

Mattio et al.: *Wolbachia* in planthopper vectors of  
plant viruses

Journal of Economic Entomology

M. F. Mattio

IPAVE-CIAP

Av. 11 de Setiembre 4755

Córdoba X5020ICA

Phone: +54-0351-4974343

Fax: +54-0351-4974330

e-mail: [mattio.fernanda@inta.gob.ar](mailto:mattio.fernanda@inta.gob.ar)

1 ***Wolbachia* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) Occurrence in Planthoppers (Hemiptera:**  
2 **Delphacidae) Vectors of Cereals Viruses in Argentina**

3

4 M. F. Mattio,<sup>1</sup> E. B. Argüello Caro,<sup>1</sup> M. S. Rodrigo,<sup>2</sup> A. D. Dumón,<sup>1</sup> V. M. Alemandri,<sup>1</sup>  
5 and G. Truol<sup>1</sup>

6

7

8

9

10

---

<sup>1</sup> Instituto de Patología Vegetal-CIAP-INTA, Av. 11 de Setiembre 4755, Córdoba, X5020ICA, Argentina

<sup>2</sup> Laboratorio de Genética Evolutiva, Departamento de Ecología, Genética y Evolución- UBA, Intendente Güiraldes y Costanera Norte s/n. Pabellón II, Ciudad Universitaria, Capital Federal, 1428, Argentina,

11 **Abstract**

12 Maize and wheat are the most important cereals to Argentina's economy. These crops are  
13 affected by several diseases. Several planthoppers species transmit causal agents of some of  
14 those diseases among we can mention to *Mal de Río Cuarto virus* (MRCV), *Barley yellow*  
15 *striate mosaic virus* (BYSMV) and the recently proposed Maize yellow striate virus. Those  
16 insects are phloem feeders and therefore it is expected are hosting bacteria which may play a  
17 role in the transmission of these pathogens. Genes amplification by PCR and sequencing  
18 demonstrated *Wolbachia* Hertig live in at least five of the tested planthoppers species. This  
19 job is the first report of *Wolbachia* presence in Delphacidae insects mentioned as vectors of  
20 viruses affecting maize and wheat crops in Argentina.

21

22 Keywords: *Wolbachia*, planthopper, vector, virus

23

24

## Introduction

25 Maize and wheat are the most important cereals to Argentina's economy. The current World  
26 Market and Trade Reports (USDA), informed Argentina is in the fifth place among maize  
27 producer countries (26 million tons) and in the third place among exporter countries of this  
28 grain. In relation to wheat crops, this report showed Argentina is the thirteenth producer  
29 country (12.5 million tons) and the eighth wheat exporter (USDA, 2014) (accessed: June,  
30 2014).

31 El rendimiento de estos cultivos puede ser afectado, entre otras cosas, por el ataque de  
32 insectos plaga que pueden causar daños directos, produciendo lesiones o heridas sobre las  
33 plantas, durante la alimentación y ovipostura, o indirectos, por la transmisión de diferentes  
34 patógenos. En Argentina varias especies de insectos de la familia Delphacidae son  
35 mencionadas como vectores de importantes virosis que afectan al maíz y al trigo. Para *Mal de*  
36 *Río Cuarto virus* (MRCV) se mencionan a *Delphacodes kuscheli* Fennah (Remes Lenicov *et*  
37 *al.*, 1985), *Caenodelphax teapae* Fowler (Velazquez, 2010), *Chionomus haywardi* (Muir)  
38 (Velazquez *et al.*, 2003), *Toya propinqua* (Fieber) (Velazquez, 2010), *Pyrophagus tigrinus*  
39 Remes Lenicov & Varela (Velazquez *et al.*, 2006), *Peregrinus maidis* Ashmead (Virla *et al.*,  
40 2004), *Tagosodes orizicolus* (Muir) (Mattio *et al.*, 2008). Asimismo, *D. kuscheli*, *P. tigrinus*,  
41 *Ch. haywardi* y *T. propinqua* también se identificaron como vectores de *Barley yellow striate*  
42 *mosaic virus* (BYSMV) (Dumón *et al.*, 2011) y *P. maidis* como vector del recientemente  
43 propuesto Maize yellow striate virus (Maurino *et al.*, 2012). Estos insectos utilizan como  
44 refugio a malezas y cultivos de crecimiento espontáneo, que a su vez cumplen un rol  
45 importante en la epidemiología ya que actúan como reservorio de los virus. Como puede  
46 observarse, existe una estrecha relación entre los virus, el hospedante y su vector. Los autores  
47 señalan entonces la necesidad de dirigir las investigaciones hacia el conocimiento de las  
48 interacciones que se establecen entre los virus y los insectos vectores para detectar puntos

49 clave en la transmisión del patógeno. En este contexto, se conoce que los insectos que se  
50 alimentan de floema, como los delfácidos, poseen microorganismos simbioses para su  
51 desarrollo o supervivencia (Douglas *et al.*, 2006). Existe cada vez mayor número de  
52 investigaciones que relacionan la presencia de estos microorganismos con la transmisión de  
53 patógenos (van den Heuvel *et al.*, 1997; Hogenhout *et al.*, 1998; Morin *et al.*, 2000; Akad *et*  
54 *al.*, 2004; O`Neill, 2007; Gottlieb *et al.*, 2010; Klot *et al.*, 2014). El género *Wolbachia* Hertig  
55 (Rickettsiales: Rickettsiaceae) (La Scola *et al.*, 2005) es un grupo de bacterias intracelulares  
56 obligadas de gran interés por las alteraciones reproductivas que causa en sus hospedantes  
57 (Bourtzis, 2008). Estas bacterias infectan el 40% de las especies de insectos (Zug &  
58 Hammerstein 2012), transformándola en el endosimbionte más ubicuo sobre la tierra  
59 (Bourtzis, 2008). Varios investigadores han detectado a *Wolbachia* en especies de delfácidos  
60 consideradas plagas del arroz en varias regiones del mundo. Entre ellas se mencionan a  
61 *Laodelphax striatellus* (vector del *Maize rough dwarf virus*, en Europa), *Nilaparvata lugens* y  
62 *Sogatella furcifera* (transmisores del *Nilaparvata lugens reovirus* y del *Pangola stunt virus*  
63 respectivamente, en Asia) y *Tagosodes orizicolus* (vector del *Rice hoja blanca virus*, en  
64 América tropical) (Noda, 1984a y b; Noda *et al.*, 2001a, Hernández *et al.*, 2004; Tang *et al.*,  
65 2010; Zhang *et al.*, 2010). Contrariamente, hasta el momento, no se han realizado estudios  
66 similares sobre el estado de infección con *Wolbachia* de los delfácidos de Argentina. Por lo  
67 tanto, este trabajo tuvo como objetivo detectar a *Wolbachia* en especies de delfácidos  
68 transmisores de virosis que afectan a cereales de gran importancia económica para este país.

69

70

## Results and Discussion

71

72

73

El gen 16S ribosomal de eubacterias es ampliamente utilizado en la detección de una gran  
variedad de bacterias. La amplificación de este gen indicó la presencia de procariotas en *C.*  
*teapae*, *Ch. haywardi*, *D. kuscheli*, *P. tigrinus*, *T. orizicolus* y en *T. propinqua*, todos ellos

74 vectores de MRCV o BYSMV (Lenardon *et al.*, 1985; Remes Lenicov *et al.*, 1985; Remes  
75 Lenicov & Varela, 1998; Velazquez *et al.*, 2003, 2006; Virla *et al.*, 2004; Mattio *et al.*, 2008;  
76 Velazquez, 2010; Dumón *et al.*, 2011). Los cebadores utilizados para este gen, amplificaron  
77 fragmentos del tamaño esperado, de aproximadamente 1150 pb (O'Neill *et al.*, 1992) en todas  
78 las especies analizadas. Estos resultados concuerdan con Douglas *et al.* (2006), quienes  
79 afirmaron que los insectos que se alimentan de floema alojan a microorganismos  
80 endosimbiontes. Asimismo, *C. teapae*, *D. kuscheli*, *P. tigrinus*, *T. orizicolus* y *T. propinqua*  
81 resultaron positivas para *Wolbachia* por la amplificación de al menos un gen específico  
82 (Tabla 1). Los tamaños de los fragmentos amplificados fueron similares a los esperados para  
83 los genes *ftsZ*, 16S rDNA y *wsp* de *Wolbachia* (O'Neill *et al.*, 1992; Werren *et al.*, 1995;  
84 Braig *et al.*, 1998). La secuenciación del gen *wsp* confirmó la presencia de *Wolbachia* en *C.*  
85 *teapae*, *D. kuscheli* y *T. propinqua* (vectores del MRCV en el campo). Las secuencias  
86 obtenidas en *C. teapae* y *D. kuscheli* resultaron idénticas (GenBank accession no. XXXXX)  
87 pero diferentes a la de *T. propinqua* (GenBank accession no. XXXX). BLAST homology  
88 searches indicated that the sequence of both species shared 97% nucleotide identity with  
89 *Wolbachia* outer surface protein (*wsp*) gene from different groups of insects (e.g. GenBank  
90 accession no. AY566423.1 E-value=0.0). This algorithm showed *wsp* sequence from *T.*  
91 *propinqua* shared 100% nucleotide identity with *Wolbachia* *wsp* gene from several mosquitos  
92 species belonging to genera *Culex* (e.g. GenBank accession no. KJ140129.1 E-value = 0.0)  
93 and also from Lepidoptera (e.g. GenBank accession no. AB094390.1 E-value = 0.0). Estas  
94 diferencias en las secuencias nucleotídicas señalan la presencia de cepas de *Wolbachia*  
95 distintas en los delfácidos estudiados. El gen *wsp* posee una elevada tasa evolutiva que  
96 posibilita discriminar diferentes cepas. Sin embargo su alto grado de recombinación no  
97 permite su empleo en la inferencia de relaciones filogenéticas (Baldo *et al.* 2005). Por esta

98 razón, se continuarán los estudios de tipificación de estas bacterias mediante la selección de  
99 otros genes que permitan definir el supergrupo al cual pertenecen.

100 Además, los datos obtenidos demostraron que no todos los ejemplares o poblaciones de la  
101 misma especie resultaron positivos para *Wolbachia*. A modo de ejemplo, las poblaciones de  
102 *D. kuscheli* de la cría de laboratorio, iniciada en 1997 a partir de ejemplares provenientes de  
103 Río Cuarto, y las de Capilla del Monte (2006) y Río Cuarto (2006) amplificaron genes  
104 específicos de *Wolbachia*. Por el contrario, las poblaciones de La Plata (2007) y Jesús María  
105 (2005) resultaron negativas. Esta variabilidad geográfica en el estado de infección con  
106 *Wolbachia* ya fue observada en *T. orizicolus* de Costa Rica y en el género *Perkinsiella* en  
107 Australia (Hernández *et al.*, 2004; Hughes *et al.*, 2011). Dado que una baja frecuencia de  
108 infección puede ser la causa de la no detección de *Wolbachia* en algunos ejemplares, debería  
109 considerarse en el análisis quizás un número mayor de insectos. De acuerdo con otros  
110 investigadores, los resultados negativos también pueden ser consecuencia de una densidad de  
111 infección ubicada por debajo del umbral detectable por PCR, como se observó en poblaciones  
112 australianas de delfácidos (Hughes *et al.*, 2011).

113 Según lo demostraron investigaciones sobre el genoma de *Wolbachia*, esta bacteria es  
114 incapaz de sintetizar una gran variedad de aminoácidos (Brownlie & O'Neill, 2006),  
115 esenciales para el adecuado desarrollo de estos insectos que se alimentan de floema. Por lo  
116 tanto, si *Wolbachia* fuera el único endosimbionte de las chicharritas, éstas carecerían de  
117 fuente de aminoácidos. La amplificación del gen ribosomal de eubacterias aún en las especies  
118 de planthoppers que resultaron negativas para *Wolbachia* indicó la presencia de otros  
119 microorganismos. En este contexto, un trabajo reciente informó la presencia de una variedad  
120 de bacterias pertenecientes a los phyla *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* y  
121 *Bacteroidetes*, en *Nilaparvata lugens*, plaga del arroz en Asia (Tang *et al.* 2010). Por esta

122 razón es que en el futuro se profundizarán los estudios sobre la diversidad bacteriana que  
123 alojan los delphácidos mencionados como vectores de virosis fitopatógenas en la Argentina.  
124 En conclusión, este trabajo constituye el primer reporte sobre la presencia de *Wolbachia* en  
125 especies de delphácidos de importancia agronómica. Actualmente, se está avanzando en la  
126 sistemática de las cepas de *Wolbachia* que infectan a estos insectos transmisores de virosis  
127 que causan pérdidas económicas substanciales en los cultivos de maíz y trigo de Argentina.  
128

129

## Experimental procedures

130 **Insect populations.** Se recolectaron ejemplares de diferentes especies de delfácidos  
131 vectores de virus de cereales sobre pasturas de crecimiento espontáneo en distintas  
132 localidades ubicadas a la vera de la Ruta Nacional 9, al Norte de la ciudad de Córdoba  
133 (Córdoba) y en Famaillá (Tucumán) y La Plata (Buenos Aires). Para ello se utilizó una red  
134 entomológica de arrastre. Los muestreos se realizaron entre los años 2004 y 2010. También  
135 se tomaron ejemplares criados en el laboratorio del Instituto de Patología Vegetal (IPAVE)  
136 desde el año 1997 (Tabla 1, Figura 1).

137

138

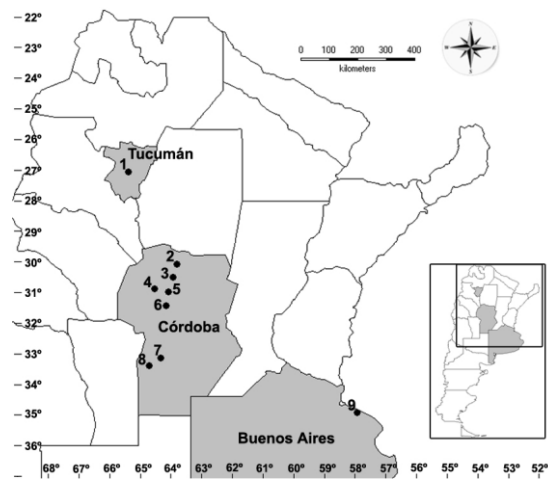
139

140

141

142

143



144

145 Figura 1. Ubicación geográfica de los sitios de muestreo de delfácidos en tres provincias de  
146 Argentina.

147

148 **Total nucleic acids extraction.** Se procesaron 344 individuos adultos de delfácidos  
149 pertenecientes a seis especies diferentes. Cada ejemplar adulto fue molido dentro de un  
150 microtubo de 1,5 ml con 305 µl de una solución de TNES y proteinasa K, según el protocolo  
151 de Reiss y colaboradores (1995). En las poblaciones en las que se recolectaron más de 10  
152 ejemplares, la extracción se realizó en bulk de entre 10 y 20 insectos. El pellet obtenido fue



153 resuspendido en 50 µl de agua DEPC. El sobrenadante fue utilizado como templado en las  
154 subsecuentes PCRs.

155 **Bacteria detection by PCR.** Universals primers were used to detect microorganisms  
156 belonging to *Eubacteria* group, and specific primers to amplify *Wolbachia* genes (Table 2).  
157 Todos los fragmentos bacterianos fueron amplificados en un volumen final de 50 µl que  
158 contenía 100.0 ng ADN genómico; buffer 1X (Invitrogen); 3.0 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen); 0.1  
159 mM of each dNTP (Promega); 0.5 uM of each primer (Invitrogen); 1 unit of Taq polimerase  
160 5 U/µl (Invitrogen) y H<sub>2</sub>O bidestilada estéril hasta completar el volumen final. Total genomic  
161 DNA from *Naupactus ambiguus* naturally infected with *Wolbachia* and *N. versatilis* were  
162 used as positive and negative controls respectively.

163 Primers designed by Normark (1994) for mitochondrial *cytochrome oxidase subunit I (COI)*  
164 gene were used to assess the quality of the DNA extraction.

165 To confirm *Wolbachia* presence in these tested insects, amplified products for *wsp* gene were  
166 purified using comercial kit *illustra MicroSpin S-300 HR Columns* (GE Healthcare) and  
167 sequenced in both directions by Macrogen Inc., South Korea.

168

169

170

## **Acknowledgements**

171 Place the acknowledgments after the text. Organize acknowledgments in paragraph form in the

172 following order: persons (omit all professional titles and degrees), groups, granting institutions,

173 grant numbers, and serial publication number.

174

175

176

178 **References**

- 179 (USDA) U.S. Department of Agriculture. 2014. Grain: World Markets and Trade. USDA,  
180 Beltsville, MD. [Accessed June 2014].
- 181 Noda, H., K. Ishikawa, H. Hibino, and T. Omura. 1991. A reovirus in the brown planthopper,  
182 *Nilaparvata lugens*. J. Gen. Virol. 72: 2425-2430.
- 183 Ros, V. I. D., V. Fleming, E. J. Feil, and J. A. J Breeuwer. 2009. How diverse is the genus  
184 *Wolbachia*? Multiple gene sequencing reveals a putatively new *Wolbachia* supergroup  
185 recovered from spider mites (Acari: Tetranychidae). *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 1036–  
186 1043.
- 187 Dumón, A.D., E. B. Argüello-Caro, V. M. Alemandri, C. Bainotti, M. F. Mattio, S. M.  
188 Rodríguez, M. del Vas, and G. Truol. 2011. Identificación y caracterización biológica del  
189 *Barley yellow striate mosaic virus* (BYSMV): nueva enfermedad del trigo en Argentina.  
190 *Trop. Plant Pathol.* 36: 374-382.
- 191 Hernandez M., T. Quesada, C. Munoz, and A. M. Espinoza. 2004. Genetic diversity of Costa  
192 Rican populations of the rice planthopper *Tagosodes orizicolus* (Homoptera: Delphacidae).  
193 *Rev. Biol. Trop.* 52: 795–806.
- 194 de Remes Lenicov A. M., A. Tesón, E. Dagoberto, and N. Huguet. 1985. Hallazgo de uno de los  
195 vectores del Mal de Río Cuarto en maíz. *Gac. Agron.* 5: 251-258.
- 196 Velazquez, P. D. 2010. Transmisión experimental y detección del virus del Mal de Río  
197 Cuarto (MRCV) en diferentes especies de delfácidos (Insecta: Hemiptera). Ph.D. dissertation,  
198 National University of Córdoba. Argentina.
- 199 Velazquez, P. D., J. Arneodo, F. A. Guzmán, L. R. Conci, and G. Truol. 2003. *Delphacodes haywardi*  
200 Muir, a new natural vector of Mal de Río Cuarto in Argentina. *J. Phytopath.* 151: 1-4.
- 201 Velazquez, P. D., F. A. Guzmán, L. R. Conci, A. M. de Remes Lenicov, and G. A. Truol.  
202 2006. *Pyrophagus tigrinus* (Hemiptera: Delphacidae), nuevo vector del *Mal de Río Cuarto*  
203 *virus* (MRCV, *Fijivirus*) en condiciones experimentales. *Agriscientia* 23: 9-14.

204 Virla E. G., Miotti M. P., Giménez Pecci M. P., Carpane P., and G. Laguna. 2004. *Peregrinus maidis*  
205 (Hemiptera: Delphacidae), new experimental vector of Mal de Río Cuarto disease to corn. *Biocell* 28:  
206 A54.

207 Mattio, M. F., A. Cassol, A. M. Marino de Remes Lenicov, and G. A. M. Truol. 2008.  
208 *Tagosodes orizicolus*: nuevo vector potencial del *Mal de Río Cuarto virus*. *Trop. Plant*  
209 *Pathol*, vol. 33:237-240.

210 Dumón, A. D., E. B. Argiello-Caro, V. M. Alemandri, C. Bainotti, M. F. Mattio, S. M.  
211 Rodríguez, M. del Vas and G. Truol. 2011. Identificación y caracterización biológica del  
212 *Barley yellow striate mosaic virus* (BYSMV): nueva enfermedad del trigo en Argentina.  
213 *Trop. Plant Pathol.* 36: 374-382.

214 Maurino, M. F., G. Laguna, F. Giolitti, C. Nome, and M. P. Giménez Pecci. 2012. First  
215 occurrence of a rhabdovirus infecting maize in Argentina. *Plant Dis.* 96: 1383.

216 Douglas, A. E. 2006. Phloem-sap feeding by animals: problems and solutions. *J. Exp. Bot.*  
217 57: 747–754.

218 Van den Heuvel, J. F. J. M., A. Bruyere, S. A. Hogenhout, V. Ziegler Graff, V. Brault, M.  
219 Verbeek, F. Van Der Wilk and K. Richards. 1997. The N-terminal region of the luteovirus  
220 readthrough domain determines virus binding to *Buchnera* GroEL and is essential for virus  
221 persistence in the aphid. *J. Virol.* 71: 7258-7265.

222 Hogenhout, S. A., F. van der Wilk, M. Verbeek, R. W. Goldbach and J. F. van den Heuvel.  
223 1998. *Potato leafroll virus* binds to the equatorial domain of the aphid endosymbiotic *GroEL*  
224 homolog. *J. Virol.* 72: 358-365.

225 Morin, S., M. Ghanim, I. Sobol and H. Czosnek. 2000. The GroEL protein of the whitefly  
226 *Bemisia tabaci* is implicated in the circulative transmission of *Tomato yellow leaf curl virus*.  
227 *Virol.* 256: 75-84.

228 Akad, F., N. Dotan and H. Czosnek. 2004. Trapping of *Tomato yellow leaf curl virus*  
229 (TYLCV) and other plant viruses with a GroEL homologue from the whitefly *Bemisia tabaci*.  
230 Arch. Virol. 149: 1481–1497.

231 O'Neill, S. 2007. *Wolbachia*-mediated life shortening of *Aedes aegypti* to reduce dengue.  
232 Entomol. Res. 37: A11–A73.

233 Gottlieb, Y., E. Zchori-Fein, N. Mozes-Daube, S. Kontsedalov, M. Skaljic, M. Brumin, I.  
234 Sobol, H. Czosnek, F. Vavre, F. Fleury and M. Ghanim. 2010. The transmission efficiency of  
235 *Tomato yellow leaf curl virus* by the whitefly *Bemisia tabaci* is correlated with the presence  
236 of a specific symbiotic bacterium species. J. Virol. DOI:10.1128/JVI.00423-10.

237 Klot, A., M. Cilia, H. Czosnek, and M. Ghanim. 2014. Implication of the bacterial  
238 endosymbiont *Rickettsia* spp. in the whitefly *Bemisia tabaci* interactions with *Tomato yellow*  
239 *leaf curl virus*. J. Virol. 88: 5652-5660.

240