., 13: 414-426.
- RIZZA S., ROSSI M., SPALLINO R.E., TEDESCHI R., MARZACHÌ C., CATARA V., TESSITORI M., 2020 Ecology based analysis of a recent association between Spartium junceum and 16SrV phytoplasma. Plant Pathol., 2020 (00): 1-13. https://doi.org/10.1111/ppa.13300.
- SABATÉ J., LAVIÑA A., BATLLE A., 2016 Incidence and distribution of 'Candidatus Phytoplasma prunorum' and its vector Cacopsylla pruni in Spain: an approach to the epidemiology of the disease and the role of wild Prunus. Plant Pathol., 65(5): 837-846.
- Stelinski L.L., 2019 Ecological aspects of the vector-borne

- bacterial disease, citrus greening (Huanglongbing): dispersal and host use by Asian citrus psyllid, Diaphorina citri Kuwayama. Insects, 10(7): 208.
- SWISHER K.D., MUNYANEZA J.E., VELASQUEZ-VALLE R., MENA-COVARRUBIAS J., 2018 Detection of Pathogens Associated with Psyllids and Leafhoppers in Capsicum annuum L. in the Mexican States of Durango, Zacatecas, and Michoacán. Plant Dis., 102(1): 146-153
- Tannières M., Fowler S.V., Manaargadoo-Catin L., Lange C., Shaw R., 2020 First report of 'Candidatus Liberibacter europaeus' in the United Kingdom. New Dis. Rep., 41: 3-3.
- Tedeschi R., Alma A., 2004 *Transmission of apple proliferation phytoplasma by* Cacopsylla melanoneura (*Homoptera: Psyllidae*). J. Econ. Entomol., 97(1): 8-13.
- Tedeschi R., Bosco D., Alma A., 2002 Population dynamics of Cacopsylla melanoneura (Homoptera: Psyllidae), a vector of apple proliferation phytoplasma in northwestern Italy. J. Econ. Entomol. 95: 544-551.
- Tedeschi R., Lauterer P., Brusetti L., Tota F., Alma A., 2009 Composition, abundance and phytoplasma infection in the hawthorn psyllid fauna of northwestern Italy. Eur. J. Plant Pathol., 123: 301-310.
- Tedeschi R., Visentin C., Alma A., Bosco D., 2003 Epidemiology of apple proliferation (AP) in northwestern Italy: evaluation of the frequency of AP-positive psyllids in naturally infected populations of Cacopsylla melanoneura (Homoptera: Psyllidae). Ann. Appl. Biol., 142: 285-290.
- Teresani G.R., Bertolini E., Alfaro-Fernández A., Martínez C., Tanaka F.A.O., Kitajima E.W., Rosello M., Sanjuan S., Ferrandiz J.C., Lopez M.M., Cambra M., Font M.I., 2014 Association of 'Candidatus Liberibacter solanacearum' with a vegetative disorder of celery in Spain and development of a real-time PCR method for its detection. Phytopathology, 104(8): 804-811.
- Teresani G., Hernandez E., Bertolini E., Siverio F., Marroquin C., Molina J., Hermoso De Mendoza A.,

- CAMBRA M., 2015 Search for potential vectors of 'Candidatus Liberibacter solanacearum': Population dynamics in host crops. Span. J. Agric. Res., 13: e10-002.
- Thebaud G., Yvon M., Alary R., Sauvion N., Labonne G., 2009 Efficient transmission of 'Candidatus Phytoplasma prunorum' is delayed by eight months due to a long latency in its host-alternating vector. Phytopathology, 99(3): 265-273.
- Thompson S., Fletcher J.D., Ziebell H., Beard S., Panda P., Jor-Gensen N., Fowler S.V., Liefting L.W., Berry N., Pitman A.R., 2013 First report of 'Candidatus Liberibacter europaeus' associated with psyllid infested Scotch broom. New Dis. Rep., 27: 6
- Van Den Berg M.A., Van Vuuren S.P., Deacon V.E., 1992 Studies on greening disease transmission by the citrus psylla, Trioza erytreae (Hemiptera: Triozidae). Israel J. Entomol., 25-26: 51-56.
- WEN A., MALLIK I., ALVARADO V.Y., PASCHE J.S., WANG X., LI W., LEVY L., LIN H., SCHOLTHOF H.B., MIRKOV T.E., RUSH C.M., GUDMESTAD N.C., 2009 Detection, distribution, and genetic variability of 'Candidatus Liberibacter's pecies associated with zebra complex disease of potato in North America. Plant Dis., 93(11): 1102-1115.
- Wenninger E.J., Hall D.G., 2008 *Importance of multiple mating to female reproductive output in* Diaphorina citri. Physiol. Entomol., 33(4): 316-321.
- Wenninger E.J., Hall D.G., Mankin R.W., 2009 Vibrational communication between the sexes in Diaphorina citri (Hemiptera: Psyllidae). Ann. Entomol. Soc. Am., 102(3): 547-555.
- YAMAMOTO P.T., FELIPPE M.R., GARBIM L.F., COELHO J.H.C., XIMENES N.L., MARTINS E.C., LEITE A.P.R., SOUSA M.C., ABRAHÃO D.P., BRAZ J.D., 2006 Diaphorina citri (Kuwayama) (Hemiptera: Psyllidae): Vector of the bacterium Candidatus Liberibacter americanus; page 96. In: Proc. of the Huanglongbing-Greening Intl. Workshop, July 16-20, 2006, Ribeirão Preto, Brazil.

VETTORI DI *XYLELLA FASTIDIOSA* IN EUROPA: UNA PROSPETTIVA ECOLOGICA SU TRASMISSIONE ED EPIDEMIOLOGIA

NICOLA BODINO^a

^aIstituto per la Protezione Sostenibile delle Piante, IPSP-CNR, Torino, Italia

Email: nicola.bodino@ipsp.cnr.it

Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Insetti vettori di agenti fitopatogeni: meccanismi ed ecologia della trasmissione di virus e batteri". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 21 febbraio 2020.

Insect vectors of Xylella fastidiosa in Europe: an ecological perpective on trasmission and epidemiology

The exotic bacterium *Xylella fastidiosa* (*Xf*) — the causal agent of the Olive Quick Decline Syndrome (OQDS) in Apulia — is transmitted in Europe by spittlebugs belonging to the Aphrophoridae family (Hemiptera: Cercopoidea). In American *Xf* pathosystems the key vector species are instead sharpshooters (Hemiptera: Cicadellidae: Cicadellinae). Several aspects of the ecology and behaviour of European vectors are poorly known, in spite of their epidemiological importance. Characteristics of vector insects in European agroecosystems such as biogeography, phenology, responses to environmental variables at the ecosystem level and nutritional preferences are discussed. The ecology of insect vectors strongly influences the pattern of *Xf* spread, as well as the development of environmentally-sound integrated control strategies against the spittlebug-*Xylella* association. The influence of vector phenology, host plant association and shifting, feeding behaviour and landscape pattern on the spread of *X. fastidiosa* is examined and discussed with particular regard to the olive grove agroecosystem.

KEY WORDS: Xylella fastidiosa, spittlebugs, insect vectors, ecological epidemiology

Introduzione

Gli insetti fitomizi sono responsabili della trasmissione di batteri vascolari fitopatogeni e dunque protagonisti fondamentali della loro diffusione. Gli agenti patogeni e i loro vettori costituiscono patosistemi spesso complessi, caratterizzati da interazioni con altri componenti ecosistemici, quali piante ospiti e ambiente.

Il crescente aumento di introduzioni di patogeni ed insetti potenziali vettori esotici in tutto il mondo sta contribuendo alla formazione di nuovi patosistemi, generati dall'incontro tra organismi alieni e agroecosistemi differenti da quelli di origine, spesso contraddistinti da dinamiche di trasmissione e diffusione diverse rispetto agli areali di origine (MEENTEMEYER et al., 2012; DAUGHERTY & ALMEIDA, 2019). L'imprevedibilità dei nuovi cicli epidemiologici e le caratteristiche ecologiche di patosistemi di recente formazione e in veloce evoluzione sono di difficile interpretazione, nonostante le interazioni tra le diverse componenti siano elementi fondamentali nel determinare diffusione ed epidemiologia dell'agente patogeno (SICARD et al., 2018). Una conoscenza approfondita delle dinamiche e interazioni che caratterizzano un patosistema è condizione necessaria per elaborare predizioni affidabili su sviluppi futuri delle malattie trasmesse da artropodi ed elaborare modalità di controllo efficaci e utili in diverse contesti.

IL BATTERIO ESOTICO XYLELLA FASTIDIOSA

Xylella fastidiosa Wells (Xanthomonadales: Xanthomonadaceae) è un batterio fitopatogeno di origine americana, riconosciuto come agente causale di gravi fitopatie epidemiche, sia in America settentrionale e meridionale, sia in aree di recente introduzione, dove si sono originati patosistemi con piante ospiti e insetti vettori differenti rispetto agli areali di origine (SICARD et al., 2018; Landa et al., 2019). Xylella fastidiosa è un batterio gram negativo, associato esclusivamente ai vasi xilematici delle piante ospiti. Unica specie ascritta al genere Xylella, è caratterizzata da un'ampia diversità genetica. Sono ufficialmente riconosciute tre sottospecie (X. fastidiosa subspp. fastidiosa, multiplex, e pauca), e altre sono state proposte (X. fastidiosa subspp. sandyi e morus) (VANHOVE et al., 2019; Landa et al., 2019). Le differenti sottospecie del batterio hanno tutte avuto origine allopatrica nel continente americano, con differenti espansioni e introduzioni nel corso del tempo sia intra- e intercontinentali (VANHOVE et al., 2019). La grande diversità genetica e la conseguente plasticità di questo batterio concorrono a determinare una gamma eccezionalmente ampia di piante ospiti, sia arboree ed erbacee (≈ 600 specie) (EFSA, 2020). Tuttavia, le sottospecie e ancor più le varianti genetiche definite sulla base di multilocus sequence typing (ST) sono caratterizzate da un numero di piante ospiti molto variabile (NUNNEY et al., 2019).

Xylella fastidiosa si comporta da commensale nella maggior parte degli ospiti vegetali, non provocando danni rilevanti all'ospite grazie a processi di autolimitazione della colonizzazione dei vasi xilematici. Il batterio tuttavia può esprimere fenotipi virulenti in alcune specie vegetali, colonizzando estensivamente i vasi xilematici e portando a interruzioni del flusso di xilema. Inoltre, la presenza di determinati fenotipi del batterio induce meccanismi di difesa da parte della pianta ospite che occludono ulteriormente i vasi xilematici, esacerbando i sintomi legati a stress idrico, arrecando estesi disseccamenti alla chioma ed eventualmente provocando la morte della pianta ospite (ROPER et al., 2019). L'espressione di fenotipi virulenti e i conseguenti disequilibri batterio-pianta si verificano con ospiti vegetali che non hanno processi coevolutivi in comune con il batterio (CASTILLO et al., 2020). Alcune delle malattie economicamente più rilevanti associate a X. fastidiosa sono la malattia di Pierce (Pierce's Disease) su vite in Nord America e la clorosi variegata degli agrumi (Citrus Variegated Chlorosis) in Brasile, responsabili di gravissime perdite nelle industrie vinicola e agru-

maria del Nuovo Mondo (Almeida *et al.*, 2005; Coletta-Filho *et al.*, 2020).

La presenza di X. fastidiosa in Europa è stata confermata per la prima volta nel 2013 su olivo in Puglia, a seguito di indagini volte a individuare le cause della patologia denominata "Disseccamento rapido dell'olivo" (OODS - Olive Quick Decline Syndrome), emersa sul finire del primo decennio del XXI secolo (SAPONARI et al., 2019). L'identificazione di X. fastidiosa subsp. pauca (ST53) come agente causale della grave emergenza fitosanitaria che interessa gli olivi pugliesi ha contribuito in modo fondamentale a far assurgere questo patogeno ad importanza globale (EFSA 2018). Le campagne di monitoraggio promosse dall'Unione Europea nei paesi comunitari hanno condotto all'identificazione di tutte e tre le sottospecie di X. fastidiosa ufficialmente riconosciute e la subsp. sandyi in diversi focolai e aree infette (Fig. 1), risultato di differenti introduzioni sia recenti (Spagna, Italia) sia passate inosservate anche per decenni (Corsica) (Soubeyrand et al., 2018; Landa et al., 2019). Italia, Spagna, Francia, Portogallo sono al momento le nazioni europee con focolai attivi di X. fastidiosa, attualmente in eradicazione

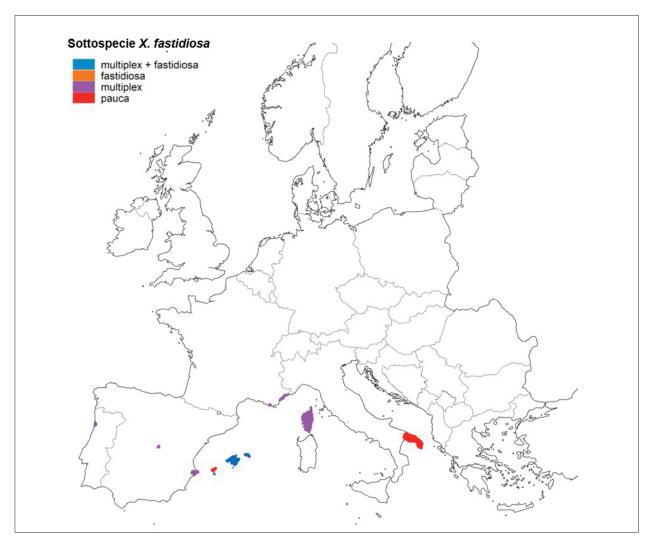


Fig. 1 - Aree infette da Xylella fastidiosa in Europa (2020). La subsp. sandyi non è mostrata in quanto non identificata in pieno campo.

o in contenimento (Fig. 1). Il genotipo *X. fastidiosa* subsp. pauca ST53 è stato al momento identificato solamente in Puglia e, limitatamente a poche piante ornamentali, a Menton, in Costa Azzurra. La sottospecie maggiormente diffusa nel bacino mediterraneo è invece *X. fastidiosa* subsp. multiplex, il cui ceppo ST6 è responsabile della patologia Almond Leaf Scorch (ALF) su mandorli in Spagna (EFSA 2019).

INSETTI VETTORI E LORO RUOLO EPIDEMIOLOGICO IN EUROPA

Xylella fastidiosa, colonizzando esclusivamente i vasi xilematici delle piante ospiti, è trasmessa da insetti xilemomizi, ovvero Emitteri Cicadomorpha appartenenti alle superfamiglie Membracoidea e Cercopoidea (REDAK et al., 2004). Tra i Membracoidea solamente le specie appartenenti alla sottofamiglia Cicadellinae (Hemiptera: Cicadellidae) sono xilemomize. Al contrario, le specie appartenenti alle superfamiglie Cercopoidea, così come quelle dei Cicadoidea, hanno tutte comportamento nutrizionale xilemomizo (Bosco, 2015).

Le caratteristiche della trasmissione di X. fastidiosa ad opera degli insetti vettori presentano aspetti intermedi rispetto alla classica definizione di trasmissione persistente/non persistente. Il batterio è infatti in grado di moltiplicarsi all'interno dell'ospite, e dunque l'insetto vettore allo stadio adulto rimane infettivo per tutta la vita (trasmissione persistente), il batterio rimane però confinato nello stomodeo (precibario) dell'insetto ospite ed è quindi perso durante le mute (assenza di trasmissione trans-stadiale), inoltre il vettore è in grado di trasmette il patogeno immediatamente dopo l'acquisizione senza la necessità di una fase di latenza (trasmissione non persistente). La specificità di trasmissione da parte di insetti vettori è stata a lungo considerata limitata al comportamento nutrizionale xilemomizo, date le caratteristiche di trasmissione non persistente e l'assenza di adattamenti specifici per diffondersi nel corpo del vettore (ALMEIDA et al., 2005). Tuttavia, le relazioni batterio-insetto sono probabilmente più complesse di quanto precedentemente immaginato. Per esempio, la cuticola dell'insetto ospite rappresenta un substrato non solo di ancoraggio ma anche nutritizio per il batterio, fornendo energia necessaria per la moltiplicazione e persistenza del batterio nell'apparato boccale del vettore (KILLINY & ALMEIDA, 2009; LABROUSSAA et al., 2017). Anche la morfologia di alcuni parti dell'apparato boccale influisce fortemente sulle dinamiche dei fluidi acquisiti e rilasciati, determinando differenti entità di popolazioni batteriche e probabilità di distacco di cellule infettive durante la nutrizione (RANIERI et al., 2019). Simili interazioni batterio-vettore possono quindi differire fortemente tra specie diverse di insetti xilemomizi, influenzando capacità ed efficienza di trasmissione del patogeno. Il ruolo delle cicale, sospettate di trasmettere *X. fastidiosa* (KRELL *et al.*, 2007), non è stato ad oggi confermato e, in particolare, *Cicada orni* (L.) (Hemiptera: Cicadidae) non è risultata in grado di trasmettere *X. fastidiosa* subsp. pauca ST53 a olivo (CORNARA *et al.*, 2020).

Il ruolo epidemiologico degli insetti vettori tuttavia non si limita esclusivamente alla capacità di acquisire e trasmettere il batterio. La trasmissione e la diffusione di un agente patogeno in un agroecosistema sono infatti eventi che necessitano che il vettore sia presente nell'agroecosistema, si nutra su piante infette e si sposti su piante sane in una finestra temporale adatta ad una efficiente inoculazione del batterio. Numerosi fattori bioecologici concorrono quindi a influenzare le probabilità di incontro tra il patogeno, il vettore e la pianta ospite, determinando l'epidemiologia di *X. fastidiosa* negli agroecosistemi europei.

BIODIVERSITÀ E BIOGEOGRAFIA

Le sputacchine (Hemiptera: Cercopoidea: Aphrophoridae) sono il gruppo principale di xilemomizi in Europa e i principali, se non unici, vettori di X. fastidiosa in Europa (CORNARA et al., 2019). I cicadellini, principali vettori del batterio nel continente americano, sono infatti un gruppo tassonomico relativamente poco rappresentato nel vecchio continente, essendo note circa 8 specie, contro le 1450 note nelle Americhe (REDAK et al., 2004; DE JONG et al., 2014). Cicadella viridis (L.) (Hemiptera: Cicadellidae) è l'unica specie europea piuttosto diffusa e localmente abbondante, tuttavia non è presente in ambienti mediterranei secchi dove si trovano i focolai noti di X. fastidiosa in Europa (CORNARA et al., 2019; MARKHEISER et al., 2020). Sia C. viridis e il cicadellidae esotico Graphocephala fennahi Young sono comunque localmente abbondanti in Europa continentale e potrebbero rappresentare dei possibili vettori di X. fastidiosa in tali zone, anche se C. viridis non sembra un vettore efficiente del batterio (MARKHEISER et al. 2020; Bodino et al., in preparazione). Gli Aphrophoridae sono presenti in tutta Europa con circa 36 specie, anche se le specie molto diffuse e abbondanti sono relativamente poche (CORNARA et al., 2019). Sono note tre specie di sputacchine in grado di trasmettere sperimentalmente X. fastidiosa ssp. pauca ST53: Philaenus spumarius (L.) (Fig. 2), *Philaenus italosignus* Drosopolous & Remane e Neophilaenus campestris (Fallén) (CAVALIERI et al., 2019). L'abbondanza e distribuzione delle sputacchine non è costante in area mediterranea, in oliveti italiani e greci la specie più abbondante è P. spumarius (TSAGKARAKIS *et al.*, 2018; BODINO *et al.*, 2019), mentre in Spagna la specie dominante è N. campestris (MORENTE et al., 2018). Philaenus spumarius è la sputacchina più diffusa e abbondante nel continente europeo, ed è caratterizzata da un elevata polifagia



Fig. 2 – Adulto di Philaenus spumarius.

sia durante gli stadi giovanili che allo stadio adulto. Può essere inoltre abbondante su chiome di olivo ed è considerato il principale vettore di X. fastidiosa in Puglia (CORNARA et al., 2018). Neophilaenus campestris è invece una sputacchina associata a monocotiledoni durante gli stadi giovanili e durante lo stadio adulto si trova principalmente su Poaceae e conifere, nonostante possa occasionalmente visitare gli olivi, di solito con basse densità (MORENTE et al., 2018). Philaenus italosignus è una specie endemica italiana, distribuita nel centro-sud della penisola, caratterizzata da stadi ninfali associati esclusivamente ad Asphodelus ramosus L. Gli adulti tuttavia possono visitare le chiome degli olivi e, in oliveti caratterizzati da una copertura erbacea con molti asfodeli, questa specie può diventare la specie xilemomiza dominante nell'agroecosistema oliveto (PANZAVOLTA et al., 2019).

COMPOSIZIONE AGROECOSISTEMA E PAESAGGIO

La diversità tassonomica e densità dei cercopoidei varia spesso in modo significativo, non solo a livello biogeografico, ma anche a scale spaziali più piccole, in funzione della composizione e della struttura del paesaggio. Ad esempio, le popolazioni di *P. spumarius* tendono a essere più abbondanti in oliveti inseriti in un contesto paesaggistico dominato da oliveti, mentre le densità del vettore diminuiscono quando gli oliveti sono circondati da agroecosistemi con gestione più intensiva, quali i vigneti (Santoiemma et al., 2019). Tuttavia, vigneti a gestione biologica e integrata possono presentare popolazioni di vettori abbondanti (BODINO et al., in preparazione). In generale, agroecosistemi diversificati e con componenti erbacee ed arboree sembrano favorire alte densità di sputacchine, grazie alla presenza sia di coperture erbacee poco disturbate utili allo sviluppo degli stadi giovanili, sia di essenze selvatiche legnose che rappresentano utili rifugi per gli adulti durante i mesi estivi (Bodino et al., 2020a). Le zone rifugio costituite da alberi e arbusti selvatici aumentano il rischio di diffusione del batterio, fornendo un riparo spesso fondamentale per il completamento del ciclo degli insetti vettori e rappresentando dei rifugi (reservoirs) per X. fastidiosa, dato che diverse piante tipiche della macchia mediterranea possono essere ospiti del batterio esotico (Soubeyrand et al., 2018; EFSA, 2020; WHITE et al., 2020). Tali considerazioni sottolineano l'importanza delle caratteristiche a livello paesaggistico e di agroecosistema nel determinare l'abbondanza degli insetti vettori e conseguentemente del batterio patogeno. Un'attenta valutazione dell'agroecosistema e del paesaggio agricolo è quindi un passo fondamentale nella stima del rischio associato all'introduzione di X. fastidiosa e nell'elaborazione di strategie di gestione delle componenti vegetazionali adatte a contenere efficacemente le popolazioni dei vettori e l'espansione dei focolai di infezione.

FENOLOGIA E CICLO BIOLOGICO

Il ciclo biologico e la fenologia degli insetti xilemomizi sono in una certa misura variabili tra specie, aree ed ecosistemi diversi, dando luogo a differenze significative nei momenti e nell'intensità dei picchi di popolazione dei vettori di X. fastidiosa sulle colture di interesse (Morente et al., 2018; Bodino et al., 2019). Tali aspetti biologici possono essere influenzati sia da variabili ambientali (e.g. temperatura), sia da pratiche agricole quali sfalcio e aratura. Le lavorazioni del terreno durante il periodo primaverile possono ridurre in modo drastico le popolazioni giovanili di sputacchine e rappresentano il più efficace metodo di lotta contro i vettori, purché effettuate durante una finestra temporale adatta, in cui tutte le uova si siano schiuse e non siano ancora presenti gli adulti (EU 2015/789, 2015; BODINO et al., 2019). Gli effetti di simili lavorazioni del terreno durante il periodo di vita adulta degli insetti sono ancora poco chiari, infatti le densità di sputacchine adulte nell'agroecosistema non sono ridotte da questi interventi, anzi essi possono potenzialmente spostarsi dallo strato erbaceo alla coltura, portando quindi a un aumento della trasmissione del batterio (Bodino et al., 2020a). In Puglia, in assenza di disturbi antropici, P. spumarius si sposta sulle chiome di olivo poco dopo lo sfarfallamento degli adulti, in maggio, e rimane sulla coltura in alte densità fino inizio estate (fine giugno – inizio luglio), diminuendo drasticamente durante il periodo estivo (Fig. 3). In aree olivicole più temperate, e.g. Liguria, le sputacchine tendono a rimanere sulle chiome degli olivi più a lungo, anche fino alla fine del periodo estivo (Bodino et al., 2019). È evidente inoltre che la permanenza degli adulti sugli ospiti erbacei durante i mesi estivi è impedita dal disseccamento generalizzato della copertura erbacea che si verifica in ambiente mediterraneo, ma non in ambienti temperati con estati sufficientemente piovose.

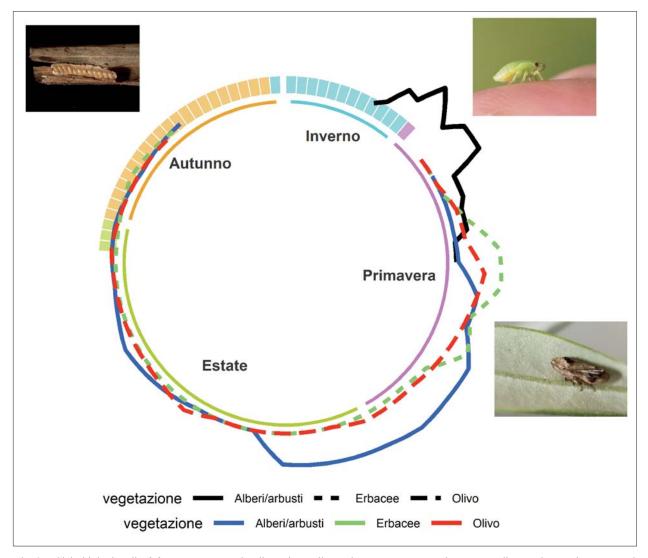


Fig. 3 – Ciclo biologico di *Philaenus spumarius* in oliveto in Puglia. Le barre rappresentano la presenza di uova deposte in campo nel periodo invernale. La linea continua nera rappresenta l'abbondanza degli stadi ninfali, mentre le linee colorate rappresentano le densità dello stadio adulto su diversi compartimenti vegetazionali presenti in oliveto. Dati non in scala tratti da Bodino *et al.* 2019.

I momenti e le durate dei periodi di picco di densità dei vettori sulle colture sono momenti chiave per la trasmissione e diffusione del batterio, pertanto differenze nella durata e intensità di tali picchi popolazionali possono fortemente influenzare le dinamiche epidemiologiche delle patologie legate a *X. fastidiosa*. Differenze marcate nella fenologia delle sputacchine in aree diverse sono pertanto da valutarsi attentamente nello sviluppo di modelli predittivi e strategie di gestione del batterio.

CAPACITÀ MOVIMENTO

Le capacità di movimento e dispersione dello stadio adulto dei vettori sono caratteristiche fondamentali nel determinare la diffusione di *X. fastidiosa* su scala agroecosistemica e influenzano fortemente le misure di controllo da adottare in caso di nuovi focolai. Tali

caratteristiche sono state poco studiate per quanto riguarda gli Aphrophoridae prima dell'introduzione di X. fastidiosa in Europa. Un recente studio stima la capacità di dispersione mediana giornaliera di P. spumarius in poche decine di metri al giorno e alcune centinaia metri nel corso dell'intera vita adulta (stimata in circa 210 giorni) (Bodino et al, 2020b). Tuttavia, le capacità di spostamento di questi insetti possono variare tra ambienti e periodi dell'anno differenti. La capacità di dispersione di P. spumarius è infatti maggiore in ambiente prativo rispetto all'agroecosistema oliveto (BODINO et al, 2020b), inoltre le sputacchine potrebbero essere in grado di movimenti di entità maggiori durante fasi di migrazione su ospiti alternativi, come la possibile estivazione su piante selvatiche fanerofite (Drosopoulos, 2003; Bodino et al., 2019). Ad esempio, N. campestris è in grado di muoversi per oltre 2 km in 20 giorni per raggiungere aree con presenza di conifere (LAGO et al., 2020). L'importanza epidemiologica di simili movimenti nella diffusione di X. fastidiosa e nella creazione e mantenimento di reservoirs del batterio è comunque ancora poco conosciuta. Spostamenti a lungo raggio, sia di natura antropica che causati da movimenti naturali potrebbero avere un grande impatto sulla diffusione di *X. fastidiosa*, creando nuovi focolai a grande distanza e determinando un rapido ampliamento dell'area infetta o a rischio di infezione, con pesanti ricadute sulle possibilità e costi di gestione delle epidemie (STRONA *et al*, 2020).

COMPORTAMENTO NUTRIZIONALE

Il comportamento nutrizionale degli insetti vettori ha un ruolo fondamentale sia direttamente, determinando le modalità e l'efficienza di trasmissione del batterio dall'apparato boccale del vettore ai vasi xilematici della pianta ospite, sia indirettamente, contribuendo a determinare le preferenze di piante ospiti e di specifiche parti delle piante (e.g. gemme, piccioli). Specie differenti di xilemomizi possono avere comportamenti nutrizionali differenti, ad esempio P. spumarius sugge linfa grezza meno frequentemente e a velocità più basse rispetto al vettore americano Graphocephala atropunctata (Signoret). Tali caratteristiche sono probabilmente legate a un'efficienza di trasmissione minore da parte della sputacchina rispetto alla cicalina, infatti questi aspetti influiscono sulle probabilità di distacco di cellule di X. fastidiosa dalle pareti dell'apparato boccale del vettore e quindi sull'efficacia della trasmissione alla pianta ospite.

La scelta di specifiche piante ospiti o comparti vegetazionali da parte dei vettori di X. fastidiosa è mediata da fattori ambientali (temperatura) e fisiologici (stress idrico, quantità e composizione degli aminoacidi presenti nello xilema, sintomi patologici visibili su piante ospiti) (Brodbeck et al., 1990; Daugherty et al., 2009; Bodino et al., 2020a). Una preferenza di nutrizione a spese dei piccioli fogliari, osservata in P. spumarius e forse dovuta alla maggior concentrazione di vasi xilematici e al minor spessore dell'epidermide rispetto ai rami, contribuisce a una efficiente trasmissione e alla successiva colonizzazione della pianta ospite da parte di X. fastidiosa, essendo i piccioli siti ottimali per la crescita del batterio (HOPKINS, 1981; CARDINALE et al., 2018). Differenze nelle preferenze di siti di nutrizione potrebbero anche spiegare l'inefficienza nella trasmissione di X. fastidiosa delle cicale (CORNARA et al., 2020).

CONCLUSIONI

Le caratteristiche ecologiche e comportamentali dei vettori di *X. fastidiosa* hanno un ruolo molto rilevante nel determinare le probabilità di acquisizione e inoculazione del batterio su una coltura, determinando quindi la diffusione del fitopatogeno nell'ecosistema. Tali aspetti ecologici variano tra specie vettrici, ecosistemi

ed aree diverse, risultando spesso specifici per ciascun patosistema. Nonostante le conoscenze acquisite su X. fastidiosa e vettori in Nord e Sud America non siano quindi direttamente utilizzabili in Europa, le ricerche svolte in questi paesi possono indirizzare studi futuri verso i percorsi di ricerca più interessanti ai fini di un controllo dei vettori e delle malattie associate il più possibile efficace ed integrato con preesistenti metodi di lotta e con il sistema colturale di interesse. In particolare, un approccio integrato con strategie di lotta a diverse scale spaziali (e.g. paesaggio, agroecosistema, pianta) può agire allo stesso tempo per i) ridurre le popolazioni di vettori negli ecosistemi agricoli di interesse, tramite ad esempio tecniche di gestione del paesaggio (lavorazioni del terreno, rimozione di piante ospiti alternative) e metodi di controllo biologico (parassitoidi, funghi entomopatogeni) (EFSA 2018; DI SERIO et al., 2019; MOLINATTO et al., 2020), ii) limitare la colonizzazione degli oliveti e degli olivi da parte dei vettori, utilizzando piante trappola/reti anti-insetto trattate o riducendo l'attrattività della coltura (e.g. kaolino) (Blua et al., 2005; Dongiovanni & Fumarola, 2018) e iii) manipolare le interazioni dei vettori con le piante ospiti, utilizzando ad esempio insetticidi che non vadano a disturbare il controllo di altri organismi dannosi e considerando anche i loro effetti non letali su acquisizione, trasmissione e movimento dei vettori (OKANO et al., 2002; BACKUS & SHIH, 2020).

Strategie di lotta integrate a differenti livelli possono sommare i loro effetti, ottenendo risultati efficaci nel controllo dei vettori. Tali strategie richiedono tuttavia un livello di conoscenza molto approfondito del patosistema e spesso del singolo agroecosistema, al fine di adattare le tecniche alle specifiche condizioni ambientali. L'elaborazione di strategie di controllo e la valutazione del rischio in caso di introduzione del batterio in nuove aree non possono quindi basarsi esclusivamente su monitoraggi volti a valutare la presenza di specie potenzialmente vettrici, ma necessitano studi più approfonditi sui fattori ecologici che influenzano l'efficienza di trasmissione di *X. fastidiosa* da parte delle comunità di xilemomizi presenti in una determinata area.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio l'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia, Professor Domenico Bosco e gli organizzatori della Tavola Rotonda "Insetti vettori di agenti fitopatogeni: meccanismi ed ecologia della trasmissione di virus e batteri" tenutasi a Firenze il 21 febbraio 2020.

RIASSUNTO

Il batterio esotico *Xylella fastidiosa (Xf)*, agente causale del Disseccamento rapido dell'olivo (OQDS - Olive Quick Decline Syndrome) in Puglia, è trasmesso

in Europa da insetti vettori appartenenti alla famiglia Aphrophoridae (sputacchine) (Hemiptera: Cercopoidea). Poiché negli areali di origine del batterio la diffusione di Xfè stata sempre associata al ruolo di vettore degli "sharpshooters" (Hemiptera: Cicadellidae: Cicadellinae), numerosi aspetti dell'ecologia e del comportamento delle sputacchine, seppur rilevanti per la diffusione di Xf, sono ancora poco conosciuti. In questo contributo le caratteristiche degli insetti vettori in agroecosistemi europei quali la biogeografia, fenologia, le risposte a variabili ambientali a livello ecosistemico e le preferenze nutrizionali sono esaminate in relazione alla loro importanza a livello di diffusione e trasmissione di Xf, alla luce delle conoscenze ottenute recentemente in Europa e precedentemente in America. Sono discusse inoltre le linee di ricerca più promettenti e utili ad elaborare strategie di controllo integrato degli insetti vettori del batterio volte a limitare l'incidenza e la diffusione delle malattie causate da Xf, con particolare riguardo all'agroecosistema oliveto.

BIBLIOGRAFIA

- ALMEIDA R.P.P., BLUA M.J., LOPES J.O.R.S., PURCELL A.H., 2005 Vector transmission of Xylella fastidiosa: applying fundamental knowledge to generate disease management strategies. Annu. Entomol. Soc. Am., 96: 775-786.
- BACKUS E.A., SHIH H.-T., 2020 Review of the EPG Waveforms of Sharpshooters and Spittlebugs Including Their Biological Meanings in Relation to Transmission of Xylella fastidiosa (Xanthomonadales: Xanthomonadaceae). J. Insect Sci., 20.
- Blua M.J., Campbell K., Morgan D.J.W., Redak R.A., 2005 Impact of a Screen Barrier on Dispersion Behavior of Homalodisca coagulata (Hemiptera: Cicadellidae). J. Econ. Entomol., 98(5): 1664-1668. doi:10.1603/0022-0493-98.5.1664.
- Bodino N., Cavalieri V., Dongiovanni C., Plazio E., Saladini M.A., Volani S., Simonetto A., Fumarola G., Carolo M.D., Porcelli F., Gilioli G., Bosco D., 2019 Phenology, seasonal abundance and stage-structure of spittlebug (Hemiptera: Aphrophoridae) populations in olive groves in Italy. Sci. Rep., 9(1): 17725. doi:10.1038/s41598-019-54279-8.
- BODINO N., CAVALIERI V., DONGIOVANNI C., SALADINI M.A., SIMONETTO A., VOLANI S., PLAZIO E., ALTAMURA G., TAURO D., GILIOLI G., BOSCO D., 2020a Spittlebugs of Mediterranean Olive Groves: Host-Plant Exploitation throughout the Year- Insects, 11(2): 130. doi:10.3390/insects11020130.
- Bodino N., Cavalieri V., Dongiovanni C., Simonetto A., Saladini M.A., Plazio E., Gilioli G., Molinatto G., Saponari M., Bosco D., 2020b Dispersal of Philaenus spumarius (Hemiptera: Aphrophoridae), a Vector of Xylella fastidiosa, in Olive Grove and Meadow Agroecosystems. Env. Entomol. Accepted.
- Bosco D., 2015 Xylella fastidiosa: vettori accertati e potenziali in America e in Europa. Atti Accad. Naz. Ital. Entomol., 62: 187-191.
- Brodbeck B.V., III R.F., French W.J., Andersen P.C., Aldrich J.H., 1990 - Amino acids as determinants of host preference for the xylem feeding leafhopper,

- Homalodisca coagulata (Homoptera: Cicadellidae). Oecologia, 83: 338-345.
- CARDINALE M., LUVISI A., MEYER J.B., SABELLA E., DE BELLIS L., CRUZ A., AMPATZIDIS Y., CHERUBINI P., 2018 Specific fluorescence in situ hybridization (FISH) test to highlight colonization of xylem vessels by Xylella fastidiosa in naturally infected olive trees (Olea europaea L.). Front. Plant Sci., 9. doi:10.3389/fpls.2018.00431.
- CASTILLO A.I., CHACÓN-DÍAZ C., RODRÍGUEZ-MURILLO N., COLETTA-FILHO H.D., ALMEIDA R.P.P., 2020 *Impacts of local population history and ecology on the evolution of a globally dispersed pathogen*. BMC Genomics, 21(1): 369. doi:10.1186/s12864-020-06778-6.
- COLETTA-FILHO H.D., CASTILLO A.I., LARANJEIRA F.F., DE ANDRADE E.C., SILVA N. ., DE SOUZA A.A., BOSSI M.E., ALMEIDA R.P.P., LOPES J.R.S., 2020 Citrus Variegated Chlorosis: an Overview of 30 Years of Research and Disease Management. Trop. Plant Pathol., 45: 175-191. doi:10.1007/s40858-020-00358-5.
- CORNARA D., BOSCO D., FERERES A., 2018 Philaenus spumarius: when an old acquaintance becomes a new threat to European agriculture. J. Pest Sci., 91(3): 957-972. doi:10.1007/s10340-018-0966-0.
- CORNARA D., MARRA M., TEDONE B., CAVALIERI V., PORCELLI F., FERERES A., PURCELL A., SAPONARI M., 2020 No evidence for cicadas' implication in Xylella fastidiosa epidemiology. Entomol. Gen., 40(2): 125-132. doi:10.1127/entomologia/2020/0912.
- CORNARA D., MORENTE M., MARKHEISER A., BODINO N., TSAI C.-W., FERERES A., REDAK R.A., PERRING T. M., LOPES J.R.S., 2019 *An overview on the worldwide vectors of* Xylella fastidiosa. Entomol. Gen., 39(3-4): 157-181. doi:10.1127/entomologia/2019/0811.
- Daugherty M.P., Almeida R.P.P., 2019 Understanding How an Invasive Vector Drives Pierce's Disease Epidemics: Seasonality and Vine-to. Phytopathology, 109(2): 277-285. doi:10.1094/PHYTO-07-18-0217-FI.
- Daugherty M.P., Bosco D., Almeida R.P.P., 2009 Temperature mediates vector transmission efficiency: inoculum supply and plant infection dynamics. - Ann. Appl. Biol., 155(3): 361-369. doi:10.1111/j.1744-7348.2009.00346.x.
- DI SERIO F., BODINO N., CAVALIERI V., DEMICHELIS S., DI CAROLO M., DONGIOVANNI C., FUMAROLA G., GILIOLI G., GUERRIERI E., PICCIOTTI U., PLAZIO E., PORCELLI F., SALADINI M., SALERNO M., SIMONETTO A., ET AL., 2019 Collection of data and information on biology and control of vectors of Xylella fastidiosa. EFSA Support. Publ. 16(5): 1628E. doi:10.2903/sp.efsa.2019.EN-1628.
- Dongiovanni C., Fumarola G., 2018 Sputacchina dell'olivo, insetticidi a confronto. Inf. Agrar., 24: 51-56.
- Drosopoulos S., 2003 New data on the nature and origin of colour polymorphism in the spittlebug genus Philaenus (Hemiptera: Aphorophoridae). Ann. Société Entomol. Fr., 39(1): 31-42. doi:10.1080/00379271. 2003.10697360.
- EFSA, 2018 *Updated pest categorisation of* Xylella fastidiosa. EFSA J., 16 (7): 5357. doi:10.2903/j.efsa. 2018.5357.
- EFSA, 2019 Update of the Scientific Opinion on the risks to plant health posed by Xylella fastidiosa in the EU territory. EFSA J., 17(5): e05665. doi:10.2903/j.efsa. 2019.5665.
- EFSA., 2020 *Update of the* Xylella *spp. host plant database systematic literature search up to 30 June 2019*. EFSA J., 18(4): e06114. doi:10.2903/j.efsa.2020.6114.

- De Jong Y., Verbeek M., Michelsen V., Bjørn P. De P., Los W., Steeman F., Bailly N., Basire C., Chylarecki P., Stloukal E., Hagedorn G., Wetzel F., Glöckler F., Kroupa A., Korb G., et al., 2014 Fauna Europaea all European animal species on the web. Biodiversity Data Journal., 2: e4034. doi: 10.3897/BDJ.2.e4034.
- Macleod A., Navajas Navarro M., Niere B., Parnell S., Potting R., Rafoss T., et al., 2018. *Updated pest categorisation of* Xylella fastidiosa. EFSA J., 16 (7). doi:10.2903/j.efsa.2018.5357.
- EU 2015/789, 2015 Measures to prevent the introduction into and the spread within the Union of Xylella fastidiosa (Wells et al.).
- HOPKINS D.L., 1981 Seasonal Concentration of the Pierce's Disease Bacterium in Grapevine Stems, Petioles, and Leaf Veins. Phytopathology, 71(4): 415. doi:10.1094/Phyto-71-415.
- KILLINY N., ALMEIDA R.P.P., 2009 Host structural carbohydrate induces vector transmission of a bacterial plant pathogen. Proc. Natl. Acad. Sci., 106(52): 22416-22420. doi:10.1073/pnas.0908562106.
- Krell R.K., Boyd E.A., Nay J.E., Park Y.-L., Perring T.M., 2007 *Mechanical and insect transmission of* Xylella fastidiosa *to* Vitis vinifera. Am. J. Enol. Vitic., 58(2): 211-216.
- LABROUSSAA F., IONESCU M., ZEILINGER A.R., LINDOW S.E., ALMEIDA R.P.P., 2017 A chitinase is required for Xylella fastidiosa colonization of its insect and plant hosts. Microbiology, 163(4): 502-509. doi:10.1099/mic.0.000438.
- LAGO C., MORENTE M., HERAS-BRAVO D.D. LAS., CAMPOY A.M., RODRIGUEZ-BALLESTER F., PLAZA M., MORENO A., FERERES A., 2020. Dispersal ability of Neophilaenus campestris, a vector of Xylella fastidiosa, from olive groves to over-summering hosts. BioRxiv.: 2020.03.17.995266. doi:10.1101/2020.03.17.995266.
- Landa B.B., Castillo A.I., Giampetruzzi A., Kahn A., Román-Écija M., Velasco-Amo M.P., Navas-Cortés J.A., Marco-Noales E., Barbé S., Moralejo E., Coletta-Filho H.D., Saldarelli P., Saponari M., Almeida R.P.P., 2019 Emergence of a Plant Pathogen in Europe Associated with Multiple Intercontinental Introductions. Appl. Environ. Microbiol., 86(3). doi:10.1128/AEM.01521-19.
- MARKHEISER A., CORNARA D., FERERES A., MAIXNER M., 2020 *Analysis of vector behavior as a tool to predict* Xylella fastidiosa *patterns of spread.* Entomol. Gen., 40(1): 1-13. doi:10.1127/entomologia/2019/0841.
- MEENTEMEYER R.K., HAAS S E., VACLAVÍK T., 2012 Landscape Epidemiology of Emerging Infectious Diseases in Natural and Human-Altered Ecosystems. Annu. Rev. Phytopathol., 50(1): 379-402. doi:10.1146/annurev-phyto-081211-172938.
- MOLINATTO G., DEMICHELIS S., BODINO N., GIORGINI M., MORI N., BOSCO D., 2020 Biology and prevalence in Northern Italy of Verrallia aucta (Diptera, Pipunculidae), a parasitoid of Philaenus spumarius (Hemiptera, Aphrophoridae), the main vctor of Xylella fastidiosa in Europe. Insects, 11(9): 607. doi:10.3390/insects11090607.
- MORENTE M., CORNARA D., PLAZA M., DURÁN J.M., CAPISCOL C., TRILLO R., RUIZ M., RUZ C., SANJUAN S., PEREIRA J.A., MORENO A., FERERES A., 2018 Distribution and relative abundance of insect vectors of Xylella fastidiosa in olive groves of the iberian Peninsula. Insects, 9(4): 175. doi:10.3390/insects9040175.
- NUNNEY L., AZAD H., STOUTHAMER R., 2019 An experimental test of the host-plant range of non

- recombinant strains of north American Xylella fastidiosa subsp. multip ex. Phytopathology, 109(2): 294-300.
- Panzavolta T., Bracalini M., Croci F., Ghelardini L., Luti S., Campigli S., Goti E., Marchi R., Tiberi R., Marchi G., 2019. Philaenus italosignus a potential vector of Xylella fastidiosa: occurrence of the spittlebug on olive trees in Tuscany (Italy). Bull. Insectology, 72(2): 317-320.
- RANIERI E., ZITTI G., RIOLO P., ISIDORO N., RUSCHIONI S., BROCCHINI M., ALMEIDA R.P.P., 2019 Fluid dynamics in the functional foregut of xylem-sap feeding insects: a comparative study of two Xylella fastidiosa vectors. J. Insect Physiol., 120: 103995. doi:10.1016/j.jinsphys. 2019.103995.
- REDAK R.A., PURCELL A.H., LOPES J.R.S., BLUA M.J., MIZELL III R.F., ANDERSEN P.C., 2004 The biology of xylem fluid-feeding insect vectors of Xylella fastidiosa and their relation to disease epidemiology. Annu. Rev. Entomol., 49(1): 243-270. doi:10.1146/annurev.ento. 49.061802.123403.
- ROPER C., CASTRO C., INGEL B., 2019 Xylella fastidiosa: bacterial parasitism with hallmarks of commensalism. Curr. Opin. Plant Biol., 50: 140-147. doi:10.1016/j.pbi. 2019.05.005.
- Santoiemma G., Tamburini G., Sanna F., Mori N., Marini L., 2019 Landscape composition predicts the distribution of Philaenus spumarius, vector of Xylella fastidiosa, in olive groves. J. Pest Sci., 92: 1101-1109. doi:10.1007/s10340-019-01095-8.
- Saponari M., Giampetruzzi A., Loconsole G., Boscia D., Saldarelli P., 2019 Xylella fastidiosa *in Olive in Apulia: Where We Stand.* Phytopathology, 109(2): 175-186. doi:10.1094/PHYTO-08-18-0319-FI.
- SICARD A., ZEILINGER A.R., VANHOVE M., SCHARTEL T.E., BEAL D.J., DAUGHERTY M.P., ALMEIDA R.P.P., 2018 Xylella fastidiosa: insights into an emerging plant pathogen. Annu. Rev. Phytopathol., 56(1): 181-202. doi:10.1146/annurev-phyto-080417-045849.
- Soubeyrand S., Jerphanion P. De., Martin O., Saussac M., Manceau C., Hendrikx P., Lannou C., 2018 Inferring pathogen dynamics from temporal count data: the emergence of Xylella fastidiosa in France is probably not recent. New Phytol., 219(2): 824-836. doi:10.1111/nph.15177.
- STRONA G., CASTELLANO C., FATTORINI S., PONTI L., GUTIERREZ A.P., BECK P.S.A., 2020 Small world in the real world: long distance dispersal governs epidemic dynamics in agricultural landscapes. Epidemics, 30: 100384. doi: 10.1016/j.epidem.2020.100384.
- TSAGKARAKIS A.E., AFENTOULIS D.G., MATARED M., THANOU Z.N., STAMATAKOU G.D., KALAITZAKI A.P., TZOBANOGLOU D.K., GOUMAS D., TRANTAS E., ZARBOUTIS I., PERDIKIS D.C., 2018 Identification and seasonal abundance of Auchenorrhyncha with a focus on potential insect vectors of Xylella fastidiosa in olive orchards in three regions of Greece. J. Econ. Entomol., 111(6): 2536-2545.
- Vanhove M., Retchless A. C., Sicard A., Rieux A., Coletta-Filho H.D., Fuente L.D.L., Stenger D. C., Almeida R.P.P., 2019 *Genomic diversity and recombination among* Xylella fastidiosa *subspecies*. Appl Env. Microbiol., 85(13): 02972-18. doi:10.1128/AEM.02972-18.
- WHITE S.M., NAVAS CORTÉS J.A., BULLOCK J.M., BOSCIA D., CHAPMAN D.S., 2020 *Estimating the epidemiology of emerging* Xylella fastidiosa *outbreaks in olives.* Plant Pathol., 69(8): 1403-1413. doi:10.1111/ppa.13238.

BEHAVIOURAL ASPECTS INFLUENCING PLANT PATHOGEN TRANSMISSION BY HEMIPTERAN INSECTS

ALBERTO FERERES^a

^a ICA-CSIC. Spanish Research Council. Calle Serrano 115dpdo, Madrid 28006, Spain Email: a.fereres@csic.es

Lettura tenuta durante la Tavola Rotonda "Insetti vettori di agenti fitopatogeni: meccanismi ed ecologia della trasmissione di virus e batteri". Seduta pubblica dell'Accademia - Firenze, 21 febbraio 2020.

Behavioural aspects influencing plant pathogen transmission by hemipteran insects

Insects are efficient vectors of many plant viruses, plant-pathogenic bacteria and phytoplasma that cause severe diseases reducing the yield and quality of several crops worldwide. Aphids are known to transmit more than 400 virus species, many of them after a very fast process while probing the superficial plant tissues when searching for a suitable host (non-circulative transmission). Some other viruses are transmitted during long feeding periods after they reach the phloem and require the circulation through the vector to reach the salivary glands before they can be inoculated to a healthy plant (circulative transmission). Other relevant virus vectors are whiteflies, thrips, mealybugs and leafhoppers. Most vectors of plant pathogens other than viruses belong to the family Psyllidae (psyllids) and to the suborder Cicadomorpha (sharpshooters and spittlebugs). Psyllids transmit phloem-restricted bacteria and phytoplasmas, while spittlebugs and sharpshooters transmit xylem-limited bacteria. Plant pathogens tend to interact with their vectors manipulating their behavior in a way that often favor disease spread. Plant pathogens may directly affect vector behaviour but more frequently cause indirect plant-mediated metabolic changes in their host plant that can alter the behaviour and fitness of insect vectors. There is increasing evidence that plant pathogens influence insect vectors enhancing disease spread by changing their behaviour and facilitating mutualistic relationships. However, some examples of antagonistic interactions also exist.

KEY WORDS: virus, bacteria, transmission, vector-pathogen-vector interactions, insect behaviour

INSECTS AS VECTORS OF PLANT PATHOGENS

Insects are well known vectors of numerous plant pathogens. Most vectors belong to the orders Hemiptera and Thysanoptera. Thus, aphids (Aphididae) whiteflies (Aleyrodidae) and thrips (Thysanoptera) are the most important vectors of plant viruses. Psyllids (Psyllidae) are vectors of phloem-restricted bacteria and phytoplasmas. Furthermore, sharpshooters (Cicadellinae) and spittlebugs (Cercopidae) are the main vectors of xylem-restricted bacteria. Insects have very well specialized mouthparts to penetrate the plant tissues. Many plant pathogens such as viruses need a living cell to replicate and survive. Viruses have evolved together with aphids and adapted to move from plant to plant by taking advantage of a very particular feeding behaviour strategy during the process of host plant recognition. In such process aphids make brief intracellular punctures and incidentally transmit many plant viruses without killing the cell. The transmission process consists of 3 essential steps that need to be completed -acquisition, retention and inoculation-. First, an insect vector needs to locate, land, and settle on an infected plant. Immediately after it probes or feeds on a particular

plant tissue to ingest plant sap that often contains virus particles or other plant pathogens. That uptake process of the pathogen by its vector is called acquisition. However, the pathogen cannot be transmitted after acquisition unless retained by the vector in the proper site. After retention of the pathogen in the insect's body, inoculation occurs when the vector reaches a healthy plant and delivers the pathogen to the plant while probing or feeding. Insects that acquire and retain the pathogen are often called viruliferous, while insects never exposed to an infected source-plant are called nonviruliferous. Another important concept is that not all insects able to acquire the pathogen are able to transmit. Detection of the pathogen in the vector's body does not necessarily mean that the vector is infective. Transmission efficacy is the ability of a given vector to transmit a pathogen and is often calculated as the ratio between the number of plants that become infected divided by the total number of inoculated plants. Non-circulative transmission (NCT) occurs when the pathogen is retained on the vector's cuticle, either on the stylet's or the foregut but do not need to circulate through the vector to be transmitted. Circulative transmission (CT) occurs when the plant pathogen crosses the gut and

salivary gland membranes and then is secreted by the saliva to a healthy plant. In some cases, both NCT and CT plant pathogens can replicate in the insect's vector, and are called propagative. The transmission of NCT pathogens occurs in seconds or few minutes after insects start probing. However, some NCT pathogens are restricted to the phloem or xylem and the process of acquisition and inoculation may require longer access times. The pathogen is lost after molting and persists for few hours in the vector, with the only exception of xylem-limited bacteria that are propagative and can persist in their vectors during their whole life cycle. NCT is also characterized by a very low level of plant pathogen-vector specificity (many insect species can transmit the same pathogen). Conversely, CT is a much slower process because insects need to feed for longer periods of time, often hours, and the pathogen needs to circulate through the insect's body to reach the salivary glands. CT pathogens persist many days in their vectors and have a high level of specificity (few insect species transmit the same pathogen).

FEEDING BEHAVIOUR AND PLANT PATHOGEN TRANSMISSION

Plant pathogens are not transmitted after fixed periods of time by their vectors, but depend on specific feeding behavioural events or particular stylet activities that occur in the depth of the plant tissues. The feeding behaviour of pierce-sucking insects can be studied by the electrical penetration graph (EPG) technique that was developed in the 60' by McLean & Kinsey (1964). Such technique is based on making an insect part of an electric circuit and monitoring the probing and feeding activities as well as the stylet tip position within the plant tissues. Each type of activity is recorded as characteristic waveforms that change depending on the insect species. A complete description of the technique and its principles can be found in TJALLINGII (1988) and WALKER (2000).

One distinct EPG pattern associated to the transmission of some NCT viruses is the potential drops (pd). This particular pattern is repeatedly observed during the first minutes of plant penetration by aphids. Potential drops represent differences in the trans-membrane potential between the apoplast and symplast that occur when a plant cell membrane is punctured for about 5-10 seconds by the aphid's maxillary stylets. Transmission of nonpersistent viruses such as potyviruses and cucumoviruses occurs during this brief intracellular punctures in superficial leaf

tissues (Powell, 1991; Martin et al., 1997). More recently, a new type of distinct potential drop of lower magnitude that represent intracellular punctures in deeper tissues -phloem sieve elements-have been described. Such phloem-pds are involved in the transmission of phloem-limited viruses. Two examples are Beet yellows virus, a NCT closterovirus transmitted by Myzus persicae (Jimenez et al., 2018) and Barley yellow dwarf virus, a CT luteovirus transmitted by Rhopalosiphum padi (Jimenez et al., 2020) (Fig. 1). The EPG technique has been used to understand the transmission of several NCT and CT viruses, but also phloem and xylem-limited bacteria (Sandanayaka et al., 2014; Backus et al., 2016).

MANIPULATION OF INSECT BEHAVIOUR BY PLANT PATHOGENS

Some parasites are known to manipulate their hosts in their own benefit, some of these changes induce atypical behaviours of the insect host to enhance its transmission and spread. This is the case of the horsehair worm, *Paragordius spp.* that induces suicide behaviour in its host, the cricket *Nemobius sylvestris*. Infected hosts harbouring mature hairworms commit suicide by jumping into water to facilitate nematode survivorship and further spread. Plant pathogens frequently manipulate their insect vectors, many of them facilitating disease spread. They can induce changes in the behaviour of their insect vectors in two different ways:

- a. Indirect plant-mediated effects by altering the biochemistry and physiology of their shared host plant
- b. Direct effects when the vector acquires the pathogen, by inducing physiological or metabolic changes directly in their vectors

Two case studies will be provided on how plant viruses can manipulate their insect vectors in a way that enhances their own spread.

Plant-mediated effects of NCT virus infection on aphid vectors

Cucumber plants infected with Cucumber mosaic virus modified the attractiveness, settlement and feeding behaviour of its aphid vector, Aphis gossypii. Free-choice preference assays showed that A. gossypii alates preferred CMV-infected over mock-inoculated plants at an early stage (30 min), but this behaviour was reverted at a later stage and aphids preferred to settle and reproduce on mock-inoculated plants. Furthermore, a sharp change in aphid probing behaviour over time when exposed to CMV-infected plants was observed. At the be-

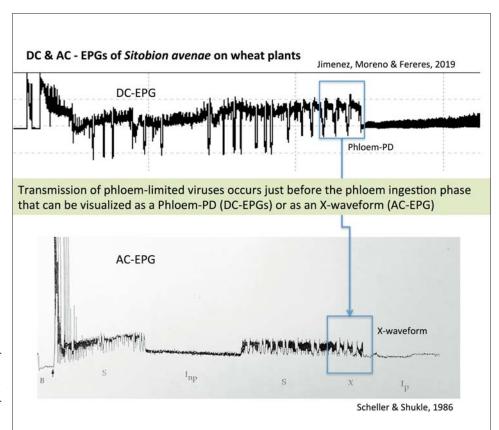


Fig. 1 – Transmission of phloem-limited viruses occurs just before the phloem phase during brief stylet intracellular punctures of phloem cells (phloem - pd).

ginning (first 15 min) aphid vectors dramatically increased the number of short superficial probes and intracellular punctures when exposed to CMVinfected plants. At a later stage (second hour of recording) aphids diminished their feeding on CMV-infected plants as indicated by much less time spent in phloem salivation and ingestion (E1 and E2). This particular probing behaviour including an early increase in the number of short superficial probes and intracellular punctures followed by a phloem feeding deterrence is known to enhance the transmission efficiency of viruses transmitted in a nonpersistent manner. Therefore, CMV induces a pull-push strategy in its aphid vector by promoting specific changes in a plant host that modify the alighting, settling and probing behaviour of its main vector A. gossypii. Such changes lead to optimum transmission and spread of the virus (CARMO-Sousa, 2014; Fig. 2).

Direct effects of a CT virus on its whitefly vector

Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) alters the locomotion, settling and feeding behaviour of its vector *Bemisia tabaci*.

A series of bioassays were used to assess the direct effects of TYLCV on vector behaviour. Eggplant were used because is an excellent host for the vector but a non-host for the virus. Thus changes in vector behaviour after virus acquisition are directly induced by the virus and are not mediated by changes in the host plant. Bioassays using video-tracking of settling behaviour of viruliferous and non-viruliferous whiteflies showed that TYLCV induced an arrestant behaviour of B. tabaci, as viruliferous whitefly adults remained motionless for more time and moved slower than non-viruliferous whiteflies after their first contact with eggplant leaf discs. In fact, EPGs showed that TYLCV-viruliferous B. tabaci fed more often from phloem sieve elements and made a larger number of phloem contacts in eggplants than non-viruliferous whiteflies. Furthermore, the duration of the salivation phase in phloem sieve elements preceding sustained sap ingestion was longer in viruliferous than in nonviruliferous whiteflies. This particular behaviour is known to significantly enhance the inoculation efficiency of TYLCV by B. tabaci. TYLCV directly manipulates the settling, probing and feeding behaviour of its vector B. tabaci in a way that enhances virus transmission efficiency and spread. TYLCV-B.tabaci interaction is mutualistic, as it is also beneficial to the whitefly vector because it increases its ability to find and feed from the phloem. Overall, TYLCV directly induces a pullarrest strategy in its whitefly vector, B. tabaci. (Moreno-Delafuente et al., 2013, Fig. 2).

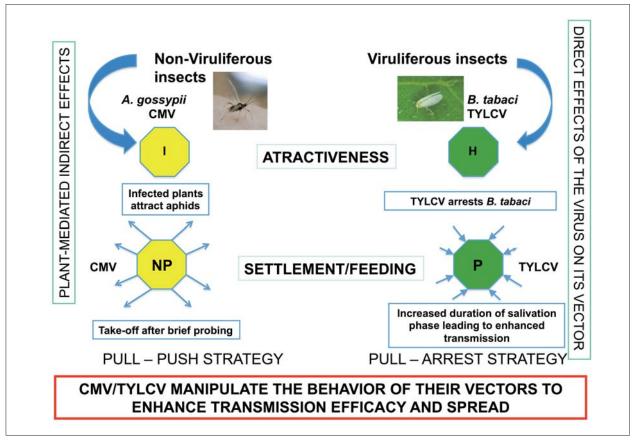


Fig. 2 – Plant-mediated and direct effects of viruses on vector behaviour: CMV and TYLCV manipulate vector behavior using a pull-push strategy and a pull-arrest strategy, respectively.

DIRECT AND INDIRECT EFFECTS
OF A NON-CIRCULATIVE PROPAGATIVE BACTERIA
ON ITS INSECT VECTORS

It is common that plants infected with plant pathogens promote changes in their physiology and biochemistry that influence insect vector behaviour during the process of host plant selection and feeding. But also the pathogen can directly alter vector behaviour when insects feed from the infected plant (post-acquistion effects). It is important to highlight that not always vectors prefer to feed on infected plants, and they can even reject plants with severe symptoms of infection. Such is the case of the xylem-limited bacteria, Xylella fastidiosa, that disrupted the feeding behaviour of its vector Bucephalogonia xanthopis on citrus plants showing clear symptoms of Citrus variegated chlorosis (CVC) (Fig. 3). However, the vector preferred non-infected or infected plants with no symptoms, suggesting that infected citrus trees maybe more important as sources for CVC spread than severely diseased ones (MIRANDA et al., 2013). Another vector of X. fastidiosa, the spittlebug Philaenus spumarius showed difficulties to feed on olive plants after acquisition of the bacteria. Infective spittlebugs compared to non-infective ones exhibited: (i) longer non-probing and shorter xylem ingestion; (ii) longer duration of single non-probing events; (iii) fewer sustained ingestions (ingestion longer than 10 min) and interruptions of xylem activity (N); and (iv) longer time required to perform the first probe. All these feeding difficulties are probably related to the presence of *X. fastidiosa* within the foregut of *P. spumarius*. Such atypical feeding behaviour of infective insects could also facilitate the inoculation of the bacteria to healthy plants. However, further experiments are needed to confirm or discard such hypothesis (CORNARA *et al.*, 2020).

CONCLUSIONS

- 1. Plant pathogen transmission does not occur at fixed access periods to the source/test plant, but it depends on specific and mandatory vector feeding activities
- 2. Plant pathogens influence their insect vectors altering the efficiency of transmission by changing their behaviour and often facilitating mutualistic relationships





Symptoms of CVC in citrus trees



Bucephalogonia xanthopis sharpshooter Cicadellidae: Cicadellinae

Fig. 3 – Bucephalogonia xanthophis, a vector of Xylella fastidiosa, the causal agent of CVC in Brasil.

- 3. In few cases some plant pathogen-vector interactions do not favor transmission (there is no apparent change in vector behaviour that benefits disease spread)
- 4. Some plant pathogens may disrupt vector settlement and feeding behaviour but not necessarily have negative implications for disease spread. Vectors of *X. fastidiosa* prefer to feed on infected asymptomatic than on symptomatic plants, suggesting that infected plants can act as better inoculum sources than plants showing clear symptoms. This particular behaviour may speed up disease spread.

REFERENCES

- Jiménez J., Tjallingii W.F., Moreno A., Fereres A., 2018 Newly distinguished cell punctures associated with transmission of the semipersistent phloem-limited Beet yellows virus. J. Virol., 92: e01076-18. https://doi.org/10.1128/JVI.01076-18.
- JIMÉNEZ J., ARIAS-MARTÍN M., MORENO A., GARZO E., FERERES A., 2020 Barley yellow dwarf virus can be inoculated during brief intracellular punctures in phloem cells before the sieve element continuous salivation phase. Phytopathology, 110: 85-93.
- CORNARA D., MARRA M., MORENTE M., GARZO E., MORENO A., SAPONARI M., FERERES A., 2020 Feeding behaviour in relation to spittlebug transmission of Xylella fastidiosa. Journal of Pest Science, 93: 197-213.
- MIRANDA M.P., VILLADA E.S., LOPES S.A., FERERES A., LOPES JR.S., 2013 *Influence of citrus plants infected with* Xylella fastidiosa *on stylet penetration activities of* Bucephalogonia xanthophis (*Hemiptera: Cicadellidae*). Ann. Entomol. Soc. Am., 106: 610-618.

- Moreno-Delafuente A., Garzo E., Moreno A., Fereres A., 2013 A plant virus manipulates the behavior of its whitefly vector to enhance its transmission efficiency and spread. Plos ONE, 8: 1-10.
- Carmo-Sousa M., Moreno A., Garzo E., Fereres A., 2014 A non-persistently transmitted-virus induces a pull-push strategy in its aphid vector to optimize transmission and spread. Virus Research, 186: 38-46.
- BACKUS E.A., 2016 Sharpshooter Feeding Behavior in Relation to Transmission of Xylella fastidiosa: A Model for Foregut-Borne Transmission Mechanisms. Vector-Mediated Transmission of Plant Pathogens. (ed by J.K. Brown) pp: 175-193.
- TJALLINGII W.F., 1988 Electrical Recording of Stylet Penetration Activities. Aphids: Their biology, natural enemies and control. (ed by AK Minks & P. Harrewijn). Elsevier, Amsterdam, pp 95-108.
- MCLEAN D.L., KINSEY M.G., 1964 A Technique for Electronically Recording Aphid Feeding and Salivation. Nature, 202:1358-1359.
- MARTIN B., COLLAR J.L., TJALLINGII W.F., FERERES A., 1997 Intracellular ingestion and salivation by aphids may cause the acquisition and inoculation of non-persistently transmitted plant viruses. J. Gen. Virol., 78: 2701-2705.
- Powell G. 1991 Cell membrane punctures during epidermal penetrations by aphids: consequences for the transmission of two potyvirus. Ann. appl. Biol., 119: 313-321.
- Sandanayaka W.R.M., Moreno A., Tooman L.K., Page-Weir N.E.M., Fereres A., 2014 Stylet penetration activities linked to the acquisition and inoculation of Candidatus Liberibacter solanacearum by its vector tomato potato psyllid. Entomologia Experimentalis et Applicata, 151: 170-181.
- Walker G.P., 2000 A Beginner's Guide to Electronic Monitoring of Homopteran Probing Behavior. Principles and applications of electronic monitoring and other techniques in the study of Homopteran feeding behaviour. (ed by GP Walker & EA Backus) pp. 4-40.

