





# I GEORGOFILI

Quaderni  
2012-V



SIMBIONTI, UNA RISORSA PER IL BENESSERE  
DELLE PIANTE E DEGLI ANIMALI

Firenze, 4 dicembre 2012



EDIZIONI POLISTAMPA

*Con il contributo di*



ENTE CASSA DI RISPARMIO DI FIRENZE

Copyright © 2013  
Accademia dei Georgofili  
Firenze  
<http://www.georgofili.it>

Proprietà letteraria riservata

Supplemento a «I Georgofili. Atti della Accademia dei Georgofili»  
Anno 2012 - Serie VIII - Vol. 9 (188° dall'inizio)

Direttore responsabile: Paolo Nanni

Edizioni Polistampa  
Via Livorno, 8/32 - 50142 Firenze  
Tel. 055 737871 (15 linee)  
[info@polistampa.com](mailto:info@polistampa.com) - [www.polistampa.com](http://www.polistampa.com)  
Sede legale: Via Santa Maria, 27/r - 50125 Firenze

ISBN 978-88-596-1240-7

Servizi redazionali, grafica e impaginazione  
SOCIETÀ EDITRICE FIORENTINA

## INDICE

ELENA CROTTI, ELEONORA ROLLI, DANIELE DAFFONCHIO <i>I microrganismi simbiotici di piante e animali: generalità ed esempi di interazioni</i>	7
DAVIDE SASSERA, SARA EPIS, MASSIMO PAJORO, CLAUDIO BANDI <i>Generalità sulle simbiosi in parassiti e in artropodi vettori, con alcuni riferimenti alle applicazioni in campo medico-veterinario</i>	29
ALBERTO ALMA, ELENA GONELLA <i>Simbiosi negli artropodi e potenziali applicazioni</i>	41
PAOLA BONFANTE <i>Alle radici della simbiosi pianta-funghi micorrizici arbuscolari: non solo uno scambio di nutrienti</i>	63
MASSIMO MARZORATI, TOM VAN DE WIELE <i>Simbiosi nell'uomo e potenziali applicazioni</i>	81



## I microrganismi simbiotici di piante e animali: generalità ed esempi di interazioni

### I. IL MICROBIOMA SIMBIOTICO: INTRODUZIONE ALLE TIPOLOGIE DI INTERAZIONE

Dalla comparsa delle prime forme di vita sulla Terra, circa 4 miliardi di anni fa, l'evoluzione biologica ha portato alla formazione di milioni di specie vegetali e animali. Tale aumento della biodiversità è dovuto principalmente alla differenziazione di specie preesistenti, ma anche all'instaurazione di legami tra organismi di specie diverse.

I microrganismi hanno stabilito diversi tipi di interazioni con possibili ospiti superiori, in alcuni casi molto strette o, addirittura, obbligate. Queste interazioni sono potenzialmente sfruttabili per il controllo degli insetti stessi o di patogeni da essi veicolati.

Esistono differenti tipi di associazione tra gli organismi, classificati in base al tipo di relazione che intercorre tra i partners. Il termine simbiosi è stato introdotto per la prima volta nel 1879 da Anton de Bary e Simon Schwendener durante uno studio sui licheni, per definire «l'associazione permanente tra due o più organismi di specie distinte, almeno per una parte del loro ciclo vitale» (Hoffmeister e Martin, 2003). Questa definizione comprende al suo interno i concetti di:

- commensalismo: associazione tra due specie in cui una ottiene dei benefici dall'interazione senza danneggiare né dare beneficio all'altra;
- mutualismo: associazione in cui entrambi i partners beneficiano della loro interazione;

\* *Dipartimento di Scienze per gli Alimenti la Nutrizione e l'Ambiente (DeFENS), Università degli Studi di Milano*

- parassitismo: associazione in cui solo uno dei partners trae beneficio a spese dell'altro;
- predazione: altro esempio di interazione negativa, in cui un organismo predatore usa come fonte di cibo un altro organismo preda.

Tra queste relazioni il mutualismo è quello considerato più importante da un punto di vista evoluzionistico: la relazione che si crea tra due simbiosi è tale che spesso non sono più in grado di vivere separatamente (Wilkinson, 2003). Al contrario della maggior parte dei procarioti, gli eucarioti hanno capacità metaboliche relativamente limitate, ragion per cui le simbiosi rappresentano per loro una straordinaria strategia evolutiva, permettendo l'accesso a un'ampia gamma di risorse metaboliche prima inaccessibili (Xu e Gordon, 2003).

Le simbiosi mutualistiche hanno caratterizzato l'evoluzione della maggior parte degli organismi superiori. Piante, animali e uomo hanno stabilito importanti relazioni con i microrganismi per arrivare alle attuali capacità funzionali. Ad esempio, nel caso delle piante, sia i microrganismi eucarioti fungini, le micorrize, che i procarioti, ad esempio gli alfa-Proteobatteri del genere *Rhizobium* e generi correlati o gli attinomiceti del genere *Frankia*, stabiliscono simbiosi con le radici delle piante provvedendo all'organizzazione dell'azoto atmosferico e garantendo all'ospite un'adeguata nutrizione azotata.

Nel caso degli insetti i simbiosi primari intracellulari, come ad esempio *Buchnera* negli afidi, garantiscono all'ospite l'approvvigionamento di aminoacidi essenziali che sono molto carenti nella linfa floematica di cui si nutrono gli afidi. Questo permette all'insetto ospite di mantenere un apporto nutrizionale equilibrato che garantisce la sostenibilità delle innumerevoli generazioni che l'animale ha ogni anno.

Anche nei mammiferi e nell'uomo sono stati evidenziati importanti contributi da parte del microbioma associato ai diversi organi. Oltre al noto contributo dei microrganismi alla protezione della mucosa vaginale dall'attacco di parassiti grazie al mantenimento delle corrette condizioni di acidità, è stato evidenziato che la microflora intestinale cambia favorendo i microrganismi del genere *Bacteroides* nelle persone normali, mentre nella condizione di obesità questo gruppo microbico è sfavorito.

Le conoscenze che stanno emergendo dagli studi delle simbiosi nei diversi ospiti hanno enormi implicazioni applicative che potrebbero portare a una gestione più sostenibile della salute dei diversi organismi. Questo è il caso dell'impiego dei batteri probiotici e dei fattori prebiotici che stimolano lo sviluppo dei probiotici stessi, i quali contribuiscono al mantenimento dello stato di salute dell'uomo. L'insieme delle strategie che utilizzano i micror-



ganismi e i loro metabolismi e metaboliti va sotto il nome anglosassone di “Microbial Resource Management” (MGM) traducibile in “Gestione della Risorsa Microbica”, un nuovo approccio finalizzato allo studio dei principi teorici e applicativi per ottimizzare l’impiego dell’enorme risorsa microbica che si è evoluta sul nostro pianeta.

Ad esempio, importanti applicazioni del MGM riguardano l’agricoltura come gli approcci di controllo simbiotico per impedire la trasmissione di patogeni vegetali alle piante da parte degli insetti vettori oppure l’impiego di microrganismi che favoriscono la crescita vegetale sostituendo o complementando i fertilizzanti chimici.

Riguardo a quest’ultimo aspetto, l’aumento dei problemi ambientali causati, direttamente o indirettamente, dall’uso di fertilizzanti, antiparassitari e fungicidi ha spinto i ricercatori a sviluppare alternative alle strategie chimiche per la promozione della crescita e protezione delle colture. Un’alternativa ideale ai prodotti di sintesi chimica dovrebbe non solo promuovere la crescita vegetale ma anche inibire i patogeni mantenendo un basso impatto sull’ambiente nonché promuovere la sostenibilità ambientale ed economica. L’impiego delle micorrize e dei batteri promotori della crescita vegetale (plant growth-promoting bacteria – PGPB) (Brown, 1974; Kloepper et al., 1988; Glick et al., 1999; Lambert and Joos, 1989) già rappresenta, di fatto, un’alternativa ai fertilizzanti chimici e, sebbene molto sia ancora da capire sui meccanismi di protezione e di promozione che questi microrganismi garantiscono, vede un aumento costante delle applicazioni reali.

Ad esempio, riguardo ai PGPB, la maggiore concentrazione è nella zona radicale, nella cosiddetta rizosfera, grazie agli alti livelli di composti organici esudati dalle radici di molte piante, che attirano i microrganismi e possono essere utilizzati da questi per la crescita (Whipps, 1997). La rizosfera, habitat naturale dei batteri ad attività PGP, è un ambiente complesso e diversificato, risultato dell’interazione di diversi organismi (piante, batteri, invertebrati), e quindi per sua natura dinamico e in continua evoluzione. Il sottoinsieme dei PGPB che vive nella rizosfera viene indicato con l’acronimo PGPR (plant growth promoting rhizobacteria), ossia rizobatteri promotori della crescita vegetale. I PGPR sono un gruppo di microrganismi benefici per le colture agrarie e in generale per tutte le piante. Presenti nella rizosfera, possono risiedere in prossimità della radice (batteri rizosferici) o colonizzare i tessuti vegetali interni (batteri endofiti). Si tratta di un gruppo eterogeneo di batteri, che comprende specie appartenenti a diversi generi. Tra i più studiati e sfruttati nelle applicazioni si ricordano: *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Arthobacter*, *Burkholderia*, *Bacillus* e *Serratia* (Kloepper et al., 1988; Glick, 1995).

Alla luce della recente letteratura scientifica appare evidente che le simbiosi con i microrganismi riguardano la stragrande maggioranza degli eucarioti superiori, con una notevole varietà di interazioni sia riguardo agli aspetti della diversità che a quelli funzionali. Per opportunità di spazio, nella trattazione che segue gli insetti e le piante verranno considerati come modelli d'ospite e come modelli di simbionti saranno trattati alcuni gruppi di batteri.

## 2. SIMBIONTI PRIMARI, SECONDARI, MANIPOLATORI RIPRODUTTIVI E COMMENSALI

La categorizzazione delle simbiosi qui di seguito presentata è tipicamente adatta a descrivere le relazioni tra simbionti e artropodi, ma ha analogie anche con le simbiosi negli altri organismi, ad esempio piante, mammiferi e uomo. In questi organismi sono generalmente associati solamente i simbionti facoltativi o secondari.

Un caso particolare di simbiosi è rappresentato dall'endosimbiosi, in cui uno dei due organismi, generalmente un procariota, si trova all'interno dell'organismo ospite. Molti studi hanno approfondito il rapporto di endosimbiosi tra batteri e insetti, relazione che rappresenta uno dei migliori esempi d'efficacia di questa associazione, anche in considerazione dell'ubiquità ecologica che gli insetti hanno saputo conquistare.

L'adattabilità degli insetti a un gran numero di habitat terrestri, compresi quelli poveri di nutrienti o nutrizionalmente sbilanciati, ha contribuito e contribuisce tuttora al loro successo evolutivo in differenti condizioni ecologiche e questo è dovuto in gran parte allo sfruttamento dei microrganismi in simbiosi con essi (Feldhaar e Gross, 2008). È ormai evidente che la stragrande maggioranza degli insetti con un regime dietetico povero o sbilanciato, ad esempio a base di linfa floematica molto carente di aminoacidi essenziali, o di tessuti legnosi maturi ricchi di cellulosa e lignina difficilmente digeribili e con potenzialità tossiche dovute a composti fenolici, o ancora a base di sangue dei vertebrati povero di certe vitamine, spesso posseggono endosimbiosi microbiche. I simbionti sono in grado di stabilire intime associazioni, altamente specializzate e costanti, o interazioni più dinamiche. Questa diversità si riflette in molte importanti caratteristiche delle simbiosi, che spaziano dalla localizzazione dei simbionti alle modalità di trasmissione e dalla plasticità del genoma dei simbionti ai loro effetti sull'ospite (Moran, 2008).

I batteri con una distribuzione nel corpo dell'ospite molto localizzata, ad esempio all'interno di cellule specializzate dell'ospite, dette batteriociti, spes-

so associate in organi specializzati detti batteriomi, sono simbionti antichi, primari e indispensabili per l'ospite, generalmente coinvolti nell'approvvigionamento di nutrienti carenti nella dieta dell'ospite. L'associazione è obbligata per entrambi i soggetti: il batterio non può essere coltivato al di fuori dell'ospite in quanto non è più in grado di produrre una serie di metaboliti essenziali che ottiene dall'ospite stesso, mentre l'insetto necessita di alcuni metaboliti carenti nella dieta che il microrganismo simbiote si è specializzato a produrre in maniera esclusiva per il suo ospite. I simbionti primari discendono da associazioni antiche: le loro relazioni filogenetiche rimangono congruenti e sono perfettamente sovrapponibili a quelle dei loro ospiti. Questi batteri tendono a ridurre il loro genoma a causa di una mancanza di pressione selettiva sui geni superflui, che codificano per funzioni non più necessarie al microrganismo che vive nell'ambiente ricco e protetto fornito dall'ospite.

Negli artropodi i simbionti secondari o facoltativi non hanno una collocazione univoca, ma si localizzano in un gran numero di tessuti e sono capaci di organizzare meccanismi di invasione delle cellule ospiti in maniera simile ai microrganismi patogeni. Tuttavia a differenza di questi ultimi l'associazione con l'ospite è benefica anche se non strettamente necessaria per la sopravvivenza dell'ospite. Questi simbionti possono influenzare positivamente lo sviluppo e la difesa dell'ospite contro i nemici naturali, stimolandone il sistema immunitario, ma sono anche in grado di ostacolare la diffusione dell'insetto agendo sul sistema riproduttivo (Dale e Moran, 2006).

Un'altra categoria di batteri simbionti, generalmente considerata parte dei simbionti secondari, è quella dei manipolatori riproduttivi. Questo gruppo di microrganismi, trasmessi per via transovarica materna è in grado di favorire la produzione di prole femminile anche a discapito di quella maschile, per favorire la propria diffusione. Il più noto manipolatore della riproduzione è l'alfa-Proteobatterio *Wolbachia pipientis*, presente in moltissimi gruppi d'insetti, oltre che in altri artropodi e nematodi. Effetti dello stesso tipo di quelli causati da *Wolbachia* sono prodotti anche da batteri diversi, in particolare dei generi *Cardinium*, *Rickettsia*, *Spiroplasma* e *Arsenophonus*, diffusi in molti insetti. Le strategie attraverso le quali questa manipolazione si verifica sono molteplici. La principale è l'incompatibilità citoplasmatica, attraverso cui gli incroci tra maschi infetti e femmine non infette non danno luogo a prole, mentre gli incroci tra maschi non infetti e femmine infette hanno successo. Tale incompatibilità, che implica lo svantaggio evolutivo delle femmine non infette, è dovuta a fattori citoplasmatici che modificano i cromosomi degli spermatozoi nei maschi, e che permettono il ripristino di questi nell'uovo.

Dato che i fattori di ripristino sono presenti solo nelle femmine infette, le uova di quelle non infette non possono condurre al normale sviluppo di un embrione diploide. Altre strategie di manipolazione riproduttiva sono il *male killing*, che consiste nell'eliminazione della progenie maschile durante l'embriogenesi, o la femminizzazione, che comporta nella progenie lo sviluppo di fenotipo femminile da parte di individui con genotipo maschile, e infine l'induzione di partenogenesi.

Ultima categoria di microrganismi simbiotici è quella dei microrganismi commensali, una miscela di microrganismi, introdotti con l'alimentazione, che transitano nel tratto gastrointestinale. Esempi sono i batteri dei generi *Bacillus* nell'ape da miele e *Enterobacter* in *Limantria dispar*. Le recenti ricerche stanno evidenziando che questi organismi esplicano sottili ancorché importanti effetti sullo sviluppo, la salute e il benessere dell'ospite.

### 3. SIMBIOSI TROFICHE

Un aspetto cruciale che ha guidato l'evoluzione e attualmente rappresenta un'importante forza determinante le relazioni simbiotiche negli insetti e nelle piante è la sostenibilità nutrizionale garantita dall'interazione tra l'ospite e il simbionte microbico. Sono stati descritti numerosi esempi di interazioni trofiche in diversi modelli di simbiosi, sia in insetti che in piante. Relativamente alla presente trattazione ci si riferirà a due modelli specifici, i) i batteri acetici commensali negli insetti e ii) i PGPR nei sistemi radicali vegetali.

#### 3.1 Batteri acetici simbiotici di artropodi e insetti

Le api, le zanzare, i moscerini della frutta, le cicaline e le cocciniglie sono tra i principali insetti per i quali sono stati descritti rapporti simbiotici con i batteri acetici, ma è probabile che il numero delle specie di insetti e artropodi che ospitano tali microrganismi sia molto superiore. Fin dall'inizio del XX secolo era ben noto che i *Gluconobacter*, microrganismi che prediligono gli ambienti ricchi di zucchero, rappresentassero una componente importante nella microflora delle api mellifere (White, 1921), mentre solo recentemente si è scoperta la presenza di batteri acetici simbiotici di zanzare, moscerini della frutta e cicaline.

Simbiosi di recente interesse tra batteri acetici e insetti sono le associazioni che si stabiliscono tra il batterio acetico *Asaia* e le zanzare che trasmettono agenti patogeni quali, tra le altre, *Anopheles stephensi*, *Anopheles maculipennis*,

*Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* (Crotti et al., 2009; Damiani et al., 2008; Favia et al., 2007) e tra *Asaia* e il cicadellide *Scaphoideus titanus*, insetto vettore della Flavescenza Dorata, una fitoplasmosi della vite. Per quanto riguarda le cicaline, già nel 1990 era stata descritta la presenza di batteri acetici nel cicadellide *Perkinsiella saccharidica* (Ashbolt e Inkerman, 1990), nella quale era stata osservata una comunità di batteri acetici con circa 5000 cellule per individuo.

Uno degli habitat principali per i microrganismi associati agli insetti è rappresentato dall'apparato digerente, grazie all'elevata disponibilità di nutrienti derivanti dall'attività di degradazione sia dagli enzimi dell'ospite che dai microrganismi (Dillon e Dillon, 2004). Il microbiota che si sviluppa nell'intestino di un insetto viene inoltre influenzato da fattori strutturali e fisiologici e dalla qualità del cibo ingerito. Questo vale anche per i batteri acetici, ritrovati preferenzialmente associati all'apparato digerente. Tuttavia, questi procarioti sono stati identificati anche sulla superficie degli insetti, come nel caso di *Drosophila melanogaster* (Ren et al., 2007), evidenziando la loro capacità di sopravvivere anche in ambienti più sfavorevoli. Studi precedenti hanno dimostrato che i batteri acetici sono in grado di sopravvivere in ambienti avversi e privi di nutrienti entrando in uno stato vitale ma non coltivabile (definito "viable but not culturable", VBNC) e riducendo la dimensione delle cellule microbiche (Millet e Lonvaud-Funel, 2000).

Poco si conosce dei metodi di trasmissione adottati dai batteri acetici nei loro ospiti. Un'eccezione è rappresentata da *Asaia*, i cui meccanismi di trasmissione sono stati identificati nei suoi principali ospiti (Crotti et al., 2009; Damiani et al., 2008; Damiani et al., 2010; Gonella et al., 2012). Esperimenti di colonizzazione eseguiti con ceppi di *Asaia* in *An. stephensi*, *An. gambiae*, *Ae. aegypti* e *S. titanus* hanno dimostrato la capacità del batterio di colonizzare prontamente, oltre l'intestino e le ghiandole salivari, anche gli organi riproduttori sia maschili che femminili.

Sebbene l'acquisizione ambientale sembra essere la più importante via di trasmissione, anche a causa della natura ubiquitaria del simbionte, è stata dimostrata la presenza di differenti modi con cui *Asaia* viene veicolata alla prole. *Asaia* viene trasmessa per via materna (Favia et al., 2007; Gonella et al., 2012) e per via paterna (Damiani et al., 2008; Gonella et al., 2012) in diversi insetti tra i quali *An. stephensi* e *S. titanus*. Inoltre, attraverso esperimenti di colonizzazione che utilizzano ceppi di *Asaia* marcati con proteine fluorescenti e attraverso analisi di ibridazione *in situ* con sonde fluorescenti (FISH) specifiche per *Asaia*, è stata dimostrata in *S. titanus*, *An. gambiae*, *An. stephensi* e *Ae. aegypti* la trasmissione verticale

del simbiote mediante *egg smearing*, ossia adesione delle cellule batteriche sulla superficie delle uova durante la deposizione (Crotti et al., 2009; Damiani et al., 2010; Gonella et al., 2012). Già nell'ovario le uova sono contaminate sulla superficie dai simbionti. Si presume che successivamente alla schiusa delle uova, i nuovi individui acquisiscano i simbionti consumando e/o sondando la superficie dell'uovo schiuso. Inoltre, durante lo sviluppo delle uova ovariche, è possibile osservare una disposizione sempre più ordinata di biomassa batterica superficiale. Durante gli stadi iniziali dello sviluppo le cellule batteriche del genere *Asaia* appaiono disperse sulla superficie, mentre durante gli stadi finali sembrano principalmente confinate alle regioni apicali.

*Asaia* possiede un altro meccanismo per essere diffusa tra gli insetti, rappresentato dalla trasmissione orizzontale. Il simbiote è infatti in grado di crescere all'esterno dell'insetto ospite e di colonizzare diverse nicchie ambientali, in modo da poter essere successivamente acquisito da altri individui. Attraverso l'impiego di ceppi di *Asaia* marcati con proteine fluorescenti, le zanzare prive di *Asaia* marcata, che condividono lo stesso ambiente nutrizionale con le zanzare esposte ad *Asaia* marcata, vengono presto contaminate dai ceppi marcati.

Inoltre *Asaia* può essere acquisita da insetti che appartengono a ordini e specie filogeneticamente distanti. Analisi PCR qualitative e quantitative e analisi FISH hanno mostrato che ceppi di *Asaia* di *An. stephensi* sono in grado di colonizzare individui di *Ae. aegypti* e della cicalina *S. titanus*. *Asaia* è quindi in grado di dare origine a una colonizzazione incrociata dei diversi insetti ospiti, insediandosi efficacemente nell'intestino, nel sistema riproduttore maschile e femminile e nelle ghiandole salivari, adottando quindi modalità di colonizzazione dei diversi distretti corporei relativamente indipendenti dalle caratteristiche biologiche dell'ospite.

Lo stringente profilo di colonizzazione dei diversi ospiti e la massiva colonizzazione dell'intestino suggeriscono che i batteri acetici abbiano una certa influenza sulle modalità nutrizionali degli insetti ospiti. Sebbene non siano ancora state prodotte prove dirette, batteri acetici come *Asaia* isolata da *An. stephensi* sono in grado di crescere in terreno di coltura minerale privo di vitamine. L'analisi del genoma di *Asaia* e di altri acetici come *Gluconobacter oxydans* ha rivelato che i batteri conservano le vie metaboliche per la sintesi *ex novo* di tutti i nucleotidi, amminoacidi, fosfolipidi e della maggior parte delle vitamine (Prust et al., 2005), supportando i dati sperimentali di auxotrofia e suggerendo che le capacità di sintesi possano essere molto utili a insetti che si nutrono di matrici relativamente incomplete riguardo al pool aminoacidico

o alle vitamine, come la linfa floematica nel caso di *S. titanus* o il sangue nel caso delle zanzare.

### 3.2 *PGPR nei sistemi radicali vegetali*

Le modalità attraverso cui un PGPR è in grado di aumentare lo sviluppo e migliorare lo stato nutrizionale della pianta ospite possono essere categorizzate in quattro tipologie: i) aumento della superficie radicale attraverso modificazione del bilancio ormonale; ii) aumento della disponibilità di nutrienti nella rizosfera; iii) attività di biocontrollo nei confronti di microrganismi deleteri per lo sviluppo vegetale; iv) la combinazione di queste attività. Generalmente, ci si riferisce alle prime due modalità definendole “dirette”, mentre l’antagonismo nei confronti dei patogeni vegetali è classificato come un’attività di promozione di crescita indiretta.

Delle diverse modalità attraverso cui i PGPR possono direttamente stimolare lo sviluppo vegetale, la fissazione dell’azoto atmosferico è una delle più dibattute e meno accreditate, dal momento che, eccezion fatta per gli azoto fissatori simbiotici, la maggioranza dei PGPR con attività nitrogenasica è in grado di rifornire la pianta ospite solo di una piccola percentuale dell’azoto necessario. Quando sono impiegati con piante non leguminose, questi batteri si comportano come endofiti in grado di fornire fino al 60% dell’azoto totale contenuto nei tessuti di piante di canna da zucchero (Boddey, 2001), e al 50% dell’azoto nei tessuti di varietà di riso (Mirza et al., 2000). Questi risultati tuttavia si riferiscono a test effettuati principalmente in condizioni controllate, in camera di crescita o in serra. Quando gli stessi microrganismi vengono saggiati in condizioni di campo, nella maggioranza dei casi si osserva una generale riduzione delle prestazioni e degli effetti benefici sulla pianta ospite (Riggs et al., 2001; Gyaneshwar et al., 2002). Si ritiene quindi che l’attività nitrogenasica possa aiutare il microrganismo a colonizzare più efficacemente e stabilmente la rizosfera.

Anche la produzione di ammoniaca dalla degradazione di altri substrati come le proteine e gli amminoacidi da residui vegetali o animali può influenzare indirettamente la crescita delle piante (Wani et al., 2007).

Alcuni PGPR sono inoltre in grado di produrre siderofori per aumentare la biodisponibilità di ferro per le cellule vegetali. Il ferro è un nutriente essenziale per le piante, ma è relativamente insolubile nel suolo. In questo contesto, i siderofori sono molecole chelanti che agiscono da recettori molecolari in grado di legare e trasportare il ferro. Esistono posizioni scientifiche contrastanti sul contributo dei

siderofori batterici al miglioramento dello stato nutrizionale delle piante: alcuni sostengono che i siderofori batterici offrano solo un piccolo contributo al generico bisogno di ferro da parte della pianta (Glick, 1995), mentre altri gli attribuiscono un ruolo importantissimo (Duijff et al., 1994), addirittura vitale, soprattutto in presenza di suoli calcarei (Masalha et al., 2000). I lavori di ricerca sui siderofori batterici sono rivolti anche allo studio del loro potenziale come agenti di bio-controllo. Essi, infatti, sarebbero in grado di sequestrare il ferro disponibile nella rizosfera, impedendo o rendendo più difficile la proliferazione dei patogeni vegetali che ne subiscono la carenza (Hiifte et al., 1994). Ai siderofori batterici viene anche riconosciuta la capacità di detossificare transitoriamente i suoli contaminati da alcuni metalli pesanti. Oltre al ferro, alcuni siderofori batterici sono infatti in grado di complessare anche il cadmio, un pericoloso e comune contaminante dei suoli, e di favorirne l'accumulo a livello intracellulare (Sinha and Mukherjee, 2007; Kraepiel et al., 2009).

Tra i nutrienti minerali, il fosforo, dopo l'azoto, è uno dei principali fattori limitanti dello sviluppo vegetale. Paradossalmente, i suoli conterebbero abbondanti riserve di fosforo, ma solo una piccola percentuale è biodisponibile per la pianta (Stevenson and Cole, 1999). La bassa disponibilità del fosforo è dovuta al fatto che la maggior parte del fosforo del suolo è in forma insolubile, mentre le piante sono in grado di assorbire solamente le due forme solubili non tossiche, ossia lo ione monoacido ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ), e lo ione biacido ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ) (Glass, 1989). Escludendo i terreni sodici, non interessati dagli usi agricoli, l'assorbimento del fosforo è favorito nei terreni tendenzialmente neutri, mentre nei terreni acidi e basici va incontro a fenomeni di insolubilizzazione (retrogradazione del fosforo) (Glass, 1989). La solubilizzazione del fosforo nella rizosfera è la modalità più comune con cui i PGPR aumentano la disponibilità di nutrienti minerali per la pianta ospite (Richardson, 2001). La produzione di acidi organici e di fosfatasi sono le attività più frequenti per la solubilizzazione del fosforo (Kim et al., 1998).

I batteri promotori della crescita vegetale possono produrre sostanze con attività ormonale per la pianta. Tra queste un ruolo chiave è ricoperto dall'acido 3-indolacetico (IAA), un fitormone appartenente al gruppo delle auxine coinvolto nell'iniziazione delle radici, nella divisione e nell'estensione cellulare (Salisbury, 1994). La produzione di IAA stimola la crescita e l'allungamento delle radici che determina una maggiore superficie di assorbimento e l'accesso a una maggiore quantità di nutrienti dal suolo. Il pathway biosintetico impiegato per la sintesi di IAA può influenzare la capacità di un batterio di promuovere o inibire la crescita vegetale. Sono stati identificati pathway multipli per la biosintesi di IAA, tra cui quelli triptofano-dipendente e -indipendente (Glick et al., 1999). I PGPR sintetizzano IAA principalmente



attraverso la via metabolica triptofano-dipendente, utilizzando l'intermedio dell'acido 3-indolpiruvico (Costacurta et al., 1994; Patten and Glick, 2002; Schutz et al., 2003), mentre nel caso dei batteri fitopatogeni, l'IAA viene prodotto a partire da triptofano preferenzialmente attraverso la formazione dell'intermedio indolacetamide (Liu et al., 1982; White et al., 1991).

I batteri PGPR promuovono indirettamente la crescita vegetale attraverso il biocontrollo dei patogeni. Tale attività dipende dall'azione di uno o più meccanismi contemporaneamente, tra i quali la produzione di antibiotici, il sequestro nella rizosfera di elementi nutritivi fondamentali, la resistenza sistemica indotta, la produzione di enzimi di lisi della parete cellulare fungina e la competizione per i siti di legame sulla radice. Il meccanismo più comunemente associato con la capacità di un ceppo microbico di esercitare attività antagonista nei confronti di un patogeno vegetale è la produzione di uno o più antibiotici (Haas et al., 1991; Keel et al., 1992; Chet and Inbar, 1994; Whipps, 1997). Alcuni PGPR sono in grado di inibire la crescita dei patogeni attraverso la sintesi di siderofori in grado di sequestrare efficacemente il ferro della rizosfera. In tale carenza il patogeno, soprattutto fungino, non riesce a proliferare e non è in grado di colonizzare efficacemente i tessuti radicali (Castignetti and Smarrelli, 1986; O'Sullivan and O'Gara, 1992). Alcuni PGPR con attività di biocontrollo producono enzimi come chitinasi,  $\beta$ -(1,3)glucanasi, proteasi o lipasi, in grado di facilitare la lisi delle pareti fungine (Chet and Inbar, 1994). Altri meccanismi includono l'esclusione competitiva che include la competizione per l'approvvigionamento di nutrienti e per i siti di legame sulla radice (Kloepper et al., 1988; O'Sullivan and O'Gara, 1992; Loper et al., 1997). Infine i PGPR possono contribuire all'induzione nelle piante di una resistenza sistemica duratura e ad ampio spettro nei confronti dei patogeni vegetali (Kessmann et al., 1994; Tuzun et al., 1994; van Loon et al., 1998). La resistenza sistemica acquisita (SAR) e la resistenza sistemica indotta (ISR) sono due forme di resistenza ai patogeni per la cui acquisizione da parte della pianta possono contribuire i PGPR. I PGPR in grado di promuovere la crescita vegetale, e nel contempo in grado di opporsi alla proliferazione di microrganismi deleteri per la pianta, possiedono un valore aggiunto, che può rivelarsi molto utile nelle applicazioni di campo (Raddadi, 2007).

#### 4. SIMBIOSI, SVILUPPO E IMMUNITÀ DELL'OSPITE

È stato evidenziato che negli artropodi i microrganismi simbionti hanno anche importanti ruoli nel completamento dello sviluppo e nell'attivazione del sistema immunitario dell'ospite.

Ad esempio, la rimozione sperimentale del batterio acetico *Asaia* dal suo ospite *An. stephensi* attraverso la somministrazione nella dieta di un antibiotico attivo contro il batterio acetico comporta un ritardo di sviluppo nelle larve (Chouaia et al., 2012). Tale ritardo viene rimosso quando la zanzara è colonizzata da ceppi di *Asaia* antibiotico resistente. Questo esperimento sottolinea che *Asaia* svolge un ruolo importante nello sviluppo dell'insetto, per esempio attraverso l'approvvigionamento di composti essenziali per l'ospite, quali vitamine o amminoacidi essenziali.

Recenti lavori hanno dimostrato che i batteri acetici sono essenziali per lo sviluppo di *D. melanogaster* (Shin et al., 2011). In particolare, quando drosfila *germ-free* veniva allevata con una dieta minima a basso livello di nutrienti l'assenza di uno specifico batterio simbiote, il batterio acetico *Acetobacter pomorum* determinava ritardo nello sviluppo, dimensioni ridotte degli organi fino alla morte dell'animale. Attraverso lo screening di una libreria di mutanti del simbiote sono stati individuati una serie di geni necessari al mantenimento del corretto pattern di sviluppo dell'ospite. Questi geni erano tutti implicati a diversi livelli nel mantenimento della funzionalità dell'alcol deidrogenasi pirrolchinolinchinone-dipendente (PQQ-ADH) che ha come prodotto metabolico l'acido acetico. La somministrazione a drosfila di acido acetico permetteva di ripristinare il corretto pattern di sviluppo. Le ricerche hanno evidenziato che la PQQ-ADH e il suo prodotto, l'acido acetico modulano il *signalling* dell'insulina e l'omeostasi metabolica e dello sviluppo attraverso regolazione del tasso di sviluppo e di accrescimento corporeo, dell'attività delle cellule staminali intestinali e del metabolismo energetico (Shin et al., 2012).

Un altro aspetto dell'interazione ospite simbiote riguarda la regolazione della risposta immunitaria innata dell'ospite. È stato dimostrato che in drosfila il controllo della risposta immunitaria è largamente regolata dai batteri acetici simbiotici che risiedono nell'intestino (Ryu et al., 2008). Cinque specie batteriche dominano l'intestino di drosfila come commensali, tra i quali i batteri acetici *A. pomorum* precedentemente descritto come essenziale per la modulazione del *pathway* di sviluppo, *Commensalibacter intestini* EW911 (Roh et al., 2008) e *Gluconobacter morbifer* EW707, quest'ultimo un patogeno per drosfila (Roh et al., 2008), rispettivamente con cariche cellulari di circa  $10^4$ ,  $10^5$  e 800 unità formanti colonia per intestino. Questi ultimi due batteri e la loro interazione con l'ospite sono essenziali per la regolazione della risposta immunitaria e il mantenimento del corretto equilibrio della flora intestinale. In condizioni normali, la flora intestinale della mosca adulta è sufficiente per sopprimere la crescita del patogeno *G. morbifer* mantenendolo a

un basso livello numerico. Quando il sistema viene perturbato, la crescita nel numero di individui di *G. morbifer* risulta in un effetto di virulenza nei confronti dell'ospite determinando apoptosi nelle cellule epiteliali dell'intestino. In condizioni normali il dialogo tra sistema immunitario e microbioma intestinale consente la dominanza di *A. pomorum* e *C. intestini*, e il conseguente controllo, attraverso esclusione competitiva, dello sviluppo di *G. morbifer*.

Questi recenti studi evidenziano che i simbionti hanno uno strettissimo legame con l'ospite e un'intima relazione che arriva a regolare addirittura il corretto sviluppo e la risposta immunitaria.

## 5. SIMBIOSI E RESISTENZE AGLI STRESS

Oltre a esplicare ruoli essenziali per la biologia degli ospiti, i microrganismi simbionti possono anche determinare ruoli secondari ma assolutamente utili all'ospite per superare diverse condizioni di stress ambientali.

Ad esempio in diversi modelli entomologici alcuni simbionti permettono all'ospite di resistere a parassiti e parassitoidi permettendo una maggiore resistenza. Altri simbionti possono favorire la resistenza dell'ospite a condizioni ambientali difficili come le temperature estreme.

Un ambito in cui i simbionti posso avere un grande interesse è la protezione delle piante dagli stress. Oltre a incrementare lo sviluppo della pianta, i PGPR sono in grado di alleviare l'effetto di diversi stress abiotici, agendo sul bilancio ormonale tramite la riduzione della concentrazione di etilene nei tessuti radicali mediante l'attività dell'enzima 1-aminociclopropano-1-carbossilato (ACC) deaminasi (Brown, 1974; Kloepper et al., 1986; Lambert and Joos, 1989; Glick, 1995; Patten and Glick, 1996). Durante i processi di sviluppo della pianta, l'etilene regola la differenziazione dello xilema, la fioritura e induce la maturazione dei frutti così come l'appassimento dei fiori. Oltre a essere un regolatore di crescita, l'etilene è anche stato riconosciuto come un ormone da stress. In condizioni di stress, come quelle generate da eccessiva salinità, siccità, metalli pesanti e patogeni, la produzione di etilene endogeno viene sostanzialmente accelerata, incidendo negativamente sullo sviluppo delle radici e conseguentemente sul complessivo sviluppo della pianta. Come parte della risposta allo stress, l'etilene inibisce l'allungamento delle radici, la nodulazione e il trasporto delle auxine, induce ipertrofie, accelera l'invecchiamento e promuove la senescenza e l'abscissione fogliare. I PGPR con attività ACC deaminasica sono in grado di promuovere la crescita vegetale anche in condizioni di stress ambientale consumando l'eccesso di etilene

metabolizzando l'ACC, uno dei suoi precursori metabolici, che sarebbe altrimenti destinato a essere trasformato in etilene da stress. In questa situazione le radici continuano a crescere nonostante le difficili condizioni ambientali, aumentando la propria superficie assorbente attraverso la formazione di radici e peli radicali. I batteri con attività ACC deaminasica sono quindi d'interesse nella messa a punto di inoculi fertilizzanti, aprendo nuove possibilità per lo sviluppo di strategie colturali sostenibili che migliorino la resistenza delle piante agli stress abiotici. Dal momento che molti PGPR possiedono contemporaneamente diversi tratti di promozione della crescita vegetale, nella maggior parte dei casi, con l'eccezione di alcuni azoto fissatori simbiotici, l'effetto di promozione non è riferibile a una singola attività, ma all'azione sinergica tra due o più di questi meccanismi (Marasco et al., 2012).

## 6. ESEMPI DI INTERAZIONI SIMBIOTICHE

Gli esempi di interazioni simbiotiche e il loro sfruttamento applicativo sono innumerevoli. Tra i più noti ci sono quelli relativi ai probiotici a uso umano che permettono di migliorare le condizioni intestinali e in definitiva lo stato di salute dell'ospite. Peraltro in pressoché tutte le culture si ritrovano alimenti fermentati con alte cariche di batteri che portano diversi benefici all'intestino e alla salute dell'ospite.

Nel caso degli artropodi interessanti applicazioni si prospettano per sostenere la salute degli insetti impollinatori (Hamdi et al., 2011), in particolare le api che sono andate incontro negli ultimi anni a un impressionante declino le cui cause sono molteplici. In particolare sono state proposte strategie di MRM per la gestione del benessere dell'ape anche attraverso l'impiego di probiotici che possano alleviare l'attacco dei patogeni e parassiti o stimolare il sistema immunitario (Crotti et al., 2012). Da qualche decennio, l'apicoltura si trova ad affrontare importanti perdite economiche in tutto il mondo con gravi conseguenze in molti settori dell'agricoltura. Molta attenzione è stata posta verso un grave fenomeno che causa lo spopolamento degli alveari, il CCD (Colony Collapse Disorder o Collasso della Colonia) (Cox-Foster et al., 2007), in cui le colonie si spopolano improvvisamente. Sebbene una causa univoca e chiara non sia stata ancora individuata e probabilmente il CCD sia determinato da più fattori, ci sono evidenze che un'importante causa sia l'effetto deriva conseguente all'impiego di certi insetticidi che a bassissime dosi determinano effetti di disorientamento sugli adulti che non riescono più a ritrovare gli alveari. In generale la salute delle api è influenzata da fattori abio-

tici, come l'inquinamento ambientale quali le sopra menzionate applicazioni di insetticidi per uso agricolo. Anche stress biotici possono causare perdita di colonie, tra cui infezioni batteriche (per esempio *Paenibacillus larvae*) e funghine (ad esempio *Ascosphaera apis*), agenti patogeni quali i microsporidi (ad esempio, *Nosema apis*), parassiti (ad esempio *Varroa destructor*) e diversi virus. Alla luce di recenti ricerche, la disbiosi intestinale, definita come la disproporzione relativa delle specie del microbioma dell'intestino, ha dimostrato di incidere sulla salute degli animali. Tale effetto appare evidente anche negli artropodi in cui l'alterazione della comunità microbica intestinale è legata allo squilibrio sia dello stato di salute che del benessere, come avviene nella mosca della frutta *Ceratitis capitata* quando è sottoposta ai trattamenti per produrre maschi sterili da impiegare nella tecnica dell'insetto sterile (Ben Ami et al., 2010). È stato ipotizzato che la disbiosi può avere un ruolo importante anche in diverse malattie delle api.

I riscontri ottenuti recentemente da numerosi studi evidenziano il crescente interesse nell'interazione tra pianta e microbioma con attività di promozione della crescita vegetale (PGP). Alcuni studi stanno evidenziando l'interesse di questo tipo di applicazioni dei PGPR anche a diverse piante di grande interesse per l'agricoltura italiana come ad esempio olivo e vite. In particolare, per quest'ultima sono stati recentemente pubblicati alcuni studi che evidenziano le potenzialità di questi microrganismi (Weller et al., 1988). Ad esempio ci sono ampie evidenze che i batteri possano colonizzare i tessuti della vite e prosperare come endofiti nelle radici, nei germogli e nelle foglie (Dong et al., 2001). Rispetto ai batteri rizosferici, gli endofiti sono relativamente protetti dall'ambiente suolo da numerosi stress ambientali (Whipps et al., 2001). Un endofita con attività di promozione della crescita della vite è *Burkholderia phytofirmans* PsJN che riduce i livelli di etilene attraverso l'attività dell'enzima ACC deaminasi. Il ceppo PsJN mostra anche attività di biocontrollo della muffa grigia *Botrytis cinerea* (Ait Barka et al., 2002). Impiegando ceppi marcati con marcatori ottici come GFP (Green Fluorescent Protein) è stato studiato il profilo di colonizzazione di *B. phytofirmans* PsJN, dimostrando come il batterio sia capace di colonizzare stabilmente radici, germogli e foglie di piantine di *Vitis vinifera*. Gli esperimenti hanno indicato che il ceppo PsJN, può invadere i tessuti interni della radice passando tra cellule epidermiche e corticali ed è in grado di raggiungere la parte centrale della radice rompendo la barriera dell'endoderma (Compant et al., 2005). A seguito della colonizzazione della radice, PsJN diffonde nella pianta e colonizza anche steli e foglie.

*B. phytofirmans* PsJN stimola un aumento della resistenza al freddo in piantine di vite inoculate. Le piante batterizzate hanno sviluppato una bio-

massa totale significativamente maggiore rispetto ai controlli sia quando venivano mantenute a 26 che a 4°C. La differenza più significativa nella crescita a 4°C si è riscontrata in particolare in un maggiore sviluppo dell'apparato radicale delle piante batterizzate (Ait- Barka et al., 2006).

I meccanismi che regolano le risposte della pianta quando si verifica l'interazione con i batteri promotori di crescita non sono completamente noti, ma considerata la potenziale importanza applicativa di queste strategie per un'agricoltura sostenibile è necessario approfondire gli studi sulle interazioni tra pianta e simbionte.

## 7. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE

Negli ultimi anni si è sviluppato un interesse sempre maggiore nei confronti delle interazioni tra endosimbionti e insetti e tra batteri rizosferici o endofiti e piante agrarie, in particolare nei confronti del loro potenziale utilizzo, in qualità di agenti di biocontrollo, per poter sviluppare strategie di lotta nei confronti di insetti dannosi per le coltivazioni o nei confronti di quelle malattie trasmesse da insetti all'uomo, agli animali o a differenti colture agrarie, o ancora per garantire una promozione della crescita delle colture agrarie sostenibile ed economica.

I microrganismi simbiotici possono essere utilizzati come diretti antagonisti di agenti patogeni trasmessi dagli insetti, oppure indirettamente sfruttando la loro capacità di agire contro l'ospite artropode, ad esempio alterandone il comportamento riproduttivo. O ancora, i microrganismi possono essere sfruttati per proteggere le colture agrarie dai parassiti minimizzando l'impiego di sostanze chimiche o per alleviare gli stress come lo stress salino o lo stress idrico, quest'ultimo considerato come una delle maggiori minacce per il futuro in conseguenza dell'emergente riscaldamento globale. Anche un minimo effetto di protezione nei confronti dello stress idrico potrebbe portare al risparmio di grandi quantità d'acqua, una materia prima essenziale e sempre più a rischio soprattutto nelle aree soggette a desertificazione (Marasco et al., 2012).

## RINGRAZIAMENTI

Questo lavoro è stato svolto nell'ambito dei progetti FIRB RBIN047MBH "Strategy to improve crop productivity under water stress" (MIUR) e BIO-DESERT "Biotechnology from desert microbial extremophiles for supporting agriculture research potential in Tunisia and Southern Europe" GA-245746

(EU 7<sup>th</sup> Framework Programme CSA-SA REGPOT-2008-2). Elena Crotti ringrazia il supporto del progetto BIOGESTECA (15083/RCC “Fondo per la promozione di accordi istituzionali”). Eleonora Rolli ringrazia Università degli Studi di Milano, il DeFENS, il Fondo Sociale europeo e Regione Lombardia per il supporto nell’ambito del contratto “Dote Ricerca”.

#### RIASSUNTO

Le simbiosi mutualistiche tra organismi eucarioti, quali insetti e piante, e procarioti rappresentano una straordinaria strategia evolutiva per la sopravvivenza e la colonizzazione di nuove nicchie ecologiche. Mentre per i procarioti le simbiosi assicurano un approvvigionamento sicuro di nutrienti, le piante ne beneficiano tramite un miglioramento del proprio bilancio di micro – e macro – nutrienti, come per esempio l’azoto, e un aumento della resistenza agli stress ambientali. Per gli insetti, l’interazione con i procarioti supplisce l’approvvigionamento di sostanze fondamentali per la crescita e lo sviluppo corretto dell’ospite. La conoscenza dei meccanismi molecolari che regolano l’interazione tra microrganismi e ospite è alla base dello sviluppo di strategie di lotta integrata per la promozione della crescita vegetale e il controllo dei patogeni o per il miglioramento della salute degli insetti impollinatori, attraverso un approccio eco-sostenibile.

#### ABSTRACT

Symbiosis established between eukaryotes, such as insects and plants, and prokaryotes, represents an effective evolutionary strategy to ensure survival and the ability to colonize new ecological niches. For prokaryotes, the symbiotic relationships provide nutrients, while plants benefit with an improved budget of micro – and macro – nutrients, such as nitrogen, or with an enhanced tolerance to environmental stresses. In insects, the symbiotic relationships with microorganisms supply for substances that are crucial for host growth and development. The study of mechanisms that rule out the microbe-host interactions represents a key step for the exploitation of eco-friendly strategies for improving pollinators health, plant growth promotion and biocontrol processes against phytopathogens.

#### BIBLIOGRAFIA

- AIT BARKA E., GOGNIES S., NOWAK J., AUDRAN J.C., BELARBI A. (2002): *Inhibitory effect of endophyte bacteria on Botrytis cinerea and its influence to promote the grapevine growth*, «Biology Control», 24, pp. 135-142.
- AIT BARKA E., NOWAK J., CLÉMENT C. (2006): *Enhancement of Chilling Resistance of Inoculated Grapevine Plantlets with a Plant Growth-Promoting Rhizobacterium*, Burkholderia phytofirmans *Strain PsJN*, «Applied Environmental Microbiology», 72, pp. 7246-7252.

- ASHBOLT N. J., INKERMANN P. A. (1990): *Acetic acid bacteria biota of the pink sugar cane mealybug, Saccharococcus sacchari, and its environs*, «Applied Environmental Microbiology», 56, pp. 707-712.
- BEN AMI E., YUVAL B., JURKEVITCH E. (2010): *Manipulation of the microbiota of mass-reared Mediterranean fruit flies Ceratitis capitata (Diptera: Tephritidae) improves sterile male sexual performance*, «ISME Journal», 1, pp. 28-37.
- BODDEY R. M., POLIDORO J. C., RESENDE A. S., ALVES B. J. R., URQUIAGA S. (2001): *Use of the natural abundance technique for the quantification of the contribution of  $N_2$  fixation to sugar cane and other grasses*, «Australian Journal of Plant Physiology», 28, pp. 889-899.
- BROWN M. E. (1974): *Seed and root bacterization*, «Annual Review of Phytopathology», 12, pp. 181-197.
- CASTIGNETTI D., SMARRELLI J. (1986): *Siderophores, the iron nutrition of plants, and nitrate catchment*, «Hydrology Science Journal», 50, pp. 193-206.
- CHET I., INBAR J. (1994): *Biological control of fungal pathogens*, «Applied Biochemistry and Biotechnology», 48, pp. 37-43.
- CHOUAIA B., ROSSI P., EPIS S., MOSCA M., RICCI I., DAMIANI C., ULISSI U., CROTTI E., DAFFONCHIO D., BANDI C., FAVIA G. (2012): *Delayed larval development in Anopheles mosquitoes deprived of Asaia bacterial symbionts*, «BMC Microbiology», 12, pp. Suppl 1-S2.
- COMPANT S., REITER B., SESSITSCH A., NOWAK J., CLEMENT C. AND AIT BARKA E. (2005): *Endophytic Colonization of Vitis vinifera L. by Plant Growth Promoting Bacterium Burkholderia sp. Strain PsJN*, «Applied Environmental Microbiology», 71, pp. 1685-1693.
- COSTACURTA A., KEIJERS V., VANDERLEYDEN J. (1994): *Molecular cloning and sequence analysis of an Azospirillum brasilense indole-3-pyruvate decarboxylase gene*, «Molecular Gene and Genetics», 243, pp. 463-472.
- CROTTI E., DAMIANI C., PAJORO M., GONELLA E., RIZZI A., RICCI I., NEGRI I., SCUPPA P., ROSSI P., BALLARINI P., RADDADI N., MARZORATI M., SACCHI L., CLEMENTI E., GENCHI M., MANDRIOLI M., BANDI C., FAVIA G., ALMA A., DAFFONCHIO D. (2009): *Asaia, a versatile acetic acid bacterial symbiont, capable of cross-colonizing insects of phylogenetically-distant genera and rodersi*, «Environmental Microbiology», 11, pp. 3252-3264.
- CROTTI E., BALLOI A., HAMDI C., SANSONNO L., MARZORATI M., GONELLA E., FAVIA G., CHERIF A., BANDI C., ALMA A., DAFFONCHIO D. (2012): *Microbial symbionts: a resource for the management of insect-related problems*, «Microbial Biotechnology», 5, pp. 307-317.
- COX, C., GILMORE M. (2007): *Native microbial colonization of Drosophila melanogaster and its use as a model of Enterococcus faecalis pathogenesis*, «Infection and Immunity», 75, pp. 1565-1576.
- DALE C., MORAN N.A. (2006): *Molecular interaction between bacterial symbionts and their hosts*, «Cell», 126, pp. 453-465.
- DAMIANI, C., RICCI I., CROTTI E., ROSSI P., RIZZI A., SCUPPA P., ESPOSITO F., BANDI C., DAFFONCHIO D., FAVIA G. (2008): *Paternal transmission of symbiotic bacteria in malaria vectors*, «Current Biology» 18, pp. R1087-R1088.
- DAMIANI C. RICCI I., CROTTI E., ROSSI P., RIZZI A., SCUPPA P., CAPONE A., ULISSI U., EPIS S., GENCHI M., SAGNON N., FAYE I., KANG A., CHOUAIA B., WHITEHORN C., MOUSSA G., MANDRIOLI M., ESPOSITO F., SACCHI L., BANDI C., DAFFONCHIO D., FAVIA G. (2010): *Mosquito-bacteria symbiosis: the case of Anopheles gambiae and Asaia*, «Microbial Ecology», 60, pp. 644-654.



- DILLON R. J., DILLON V. M. (2004): *The gut bacteria of insects: non-pathogenic interactions*, «Annual Review of Entomology», 49, pp. 71-92.
- DONG Z., CANNY M. J., MCCULLY M.E., ROBOREDO M.R., CABADILLA C.F., ORTEGA E. AND RODES R. (1994): *A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems. A new role for the apoplast*, «Plant Physiology», 105, pp. 1139-1147.
- DUIJFF B. J., KOGL W. J., BAKKER P. A. H. M., SCHIPPERS B. (1994): *Influence of pseudobactin 358 on the iron nutrition of barley*, «Soil Biology and Biochemistry», 26, pp. 1681-1688.
- FAVIA G., RICCI I., DAMIANI C., RADDADI N., CROTTI E., MARZORATI M., RIZZI A., URSO R., BRUSETTI L., BORIN S., MORA D., SCUPPA P., PASQUALINI L., CLEMENTI E., GENCHI M., CORONA S., NEGRI I., GRANDI G., ALMA A., KRAMER L., ESPOSITO F., BANDI C., SACCHI L., DAFFONCHIO, D. (2007): *Bacteria of the genus Asaia stably associate with Anopheles stephensi, an Asian malarial mosquito vector*, «Proceedings of the National Academy of Sciences USA», 104, pp. 9047-9051.
- FELDHAAR H., GROSS E R. (2008): *Insects as hosts for mutualistic bacteria*, «International Journal of Medical Microbiology», 299, pp. 1-8.
- GLASS A.D.M. (1989): *Plant Nutrition: An Introduction to Current Concepts*, Jones and Bartlett Publishers, Boston, p. 234.
- GLICK B.R. (1995): *The enhancement of plant growth by free-living bacteria*, «Canadian Journal of Microbiology», 41, pp. 109-117.
- GLICK B.R., HOLGUIN G., PATTEN C. L. (1999): *Genetics and molecular biology of Azospirillum*, «Biology and Fertility of Soils», 29, pp. 10-23.
- GYANESHWAR P., JAMES E.K., REDDY P.M., LADHA J.K. (2002): *Herbaspirillum colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminium-tolerant rice varieties*, «New Phytologist» 154, pp. 131-145.
- GONELLA E., CROTTI E., RIZZI A., MANDRIOLI M., FAVIA G., DAFFONCHIO D., ALMA A. (2012): *Horizontal transmission of the symbiotic bacterium Asaia sp. in the leafhopper Scaphoideus titanus Ball (Euryptera: Cicadellidae)*, «BMC Microbiology», 12, pp. Suppl 1-54.
- HAAS D., KEEL C., LAVILLE J., MAURHOFER M., OBERHANSLI T., SCHNIDER U., VOISARD C., WUTHRICH B., DEFAGO G. (1991): *Secondary metabolites of Pseudomonas fluorescens strain CHAO involved in the suppression of root diseases*, «Advances of Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions», pp. 450-456.
- HAMBDI C., BALLOI A., ESSANAA J., CROTTI E., GONELLA E., RADDADI N., RICCI I., BOUDABOUS A., BORIN S., MANINO A., BANDI C., ALMA A., DAFFONCHIO D., CHERIF A. (2012): *Gut microbiome dysbiosis and honeybee health*, «Journal of applied entomology», 135, pp. 102-106.
- HIIFTE M., VANDE WOESTYNE M., VERSTRAETE W. (1994): *Role of siderophores in plant growth promotion and plant protection by fluorescent pseudomonads*, «In Biochemistry of Metal Micronutrients in the Rhizosphere», pp. 81-92.
- HOFFMEISTER M., MARTIN W. (2003): *Interspecific evolution: microbial symbiosis, endosymbiosis and gene transfer*, «Environmental Microbiology» 5, pp. 641-649.
- KEEL C., SCHNIDER U., MAURHOFER, M., VOISARD C., LAVILLE J., BURGER U., WIRTHNER P., HAAS D., D'EFAGO G. (1992): *Suppression of root diseases by Pseudomonas fluorescens CHAO: importance of the bacterial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol*, «Molecular Plant- Microbe Interaction», 5, pp. 4-13.
- KESSMANN H., STAUB T., HOFMANN C., MAETZKE T., HERZOG J., WARD E., UKNES S., RYALS J. (1994): *Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals*, «Annual Review of Phytopathology», 32, pp. 439-459.

- KIM K. Y., JORDAN D., McDONALD G.A. (1998): *Effect of phosphate solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity*, «Biology and Fertility of the Soils», 26, pp. 79-87.
- KLOEPPER J.W., HUME D.J., SCHER F.M., SINGLETON C. (1988): *Plant growth-promoting rhizobacteria on canola (rapeseed)*, «Plant Disease», 72, pp. 42-47.
- KRAEPIEL M. L., BELLENGER J.-P., ARNAUD-NEU F., ASFARI Z., MYNENI SATISH C. B., STIEFEL EDWARD I. (2007): *Complexation of oxoanions and cationic metals by the biscatecholate siderophore azotochelin*, «Journal of Biological Inorganic Chemistry», 12, pp. 367-376.
- LAMBERT B., JOOS V. (1989): *Fundamental aspects of rhizobacterial plant growth promotion research*, «Trends Biotechnology», 7, pp. 215-219.
- LIU S.T., PERRY K.L., SCHARDL C.L., KADO C.I. (1982): *Agrobacterium Ti plasmid indoleacetic acid gene is required for crown gall oncogenesis*, «Proceedings of the National Academy of Sciences USA», 79, pp. 2812-2816.
- LOPER, J. E., NOWAK-THOMPSON B., WHISTLER C. A., HAGEN M. J., CORBELL N. A., HENKELS M. D., STOCKWELL V. O. (1997): *Biological control mediated by antifungal metabolite production and resource competition: an overview*. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Present Status and Future Prospects, OECE, Paris, pp. 73-79.
- MARASCO R., ROLLI E., ETTOUNI B., VIGANI G., MAPELLI F., BORIN S., ABOU-HADID A., EL-BAHAIRY U., SORLINI C., CHERIF A., ZOCCHI G., DAFFONCHIO D. (2012): *A drought-resistance promoting microbiome is selected by root system under desert farming*, «PLOS ONE», 7,10, pp. e48479- e48479.
- MASALHA J., KOSEGARTEN H., ELMACI Ö., MENGEL K. (2000): *The central role of microbial activity for iron acquisition in maize and sunflower*, «Biology and Fertility of the Soils», 30, pp. 433-439.
- MILLET V.E.A., LONVAUD-FUNEL. (2000): *The viable but non-culturable state of wine microorganisms during storage*, «Letters in Applied Microbiology», 30, pp. 136-141
- MIRZA M. S., RASUL G., MEHNAZ S., LADHA J. K., SO R. B., SIKANDER, AND MALIK KAUSER A. (2000): *Beneficial effects of inoculated nitrogen-fixing bacteria on rice*, «Australian Journal of Plant Physiology» 28 (9), pp. 889-895.
- MORAN N. A., MCCUTCHEON J.P., NAKABACHI A. (2008): *Genomics and Evolution of Heritable Bacterial Symbionts*, «Annual Review of Genetics», 42, pp. 165-190.
- O'SULLIVAN D.J., O'GARA F. (1992): *Traits of fluorescent Pseudomonas spp. involved in suppression of plant root pathogens*, «Microbiological Review», 56, pp. 662-676.
- PATTEN C.L., GLICK B.R. (2002): *Role of Pseudomonas putida indoleacetic acid in development of the host plant root system*, «Applied Environmental Microbiology», 68, pp. 3795-3801.
- PRUST C., HOFFMEISTER M., LIESEGANG H., WIEZER A., FRICKE W. F., EHRENREICH A., GOTTSCHALK G., DEPPENMEIER U. (2005): *Complete genome sequence of the acetic acid bacterium Gluconobacter oxydans*, «Nature Biotechnology», 23, pp. 195-200.
- RADDADI N., CHERIF OUZARI I., MARZORATI M., BRUSETTI L., BOUDABOUS A., DAFFONCHIO D. (2007): *Bacillus thuringiensis beyond insect biocontrol: plant growth promotion and biosafety of polyvalent strains*, «Annals of Microbiology», 57, pp. 481-494.
- REN C., WEBSTER P., FINKEL S. E., TOWER E J. (2007): *Increased internal and external bacterial load during Drosophila aging without life-span trade-off*, «Cell Metabolism», 6, pp. 144-152.
- RICHARDSON A. E. (2001): *Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants*, «Australian Journal of Plant Physiology», 28, pp. 897-906.

- RIGGS P J., CHELIUS M.K., INIGUEZ A.L., KAEPLER S.M., TRIPLETT E.W. (2001): *Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria*, «Australian Journal of Plant Physiology», 28, pp. 829-836.
- ROH S. W., NAM Y.-D., CHANG H.-W., KIM K.-H., KIM M.-S., RYU J.-H., KIM S.-H., LEE W.-J., BAE J.-W. (2008): *Characterization of two novel commensal bacteria involved with innate immune homeostasis in Drosophila melanogaster*, «Applied Environmental Microbiology», 74, pp. 6171-6177.
- RYU J.-H., KIM S.-H., LEE H.-Y., BAI J. Y., NAM Y.-D., BAE J.-W., LEE D. G., SHIN S. C., HA E.- M., LEE W.-J. (2008): *Innate Immune homeostasis by the homeobox gene Caudal and commensal-gut mutualism in Drosophila*, «Science», 319, pp. 777-782.
- SALISBURY F.B. (1994): *The role of plant hormones*, Plant-Environment Interactions. Edizioni R E Wilkinson, New York, USA, pp. 39-81.
- SCHUTZ A., GOLBIK R., TITTMANN K., SVERGUN D.I., KOCH M.H.J., HUBNER G., KONIG S. (2003): *Studies on structure-function relationships of indolepyruvate decarboxylase from Enterobacter cloacae, a key enzyme of the indole acetic acid pathway*, «European Journal of Biochemistry», 270, pp. 2322-2331.
- SINHA, MUKHERJEE. (2007): *Cadmium-Induced Siderophore Production by a High Cd-Resistant Bacterial Strain Relieved Cd Toxicity in Plants Through Root Colonization*, «Current Microbiology», 56, pp. 55-60.
- SHIN S.C., KIM S.H., YOU H., KIM B., KIM A.C., LEE K.A., YOON J.H., RYU J.H., LEE W.J. (2011): *Drosophila microbiome modulates host developmental and metabolic homeostasis via insulin signalling*, «Science», 334, pp. 670-4.
- STEVENSON F.J., COLEMAN A. (1999): *Cycles of Soil: Carbon, Nitrogen, Phosphorus, Sulfur, Micronutrients*, 2nd Edition, Wiley, New York, USA, p. 427
- TUZUN S., KLOPPER J.W., ZEHNDER G.W., WEI G. (1997): *Multiple Disease Protection by Rhizobacteria that Induce Systemic Resistance-Historical Precedence*, «Phytopathology», 87, pp. 136-7.
- VAN LOON C., BAKKER P.A.H. M., PIETERSE C. M. J. (1998): *Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria*, «Annual Review of Phytopathology», 36, pp. 453-83.
- WANI P. A., KHAN M. S., ZAIDI A. (2007): *Plant Growth-Promoting Potentials and Metal Solubilization by Bacillus sp. Isolated from Alluvial Soil*, «Current Microbiology», 54, pp. 237-243.
- WHIPPS, J. M. (1997): *Developments in the biological control of soil-borne plant pathogens*, «Advanced Botany Research», 26, pp. 1-134.
- WELLER D.M. (1988): *Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria*, «Annual Review of Phytopathology», 26, pp. 379-407.
- WHITE, P. B. (1921): *The normal bacterial flora of the bee*, «Journal of Pathology and Bacteriology», 24, pp. 64-78.
- WHITE F., ZIEGLER S.F. (1991): *Cloning of the Genes for Indoleacetic Acid Synthesis from Pseudomonas syringae pv. Syringae*, «Molecular plant microbe interactions», 4, pp. 207-210.
- WILKINSON T.L., FUKATSU T., ISHIKAWA H. (2003): *Transmission of symbiotic bacteria Buchnera to parthenogenetic embryos in the aphid Acyrthosiphon pisum (Hemiptera: Aphidoidea)*, «Arthropod Structure and Development», 32, pp. 241-5.
- XU J., GORDON J.I. (2003): *Honor thy symbionts*, «Proceedings of the National Academy of Sciences of USA», 100, pp. 10452-10459.



## Generalità sulle simbiosi in parassiti e in artropodi vettori, con alcuni riferimenti alle applicazioni in campo medico-veterinario

### INTRODUZIONE

Secondo una visione comune, proposta da diversi libri di testo di parassitologia, la selezione naturale tende a ridurre la virulenza dei parassiti, portando a uno stato di convivenza tra ospite e parassita. In realtà, i biologi evoluzionisti ritengono che la riduzione della virulenza di un parassita possa realizzarsi, ma solo in determinate condizioni ecologiche e in relazione alle caratteristiche del ciclo biologico del parassita e delle modalità attraverso cui il parassita esplica la sua azione patogena. In primo luogo, la modalità di trasmissione dei parassiti è ritenuta essere un fattore determinante nell'evoluzione della virulenza. Ad esempio, si ritiene che la virulenza possa aumentare nei casi in cui ci sia alta probabilità di trasmissione orizzontale del parassita e alta probabilità che un ospite venga infettato contemporaneamente da ceppi diversi del parassita, soprattutto nei casi in cui l'aumento di fecondità e di probabilità di trasmissione a un nuovo ospite implicino un aumento di virulenza. D'altra parte, se i parassiti sono trasmessi verticalmente (dai genitori alla progenie), con bassa o nulla probabilità di trasmissione orizzontale, il successo riproduttivo sia dell'ospite che del parassita sono strettamente collegati, e la selezione dovrebbe favorire ceppi di parassiti più benigni. In queste condizioni, la selezione naturale potrebbe anche promuovere la comparsa di azioni benefiche esercitate dall'agente infettivo ereditario sull'ospite. In questo senso, la trasmissione verticale può essere indicata come uno dei fattori che possono portare allo sviluppo di interazioni mutualistiche. Negli animali, i parassiti e i simbiotici a trasmissione verticale seguono, nella maggior parte dei casi, la via materna

\* *Dipartimento di Scienze Veterinarie e Sanità Pubblica, Università degli Studi di Milano*

(dalla madre alla progenie) e sono, in generale, microrganismi, eucariotici o procariotici; vengono spesso indicati come microrganismi ereditari (per una introduzione ad alcuni aspetti della biologia evoluzionistica delle simbiosi, vedi Bandi et al., 2001).

#### I MICRORGANISMI A TRASMISSIONE EREDITARIA E LA MANIPOLAZIONE DELLA RIPRODUZIONE DEGLI OSPITI

È ovvio aspettarsi che i microrganismi ereditari abbiano interessi in comune con il loro ospite; in realtà, essendo generalmente ereditati per via materna, gli interessi di questi microrganismi coincidono in modo particolare con quelli dell'ospite di sesso femminile. Le pressioni selettive sugli elementi a ereditarietà materna differiscono da quelle sul genoma dell'ospite. In primo luogo, la selezione sui microrganismi ereditari dovrebbe selezionare in modo diretto gli effetti positivi verso il sesso ospitante responsabile della trasmissione (cioè, in generale, le femmine); gli effetti benefici sui maschi potrebbero svilupparsi indirettamente, ma non si ritiene che siano una conseguenza diretta della selezione. Nei fatti, esistono numerosi tipi di simbiosi in cui microrganismi ereditari determinano una riduzione della fitness degli individui non coinvolti nella loro trasmissione (maschi, o anche femmine non infette), contestualmente a un aumento della fitness nelle femmine portatrici. Pertanto, oltre a favorire fenotipi benigni (soprattutto nei confronti degli ospiti responsabili della loro trasmissione, come le femmine infette), la selezione sui microrganismi ereditari può favorire la diffusione di fenotipi che sono dannosi per gli ospiti non coinvolti nella loro trasmissione (maschi o femmine non infette). Pertanto, i microrganismi a trasmissione ereditaria non sono coinvolti solo in forme di simbiosi mutualistica (benefica per l'ospite), ma anche in forme particolari di simbiosi, in cui si assiste a una riduzione della fitness delle femmine non infette (attraverso il fenomeno dell'incompatibilità citoplasmatica), o ad alterazioni del rapporto sessi a favore delle femmine (attraverso fenomeni di partenogenesi, morte di embrioni maschili, o sviluppo in senso femminile di maschi genetici). I microrganismi ereditari in grado di esercitare questi effetti sugli ospiti vengono indicati come manipolatori (o parassiti) della riproduzione. I microrganismi manipolatori della riproduzione sono diffusi nel phylum degli artropodi, e vengono studiati in modo particolare negli insetti, anche in relazione alle loro potenzialità applicative. Fra i diversi manipolatori della riproduzione il più noto è probabilmente *Wolbachia*, un batterio intracellulare dell'ordine Rickettsiales, diffuso negli artropodi e in alcune linee

filogenetiche di nematodi, fra cui le filarie. *Wolbachia* ha attirato l'attenzione della ricerca applicata per diverse ragioni. In primis, è in grado di determinare incompatibilità citoplasmatica, una sorta di sterilizzazione delle femmine non infette nella popolazione ospite, innescata dall'accoppiamento con maschi infetti. La sterilizzazione (o comunque la ridotta fecondità) delle femmine non infette implica un più alto tasso riproduttivo per le femmine infette, dal che deriva la diffusione di *Wolbachia* nella popolazione ospite (garantita dalla trasmissione verticale). *Wolbachia* è quindi in grado di diffondersi nelle popolazioni degli insetti ospiti. Laddove l'infezione di un insetto da parte di *Wolbachia* sia associata a effetti utili dal punto di vista applicativo (ad esempio una riduzione della capacità vettoriale nei confronti di patogeni animali o vegetali), possono derivare interessanti ricadute applicative. Ne è un esempio una nuova strategia sviluppata in Australia per il controllo del Dengue, attraverso la diffusione di *Wolbachia* nelle popolazioni di zanzare (Hoffman et al., 2011). Un altro effetto determinato da *Wolbachia* che potrebbe essere utilizzato a fini applicati è l'induzione della partenogenesi telitoca: le vespe parassitoidi utilizzate nel biocontrollo potrebbero essere rese partenogenetiche attraverso l'infezione da parte di *Wolbachia*, con generazione di popolazioni interamente femminili (e quindi senza maschi, di per sé inutili ai fini delle applicazioni nel biocontrollo). Per una rassegna della letteratura relativa agli argomenti trattati in questo paragrafo, vedi Bandi et al. (2001).

#### SIMBIOSI MUTUALISTICHE NEGLI INSETTI EMATOFAGI

Diversi artropodi di interesse medico-veterinario, siano essi vettori di agenti patogeni o semplici parassiti ematofagi, vivono in simbiosi con microrganismi che incidono fortemente sulla loro biologia. Nel paragrafo precedente ci siamo concentrati su simbionti a trasmissione ereditaria in grado di manipolare la riproduzione degli ospiti. Nei due paragrafi seguenti tratteremo alcuni esempi di simbiosi in insetti ematofagi, vettori di importanti malattie degli animali e dell'uomo. In generale si ritiene che le simbiosi di tipo mutualistico siano particolarmente diffuse in animali la cui dieta sia sbilanciata, ad esempio dal punto di vista della composizione amminoacidica, o per quanto riguarda carenze di vitamine/cofattori. Secondo l'interpretazione corrente, i simbionti degli insetti ematofagi avrebbero un ruolo importante nella produzione di vitamine di cui il sangue è carente, ad esempio vitamine del gruppo B. In questo senso i simbionti mutualistici sarebbero particolarmente utili per insetti la cui dieta sia esclusivamente ematofaga. I pidocchi dell'uomo,

ad esempio, sono ematofagi a livello di tutti gli stadi vitali, e vivono in simbiosi obbligata con batteri del genere *Riesia*. Questi batteri, trasmessi per via materna alla progenie, avrebbero un ruolo importante nella produzione di molecole necessarie all'insetto ospite. L'essenzialità di questa simbiosi nel pidocchio è tale che, secondo dati pur aneddotici ottenuti da pazienti umani, la somministrazione di antibiotici attivi sul simbionte porterebbe alla risoluzione dell'infestazione (per una rassegna della letteratura relativa alla simbiosi nei pidocchi, vedi Perotti et al., 2009). In altre specie di insetti in cui il ciclo biologico prevede stadi vitali non dipendenti dall'alimentazione ematofaga, ad esempio in insetti olometaboli quali i ditteri, o comunque in insetti emimetaboli che non siano esclusivamente ematofagi, l'associazione simbiotica può presentarsi in forme meno integrate rispetto a quanto osservato negli ematofagi obbligati.

#### *RHODOCOCCUS*, SIMBIONTE DELLE CIMICI TRIATOMINAE

La sottofamiglia Triatominae della famiglia Reduviidae (Rhynchota) include le cimici ematofaghe dei generi *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus*, che sono i principali vettori del protozoo *Trypanosoma cruzi*, l'agente eziologico della malattia di Chagas (Vallejo et al., 2009). Le triatomine sono fondamentali nel ciclo di vita di *T. cruzi*, sia per il loro ruolo vettoriale, sia come stazione di moltiplicazione di questo parassita. Queste cimici consumano il loro pasto di sangue soprattutto di notte, o comunque quando l'ospite sta dormendo. Se l'ospite è infetto, la cimice può acquisire il protozoo, permettendo a esso di moltiplicarsi e di completare il suo ciclo di vita e di essere rilasciato con le feci. Durante il pasto di sangue la cimice tende infatti a defecare, e può quindi contaminare la cute dell'ospite. Grazie alla loro motilità flagellare i tripanosomi presenti nelle feci possono raggiungere le microlesioni causate dal morso della cimice, o penetrare attraverso le mucose, o attraverso microlesioni generate dal grattamento. Oltre ad acquisire tripanosomi attraverso il pasto di sangue, le cimici triatomine possono infettarsi attraverso il consumo di feci infette depositate da altre cimici, o attraverso il cannibalismo.

Le triatomine generalmente infestano baracche e case mal costruite, e questo rende la malattia di Chagas endemica nelle zone rurali e povere del Centro e Sud America, dove si stima che siano infette 8-11 milioni di persone; più di 90 milioni sarebbero a rischio di contrarre l'infezione (WHO 2012). Il Chagas è una malattia cronica con un corso altamente invalidante, che porta all'insorgenza di alterazioni al sistema cardiovascolare (e.g. cardiomiopatia di-



latativa), digestivo (e.g. mega-esofago e mega-colon) e del sistema nervoso. La malattia causa una grave disabilità e una riduzione significativa dell'aspettativa di vita dei pazienti. *T. cruzi* ha una bassa specificità d'ospite: può infettare diversi specie di animali (cane, opossum, armadillo, ecc.), che rappresentano il serbatoio della malattia. Si tratta quindi di una tipica zoonosi di interesse sia medico che veterinario, la cui eradicazione risulta difficilmente realizzabile (Rabinovich et al., 2011). Per questi motivi, il controllo della malattia di Chagas può essere raggiunto solo attraverso la progettazione di un approccio integrato che preveda azioni per contenere le popolazioni di insetti e per ridurre le loro capacità vettoriali.

La comunità microbica dell'intestino delle cimici triatomine è stata studiata per oltre cinquanta anni (Baines, 1956). Di particolare interesse sono i batteri del genere *Rhodococcus* (ad esempio *R. rhodnii*, *R. corynebacteroides*, *R. triatomae*), che si ritiene diano un contributo importante per il metabolismo degli insetti, ad esempio attraverso la sintesi di vitamine del gruppo B, carenti nel sangue (Beard et al., 1992). La prima fase ninfale della cimice è priva di simbionti (aposimbiotica), che sono poi acquisiti tramite coprofagia, che permette quindi di acquisire sia i simbionti rilasciati da altri insetti, sia, quando presenti, i tripanosomi.

Il sistema simbiotico triatomine-*Rhodococcus* è particolarmente interessante per lo sviluppo di una strategia di controllo della tripanosomiasi di tipo paratransgenico (Beard et al., 1992). L'approccio paratransgenico prevede la manipolazione genetica di un simbionte associato a un determinato vettore di una malattia infettiva, al fine di rendere il simbionte ingegnerizzato capace produrre molecole che interferiscano con l'agente infettivo. *Rhodococcus* può infatti essere coltivato in terreni acellulari e geneticamente modificato per esprimere stabilmente proteine che esercitano azioni dannose nei confronti di *T. cruzi*. Inoltre, simbionti e tripanosomi colocalizzano nell'intestino dell'insetto vettore, e il metodo naturale di acquisizione dei simbionti attraverso l'ingestione di materiale fecale ha permesso di prevedere una strategia per favorire l'ingestione dei batteri geneticamente modificati da parte dell'insetto, attraverso pellets di materiale organico.

Il primo passo verso l'applicazione di questa strategia è stata la dimostrazione della possibilità di ridurre la carica batterica nell'intestino di cimici "wild-type" mediante l'inclusione di antibiotici nei pellets, e quindi di promuovere la colonizzazione da parte di batteri resistenti agli antibiotici, tramite alimentazione delle cimici con pellets contenenti i batteri resistenti (Beard et al., 1992). Il passo successivo è stato quello di alimentare le cimici con batteri antibiotico-resistenti geneticamente manipolati per essere in grado

di produrre fattori anti-tripanosoma (ad esempio cecropina A; Durvasula et al., 1997). Questo ha permesso di ottenere la colonizzazione dell'insetto con batteri "tossici" per il protozoo, riducendo in modo significativo la capacità vettoriale degli insetti. Gli studi su questo sistema sono continuati nel corso degli anni, con la determinazione dell'efficacia di diverse molecole anti-tripanosoma (apidaecina, magainina II, melittina), ma anche attraverso la creazione di pellets "anti-tripanosoma" utilizzabili in esperimenti di campo (Cruziguard<sup>®</sup>; Hurwitz et al., 2011). Ad oggi, non è ancora possibile lanciare campagne su larga scala per il controllo della malattia di Chagas utilizzando questa strategia, ma i risultati pubblicati sono certamente incoraggianti, e rendono il modello simbiotico triatomine-*Rhodococcus* uno dei sistemi di controllo mediante paratransgenesi più avanzati e più vicini all'applicazione.

#### I SIMBIONTI DELLE MOSCHE TSE-TSE: *WIGGLESWORTHIA* E *SODALIS*

Le mosche appartenenti al genere *Glossina* (Diptera: Glossinidae) sono vettori delle tripanosomiasi africane, la cui forma più nota è la malattia del sonno dell'uomo. Negli esseri umani, questa malattia è causata da protozoi appartenenti a due sottospecie di *Trypanosoma brucei*. Il *T. b. rhodesiense* (malattia del sonno dell'Africa orientale) è localizzato principalmente nella parte orientale e sud-orientale dell'Africa, dove ogni anno causa centinaia di nuovi casi umani. La maggior parte dei casi di malattia del sonno, circa 7.000-10.000 nuovi casi per anno, sono causati dalla seconda sottospecie, il *T. b. gambiense* (malattia del sonno dell'Africa centro-occidentale; Malvy e Chappuis, 2011). Inoltre, i tripanosomi della sottospecie *T. b. brucei* sono gli agenti eziologici di una malattia di grande importanza in ambito veterinario, il nagana. Questa malattia colpisce i bovini e altri ruminanti, e rende l'allevamento di questi animali virtualmente impossibile in vaste zone dell'Africa centrale, con gravissime conseguenze socio-economiche (Jordan, 1986).

Le malattie causate dai tripanosomi del gruppo *T. brucei* (con l'eccezione di *T. b. rhodesiense* nell'uomo) progrediscono in genere lentamente, portando a quadri cronici caratterizzati da profonda alterazione della risposta immunitaria (da cui possono derivare infezioni secondarie/opportunistiche) e da un quadro di risposta infiammatoria a livello del sistema nervoso centrale, con eventuali danni a livello della guaina mielinica. Nell'uomo, dopo una prima fase della durata di 1-2 anni, la malattia del sonno progredisce, coinvolgendo il sistema nervoso centrale, portando a cambiamenti di personalità, sonnolenza diurna, alterazioni del ciclo veglia/sonno, e progressiva confusione, fino

alla possibile morte del paziente (Malvy e Chappuis, 2011). Nelle mandrie di animali infettati il nagana porta a significative riduzioni di produttività e di fertilità.

Le glossine, note anche come mosche tse-tse, pungono durante le ore diurne; sia il maschio che la femmina possono trasmettere il *Trypanosoma*. Nella savana dell'Africa orientale le glossine vivono prevalentemente nelle zone rurali, nei boschi e nelle zone ricche di cespugli. Nell'Africa centrale e occidentale, questi ditteri vivono nelle foreste e vicino ai margini dei fiumi.

La mosca tse-tse ospita due distinte popolazioni di batteri simbiotici: un simbiote primario (e quindi necessario per la sopravvivenza della mosca) chiamato *Wigglesworthia* e un simbiote secondario appartenente al genere *Sodalis*. I batteri del genere *Wigglesworthia* vivono all'interno di cellule specializzate (chiamate batteriociti) che insieme formano un organo (batterioma) situato nell'intestino. Ogni batterioma contiene circa 100 milioni di cellule di *Wigglesworthia* che popolano il citoplasma dei batteriociti. La funzione principale di questo simbiote può essere meglio compresa se si considera la particolare forma di riproduzione della mosca tse-tse. Le glossine sono infatti vivipare e la femmina produce un solo uovo, che trattiene all'interno dell'utero, dove la larva si sviluppa fino al terzo stadio di sviluppo. Al termine dello sviluppo larvale, la femmina depone una larva matura che si trasforma in pupa. Lo sviluppo intrauterino della larva è reso possibile dalla disponibilità di vitamine/cofattori prodotti dal simbiote primario, *Wigglesworthia*, che vengono utilizzati dalla larva grazie alle secrezioni della ghiandola del latte.

Ad oggi, sono stati sequenziati i genomi di due specie di questo simbiote, *W. glossinidia* e *W. morsitans* (Akman et al., 2002; Rio et al., 2012); presentano molte caratteristiche interessanti, la maggior parte delle quali comuni a entrambe le specie. I genomi hanno una dimensione di circa 700 Kb. Nonostante le ridotte dimensioni, il genoma di *Wigglesworthia* contiene oltre 60 geni necessari per sintetizzare una notevole varietà di vitamine, essenziali per integrare la dieta dell'ospite, qualitativamente carente. Un'altra prova indiretta del rapporto di mutualista obbligato di *Wigglesworthia* verso *Glossina* può essere ottenuta con ceppi aposimbiotici (cioè privi di simbiotici), ottenuti trattando l'insetto con antibiotici. Le mosche private dei loro simbiotici primari mostrano un ritardo nello sviluppo e una riduzione quasi totale dell'attività riproduttiva (Nogge, 1976). Questa situazione può essere in parte risolta alimentando le mosche aposimbiotiche con un pasto di sangue addizionato con vitamine del gruppo B (Nogge, 1981).

Il simbiote secondario delle glossine è il batterio *Sodalis glossinidius*. Questo simbiote colonizza l'intestino, i muscoli, i corpi grassi, l'emolinfa,

la ghiandola del latte e le ghiandole salivari (Dale et al., 2001). I meccanismi della relazione simbiotica di *Sodalis* con *Glossina* non sono ancora chiari: si tratterebbe di una situazione al limite tra commensalismo e simbiosi mutualistica facoltativa. Infatti, l'eliminazione di questo simbionte non produce alcuna riduzione significativa della capacità riproduttiva e di sviluppo delle mosche tse-tse. La presenza di *Sodalis* non risulta quindi essere essenziale per l'ospite (a differenza *Wigglesworthia*). *S. glossinidius* viene coltivato in vitro ed è stato possibile produrre ceppi ricombinanti in grado di esprimere la proteina verde fluorescente (GFP) come marcatore. Questi batteri marcati, iniettati nell'emolinfia di femmine gravide, sono stati acquisiti dalla larva intrauterina e quindi trasmessi alla generazione successiva, continuando a esprimere il marcatore GFP anche negli adulti (Weiss et al., 2006). Sono in atto progetti finalizzati a generare ceppi del simbionte capaci di interferire con lo sviluppo dei tripanosomi responsabili della malattia del sonno e del nagana. Ad esempio, *S. glossinidius* è stato modificato geneticamente per l'espressione di un anticorpo anti-*Trypanosoma* a singolo dominio diretto verso la proteina variante di superficie del parassita (De Vooght et al., 2012). La riduzione della capacità di trasmissione del tripanosoma attraverso un approccio di tipo paratransgenico rappresenterebbe un'importante strategia di controllo, che potrebbe integrare quelle già esistenti (tecnica dell'insetto sterile, trappole a feromoni, insetticidi, ecc.) nelle zone in cui la malattia del sonno e il nagana sono endemiche.

#### LA SIMBIOSI DI *WOLBACHIA* CON I NEMATODI FILARIDI

I nematodi filaridi sono importanti parassiti dell'uomo e degli animali. Nell'uomo sono responsabili di malattie tropicali altamente invalidanti, come l'elefantiasi (causata da *Wuchereria bancrofti* e *Brugia malayi*) e la cecità dei fiumi (*Onchocerca volvulus*). Nel cane, anche nelle aree a clima temperato, *Dirofilaria immitis* causa la filariosi cardiopolmonare, malattia che può portare a una significativa riduzione dell'aspettativa di vita dell'animale (la malattia può interessare anche il gatto, seppur con minore frequenza). Diversi nematodi filaridi, fra cui *O. volvulus*, *W. bancrofti*, *B. malayi*, *Mansonella* spp. e *D. immitis*, ospitano batteri simbiotici intracellulari del genere *Wolbachia*. Studi di microscopia elettronica hanno mostrato la presenza di *Wolbachia* nel citoplasma delle cellule delle corde laterali sia dei maschi che delle femmine (Sironi et al., 1995). Nelle femmine di filaria, i batteri sono altresì presenti negli oogoni, negli oociti e negli embrioni; *Wolbachia* è stata anche osservata

nelle microfilarie e nelle larve all'interno degli insetti vettori. Il batterio risulta quindi trasmesso alla progenie per via transovarica (Bandi et al., 2001b).

Il trattamento con antibiotici come tetracicline e rifampicina, noti per essere attivi su tutte le rickettsiae inclusa la *Wolbachia* degli insetti, determina effetti deleteri sulle filarie associate in simbiosi con *Wolbachia*. Da una parte, il trattamento antibiotico porta a una significativa riduzione del carico in *Wolbachia* nel corpo del nematode. D'altra parte il nematode filaride sottoposto a trattamento antibiotico presenta un blocco dell'embrionogenesi e un blocco dello sviluppo da larva ad adulto. Inoltre, pur a distanza di settimane/mesi dal trattamento, i vermi adulti esposti all'antibiotico vanno incontro a morte (Bandi et al., 2001b). Questi studi indicano che la simbiosi tra *Wolbachia* e filarie sarebbe di tipo obbligato, soprattutto se si considera che trattamenti con i medesimi antibiotici effettuati su filarie prive di *Wolbachia* (come *Acanthocheilonema viteae*) non portano ad alcun effetto negativo sulle filarie (Bandi et al., 2001b). Per queste ragioni, *Wolbachia* è stata presa in considerazione come un target estremamente interessante per la cura delle più gravi forme di filariosi dell'uomo e degli animali.

#### RIASSUNTO

La simbiosi è un fenomeno biologico diffuso, ed è un importante forza evolutiva, che nel corso della storia ha modellato gli organismi, portando a sviluppi che non sarebbero spiegabili attraverso i modelli della teoria sintetica dell'evoluzione, ad esempio l'origine della cellula eucariotica. Le simbiosi sono osservate in tutti i gruppi di eucarioti, inclusi i diversi parassiti unicellulari e pluricellulari di piante e animali. Questo articolo è focalizzato sulla descrizione di alcuni esempi di simbiosi in parassiti e insetti vettori di interesse medico-veterinario, e sulle possibili strategie di controllo basate sull'utilizzo di organismi simbiotici, o sulla manipolazione del sistema ospite/simbionte nel suo complesso.

#### ABSTRACT

Symbiosis is a widespread biological phenomenon, and is an important evolutionary mechanism, that, during the history of life, has lead to major transitions, such as the origin of eukaryotic cell. Symbiotic associations are observed in all eukaryotic groups, from protists to higher metazoans, including unicellular and pluricellular parasites of plants and animals. This review is focussed on the description a few examples of symbiotic association in insect vectors and parasites of medical and veterinary importance, and on the possible strategies to exploit the symbionts for the control of human and animal diseases.

## BIBLIOGRAFIA

- AKMAN L., YAMASHITA A., WATANABE H., OSHIMA K., SHIBA T., HATTORI M., et al. (2002): *Genome sequence of the endocellular obligate symbiont of tsetse flies*, *Wigglesworthia glossinidia*, «Nature Genetics», 32, pp. 402-407.
- BAINES S. (1956): *The role of the symbiotic bacteria in the nutrition of Rhodnius prolixus*, «Journal of Experimental Biology», 33, pp. 533-541.
- BANDI C., DUNN A.M., HURST G.D., RIGAUD T. (2001): *Inherited microorganisms, sex-specific virulence and reproductive parasitism*, «Trends in Parasitology», 17, pp. 88-94.
- BANDI C., TREES A.J., BRATTIG N.W. (2001): *Wolbachia in filarial nematodes: evolutionary aspects and implications for the pathogenesis and treatment of filarial diseases*, «Veterinary Parasitology», 12, pp. 215-238.
- BEARD C.B., MASON P.W., AKSOY S., TESH R.B., RICHARDS F.F. (1992): *Transformation of an Insect Symbiont and Expression of a Foreign Gene in the Chagas' Disease Vector Rhodnius Prolixus*, «American Journal of Tropical Medicine and Hygiene», 46, pp. 195-200.
- DALE C., TOUNG S.A., HAYDON D.T., WELBURN S.C. (2001): *The insect endosymbiont Sodalis glossinidius utilizes a type III secretion system for cell invasion*, «Proceedings of the National Academy of Science USA», 13, pp. 1883-8.
- DE VOOGHT L., CALJON G., STIJLEMANS B., DE BAETSELIER P., COOSEMANS M., VAN DEN ABEELE J. (2012): *Expression and extracellular release of a functional anti-trypanosome Nanobody® in Sodalis glossinidius, a bacterial symbiont of the tsetse fly*, «Microbial Cell Factories», 15 pp. 11-23.
- DURVASULA R.V., GUMBS A., PANACKAL A., KRUGLOV O., AKSOY S., MERRIFIELD R.B., RICHARDS F.F., BEARD C.B. (1997): *Prevention of insect-borne disease: an approach using transgenic symbiotic bacteria*, «Proceedings of the National Academy of Science USA», 94, pp. 3274-3278.
- HOFFMANN A.A., MONTGOMERY B.L., POPOVICI J., ITURBE-ORMAETXE I., JOHNSON P.H., et al. (2011): *Successful establishment of Wolbachia in Aedes populations to suppress dengue transmission*, «Nature», 476, pp. 454-7.
- HURWITZ I., FIECK A., READ A., HILLESLAND H., KLEIN N., KANG A. et al. (2007): *Para-transgenic control of vector borne diseases*, «International Journal of Biological Sciences», 7, pp. 1334-1344.
- JORDAN A.M. (1986): *Trypanosomiasis Control and African rural Development*, Longman, London.
- MALVY D., CHAPPUIS F. (2011): *Sleeping sickness*, «Clinical Microbiology and Infections», 17, pp. 986-95.
- NOGGE G. (1976): *Sterility in tsetse flies (Glossina morsitans Westwood) caused by loss of symbionts*, «Experientia», 32, pp. 995-996.
- NOGGE G. (1981): *Significance of symbionts for the maintenance of an optimal nutritional state for successful reproduction in haematophagous arthropods*, «Parasitology», 82, pp. 101-104.
- PEROTTI M.A., KIRKNESS E.F., REED D.L., BRAIG H.R. (2009): *Endosymbionts of lice*. In: *Insect Symbiosis Volume 3*. Editors Bourtzis K. & Miller T. CRC Press, Boca Raton (FL), pp. 205-219.
- RABINOVICH J.E., KITRON U.D., OBED Y., YOSHIOKA M., GOTTDENKER N., CHAVES

- L.F. (2011): *Ecological patterns of blood-feeding by kissing-bugs* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), «Memórias do Instituto Oswaldo Cruz», 106, pp. 479-494.
- RIO R.V., SYMULA R.E., WANG J., LOHS C., WU Y.N., SNYDER A.K., et al. (2012): *Insight into the transmission biology and species-specific functional capabilities of tsetse* (Diptera: Glossinidae) *obligate symbiont* Wigglesworthia, «Mbio», 3 (1) e00240-11.
- SIRONI M., BANDI C., SACCHI L., DI SACCO B., DAMIANI G., GENCHI C. (1995): *Molecular evidence for a close relative of the arthropod endosymbiont Wolbachia in a filarial worm*, «Molecular and Biochemical Parasitology», 74, pp. 223-227.
- VALLEJO G.A., GUHL F., SCHAUB G.A. (2009): Triatominae-Trypanosoma cruzi/T. rangeli: *Vector-parasite interactions*, «Acta Tropica», 110, pp. 137-147.
- WEISS B.L., MOUCHOTTE R., RIO R.V., WU Y.N., WU Z., HEDDI A, et al. (2006): *Inter-specific transfer of bacterial endosymbionts between tsetse fly species: infection establishment and effect on host fitness*, «Applied and Environmental Microbiology», 72, pp. 7013-7021.
- WHO (2011): *Chagas disease: control and elimination. Report by the Secretariat. Sixty-second World Health Assembly*: WHO [cited 2011 Nov 12], Available from: [http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf\\_files/A62/A62\\_17-en.pdf](http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/A62/A62_17-en.pdf).





## Simbiosi negli artropodi e potenziali applicazioni

### INTRODUZIONE

#### *L'importanza dei simbionti nell'ecologia ed evoluzione degli artropodi*

La simbiosi con microrganismi è molto diffusa nel regno animale e vegetale, e l'importanza delle comunità microbiche associate a piante e animali è da tempo ampiamente riconosciuta. Gli artropodi sono tra gli organismi che più hanno beneficiato delle simbiosi microbiche, che possono essere considerate all'origine dell'enorme successo evolutivo di questo *phylum*. Gli artropodi, infatti, si sono dimostrati capaci di colonizzare una moltitudine di nicchie ecologiche anche grazie all'apporto dei propri simbionti. Le peculiarità delle simbiosi negli artropodi, se paragonate a quelle in altri organismi, come nel caso dei mammiferi, sono rappresentate da una relativa semplicità dei microbiota, composti da un numero limitato di specie microbiche rispetto a quelli riscontrati nei mammiferi, e dalla presenza di simbionti intracellulari, spesso localizzati in organi deputati a ospitarli, detti batteriomi. D'altro canto, il ridotto numero di specie microbiche che compongono le singole comunità è controbilanciato dall'elevata biodiversità degli artropodi rispetto ai mammiferi. Questo determina una maggiore variabilità di *taxa* che si possono ritrovare nei primi se paragonati ai secondi (Douglas, 2011).

Il ruolo di queste simbiosi è di tale rilevanza da influenzare la biologia, l'ecologia e l'evoluzione degli artropodi in maniera determinante, fino a rendere necessario considerare il sistema ospite-microbioma come un unico organismo dinamico, detto olobionte. Il materiale genetico relativo all'insieme degli

\* DISAFA, Università degli Studi di Torino

organismi che compongono l'olobionte è detto ologenoma, le cui caratteristiche (genetiche ed epigenetiche) e modificazioni nel tempo sono determinate da ciascun elemento del consorzio con un'influenza reciproca. Inoltre, la trasmissione verticale dell'ologenoma in evoluzione permette il mantenimento dei cambiamenti del fenotipo dell'olobionte, mentre la trasmissione orizzontale consente l'immissione di nuovo materiale genetico che arricchisce l'ologenoma (Rosemberg e Zilber-Rosemberg, 2011). Il trasferimento genico orizzontale dal simbionte all'ospite, osservato ad esempio in diversi insetti per *Wolbachia pipientis*, può condurre a un ulteriore arricchimento dell'ologenoma, fornendo potenziali nuove funzioni genetiche anche a individui non infettati da un determinato ceppo batterico; tuttavia non è attualmente chiara l'effettiva funzionalità dei geni inseriti nel genoma dell'ospite (Dunning Hotopp et al., 2007).

I batteri, i simbionti meglio conosciuti degli artropodi, apportando materiale genetico e processi metabolici all'olobionte possono fornire nuove caratteristiche all'ospite, influenzandone importanti tratti biologici ed ecologici. È nota la capacità dei batteri simbionti di facilitare negli ospiti la colonizzazione di nuove nicchie alimentari, di proteggere da patogeni o parassitoidi, di alterare il comportamento dell'artropode (Feldhaar, 2011). Queste funzioni traggono origine dalla necessità di mantenere l'associazione nel tempo, migliorando la fitness dell'ospite oppure impedendo lo sviluppo degli individui non infetti (Brownlie e Johnson, 2009). Il ruolo delle simbiosi batteriche nel miglioramento della fitness è di particolare rilevanza nel caso degli artropodi dannosi, a causa dell'effetto che queste possono avere sulla capacità invasiva dell'ospite (Feldhaar, 2011).

Il rifornimento in nutrienti può essere considerato tra le principali funzioni dei batteri simbionti degli artropodi. Molto studiati sono i casi degli insetti che si nutrono su substrati poveri in alcuni nutrienti, come la linfa delle piante, la cellulosa o il sangue. Ad esempio alcuni simbionti sono in grado di utilizzare composti dell'azoto non metabolizzabili direttamente dall'ospite, rendendoli in seguito disponibili per l'insetto. In altri casi i batteri simbionti forniscono all'ospite amminoacidi essenziali, steroli o vitamine naturalmente assenti nella dieta. Sono inoltre noti esempi di simbiosi nelle quali il partner microbico fissa l'azoto atmosferico, tuttavia la loro utilità per l'ospite non è al momento chiara, dato che l'ammonio, il prodotto finale della fissazione, è di per sé tossico per l'insetto. Oltre a fornire elementi non presenti nella dieta degli ospiti, i simbionti possono degradare substrati complessi, come la cellulosa, o contribuire alla detossificazione da composti secondari nocivi presenti nei substrati alimentari (Douglas, 2009). Da un punto di vista eco-

logico, l'apporto nutrizionale dato dai microrganismi simbiotici è in primo luogo responsabile della capacità di diverse specie di artropodi di colonizzare nicchie ecologiche caratterizzate da substrati nutrizionali poveri. I simbiotici che forniscono nutrienti essenziali per la sopravvivenza dell'ospite sono generalmente obbligati e quindi garantiscono capacità metaboliche aggiuntive alla totalità degli individui che costituiscono le popolazioni degli ospiti. Invece, nel caso di simbiotici facoltativi che possono influenzare la tipologia e la quantità di cibo ingerito durante la vita da parte di individui infettati da simbiotici diversi o privi di organismi associati, la colonizzazione di ambienti diversi dipenderà da quali microrganismi siano maggiormente presenti nelle singole popolazioni di ospiti. Esempi di questo genere di interazione sono i simbiotici secondari '*Candidatus Regiella insecticola*' e '*Ca. Hamiltonella defensa*', per i quali è stato riconosciuto un ruolo nell'utilizzo di *Tripholium repens* e *Lamium purpureum* da parte degli afidi ospiti (Douglas, 2009). In questi casi l'effetto del simbiote sul comportamento alimentare dell'insetto è stato riscontrato essere piuttosto variabile, probabilmente in funzione dell'interazione tra i genotipi di ospite e batteri.

Molti microrganismi simbiotici che non forniscono vantaggi nutrizionali ai propri ospiti hanno sviluppato sistemi di miglioramento della fitness degli artropodi al fine di indurli a mantenere l'associazione nelle generazioni. Tale miglioramento può essere dovuto alla difesa da patogeni e parassitoidi, attuate secondo un meccanismo denominato "protezione mediata dal simbiote" (Oliver et al., 2005), oppure può essere basato sull'adattamento a stress abiotici (Feldhaar, 2011), o ancora sul mantenimento dell'omeostasi immunitaria (Crotti et al., 2011).

Esempi di protezione mediata da simbiotici sono il sistema *Wolbachia-Drosophila melanogaster*, in cui il simbiote è in grado di proteggere l'insetto da infezioni virali (Hedges et al., 2008; Teixeira et al., 2008), oppure diversi simbiotici batterici associati ad afidi, formiche e coleotteri curculionidi, capaci di proteggere gli ospiti da funghi entomopatogeni (Currie et al., 2003; Scarborough et al., 2005; Scott et al., 2008). Particolarmente complesso è il caso della difesa da predatori e parassitoidi attuata da simbiotici secondari di diverse specie di afidi. I simbiotici *Hamiltonella*, *Regiella* e '*Ca. Serratia symbiotica*' conferiscono all'ospite una resistenza ai parassitoidi. *Rickettsiella* sp., invece, nell'afide *Acyrtosiphon pisum* promuove il cambiamento cromatico dell'ospite da una colorazione rossastra verso il verde, rendendolo meno visibile ai predatori. D'altro canto i parassitoidi attaccano preferenzialmente gli afidi verdi, tuttavia la presenza simultanea di *Rickettsiella* e uno o più dei simbiotici sopra citati garantisce una protezione ad ampio spettro (Feldhaar, 2011).

Nell'ambito della risposta a stress abiotici, l'effetto dei simbionti sulla tolleranza al calore è il principale fattore finora studiato. Tale effetto può essere positivo, come nel caso dei simbionti secondari degli afidi *Serratia* e *Hamiltonella*, che aumentano la tolleranza a stress termico negli ospiti (Montllor et al., 2002; Russell e Moran, 2006). D'altra parte, la comunità microbica può anche influenzare negativamente la tolleranza al calore dell'artropode, come nel caso dei simbionti del pentatomide *Nezara viridula*, che vengono persi dall'ospite in presenza di temperature superiori a 30°C, con una conseguente ridotta fertilità dell'insetto (Prado et al., 2009). Infine, l'effetto dei simbionti può essere variabile, come nel caso di alcuni ceppi di *Buchnera aphidicola* in cui una mutazione di una singola base aumenta la sensibilità alle alte temperature degli insetti che ospitano simbionti mutati, mentre gli stessi individui mostrano un miglioramento della fitness a temperature più basse (Moran et al., 2008). Questi effetti legati alla temperatura hanno un forte significato ecologico, in quanto possono influenzare la capacità di diverse specie o popolazioni di artropodi di colonizzare ambienti caratterizzati da temperature diverse (Feldhaar, 2011).

Un altro importante contributo alla fitness fornito dai microrganismi simbionti ai loro ospiti è costituito dall'attivazione del loro sistema immunitario. Questo infatti è stimolato in modo da garantire il mantenimento dell'associazione simbiotica e contestualmente proteggere l'artropode da organismi patogeni. Ad esempio uno degli ambienti più ricchi di batteri simbionti e commensali, vale a dire il tratto digestivo degli insetti, è regolato da una sofisticata rete di segnali, che controlla la produzione di composti antimicrobici, conferendo una tolleranza ai microrganismi benefici e bloccando la proliferazione dei patogeni (Leulier e Royet, 2009). Il ruolo della comunità microbica nella modulazione della risposta immunitaria è stato studiato in diversi olobionti. Nell'intestino di *D. melanogaster* è stato osservato il ruolo della comunità di batteri acetici nel mantenimento dell'equilibrio immunitario dell'ospite. Una normale comunità microbica sopprime la crescita di agenti patogeni, mentre se la comunità viene sbilanciata si assiste alla proliferazione dei patogeni (Ryu et al., 2008). Un altro modello molto studiato è rappresentato dalle mosche Tsetse e dal loro simbionte primario *Wigglesworthia glossinidia*. Oltre a fornire nutrienti essenziali per la sopravvivenza dell'ospite, *Wigglesworthia* è stata dimostrata avere un ruolo di stimolazione immunitaria, dato che da larve private di questo simbionte si sviluppano adulti immunocompromessi, e dunque fortemente soggetti a infezioni (Weiss et al., 2012). Anche la protezione dell'ospite dall'attacco di patogeni espressa da *Wolbachia* sembra avere origine, in alcuni sistemi-modello, dall'attivazione della risposta immunitaria

(Wong et al., 2011). La stimolazione immunitaria da parte dei simbionti è di particolare interesse non solo in relazione alle conseguenze ecologiche legate alla proliferazione di insetti protetti dai patogeni, ma anche per gli effetti che questa può avere sulla trasmissione di patogeni da parte degli artropodi. Infatti è stato osservato come in insetti colonizzati da alcuni simbionti, la presenza di diversi patogeni umani, quali virus e protozoi, sia fortemente ridotta, in seguito alla produzione da parte dell'insetto di composti anti-patogeno stimolata dai simbionti stessi (Weiss e Aksoy, 2011).

Oltre ai simbionti mutualisti, anche altri tipi di simbionti hanno un forte impatto sull'ecologia e sull'evoluzione dei propri ospiti, come nel caso dei manipolatori riproduttivi. Ad esempio, i batteri induttori di incompatibilità citoplasmatica rendono sterili gli incroci tra maschi infetti e femmine non infette, o tra maschi e femmine infetti da ceppi diversi tra loro. Questo impedisce il flusso di geni tra le sottopopolazioni composte da insetti con comunità microbiche diverse, rendendole meta-popolazioni. I manipolatori riproduttivi che modificano la *sex ratio*, invece, diminuiscono la diversità genetica all'interno di singole popolazioni di artropodi, oltre a ridurne le dimensioni. Questo comporta pesanti effetti negativi come l'aumento del tasso di fissazione delle mutazioni deleterie o l'incremento di fenomeni di deriva genetica (Feldhaar, 2011).

#### APPLICAZIONI LEGATE ALL'USO DI SIMBIONTI DEGLI ARTROPODI

##### *Il controllo simbiotico e la gestione della risorsa microbica applicata agli artropodi*

La diffusione e la diversità delle associazioni simbiotiche tra microrganismi e artropodi, e il forte impatto che queste hanno sulla biologia dell'ospite, aprono nuovi scenari che vedono gli artropodi non solamente come singoli individui ma come un sistema ben più complesso, governato dalle interazioni tra gli organismi che costituiscono l'olobionte. La conoscenza della fisiologia, dell'ecologia e del comportamento di questi animali, e la loro gestione nell'ambito della difesa delle piante, delle produzioni agro-alimentari e della protezione medico-veterinaria, devono tenere in considerazione questo sistema articolato. Nella lotta a patogeni e artropodi dannosi i microrganismi simbionti possono rappresentare validi strumenti, se sfruttati come agenti di lotta secondo la strategia definita Controllo Simbiotico (CS). Questo metodo di lotta può essere mirato all'eliminazione diretta di artropodi dannosi, ad esempio tramite la produzione da parte dei simbionti di molecole ad attività

antagonistica, o mediante lo sbilanciamento delle popolazioni operato da manipolatori riproduttivi. L'attività di controllo, inoltre, può essere indirizzata agli agenti patogeni trasmessi da artropodi, sfruttando la competizione tra simbionti e patogeni nella colonizzazione dell'ospite, oppure traendo vantaggio dalla riduzione, a opera di un simbionte, della capacità dell'artropode di trasmettere il patogeno (Alma et al., 2010). Gli agenti di CS selezionati all'interno della comunità microbica degli artropodi che rappresentano l'obiettivo della strategia possono essere costituiti da ceppi *wild-type* di microrganismi simbionti con caratteristiche particolarmente promettenti, oppure da isolati opportunamente modificati, secondo tecniche di paratransgenesi. Quest'ultima, essendo fondata sulla manipolazione genetica dei simbionti di un artropode per il contenimento dei danni correlati, si contrappone alla transgenesi, che si basa sulla modificazione genetica dell'insetto stesso. Il CS può essere considerato una delle componenti applicate agli artropodi di un approccio più generale chiamato Gestione della Risorsa Microbica (Microbial Resource Management, MRM) (Verstraete, 2007). L'MRM è definito come la gestione umana di sistemi microbici complessi, con le relative capacità metaboliche, per risolvere problemi di natura pratica, ed è stato applicato con successo in vari ecosistemi come nel caso dei trattamenti delle acque reflue oppure della prebiotica umana. Nell'ambito della gestione di problematiche correlate agli artropodi, oltre che per il CS l'MRM può essere applicato per proteggere gli insetti utili da malattie e stress (Crotti et al., 2012).

Tra i simbionti che compongono la comunità microbica di artropodi target per strategie di CS o in generale di MRM, solo quelli che soddisfano alcuni requisiti possono essere selezionati come potenziali agenti microbici. Questi includono la stabile associazione con l'ospite, la dominanza all'interno della comunità microbica dei singoli individui, la localizzazione negli stessi organi colonizzati dai patogeni (nel caso lotta a malattie degli artropodi o trasmesse da questi), la facilità di coltivazione e manipolazione genetica *in vitro*, e la trasmissione verticale e/o orizzontale. Alte percentuali di infezione ed elevate concentrazioni batteriche negli individui infettati dall'agente di biocontrollo aumentano l'efficacia dell'attività antagonistica espressa; la presenza del simbionte nei siti chiave di colonizzazione di un patogeno permette l'effettiva espressione dei fattori di lotta. La stabilità e la competitività dei microrganismi modificati nella comunità microbica, unita all'innocuità per l'ospite e per gli altri organismi del microbiota, consentono l'impiego di ceppi trasformati non solo per paratransgenesi, ma anche nel caso dell'uso di microrganismi naturali, per consentire uno studio accurato delle relazioni tra simbionte e ospite. La presenza di una o più vie di trasmissione nelle popolazioni ospiti

garantisce una distribuzione capillare dell'agente microbico al di là della somministrazione diretta (Alma et al., 2010). Al fine di individuare i simbionti in possesso dei requisiti richiesti per lo sviluppo di strategie di MRM, studi di ecologia microbica volti a descrivere la composizione del microbiota associato agli artropodi target sono dunque un passo preliminare fondamentale, che deve essere seguito da ricerche sulle interazioni ospite-simbionte focalizzate sui batteri più promettenti. Una caratterizzazione della comunità microbica mediante tecniche di "fingerprinting" molecolare indipendenti dalla coltivazione può fornire una descrizione completa degli organismi che compongono il sistema olobionte. Analisi successive basate sulla microscopia elettronica o sull'ibridazione *in situ* possono fornire informazioni sulla naturale distribuzione dei simbionti nel corpo dell'ospite. Prove di trasmissione verticale o orizzontale possono essere condotte nel caso in cui la presenza di simbionti sia osservata in organi chiave come gonadi o ghiandole salivari; test *in vitro* volti a individuare attività di biocontrollo da parte dei simbionti coltivabili possono consentire di individuare gli agenti microbici più efficaci. Infine, una volta definito un protocollo di MRM e valutata la sua effettiva efficacia, prima di poter mettere in pratica il metodo individuato è necessaria un'attenta e approfondita valutazione dei rischi connessi al rilascio nell'ambiente dell'agente microbico. La tossicità verso l'artropode o verso gli organismi animali e vegetali con cui questo viene in contatto deve essere valutata unitamente a potenziali effetti sull'ecologia delle loro comunità microbiche. Un'analisi ancora più approfondita deve essere condotta nel caso di impiego di tecniche di paratransgenesi, per verificare le implicazioni correlate al rilascio di un microrganismo geneticamente modificato nell'ambiente. Se in seguito alle opportune verifiche il protocollo di lotta è applicabile, questo può finalmente essere proposto per un effettivo impiego (Alma et al., 2010).

### *Esempi di controllo simbiotico in campo agrario nel Mondo*

L'effettiva possibilità di attuare strategie di difesa basate sull'uso di microrganismi simbionti degli artropodi è stata proposta per la prima volta in campo medico, contro le tripanosomiasi che causano le malattie di Chagas e del sonno, i cui agenti eziologici sono trasmessi rispettivamente dalla cimice *Rhodnius prolixus* e dalla mosca Tse Tse, *Glossina brevipalpis*. Tuttavia, anche in campo agrario alcune soluzioni di lotta sono state proposte, sia per il controllo diretto di artropodi dannosi sia per il contenimento di malattie veicolate da insetti.

### Tecnica dell'insetto incompatibile applicata a *Ceratitis capitata*

La mosca mediterranea della frutta, *Ceratitis capitata*, rappresenta una minaccia economicamente molto rilevante per la frutticoltura di tutto il mondo, data la sua vasta diffusione, la sua polifagia e la sua capacità di adattarsi anche ai climi più freschi. Studi focalizzati sul manipolatore riproduttivo *Wolbachia* hanno sottolineato l'assenza dell'Alfaproteobatterio in questo insetto (Bourtzis et al., 1994). La mancanza di questo simbionte ha permesso d'ipotizzare l'applicazione di un approccio di lotta analogo alla tecnica definita dell'insetto sterile (sterile insect technique, SIT), mirato alla riduzione della fertilità degli insetti dannosi, al fine di eradicarne in breve tempo le popolazioni. Mentre la SIT prevede l'irradiazione o l'uso di sterilizzanti chimici applicati a maschi che devono in seguito essere lanciati nei propri ambienti di sviluppo, l'approccio basato sull'uso di *Wolbachia* trae vantaggio dalla naturale incompatibilità riproduttiva tra linee di *C. capitata* infettate da ceppi di *Wolbachia* induttori di incompatibilità citoplasmatica e linee sane. Questo metodo è chiamato tecnica dell'insetto incompatibile (incompatible insect technique, IIT) (Bourtzis e Robinson, 2006). Linee di mosca mediterranea infettate da *Wolbachia* sono state ottenute tramite transinfezione impiegando come donatore la mosca del ciliegio *Rhagoletis cerasi*, naturalmente infetta da questo manipolatore riproduttivo (Zabalou et al., 2004). L'efficacia della tecnica di lotta è stata valutata in primo luogo tramite la verifica dell'infezione di *Wolbachia* nelle linee transinfettate, e in seguito mediante prove di accoppiamento tra maschi appartenenti a questa nuova linea e femmine di popolazioni naturali di *C. capitata*. I risultati ottenuti hanno dimostrato come le linee in cui l'infezione è stata effettivamente stabilizzata siano in grado di abbattere del 99% le popolazioni in seguito al rilascio di 50 maschi incompatibili per ogni coppia composta da femmina e maschio naturali (Zabalou et al., 2004). Una tale efficacia di azione, che permette di ottenere un controllo praticamente totale delle popolazioni tramite un metodo eco-compatibile, rende la tecnica dell'IIT particolarmente promettente, al punto che anche per altri insetti dannosi sono state proposte strategie analoghe. Tuttavia l'applicazione di questa strategia non è priva di controindicazioni. In primo luogo, l'eventualità di lanci accidentali di femmine insieme ai maschi infettati da *Wolbachia* deve essere completamente esclusa, in quanto queste femmine sarebbero in grado di produrre una normale progenie in seguito all'accoppiamento con i maschi lanciati, vanificando l'azione sterilizzante del lancio e diffondendo la presenza di femmine infette di seconda generazione che comprometterebbero del tutto la strategia di lotta. L'ipotesi di un impiego combinato di IIT



e SIT, basato su un'irradiazione a bassa intensità delle linee infettate da *Wolbachia*, in modo da rendere sterili le femmine accidentalmente incluse nei lanci, può permettere di mantenere l'efficacia del trattamento. L'efficienza dell'induzione di incompatibilità svolta da *Wolbachia* nei maschi infetti può inoltre essere influenzata dall'età dell'insetto, dal numero di accoppiamenti e dalla temperatura, con una conseguente possibile riduzione dell'attività di controllo (Bourtzis e Robinson, 2006). Tuttavia, nonostante la tecnica sia in fase sperimentale e presenti alcune criticità, le sue potenzialità nel controllo di *C. capitata* indicano l'importanza dei manipolatori riproduttivi come agenti di lotta a basso impatto ambientale.

### Paratransgenesi per la lotta alla malattia di Pierce della vite

La malattia di Pierce è tra le più preoccupanti avversità per la viticoltura americana. Il suo agente eziologico è il Gammaproteobatterio *Xylella fastidiosa*, trasmesso da diversi cicadellidi e cercopidi. Tuttavia il principale vettore di questo patogeno è il cicadellide cicadellino *Homalodisca vitripennis*. La possibilità di sfruttare i microrganismi simbiotici per strategie di controllo è emersa in seguito all'identificazione di batteri del genere *Alcaligenes*, principalmente associati a piante (tra cui la vite), anche in associazione a *H. vitripennis*. È stata dunque proposta una strategia di controllo basata sulla paratransgenesi, utilizzando ceppi di *Alcaligenes* modificati per esprimere molecole antimicrobiche o per interferire con la capacità del patogeno di colonizzare l'insetto. Al fine di valutare l'effettiva fattibilità di questo tipo di approccio sono stati costruiti ceppi trasformati per la produzione di proteine fluorescenti, per verificare la capacità di *Alcaligenes* di colonizzare il primo tratto del tubo digerente di *H. vitripennis*, sito chiave per la trasmissione del patogeno. Indagini di microscopia in fluorescenza eseguite sugli organi della cicalina, dissezionati in seguito alla somministrazione dei batteri, hanno dimostrato l'efficacia della colonizzazione da parte del simbionte, fornendo la prima evidenza a supporto della possibilità di impiego di *Alcaligenes* come agente di controllo (Bextine et al., 2004). Sulla base di queste evidenze è stata indagata la possibilità di sviluppo di un sistema di controllo basato sul rilascio di batteri direttamente nella pianta. La capacità di un ceppo marcato di *Alcaligenes* di colonizzare diverse specie vegetali è stata dunque presa in esame. Questo ceppo è stato inoculato in diverse piante ospiti della cicalina, al fine di verificare la capacità di colonizzarle. Le analisi successive sul materiale colonizzato hanno evidenziato una stretta correlazione tra microrganismo, pianta e insetto, data la con-

gruenza tra l'efficienza di colonizzazione di singole specie vegetali da parte di *Alcaligenes* e la preferenza a servirsene come pianta ospite da parte della cicalina (Bextine et al., 2005). Alla luce del potenziale espresso da *Alcaligenes* come agente di CS, e vista la possibilità di impiegarlo direttamente nella pianta, potendo così curare viti infettate da *X. fastidiosa*, che attualmente devono invece essere rimosse, studi di valutazione di rischi sono stati condotti sull'impatto relativo al rilascio d'isolati trasformati di *Alcaligenes* nel suolo, nell'acqua e nelle piante. Una completa valutazione dei rischi connessi al rilascio di ceppi trasformati di questo batterio è in corso, condotta attraverso studi sulle possibilità di trasferimento genico o sulla presenza di fattori di virulenza su altri microrganismi, su possibili modificazioni della fisiologia delle piante o della comunità microbica ospitata nello xilema, e sulla possibilità che il simbionte trasformato arrivi a colonizzare il frutto e a sopravvivere ai diversi passaggi del processo di vinificazione (Miller et al., 2006).

### *Studi applicativi condotti in Italia*

#### Le simbiosi negli insetti vettori di fitoplasmi alla vite e ai fruttiferi

In Italia, gli insetti vettori di fitoplasmi rappresentano uno degli obiettivi più interessanti in campo agrario per il CS mirato al contenimento della diffusione di questi patogeni. Le prime ricerche condotte in Italia sono state indirizzate allo studio della comunità microbica associata al cicadellide *Scaphoideus titanus*, vettore del fitoplasma della flavescenza dorata (FD) della vite, che causa ingenti danni economici alla viticoltura europea da diversi decenni. Dalla caratterizzazione molecolare del microbiota di *S. titanus*, uno dei simbionti più frequentemente associato alla cicalina è risultato essere il Bacteroidetes 'Ca. Cardinium hertigii' (Marzorati et al., 2006). Questo manipolatore riproduttivo, estremamente diffuso tra gli artropodi, è stato inoltre osservato in diversi tessuti della cicalina anche tramite analisi di microscopia elettronica, che hanno permesso di riscontrare il simbionte grazie a un marker morfologico costituito da una struttura microtubulare all'interno della cellula (Sacchi et al., 2008). Da un punto di vista filogenetico, i ceppi più strettamente imparentati con quello identificato in *S. titanus* sono simbionti di diverse zecche e acari (Marzorati et al., 2006). Nonostante la nota capacità di *Cardinium* di alterare la riproduzione dei propri ospiti, la presenza di manipolazioni sessuali nel cicadellide non è stata individuata. Il simbionte è comunque trasmesso verticalmente alla progenie, come testimoniato dal suo

ritrovamento negli ovari di *S. titanus* (Marzorati et al., 2006). Oltre che negli organi riproduttivi, il *Bacteroidetes* è stato osservato anche in numerosi altri tessuti, tra cui i corpi grassi, che rappresentano una localizzazione ottimale per un eventuale rifornimento in nutrienti, o le ghiandole salivari. La presenza di *Cardinium* nelle ghiandole salivari sembra indicare che il simbionte abbia un ciclo vitale complesso, che include sia la colonizzazione dell'insetto che della pianta su cui questo si nutre, come suggerito da studi preliminari che hanno dimostrato la presenza del batterio nel mezzo alimentare (Pajoro et al., 2008). La possibilità di un trasferimento di *Cardinium* tra individui attraverso la pianta potrebbe garantire la sua naturale trasmissione nelle popolazioni del vettore della FD, nel caso in cui questo simbionte potesse essere impiegato come agente di controllo. Tuttavia, la sua incoltivabilità rende di difficile applicabilità la prosecuzione di studi mirati a identificare ceppi utili ai fini del CS. Un altro importante simbionte di *S. titanus*, appartenendo a un genere di batteri coltivabili, risulta dunque più promettente come candidato agente di lotta. Questo microrganismo, riscontrato insieme a *Cardinium* nel corso dell'indagine molecolare sulla comunità microbica della cicalina, è il batterio acetico *Asaia* sp. (Marzorati et al., 2006; Crotti et al., 2009). Per quanto non si conosca il ruolo di *Asaia* in *S. titanus*, la sua dominanza all'interno del microbiota del cicadellide suggerisce una stretta interazione tra i due organismi, e la sua presenza in diversi organi, inclusi intestino, ghiandole salivari e gonadi, indica una trasmissione orizzontale e verticale. È stato infatti dimostrato che *Asaia* viene rilasciata dall'insetto nel substrato di nutrizione, e che può essere acquisita da altri individui durante l'alimentazione (Gonella et al., 2012). Inoltre, può essere trasmesso da maschio a femmina tramite l'accoppiamento (Gonella et al., 2012), e dalla femmina alla progenie tramite un fenomeno detto "egg smearing", che consiste nella contaminazione dell'uovo durante la maturazione nell'ovario, seguita dalla penetrazione al suo interno nel corso dello sviluppo (Crotti et al., 2009). Nonostante batteri del genere *Asaia* siano comunemente isolati in coltura pura a partire dai propri ospiti, sia nel caso di piante e fiori, sia nel caso di insetti, il ceppo presente in *S. titanus* non è facilmente coltivabile, forse a causa di una coevoluzione con la cicalina che potrebbe aver condotto all'incapacità di vivere al di fuori dell'ospite. Tuttavia gli isolati provenienti da zanzare dei generi *Anopheles* e *Aedes* appaiono promettenti candidati agenti di controllo, in quanto sono in grado di ricolonizzare i rispettivi ospiti e anche insetti molto diversi, incluso *S. titanus* (Crotti et al., 2009).

Un altro vettore di fitoplasmi alla vite, oltre a *S. titanus*, è stato ultimamente oggetto di studi relativi alla comunità microbica, vale a dire il cixiide

*Hyalesthes obsoletus*, che trasmette il fitoplasma responsabile del Legno Nero (LN). La caratterizzazione molecolare del microbiota ha permesso di individuare una comunità piuttosto complessa, costituita da diverse specie batteriche localizzate in organi e tessuti differenti (Gonella et al., 2011). Tra queste, simbionti conosciuti come manipolatori riproduttivi, come *Wolbachia* e *Cardinium*, sono stati identificati spesso in concomitanza. Altri microrganismi osservati sono noti come simbionti primari di insetti strettamente imparentati con *H. obsoletus*, come nel caso del Bacteroidetes *Sulcia* e del Gammaproteobatterio '*Ca. Purcelliella pentastirinorum*'. Anche in questo cixiide l'alta percentuale di individui infettati da tali simbionti suggerisce un ruolo fondamentale per la sopravvivenza dell'ospite, per quanto queste funzioni siano attualmente sconosciute. Oltre a batteri già conosciuti come simbionti di insetti, un microrganismo mai descritto in precedenza, denominato '*Ca. Vidania fulgoroideae*', è stato frequentemente individuato in *H. obsoletus*. Questo simbionte, così come riscontrato per *Sulcia* e *Purcelliella*, presenta una stabile associazione con il cixiide, che suggerisce un ruolo di primaria importanza. La sua localizzazione nelle gonadi, osservata tramite ibridazione *in situ* in fluorescenza, implica inoltre che *Vidania* sia trasmessa verticalmente alla progenie (Gonella et al., 2011).

Vista una tale complessità della comunità microbica associata a *H. obsoletus*, la presenza di interazioni tra simbionti localizzati negli stessi organi dell'ospite dovrà essere ulteriormente investigata in futuro, unitamente al ruolo che questi microrganismi hanno nel vettore del LN. Tali conoscenze potrebbero infatti risultare di estrema utilità per lo sviluppo di protocolli di lotta alle fitoplasmosi basati su uno o più di questi simbionti, tramite l'espressione di fattori antagonisti da parte di microrganismi che colonizzano gli stessi organi occupati dal fitoplasma, oppure mediante eventuali alterazioni riproduttive causate dai manipolatori sessuali.

Oltre ai vettori di fitoplasmi alla vite, gli insetti che trasmettono questi agenti patogeni alle piante da frutto rappresentano un target di particolare interesse per il CS, dato che le malattie causate da fitoplasmi ai fruttiferi sono causa di ingenti danni alla frutticoltura italiana ed europea. Tra questi, lo psillide *Cacopsylla pyri*, vettore del fitoplasma responsabile del Pear Decline del pero, è stato recentemente sottoposto a un'analisi della comunità microbica, al fine di identificare simbionti rilevanti per il contenimento della malattia. Tra i microrganismi associati a questa psilla, sono stati osservati molti batteri noti come simbionti primari e secondari di altri insetti, appartenenti ai generi *Carsonella*, *Ralstonia*, *Sodalis* e *Arsenophonus*. Inoltre, la presenza di un batterio riconducibile a una nuova specie nel genere '*Ca. Liberibacter*' è stata

riscontrata in un'elevata percentuale di individui. I liberibacter sono un gruppo di patogeni emergenti, agenti causali di malattie a carico di diverse piante coltivate, come agrumi e solanacee, responsabili di ingenti perdite produttive in tutto il mondo. Il microrganismo associato a *C. pyri*, chiamato 'Ca. Liberibacter europaeus' (Cleu), è stato osservato in diversi organi, inclusi l'intestino, i tubuli malpighiani e le ghiandole salivari, ed è stato dimostrato essere trasmesso al pero dall'insetto (Raddadi et al., 2011). Tuttavia, data l'assenza di sintomi nelle piante inoculate tramite *C. pyri*, è possibile ipotizzare che Cleu non sia un agente fitopatogeno, ma un simbionte delle psille ed endofita del pero (Raddadi et al., 2011) e di altre rosacee (Camerota et al., 2012).

### L'uso dei simbionti dell'ape nella lotta alla peste americana

L'ape, *Apis mellifera*, è un insetto di notevole importanza economica per l'uomo, sia per i numerosi prodotti derivati dal suo allevamento, sia per il suo ruolo di impollinatore di numerose specie di piante selvatiche e coltivate. Il mantenimento della buona salute dell'ape è dunque essenziale per preservare equilibri economici e ambientali in tutto il mondo. La conoscenza della comunità microbica che vive in associazione con l'ape può fornire importanti strumenti per lo sviluppo di strategie di MRM mirate al miglioramento dello stato sanitario. Infatti è ormai noto il ruolo fondamentale del microbiota indigeno nel mantenimento della salute di un individuo, sia nel caso dell'uomo sia negli animali.

I primi studi in merito ai microrganismi associati alle api sono stati basati su metodi di coltivazione microbica, che hanno permesso di identificare la presenza, nel tubo digerente di questi insetti, di diversi batteri, tra cui *Bacillus* spp. e altre Enterobacteriaceae, di muffe dei generi *Aspergillus* e *Penicillium*, e di lieviti. La presenza di questi ultimi risultava correlata a condizioni di stress nell'ospite (Gilliam, 1997). Successivamente, studi basati su metodi indipendenti dalla coltivazione hanno evidenziato la presenza di batteri riconducibili a diversi *phyla*, tra cui Proteobatteri, Firmicutes, Bacteroidetes e Attinobatteri (Mohr e Tebbe, 2006). Tra i batteri che compongono la comunità microbica delle api, risultano di particolare interesse i batteri lattici e acetici, noti per ospitare il tratto intestinale di molti insetti e altri animali (nel caso dei batteri lattici), nei quali esercitano un'attività benefica per l'ospite in quanto coinvolti nell'immunomodulazione e nel mantenimento di una microflora intestinale sana. In particolare, tra i batteri lattici, diverse specie nel genere *Lactobacillus* sono state identificate nell'intestino di *A. mellifera* (Mohr e Tebbe,

2006), mentre tra i batteri acetici diversi membri dei generi *Gluconobacter*, *Acetobacter*, *Gluconacetobacter* e *Saccharibacter* sono stati segnalati come simbionti dell'ape (Mohr e Tebbe, 2006; 2007). L'intestino dell'ape rappresenta una nicchia ecologica ottimale per batteri lattici e acetici, dato l'alto tenore zuccherino e il pH acido che caratterizza il tratto intestinale.

Le interazioni tra il microbiota ospitato dall'ape e l'insetto ospite, essendo fondamentali per la sua salute, sembrano essere uno dei fattori che determinano l'insorgenza del fenomeno di moria delle colonie, osservato in tutto il mondo con simili sintomatologie (improvvisa scomparsa delle api adulte e contemporanea presenza di molti favi con covata non alterata), e definito Colony Collapse Disorder (CCD). Molto probabilmente la concorrenza di più fattori che hanno come effetto l'indebolimento del sistema immunitario dell'ape è alla base di questa malattia; il cambiamento, rispetto agli individui sani, della composizione della comunità microbica è tra le cause di questo indebolimento, che rende l'insetto più suscettibile all'insorgenza di patologie di varia natura, tra le quali infezioni virali e batteriche. Infatti, uno studio che ha messo a confronto il microbiota di api sane e individui colpiti da CCD, ha dimostrato che nelle api provenienti da alveari malati, rispetto alle api sane, la comunità microbica è caratterizzata da una dominanza abnorme di Gammaproteobatteri e da una presenza minore di batteri ascrivibili al gruppo dei lattici, acetici, Firmicutes e agli Alphaproteobatteri (Cox-Foster et al., 2007). Alla luce di queste scoperte, l'importanza del ruolo del microbiota intestinale deve essere tenuta in considerazione non soltanto per l'insorgenza di CCD, ma anche per la suscettibilità ai numerosi patogeni che colpiscono l'ape. Tra questi, i patogeni batterici sono causa di elevate mortalità nelle colonie; malattie di origine batterica particolarmente gravi sono la peste americana, causata da *Paenibacillus larvae*, e la peste europea, causata da *Melissococcus plutonius*. L'uso di batteri probiotici appare una strategia promettente per il contenimento di queste malattie, attualmente molto difficili da controllare. È stata dimostrata un'inibizione della crescita *in vitro* di *P. larvae* a opera di diversi batteri lattici, sporigeni e acetici, noti per essere in grado di ostacolare la colonizzazione di batteri patogeni attraverso la produzione di composti antimicrobici, o la creazione di condizioni per questi inospitali, ad esempio tramite l'abbassamento del pH. Queste evidenze, unite ai risultati emersi da prove *in vivo* condotte con larve alimentate con ceppi di batteri lattici e successivamente esposte a *P. larvae* (Forsgren et al., 2010), sottolinea come batteri probiotici possano essere impiegati per proteggere le larve dall'attacco di patogeni attraverso la modulazione dell'omeostasi intestinale. Ulteriori studi mirati alla comprensione dei diversi meccanismi che entrano in gioco nell'i-

nibizione dei patogeni, come esclusione competitiva, produzione di sostanze antimicrobiche e stimolazione del sistema immunitario, potranno contribuire allo sviluppo di nuove strategie di controllo delle malattie delle api, basate sull'utilizzo dei microrganismi simbiotici.

### I simbiotici di *Drosophila suzukii*

Il dittero brachicero *Drosophila suzukii* è, all'interno del genere *Drosophila*, una specie particolarmente dannosa per le produzioni frutticole, in quanto, a differenza della maggior parte delle specie congeneri, attacca i frutti maturi e sani ancora presenti sulla pianta (Grassi et al., 2009). Questo moscerino della frutta, originario del sud-est asiatico, di recente è stato accidentalmente introdotto nei continenti europeo e americano (Hauser et al., 2009; Calabria et al., 2012). In Italia *D. suzukii* è stata segnalata dapprima in Trentino Alto Adige (Grassi et al., 2009), e in seguito in diverse altre regioni. Oltre a causare danni su fragola, piccoli frutti e fruttiferi maggiori, l'insetto attacca anche diverse specie di piante spontanee. Data la rilevanza di *D. suzukii*, causata dalle ingenti perdite economiche di cui è responsabile, numerosi studi volti allo sviluppo di strategie di contenimento di questo insetto sono in corso. Tra queste, un possibile approccio potrebbe essere basato sull'utilizzo dei microrganismi simbiotici associati a questo dittero. Attualmente le conoscenze in merito alla comunità microbica associata a *D. suzukii* sono molto scarse. La caratterizzazione dei lieviti associati all'insetto e alle sue piante ospiti è stata riportata recentemente (Hamby et al., 2012); tuttavia non esistono in letteratura lavori di descrizione del microbiota batterico affiliato a questa specie. Al contrario, numerosi studi sui principali *taxa* batterici presenti in altre specie del genere *Drosophila* sono stati condotti negli ultimi anni. Un'analisi delle comunità microbiche associate a diverse specie di *Drosophila* con regimi alimentari differenti ha dimostrato come la composizione del microbiota di questi insetti sia fortemente influenzata dalla dieta, in termini di quantità e tipologie di specie ospitate (Chandler et al., 2011). In ogni caso, i gruppi tassonomici più fortemente rappresentati nel microbiota di *Drosophila* spp. comprendono le Enterobacteriaceae, i Lactobacillales, e le Acetobacteriaceae. Batteri appartenenti a ciascuno di questi *taxa* sono di particolare interesse nell'ambito dell'MRM, e possono includere microrganismi con potenzialità di CS. Anche il ruolo recentemente riconosciuto per i batteri acetici nel modulare l'omeostasi immunitaria in *D. melanogaster* (Roh et al., 2008) pone le basi verso la possibilità di impiegare questi simbiotici per il contenimento di *D. suzukii*.

Un altro simbiote ampiamente diffuso nel genere *Drosophila* è *Wolbachia*. Molti ceppi di questo Alfaproteobatterio, principalmente noto come manipolatore riproduttivo in diversi artropodi, colonizzano *Drosophila* spp., in cui svolgono molteplici ruoli. In *Drosophila*, *Wolbachia* è stata descritta come induttore di incompatibilità citoplasmatica (Werren et al., 2008) e di male killing (Montenegro et al., 2005), come simbiote mutualista (Hedges et al., 2008) e come patogeno (Min e Benzer, 1997). Lo studio delle interazioni tra *Wolbachia* e *D. suzukii* appare di estrema rilevanza anche alla luce dell'emergente interesse per l'Alfaproteobatterio come potenziale agente di biocontrollo in diversi sistemi (Bourtzis, 2008).

Nel complesso, data la probabile presenza in *D. suzukii* di numerosi microrganismi con promettenti potenzialità di controllo, studi mirati alla conoscenza della comunità microbica di questo insetto, e alla comprensione delle interazioni tra ospite e simbionti, potranno aprire nuovi scenari di lotta a basso impatto ambientale che coinvolgano l'impiego di agenti microbici.

#### CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Un numero sempre crescente di studi sulle relazioni che intercorrono tra i microrganismi simbionti e gli artropodi che li ospitano sottolineano la forte influenza esercitata dal microbiota sul sistema complesso costituito dall'olobionte. Svatiati dettagli sulla natura di queste interazioni sono stati svelati negli ultimi anni, permettendo di chiarire numerosi meccanismi coinvolti nella fisiologia, nel metabolismo e nel comportamento degli artropodi. In molti casi, le conoscenze acquisite sono risultate un utile strumento da utilizzare nella gestione di problematiche connesse agli artropodi, come nel caso della creazione di protocolli di CS. Futuri studi volti a chiarire aspetti ancora sconosciuti delle simbiosi tra artropodi e microrganismi, che coinvolgono modelli non ancora esplorati, forniranno ulteriori elementi verso lo sviluppo di strategie di lotta a patogeni e artropodi dannosi.

#### RIASSUNTO

La simbiosi tra artropodi e microrganismi è di estrema importanza per l'ecologia e l'evoluzione di questi animali. I molteplici vantaggi forniti dai simbionti agli ospiti hanno fortemente influenzato la capacità degli artropodi di occupare diverse nicchie ecologiche, di essere protetti dai nemici o di affrontare stress ambientali. Data la loro rilevanza, le interazioni tra artropodi e microrganismi possono essere sfruttate per la gestione di diverse



problematiche, come le infestazioni di artropodi dannosi, la proliferazione di malattie da questi veicolate, o l'infezione da parte di patogeni negli insetti utili. Approcci di lotta a patogeni e insetti dannosi in campo agrario sono stati sperimentati per diversi modelli, come nel caso del controllo della malattia di Pierce della vite o della mosca mediterranea della frutta *Ceratitis capitata*. In Italia i primi studi applicativi sono stati condotti per i vettori di fitoplasmi a vite e fruttiferi, per l'ape e per *Drosophila suzukii*.

#### ABSTRACT

Symbiosis involving arthropods and microorganisms is of high relevance for their ecology and evolution. Indeed, several advantages are provided by symbionts to their hosts, affecting their capability to occupy different ecological niches, to be protected by natural enemies or to face environmental stresses. In the light of their importance, these interactions may be exploited for the management of arthropod-related problems, such as pest diffusion, spread of arthropod-borne diseases, or infection of useful insects by pathogens. Control strategies against pathogens and pests in agriculture have been proposed for several models, including the control of Pierce Disease of grapevine and the containment of the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata*. In Italy, the first applicative studies have been carried out for phytoplasma vectors of grapevine and fruit trees, for honeybee protection and for *Drosophila suzukii*.

#### BIBLIOGRAFIA

- ALMA A., DAFFONCHIO D., GONELLA E., RADDADI N. (2010): *Microbial symbionts of Auchenorrhyncha transmitting phytoplasmas: a resource for symbiotic control of phytoplasmas*, in *Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vectors* (P. Weintraub and P. Jones Eds), CAB International, Wallingford, UK, pp. 272-292.
- BEXTINE B.R., LAUZON C., POTTER S.E., LAMPE D. AND MILLER T.A. (2004): *Delivery of a genetically marked *Alcaligenes* sp. to the glassy winged sharpshooter for use in a paratransgenic control strategy*, «Current Microbiology», 48, pp. 327-331.
- BEXTINE B.R., LAMPE D., LAUZON C., JACKSON B. AND MILLER T.A. (2005): *Establishment of a genetically marked insect-derived symbiont in multiple host plants*, «Current Microbiology», 50, pp. 1-7.
- BOURTZIS K. (2008): *Wolbachia-based technologies for insect pest population control*, «Advances in Experimental Medicine and Biology», 627, pp. 104-113.
- BOURTZIS K., ROBINSON S. (2006): *Insect pest control using Wolbachia and/or radiation*, in *Insect Symbiosis* (K. Bourtzis e T.A. Miller, Eds), Vol. 2, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, pp. 225-246.
- BOURTZIS K., NIRGIANAKI A., ONYANGO P., SAVAKIS C. (1994): *A prokaryotic dnaA sequence in Drosophila melanogaster: Wolbachia infection and cytoplasmic incompatibility among laboratory strains*, «Insect Molecular Biology», 3 (3), pp. 131-142.
- BROWNLEE J.C. E JOHNSON K.N. (2009): *Symbiont-mediated protection in insect hosts*, «Trends in Microbiology», 17, pp. 348-354.
- CALABRIA G., MÀCA J., BACHLI G., SERRA L., PASCUAL M. (2012): *First records of the*

- potential pest species Drosophila suzukii (Diptera: Drosophilidae) in Europe*, «Journal of Applied Entomology», 136, pp. 139-147.
- CAMEROTA C., RADDADI N., PIZZINAT A., GONELLA E., CROTTI E., TEDESCHI R., MOZES-DAUBE N., EMBER I., ACS Z., KOLBER M., ZCHORI-FEIN E., DAFFONCHIO D., ALMA A. (2012): *Incidence of 'Candidatus Liberibacter europaeus' and phytoplasmas in Cacopsylla species (Hemiptera: Psyllidae) and their host/shelter plants*, «Phytoparasitica», 40, pp. 213-221.
- CHANDLER J. A., MORGAN LANG J., BHATNAGAR S., EISEN J. A., KOPP A. (2011): *Bacterial Communities of Diverse Drosophila Species: Ecological Context of a Host-Microbe Model System*, «Plos Genetics», 7(9), e1002272.
- COX-FOSTER D.L., CONLAN S., HOLMES E.C., PALACIOS G., EVANS J.D., MORAN N.A., QUAN P.-L., BRIESE T., HORNIG M., GEISER D.M., MARTINSON V., VANENGELSDORP D., KALKSTEIN A.L., DRYSDALE A., HUI J., ZHAI J., CUIN L., HUTCHISON S.K., FREDRIK SIMONS J., EGHOLM M., PETTIS J.S., LIPKIN W.I. (2007): *A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder*, «Science», 318, pp. 283-287.
- CROTTI E., BALLOI A., HAMDI C., SANSONNO L., MARZORATI M., GONELLA E., FAVIA G., CHERIF F.A., BANDI C., ALMA A., DAFFONCHIO D. (2012): *Microbial symbionts: a resource for the management of insect-related problems*, «Microbial Biotechnology», 5, pp. 307-317.
- CROTTI E., DAMIANI C., PAJORO M., GONELLA E., RIZZI A., RICCI I., NEGRI I., SCUPPA P., ROSSI P., BALLARIN P., RADDADI N., MARZORATI M., SACCHI L., CLEMENTI E., GENCHI M., MANDRIOLI M., BANDI C., FAVIA G., ALMA A., DAFFONCHIO D. (2009): *Asaia, a versatile acetic acid bacterial symbiont, capable of cross-colonizing insect of phylogenetically distant genera and orders*, «Environmental Microbiology», 11 (12), pp. 3252-3264.
- CROTTI E., GONELLA E., RICCI I., CLEMENTI E., MANDRIOLI M., SACCHI L., FAVIA G., ALMA A., BOURTZIS K., CHERIF F.A., BANDI C., DAFFONCHIO D. (2011): *Secondary symbionts of insects: acetic acid bacteria*, in *Manipulative tennants: bacteria associated with arthropods* (E. Zcori-Fein and K. Bourtzis eds.), CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, pp. 45-72.
- CURRIE C.R., WONG B., STUART A.E., SCHULTZ T.R., REHNER S.A., MUELLER U.G., SUNG G.-H., SPATAFORA J.W., STRAUS N.A. (2003): *Ancient tripartite coevolution in the attine ant-microbe symbiosis*, «Science», 299, pp. 386-388.
- DOUGLAS A.E. (2009): *The microbial dimension in insect nutritional ecology*, «Functional Ecology», 23, pp. 38-47.
- DOUGLAS A.E. (2011): *Lessons from studying insect symbioses*, «Cell Host & Microbe», 10, pp. 359-367.
- DUNNING HOTOPP J. C., CLARK M.E., OLIVEIRA D.C.S.G., FOSTER J.M., FISCHER P., MUNOZ TORRES M.C., GIEBEL J.D., KUMAR N., ISHMAEL N., WANG S., INGRAM J., NENE R.V., SHEPARD J., TOMKINS J., RICHARDS S., SPIRO D.J., GHEDIN E., SLATKO B.E., TETTELIN H., WERREN J.H. (2007): *Widespread lateral gene transfer from intracellular bacteria to multicellular eukaryotes*, «Science», 317, pp. 1753-1756.
- FELDHAAR H. (2011): *Bacterial symbionts as mediators of ecologically important traits of insect hosts*, «Ecological Entomology», 36, pp. 533-543.
- FORSGREN E., OLOFSSON T.C., V'ASQUEZ A., FRIES I. (2010): *Novel lactic acid bacteria inhibiting Paenibacillus larvae in honey bee larvae*, «Apidologie», 41 (1), pp. 99-108.
- GILLIAM M. (1997): *Identification and roles of nonpathogenic microflora associated with honey bees*, «FEMS Microbiology Letters», 155, pp. 1-10.

- GONELLA E., CROTTI E., RIZZI A., MANDRIOLI M., FAVIA G., DAFFONCHIO D., ALMA A. (2012): *Horizontal transmission of the symbiotic bacterium Asaia sp. in the leafhopper Scaphoideus titanus Ball (Hemiptera: Cicadellidae)*, «BMC Microbiology», 12 (Suppl 1), S4.
- GONELLA E., NEGRI I., MARZORATI M., MANDRIOLI M., SACCHI L., PAJORO M., CROTTI E., RIZZI A., CLEMENTI E., TEDESCHI R., BANDI C., ALMA A., DAFFONCHIO D. (2011): *Bacterial endosymbiont localization in Hyalesthes obsoletus, the insect vector of Bois Noir in Vitis vinifera*, «Applied and Environmental Microbiology», 77 (4), 1423-1435.
- GRASSI A., PALMIERI L., GIORGIO L. (2009): *Nuovo fitofago per i piccoli frutti in Trentino*, «Terra Trentina», 10, pp. 19-23.
- HAMBY K.A., HERNÁNDEZ A., BOUNDY-MILLS K., ZALOM F.G. (2012): *Associations of Yeasts with Spotted-Wing Drosophila (Drosophila suzukii; Diptera: Drosophilidae) in Cherries and Raspberries*, «Applied Environmental Microbiology», 78 (14), pp. 4869-4873.
- HAUSER M., GAIMARI S., DAMUS M. (2009): *Drosophila suzukii new to North America*, «FlyTimes», 43, pp. 12-15.
- HEDGES L.M., BROWNLIE J.C., O'NEILL S.L., JOHNSON K.N. (2008): *Wolbachia and virus protection in insects*, «Science», 322, p. 702.
- LEULIER F. e ROYET J. (2009): *Maintaining immune homeostasis in fly gut*, «Nature Immunology», 10, pp. 936-938.
- MARZORATI M., ALMA A., SACCHI L., PAJORO M., PALERMO S., BRUSETTI L., RADDADI N., BALLOI A., TEDESCHI R., CLEMENTI E., CORONA S., QUAGLINO F., BIANCO P.A., BENINATI T., BANDI C. AND DAFFONCHIO D. (2006): *A novel Bacteroidetes symbiont is localized in Scaphoideus titanus, the insect vector of flavescence dorée in Vitis vinifera*, «Applied and Environmental Microbiology», 72, pp. 1467-1475.
- MILLER T.A., LAUZON C., LAMPE D., DURVASULA R., MATTHEWS S., (2006): *Paratransgenesis applied to control insect-transmitted plant pathogens: the Pierce's disease case*, in Bourtzis K., Miller T.A. (eds), *Insect Symbiosis*, Vol. 2, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, pp. 247-263.
- MIN K.-T. e BENZER S. (1997): *Wolbachia, normally a symbiont of Drosophila, can be virulent, causing degeneration and early death*, «Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America», 94, pp. 10792-10796.
- MONTENEGRO H., SOLFERINI V.N., KLACZKO L.B., HURST G.D.D. (2005): *Male-killing Spiroplasma naturally infecting Drosophila melanogaster*, «Insect Molecular Biology», 14 (3), pp. 281-287.
- MONTLLOR C.B., MAXMEN A. PURCELL A.H. (2002): *Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphids Acyrthosiphon pisum under heat stress*, «Ecological Entomology», 27, pp. 189-195.
- MOHR K.I. e TEBBE C.C. (2006): *Diversity and phylotype consistency of bacteria in the guts of three bee species (Apoidea) at an oilseed rape field*, «Environmental Microbiology», 8, pp. 258-272.
- MOHR K.I. e TEBBE C.C. (2007): *Field study results on the probability and risk of a horizontal gene transfer from transgenic herbicide-resistant oilseed rape pollen to gut bacteria of bees*, «Applied Microbiology and Biotechnology», 75, pp. 573-582.
- MORAN N.A., MCCUTCHEON J.P., NAKABACHI A. (2008): *Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts*, «Annual Review of Genetics», 42, pp. 165-190.
- OLIVER K.M., MORAN N.A. HUNTER M.S. (2005): *Variation in resistance to parasitism in aphids is due to symbionts not host genotype*, «Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America», 102, pp. 12795-12800.

- PAJORO M., MARZORATI M., NEGRI I., SACCHI L., DAFFONCHIO D., ALMA A. (2008): *Investigation on the life cycle of ST1-C, the endosymbiont of Scaphoideus titanus*, «Bulletin of Insectology», 61 (1), pp. 217-218.
- PRADO S.S., GOLDEN M., FOLLETT P.A., DAUGHERTY M.P., ALMEIDA R.P.P. (2009): *Demography of gut symbiotic and aposymbiotic Nezara viridula L. (Hemiptera: Pentatomidae)*, «Environmental Entomology», 38, pp. 103-109.
- 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, «Environmental Microbiology», 13 (2), pp. 414-426.
- ROH S. W., NAM Y.-D., CHANG H.-W., KIM K.-H., KIM M.-S., RYU J.-H., KIM S.-H., LEE W.-J., BAE J.-W. (2008): *Phylogenetic characterization of two novel commensal bacteria involved with innate immune homeostasis in Drosophila melanogaster*, «Applied and Environmental Microbiology», 74, pp. 6171-6177.
- ROSENBERG E. E ZILBER-ROSENBERG I. (2011): *Symbiosis and Development: The Hologenome Concept*, «Birth Defects Research», (Part C) 93, pp. 56-66.
- RUSSELL J.A. E MORAN N.A. (2006): *Costs and benefits of symbiont infection in aphids: variation among symbionts and across temperatures*, «Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences», 273, pp. 603-610.
- RYU J.H., KIM S.H., LEE H.Y., BAI J.Y., NAM Y.D., BAE J.-W., LEE D.G., KIM J., LEE D., LEE W.J. (2008): *Innate immune homeostasis by the homeobox gene Caudal and commensal-gut mutualism in Drosophila*, «Science», 319, pp. 777-782.
- SACCHI L., GENCHI M., CLEMENTI E., BIGLIARDI E., AVANZATI A.M., PAJORO M., NEGRI I., MARZORATI M., GONELLA E., ALMA A., DAFFONCHIO D. AND BANDI C. (2008): *Multiple symbiosis in the leafhopper Scaphoideus titanus (Hemiptera: Cicadellidae): details of transovarial transmission of Cardinium sp. and yeast-like endosymbionts*, «Tissue & Cell», 40, pp. 231-242.
- SCARBOROUGH C.L., FERRARI J., GODFRAY H.C.J. (2005): *Aphid protected from pathogen by endosymbiont*, «Science», 310, p. 1781.
- SCOTT J.J., OH D.-C., YUCEER M.C., KLEPZIG K.D., CLARDY J., CURRIE C.R. (2008): *Bacterial protection of beetle-fungus mutualism*, «Science», 322, p. 63.
- TEIXEIRA L., FERREIRA A., ASHBURNER M. (2008): *The bacterial symbiont Wolbachia induces resistance to RNA viral infections in Drosophila melanogaster*, «Plos Biology», 6, pp. 2753-2763.
- VERSTRAETE W. (2007): *Microbial ecology and environmental biotechnology*, «ISME Journal» 1, pp. 1-4.
- WEISS B.L. E AKSOY S. (2011): *Microbiome influences on insect host vector competence*, «Trends in Parasitology», 27, pp. 514-522.
- WEISS B.L., MALTZ M., AKSOY S. (2012): *Obligate symbionts activate immune system development in the tsetse fly*, «Journal of Immunology», 188 (7), pp. 3395-3403.
- WERREN J.H., BALDO L., CLARK M.E. (2008): *Wolbachia: master manipulators of invertebrate biology*, «Nature Reviews Microbiology», 6, pp. 741-751.
- WONG Z.S., HEDGES L.M., BROWNLIE J.C., JOHNSON K.N. (2011): *Wolbachia-Mediated Antibacterial Protection and Immune Gene Regulation in Drosophila*, «Plos One», 6 (9), e25430.
- ZABALOU S., REIGLER M., THEODORAKOPOULOU M., STAUFFER C., SAVAKIS C., BOURTZIS K. (2004): *Wolbachia-induced cytoplasmic incompatibility as a means for insect pest pop-*

*ulation control*, «Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America», 101, pp. 15042-15045.



## Alle radici della simbiosi pianta-funghi micorrizici arbuscolari: non solo uno scambio di nutrienti

### INTRODUZIONE

Un numero sempre crescente di evidenze sperimentali dimostra come lo stato di salute di un organismo sia animale sia vegetale dipenda dalle comunità microbiche associate. Oggi sappiamo che un corpo umano contiene dieci volte più cellule batteriche che umane e le centinaia di specie diverse di batteri che tappezzano la nostra pelle e le nostre cavità non sono viaggiatori clandestini, ma regolano molte delle nostre funzioni (Gill et al., 2006). Essi costituiscono il microbioma umano, una straordinaria sorgente di diversità individuale che controlla funzioni vitali come l'immunità, l'obesità o l'invecchiamento. Allo stesso modo, le piante interagiscono con migliaia di microorganismi che vivono nella rizosfera o sulle foglie. I numeri del microbioma vegetale sono assai elevati: si sono evidenziati fino a  $10^{11}$  cellule microbiche per grammo di radice. Lo sviluppo delle nuove tecnologie basate su piattaforme che permettono un rapido ed esteso sequenziamento (le cosiddette Next Generation Sequencing) ha permesso di dare un nome a molti di questi microorganismi. La rivista «Nature» nel numero di agosto 2012 ha dedicato la copertina ai microbi che colonizzano la rizosfera portando all'identificazione e alla caratterizzazione del microbioma di *Arabidopsis thaliana*, la pianta modello in biologia vegetale. Tuttavia, lo studio del plant microbiome porta a semplificare la complessità del microbioma come costituito essenzialmente da organismi procarioti. Al contrario, i funghi sono componenti essenziali e tra quelli benefici un ruolo ben noto è attribuito ai funghi che agiscono nel biocontrollo dei patogeni (Lorito et al., 2010) e ai saprotrofi che favoriscono il riciclo di

\* Dipartimento di Scienze della vita e Biologia dei Sistemi, Università degli Studi di Torino

nutrienti (Orgiazzi et al., 2012): tuttavia, i primi attori sono sicuramente i funghi micorrizici.

#### I FUNGHI MICORRIZICI E LA LORO COORTE DI FUNGHI

E BATTERI ASSOCIATI SONO IMPORTANTI COMPONENTI DEL *PLANT MICROBIOME*

Con il nome di funghi micorrizici si identifica un gruppo assai eterogeneo di miceti che appartengono a diversi taxa fungini e che stabiliscono delle associazioni definite come micorrize con le radici di quasi tutte le piante che si trovano sulla terra. Non è banale tuttavia ricordare che questi funghi si associano anche a piante che negli alberi filogenetici occupano posizioni basali: ad esempio i talli di numerose Bryophyta sono colonizzati da basidiomiceti, ascomiceti o glomeromiceti (Read et al., 2000; Bonfante e Genre, 2008).

La funzione ormai riconosciuta per le simbiosi micorrizica è che la pianta migliora la sua nutrizione minerale, registrando un effetto positivo sulla sua crescita, e cedendo in cambio zuccheri al fungo. Grazie alla simbiosi micorrizica, la pianta diventa più resistente a stress biotici o abiotici, aumenta la tolleranza alla mancanza di acqua o alla presenza di inquinanti, e porta a una riduzione della sua suscettibilità ai più comuni agenti patogeni (Smith e Read, 2008). Lo scambio equilibrato tra i due partners è ora descritto come un mercato biologico, dove ognuno dei due partner ottiene la giusta ricompensa (Kiers et al., 2011).

Le modalità con cui le piante si associano ai funghi simbiotici sono svariate e danno origine a una lunga lista di categorie riconoscibili in base alla morfologia, al funzionamento, alla posizione tassonomica dei partner e alle caratteristiche dell'interfaccia simbiotica che si crea tra pianta e fungo (Smith e Read, 2008). Tuttavia, uno dei contributi più interessanti emersi dall'applicazione delle tecniche di biologia molecolare alle micorrize raccolte in campo è che l'associazione tra taxon fungino e tipologia micorrizica è molto lassa: lo stesso fungo può associarsi a piante diverse e stabilire interazioni morfologicamente diverse. Uno degli esempi più convincenti è dato da funghi ectomicorrizici (come le russule, o i tartufi) che colonizzano radici di orchidee, dimostrando una grande plasticità adattativa (Girlanda et al., 2005).

Questa review si focalizza su un unico tipo di simbiosi micorrizica, quella arbuscolare, che è la più antica (strutture simili alle micorrize arbuscolari sono documentate da fossili che risalgono al Devoniano) e coinvolge la maggior parte delle piante erbacee appartenenti a specie coltivate, per esempio, riso, mais e pomodoro (Bonfante e Genre, 2008). Particolare attenzione viene



data a risultati che si basano su approcci di genomica e genomica funzionale (i cosiddetti approcci omics) e che hanno permesso di evidenziare le peculiarità dei funghi AM e delle interazioni con le piante ospiti. Inoltre, dati di ecogenomica hanno evidenziato come i funghi AM non solo siano molto diffusi nel suolo (Lumini et al., 2011) sotto forma di reti di micelio che interconnettono piante diverse, ma anche si associano a gruppi di batteri con cui agiscono in sinergia (Dames e Rinsdale, 2012), oltre che presentare al loro interno popolazioni batteriche (Bonfante e Anca, 2009). L'identificazione di proteobatteri filogeneticamente vicini a *Bourkolderia*, ma funzionalmente correlati con gli endobatteri simbiotici degli insetti (Ghignone et al., 2012) ha permesso di aprire una finestra sul significato funzionale di tali interazioni. Dall'altra parte, la scoperta di altri endobatteri, identificati come vicini ai Mollicuti sulla base del 16S ribosomale (Nauman et al., 2010; Desirò et al., 2012) suggerisce che i funghi AM ospitano un bacterial microbiome ancora inesplorato.

Sulla base delle sequenze del gene ribosomale 18S, i funghi AM sono stati inseriti nel phylum dei Glomeromycota, che è un gruppo separato rispetto agli Asco- e Basidiomiceti (Schubler et al., 2001). Nonostante che nuove informazioni filogenetiche siano state ottenute attraverso analisi di diversi geni e la creazione di data base (Opik et al., 2010), ulteriori dati sono sicuramente necessari per definire meglio questo phylum, e le sue relazioni con gli altri taxa fungini. A partire dal 2009 la filogenesi dei funghi AM è stata affrontata anche utilizzando geni mitocondriali: il sequenziamento del genoma mitocondriale di *Glomus intraradices* (Lee e Young, 2009), di *Gigaspora rosea* e *Gi. margarita* (Nadimi et al., 2012; Pelin et al., 2012) ha inequivocabilmente suggerito una stretta relazione con gli Zigomiceti, come *Mortierella*. Questi dati ricordano le ipotesi di Beniamino Peyronel che descrisse gli attuali funghi AM come Ficomicetoidi, vicini alle Mortierelle (Peyronel, 1923).

#### IL CONTRIBUTO DELLE NUOVE TECNOLOGIE CELLULARI E MOLECOLARI ALLA BIOLOGIA DEI FUNGHI ARBUSCOLARI MICORRIZICI

A partire dagli anni '90, periodo in cui fu lanciato il progetto Human Genome Project (HGP), abbiamo imparato come sequenziare un genoma voglia dire determinare l'ordine delle quattro basi azotate che compongono lo scheletro del DNA permettendo la lettura di tutta la molecola, e dando le basi meccanicistiche per capire il make up genetico di una specie. Da quei lavori pionieristici sono emerse enormi quantità di dati generati dal sequenziamen-

to di microorganismi, funghi e piante oltre che animali (vedere ad esempio <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/>). La classica tecnologia di sequenziamento Sanger è stata superata negli ultimi anni da metodiche genericamente definite Next Generation Sequencing che permettono letture multiple e parallele di migliaia di singoli frammenti di DNA di lunghezza media compresa tra le 400 e 500 paia di basi. Questo significa che si possono produrre tantissimi dati che provengono dalla lettura di milioni di basi in relativamente poco tempo. Le informazioni vanno però poi assemblate usando un genoma di riferimento. È questa la fase più lunga e complessa dei lavori che usano le piattaforme NGS.

I funghi AM non sono sfuggiti a questa logica. Il sequenziamento di *Glo-mus intraradices* strain DAOM 197198 è partito nel 2004 basandosi su una strategia Sanger (<http://www.jgi.doe.gov/sequencing/DOEmicrobes2004.html>), ma a causa dello stato biotrofico del fungo, il progetto ha incontrato inattese difficoltà che hanno reso il suo completamento non immediatamente raggiungibile (Martin et al., 2008). Solo adesso grazie alle NGS il genoma è stato assemblato, e osservazioni non ancor pubblicate (Francis Martin, *Glo-mus* Genome Consortium, GGC, in preparazione) mostrano un genoma di circa 150 Mb (10 volte di più del previsto!) con circa 30.000 geni codificanti. In attesa che il genoma di *G. intraradices* sia del tutto annotato, il crescente numero di sequenze EST ottenute all'interno del consorzio GGC, database INRA *Glomus*: <http://mycor.nancy.inra.fr/genomeResources.php>) ha fornito importanti informazioni sulla biologia di questi funghi (Tisserant et al., 2012). I dati assemblati da 25.906 trascritti danno una buona visione del trascrittoma del fungo fotografato in diverse condizioni del suo ciclo vitale: spore germinate, micelio trattato con strigolattoni (cfr. paragrafo “Le molecole segnale che sono alla base dell'interazione”), micelio simbiotico. Tra i dati più significativi ci sono quelli che mostrano come *G. intraradices* abbia trascritti che codificano per il processo meiotico. Questo risultato è molto interessante in quanto geni coinvolti nella meiosi sono stati identificati e caratterizzati anche da altri gruppi (Halary et al., 2011), suggerendo che la mancata dimostrazione di una riproduzione sessuata non sia dovuta a mancanza dei geni necessari e dei loro trascritti. Vale inoltre la pena osservare che la strategia “riproduzione asessuata” comunque non ha impedito il successo sia nel tempo sia nello spazio dei funghi AM. Questo sembra un paradosso, perché uno dei dogmi della biologia è che la variabilità genetica legata agli eventi di ricombinazione sia la chiave per il successo evolutivo degli organismi viventi.

Altre caratteristiche emerse dall'analisi del trascrittoma riguardano le sequenze che codificano per small secreted proteins che – insieme con la man-

canza di geni che codificano per la degradazione della parete cellulare dell'ospite – sono condivise con funghi ectomicorrizi finora sequenziati (Bonfante e Genre 2010 per ulteriori referenze, Lanfranco e Young, 2012). Sembra pertanto che i funghi simbionti siano accomunati da alcune caratteristiche dei loro genomi, nonostante le forti lontananze filogenetiche.

#### LE PIANTE MODELLO PER LA SIMBIOSI AM: NON SOLO LEGUMINOSE PER STUDIARE I PATHWAY DI SEGNALAZIONE

Se la biologia dei funghi AM ha sofferto (e soffre tuttora) per le forti limitazioni sperimentali causate da organismi biotrofi obbligati, le piante ospiti sono molto meglio conosciute. Con l'eccezione di *Arabidopsis thaliana*, pianta non ospite per i funghi AM, molte delle piante il cui genoma è stato sequenziato (riso, medicago, pomodoro, vite, melo) sono eccellenti ospiti per i Glomeromycota. Per questi motivi, le risposte della pianta alla colonizzazione del fungo AM rappresentano un capitolo ricco di informazioni che si basano sulla genetica, sull'uso dei mutanti, su tecniche cellulari e molecolari. Una descrizione dettagliata di come i funghi AM colonizzano le radici delle loro piante ospiti esula dagli scopi di questo capitolo. La figura 1 riassume le tappe essenziali: nella rizosfera (la zona di suolo che circonda le radici), le spore dei funghi AM germinano e formano un'ifa di germinazione, con cui arrivano a contattare l'apparato radicale. Studi recenti hanno dimostrato la presenza di segnali molecolari rilasciati dal fungo che sono percepiti dalla pianta prima ancora che avvenga il contatto fisico con il fungo (Bonfante e Requena, 2011). A questo punto la pianta emette dei segnali di riconoscimento, gli strigolattoni, molecole in grado di provocare l'allungamento e la ramificazione del micelio in direzione dell'ospite. Dopo il riconoscimento dell'ospite, dall'ifa fungina si originano gli ifopodi, ovvero strutture infettive allargate e multinucleate che aderiscono alla superficie della radice e consentono la penetrazione del fungo. Nella seconda fase, gli ifopodi formano ife di penetrazione che crescono intercellularmente dentro la radice e intracellularmente fino agli strati corticali, dando vita agli arbuscoli, le strutture responsabili degli scambi nutritizi. Gli arbuscoli sono costituiti da un tronco principale da cui si dipartono numerosi rami laterali; essi non vengono mai a diretto contatto con il citoplasma della cellula ospite, ma sono separati da questo dalla membrana della cellula ospite. Il fungo resta pertanto "confinato" in uno spazio apoplastico rispetto alla cellula colonizzata (Bonfante, 2001). Nelle simbiosi AM questo compartimento è chiamato compartimento d'interfaccia

ed è costituito dalla membrana plasmatica dell'ospite che si invagina intorno alle ife intracellulari (membrana periarbuscolare), da uno spazio in cui viene deposto del materiale in comune alla parete cellulare vegetale, dalla parete cellulare e dalla membrana plasmatica fungina (Balestrini e Bonfante, 2005). Gli arbuscoli invecchiano e collassano dopo pochi giorni. Per rimpiazzare quelli senescenti, se ne formano continuamente di nuovi, per cui in una stessa radice micorrizzata è possibile trovare arbuscoli a tutti gli stadi di sviluppo.

Un approccio, inoltre, che è stato portatore di grandi scoperte è il confronto tra la simbiosi micorrizica e la simbiosi azoto fissatrice che nelle radici delle leguminose porta allo sviluppo dei noduli (Parniske, 2008). Per questi motivi, le leguminose come *Medicago truncatula*, *Lotus japonicus*, *Pisum sativum* e i loro mutanti sono tra le piante più studiate rispetto alle interazioni con i funghi AM.

A partire dal gruppo di Martin Parniske (2004), molti ricercatori hanno identificato geni che nelle leguminose svolgono ruoli simili e hanno sequenze altamente conservate. Questi geni prendono il nome di SYM genes, in quanto mediano la risposta della pianta non solo ai fattori fungini, influenzando l'instaurarsi della simbiosi e i primi stadi di colonizzazione della radice, ma anche a molecole batteriche, controllando l'instaurarsi dei noduli radicali. Lo studio dei geni del common SYM pathway è in continua evoluzione, come ben riassumono Singh e Parniske (2012) in una loro recente review. Per alcuni geni il ruolo simile nelle due simbiosi è ben definito: ad esempio il gene SYMRK, che codifica per una chinasi che partecipa al meccanismo di trasduzione dei segnali simbiotici. La via comune di segnalazione include anche una chinasi recettoriale, DMI2, che si localizza sulla membrana plasmatica, e si ritiene responsabile dell'attivazione di una cascata di segnali attraverso eventi di fosforilazione; un canale cationico, DMI1, localizzato sulla membrana nucleare; e una chinasi calcio-dipendente posizionata all'interno del nucleo, DMI3 (Singh e Parniske, 2012). La via di segnalazione SYM porta all'espressione dei geni necessari allo sviluppo della simbiosi. Uno degli eventi cruciali che ha luogo durante questa sequenza è lo scatenarsi di oscillazioni della concentrazione di ioni calcio dentro e intorno al nucleo della cellula epidermica. Si ritiene che tali segnali vengano decodificati dalla chinasi calcio-dipendente, localizzata nel nucleoplasma, DMI3.

Al contrario, non è chiaro se i recettori che lavorano a monte e percepiscono il segnale batterico, il Nod factor, siano gli stessi che percepiscono i fattori fungini (Myc factor/s). Alcuni studi suggeriscono che i geni NFR1 e NFP siano richiesti per la nodulazione, ma non per la simbiosi AM (Ben Amour et al., 2003; Chaboud et al., 2011), mentre altri report sembrano suggerire che molecole segnale simili (Nod e Myc factor, vedi paragrafo successivo) si leghino agli stessi recettori nelle due simbiosi (Maillet et al., 2011; Op Camp et al., 2011).

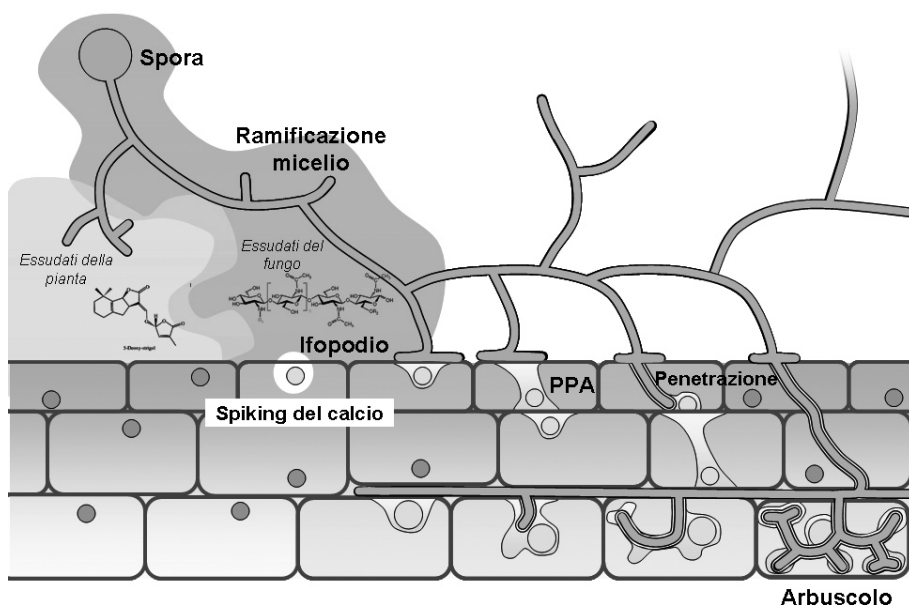


Fig. 1 Schema che illustra il processo di colonizzazione di una radice da parte di un fungo AM. La spora germina producendo un breve tubetto di germinazione. Nel momento in cui il fungo percepisce le molecole segnale rilasciate dalla pianta (viene mostrata la molecola di uno strigolattone), esso va incontro a un intenso processo di ramificazione, aumentando la probabilità di contatto con il suo ospite. Nello stesso tempo, il fungo rilascia molecole bioattive (viene riportata la molecola di un lipochitooligosaccaride), che sono percepite dalla radice, dove scatenano oscillazioni di calcio attraverso l'attivazione di un processo di segnalazione, definito common SYM pathway. La trasduzione del segnale porta all'attivazione di numerosi processi. Il contatto tra pianta e fungo si concretizza nella formazione di un ifopodio che stimola la formazione di un aggregato citoplasmatico chiamato apparato di prepenetrazione (PPA). Durante il suo sviluppo intracellulare il fungo segue tendenzialmente la strada segnata dal PPA come se fosse un binario. Una volta raggiunte le cellule corticali, il fungo si ramifica dando origine al tipico arbuscolo che occupa la gran parte del volume cellulare. Modificato da Bonfante e Genre 2010

Tuttavia, il fatto che i geni della via di segnalazione siano conservati anche nelle piante non leguminose (ad esempio in riso) dimostra chiaramente che il processo di trasduzione del segnale che passa attraverso i geni SYM è molto antico e conservato, e precede sicuramente la separazione tra dico- e monocotiledoni.

#### LE MOLECOLE SEGNALE CHE SONO ALLA BASE DELL'INTERAZIONE

La successione di eventi che interessa i due partner simbiotici durante lo sviluppo della simbiosi AM si può dividere in tre momenti principali: una prima

tappa in cui i due organismi, che non hanno ancora stabilito un contatto diretto, si scambiano dei messaggi chimici in un vero e proprio dialogo molecolare; una seconda tappa in cui avviene il contatto, con formazione dell'ifopodio e dell'apparato di prepenetrazione, e infine l'evento di colonizzazione vera e propria, con la formazione degli arbuscoli intraradicali e l'acquisizione della piena funzionalità della simbiosi (fig. 1).

Lo scambio di segnali chimici tra piante e funghi micorrizici è uno dei settori più affascinanti della biologia delle interazioni. Si sa che nella rizosfera, ancora prima che i due partner arrivino a un contatto diretto, si svolge uno scambio di molecole segnale capaci di informare l'uno della presenza dell'altro. Tra le molecole segnale rilasciate dalla pianta e percepite dai funghi AM sono recentemente stati individuati gli strigolattoni (Akiyama et al., 2005), induttori della ramificazione e della crescita delle ife fungine e dell'aumento dell'attività metabolica (Besserer et al., 2006). Si tratta di molecole note da più di 50 anni (fig. 1), già caratterizzate come fattori che inducono la germinazione dei semi di *Striga*, una pianta parassita. A queste molecole oggi si attribuisce anche una funzione ormonale, in quanto sono in grado di regolare lo sviluppo sia della radice sia del fusto, rappresentando quindi uno degli hot topics nella biologia vegetale (Xie et al., 2010). Contemporaneamente il fungo rilascia a sua volta dei segnali chimici diffusibili, chiamati Myc Factors, che inducono la pianta ad accogliere il fungo. La loro esistenza fu suggerita da un esperimento in cui il contatto diretto tra fungo e pianta era impedito dalla presenza di una membrana impenetrabile dal fungo (Kosuta et al., 2003): la regolazione di geni specifici per la simbiosi ha dimostrato che la pianta ospite percepisce un segnale diffusibile in grado di attraversare la membrana. Tali fattori diffusibili (Myc factors) attivano specifiche vie di trasduzione del segnale, modificando, oltre all'espressione genica (Kuhn et al., 2010; Ortu et al., 2012) lo sviluppo radicale (Mukherjee e Ané, 2011) e il metabolismo degli zuccheri (Gutjahr et al., 2009). La natura chimica di alcune molecole presenti negli essudati dei funghi AM è stata caratterizzata di recente. Già da tempo era stato ipotizzato che tali sostanze avessero una struttura di base chitinosa; oggi, grazie al lavoro di Maillet et al. (2011), si conosce la struttura di uno di questi fattori: si tratta di lipooligosaccaridi (Myc LCOs), molto simili ai fattori Nod, ma con struttura più semplice (fig. 1). È stato ipotizzato che queste piccole differenze possano rappresentare la chiave che consente alle leguminose di discriminare i due tipi di segnali.

Se da un lato questi parallelismi sembrano confermare l'ipotesi di un'origine evolutiva della nodulazione a partire dalla simbiosi AM, resta da chiarire attraverso quale meccanismo i batteri simbiotici azoto fissatori abbiano acquisito la capacità di produrre e rilasciare molecole segnale omologhe a quelle

di origine fungina. Si può ipotizzare che questa capacità sia stata ereditata tramite trasferimento genico orizzontale; alternativamente altre molecole di origine fungina possono avere un ruolo altrettanto importante (Bonfante e Requena, 2011). Tale ipotesi è stata recentemente confermata con l'identificazione di chitooligosaccaridi (Genre et al., 2013).

In seguito al reciproco scambio di segnali, segue una fase di avvicinamento che culmina con la formazione dell'ifopodio (Parniske, 2008). A questo punto la crescita fungina si arresta per un periodo che va dalle 4 alle 6-12 ore durante il quale sono stati osservati diversi processi che portano all'espressione di geni coinvolti nell'accoglienza del fungo, ad esempio il gene *ENOD11* (Chabaud et al., 2002). Tale gene sembra avere un ruolo nel modificare la plasticità della parete nelle cellule radicali e quindi consentire la penetrazione del fungo. Contemporaneamente, nel citoplasma della cellula con cui il fungo ha stabilito un contatto, si assiste all'organizzazione di uno specifico apparato, denominato apparato di prepenetrazione (PPA). Esso consiste in una sorta di colonna citoplasmatica, ricca di elementi del citoscheletro, reticolo endoplasmatico e componenti della via di secrezione. La formazione del PPA sembra essere guidata dal nucleo che, precedentemente, si posiziona nella zona di contatto dell'ifopodio e da lì si sposta, guidando verso lo strato corticale l'apparato in formazione. Solo al termine di questi eventi l'ifa fungina può dare inizio alla penetrazione vera e propria della cellula. I segnali che inducono la formazione del PPA restano sconosciuti, anche se è stata dimostrata la sua dipendenza dall'attivazione della common SYM pathway (Genre et al., 2005).

#### DALLE RADICI AI FRUTTI: COME CAMBIA IL PROFILO TRASCRIZIONALE

Gli approcci di trascrittomica compiuti su piante modello hanno convincentemente dimostrato che la pianta ospite reagisce ai segnali fungini, al contatto, alla colonizzazione e poi alla formazione degli arbuscoli con straordinari cambiamenti sia nella organizzazione cellulare (fig. 2) sia nell'espressione genica. Tali studi hanno dimostrato infatti come *Medicago* e *Lotus* ben rispondano alle molecole segnale lipochitooligosaccaridiche (Czaja et al., 2012), al contatto del fungo (Ortu et al., 2012), alle prime fasi di colonizzazione (Siciliano et al., 2009), e infine alla fase di colonizzazione arbuscolare (tra gli altri, Liu et al., 2003; Honj et al., 2005; Guether et al., 2009; Hoge et al., 2011).

A conferma dei dati morfologici che evidenziano un forte meccanismo di ri-programmazione cellulare (Bonfante e Genre, 2010, fig. 2), i lavori di trascrittomica funzionale hanno dimostrato come l'arbuscolo sia davvero il cuore

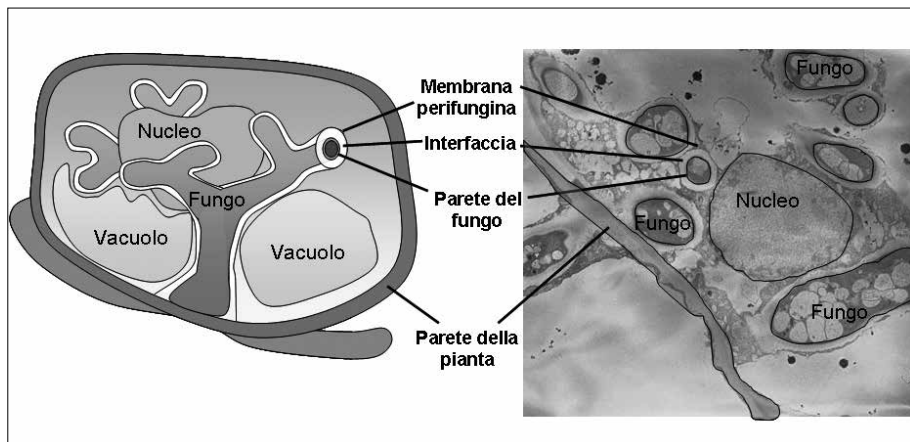


Fig. 2 La figura mostra l'organizzazione di una cellula arbuscolata. Nello schema si evidenzia come l'ifa fungina intracellulare sia avvolta da una membrana che è continua con la membrana periferica, pur essendo molecularmente differente. Si identifica in questo modo una zona detta di interfaccia che è uno spazio apoplastico che circonda e isola il fungo, ma nello stesso tempo media gli scambi nutrizionali tra pianta e fungo. Il vacuolo si sviluppa occupando lo spazio lasciato dal fungo, mentre il nucleo aumenta il suo volume e occupa una posizione centrale tra i rami fungini. L'immagine di microscopia elettronica mostra alcun dettagli come si possono osservare in una cellula di *Lotus japonicus*. Il compartimento di interfaccia è chiaramente visibile attorno al fungo mentre gli organelli della cellula vegetale si affollano attorno alla membrana perifungina. Modificato da Bonfante e Genre 2010

della simbiosi e come svariate nuove funzioni emergano proprio dall'intima interazione tra le fini ramificazioni arbuscolari e la cellula corticale. Sono soprattutto geni che codificano per i trasportatori di nutrienti che vengono attivati: in primis il trasportatore di fosfato che è considerato il marker funzionale della simbiosi e la cui espressione controlla strettamente la morfologia dell'arbuscolo e i processi che portano alla biogenesi della membrana periarbuscolare (Javot et al., 2007; Pumplin et al., 2012). Inoltre, negli ultimi anni sono stati caratterizzati numerosi altri trasportatori: quello dell'ammonio (Guether et al., 2009), di aminoacidi (Gueter et al., 2011), e di molecole di acqua tramite aquaporine (Giovannetti et al., 2012). Nella fabbrica di intensa attività cellulare che è la cellula arbuscolata anche tutta una serie di geni legati alla costruzione della membrana periarbuscolare vengono attivati: sono geni che codificano ad esempio per la Vapyrin (Pumplin et al., 2010), una proteina che regola la funzionalità della cellula arbuscolata. La presenza del fungo attiva inoltre numerosi potenziali fattori trascrizionali. Ben 24 sono stati segnalati da Guether et al. (2009), alcuni dei quali confermati recentemente da Hoge Kamp et al. (2012). Tuttavia a differenza di quanto avviene per la simbiosi azotata (Libault et al., 2009), il



significato funzionale e la validazione di questi potenziali TF non è ancora stato chiarito. Insieme con l'attivazione di microRNA che sono stati segnalati recentemente come regolatori delle reti di interazione (Branscheid et al., 2010), essi possono essere coinvolti nel processo di regolazione a breve e a lunga distanza dei segnali simbiotici. Numerosi altri lavori hanno infatti segnalato come l'effetto della simbiosi micorrizica si eserciti a lunga distanza: non solo sul fusto dando maggiore resistenza a batteri patogeni (Liu et al., 2007), e cambiando il suo profilo trascrittomico (Fiorilli et al., 2009), ma anche sui frutti (Salvioli et al., 2012). Nel caso del pomodoro i dati trascrittomici sono validati da dati metabolici che mostrano come in pomodori derivati da piante micorrizzate ci sia un significativo aumento di composti antiossidanti (Giovannetti et al., 2012).

Nuove ricerche sembrano ora indicare ulteriori direzioni: un potenziale fattore di trascrizione che già era emerso da un'analisi trascrittomica (Guether et al., 2009) come differenzialmente espresso nelle radici micorrizzate, è risultato appartenere a una antica famiglia di geni coinvolti nella Pi starvation (Volpe et al., 2012). Questo gene da noi chiamato LjMAMI (per Meristem and Arbuscular Mycorrhizal Induced) è risultato essere non solo espresso nelle cellule arbuscolate ma anche nei meristemi radicali. Grazie allo sviluppo di linee silenziata abbiamo dimostrato che il gene blocca la ramificazione delle radici, e che il processo è riattivato dalla presenza del fungo (Volpe et al., 2012). Questi dati dimostrano in modo convincente che l'effetto dei funghi simbiotici sulla radice passa attraverso l'attivazione di geni che sono coinvolti in processi ancora più generali di quelli tradizionalmente ipotizzati: sembrano infatti controllare processi morfogenetici cruciali, come lo sviluppo della radice.

## CONCLUSIONI E PROSPETTIVE

Da questa ovviamente non comprensiva revisione di alcuni aspetti recenti riguardanti la biologia delle simbiosi AM, si possono trarre alcune conclusioni: i funghi AM sono sicuramente importanti componenti del plant microbiome e come tali rappresentano delle componenti benefiche che devono essere utilizzati al meglio nell'ambito di strategie agronomiche più rispettose della natura.

L'impatto dei funghi simbiotici sulla fisiologia della radice e della pianta nel suo complesso è straordinario: vengono attivate molte funzioni che non sono solo strettamente legate all'assunzione e al trasferimento di nutrienti dal suolo alla pianta –tramite il fungo che agisce come un ponte bioattivo. Tra quelle emerse recentemente si devono ricordare i processi di difesa basati sull'attivazione di eventi

di priming (Pozo e Azcón-Aguilar, 2007), processi morfogenetici come quelli legati allo sviluppo dell'apparato radicale (Volpe et al., 2012) e sorprendentemente eventi che controllano la fertilità (Tansengko et al., 2003, 2004).

Tutti questi caratteri alcuni dei quali inaspettati, suggeriscono nuove linee di sviluppo per l'utilizzazione della simbiosi micorrizica nell'ambito della sostenibilità: da una parte l'uso di inoculi micorrizici già sul mercato da anni (Gianinazzi et al., 2010) potrà essere incrementato grazie a inoculi più efficienti e sicuri, dall'altra parte grazie alle nuove tecniche di breeding, si può auspicare la selezione di varietà di piante di interesse agronomico che rispondano al meglio agli effetti positivi dei funghi AM.

#### RINGRAZIAMENTI

Paola Bonfante ringrazia le dottoresse Mara Novero e Maria Teresa Della Belfa per l'aiuto nella preparazione delle figure e nella compilazione della bibliografia. I fondi per la ricerca illustrata in questa nota derivano dal progetto BIOBIT-CIPE <http://www.biobits.di.unipmn.it>, dal Progetto ARaS (Parchi Biotecnologici) e dal Progetto Prin 2010.

#### RIASSUNTO

Un corpo umano contiene dieci volte più cellule batteriche che umane e le centinaia di specie batteriche che vivono con noi costituiscono il microbioma umano, una straordinaria sorgente di diversità genetica e funzionale. Lo scopo della nota è di fare il punto sul meno conosciuto microbioma vegetale, focalizzando l'attenzione sui funghi micorrizici arbuscolari (AM) che determinano la simbiosi AM. Grazie ai progetti di sequenziamento, alle nuove tecnologie di genomica funzionale e allo sviluppo di piattaforme che permettono un confronto tra geni espressi in diverse piante ospiti, si delinea un quadro di grande complessità: piante e funghi scambiano segnali già nella rizosfera e iniziano un processo di interazione che porta a cospicui cambiamenti della fisiologia della pianta ospite. Gli effetti a livello sistemico osservati in piante coltivate (dalle radici, al fusto, ai frutti) suggeriscono prospettive che sembrano particolarmente favorevoli nel contesto di un'agricoltura che voglia rispettare l'ambiente in modo sostenibile.

#### ABSTRACT

An increasing body of evidence illustrates how the health of multicellular organisms such as animals and plants relies on their tight association with complex and diverse microbial communities (microbiomes). The total number of microbial cells found in

the human gut microbiome may exceed the number of cells making up the human body itself by a factor of ten-to-one, while the number of genes associated with the human microbiome could exceed the total number of human genes by a factor of hundred-to-one. Similarly, plants rely on the still largely unknown plant giving special attention to arbuscular mycorrhizal (AM) fungi, the microbes which establish the AM symbiosis with the roots of most of land plants. Thanks to the sequencing projects, the Next Generations Sequencing approaches and the platforms which allow comparisons among huge sets of data, a highly complex scenario is now emerging. Plants and fungi exchange signals in the rhizosphere and start an interaction process leading to important changes in plant metabolism. AM fungi cause deep systemic effects which may have relevant consequences on the physiology of crop plants. The new knowledge opens perspectives which can be discussed in the context of a more sustainable agriculture.

## BIBLIOGRAFIA

- AKIYAMA K., MATSUZAKI K., HAYASHI H. (2005): *Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi*, «Nature», 435, pp. 824-827.
- BALESTRINI R., BONFANTE P. (2005): *The interface compartment in arbuscular mycorrhizae: A special type of plant cell wall?*, «Plant Biosystems», 139, pp. 8-15.
- BEN AMOR B., SHAW S.L., OLDROYD G.E.D., MAILLET F., PENMETSA R.V., COOK D., LONG S.R., DENARIE J., GOUGH C. (2003): *The NFP locus of Medicago truncatula controls an early step of Nod factor signal transduction upstream of a rapid calcium flux and root hair deformation*, «Plant Journal», 34, pp. 495-506.
- BESSERER A., PUECH-PAGES V., KIEFER P., GOMEZ-ROLDAN V., JAUNEAU A., ROY S., PORTAIS J. C., ROUX C., BECARD G., SEJALON-DELMAS N. (2006): *Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria*, «PLoS Biol.», 4, e226.
- BONFANTE P. (2001): *At the interface between mycorrhizal fungi and plants: the structural organization of cell wall, plasma membrane and cytoskeleton*. In: Hock, B. (ed.), *The Mycota, IX: Fungal Associations*, Springer, Berlin, pp. 45-61.
- BONFANTE P., ANCA I.A. (2009): *Plants, mycorrhizal fungi, and bacteria: a network of interactions*, «Annual Review of Microbiology», 63, pp. 363-383.
- BONFANTE P., GENRE A. (2008): *Plants and arbuscular mycorrhizal fungi: an evolutionary-developmental perspective*, «Trends in Plant Science», 13, pp. 492-498.
- BONFANTE P., GENRE A. (2010): *Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis*, «Nature Communications», 1, p. 48.
- BONFANTE P., REQUENA N. (2011): *Dating in the dark: how roots respond to fungal signals to establish arbuscular mycorrhizal symbiosis*, «Current Opinion in Plant Biology», 14, pp. 451-457.
- BRANSCHIED A., SIEH D., DATT P.B., MAY P., DEVERS E.A., ELKROG A., SCHAUER L., SCHEIBLE W.R., KRAJINSKI F. (2010): *Expression pattern suggests a role of MiR399 in the regulation of the cellular response to local Pi increase during arbuscular mycorrhizal symbiosis*, «Mol. Plant Microb. Interact.», 23, pp. 915-926.
- CHABAUD M., VENARD C., DEFAUX-PETRAS A., BECARD G., BARKER D.G. (2002): *Targeted inoculation of Medicago truncatula in vitro root cultures reveals MtENOD11 expression during early stages of infection by arbuscular mycorrhizal fungi*, «New Phytologist», 156, pp. 265-273.

- CHABAUD M., GENRE A., SIEBERER B.J., FACCIO A., FOURNIER J., NOVERO M., BARKER D.G., BONFANTE P. (2011): *Arbuscular mycorrhizal hyphopodia and germinated spore exudates trigger Ca<sup>2+</sup> spiking in the legume and nonlegume root epidermis*, «New Phytologist», 189, pp. 347-355.
- CZAJA L.F., HOGEKAMP C., LAMM P., MAILLET F., MARTINEZ E.A., SAMAIN E., DÉNARIÉ J., KÜSTER H., HOHNJEC N. (2012): *Transcriptional responses toward diffusible signals from symbiotic microbes reveal MtNFP- and MtDMI3-dependent reprogramming of host gene expression by arbuscular mycorrhizal fungal lipochitooligosaccharides*, «Plant Physiology», 159, pp. 1671-1685.
- DAMES J.F., RIDSDALE C.J. (2012): *What we know about arbuscular mycorrhizal fungi and associated soil bacteria*, «African Journal of Biotechnology», 11, pp. 13753-13760.
- DESIRÒ A., NAUMANN M., EPIS S., NOVERO M., BANDI C., GENRE A., BONFANTE P. (2012): *Mollicutes-related endobacteria thrive inside liverwort-associated arbuscular mycorrhizal fungi*, «Environmental Microbiology» doi:10.1111/j.1462-2920.2012.02833.x
- FIORILLI V., CATONI M., MIOZZI L., NOVERO M., ACCOTTO G.P., LANFRANCO L. (2009): *Global and cell-type gene expression profiles in tomato plants colonized by an arbuscular mycorrhizal fungus*, «New Phytologist», 184, pp. 975-987.
- GENRE A., CHABAUD M., TIMMERS T., BONFANTE P., BARKER D.G. (2005): *Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in Medicago truncatula root epidermal cells before infection*, «Plant Cell», 17, pp. 3489-3499.
- GENRE A., CHABAUD M., BALZERGUE C., PUECH-PAGÈS V., NOVERO M., REY T., FOURNIER J., ROCHANGE S., BÉCARD G., BONFANTE P., and BARKER D.G. (2013): *Short-chain chitin oligomers from arbuscular mycorrhizal fungi trigger nuclear Ca<sup>2+</sup> spiking in Medicago truncatula roots and their production is enhanced by strigolactone*, «New Phytologist» in press
- GHIGNONE S., SALVIOLI A., ANCA I., LUMINI E., ORTU G., PETITI, L., CRUVEILLER S., BIANCIOTTO V., PIFFANELLI P., LANFRANCO L., BONFANTE P. (2012): *The genome of the obligate endobacterium of an AM fungus reveals an interphylum network of nutritional interactions*, «ISME Journal», 6, pp. 136-145.
- GIANINAZZI S., GOLLOTTE A., BINET M.N., van TUINEN D., REDECKER D., WIPF D. (2010): *Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services*, «Mycorrhiza», 20, pp. 519-530.
- GILL S.R., POP M., DEBOY R.T., ECKBURG P.B., TURNBAUGH P.J., SAMUEL B.S., GORDON J.I., RELMAN D.A., FRASER-LIGGETT C.M., NELSON K.E. (2006): *Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome*, «Science», 312, pp. 1355-1359.
- GIOVANNETTI M., AVIO L., BARALE R., CECCARELLI N., CRISTOFANI R., IEZZI A., MIGNOLLI F., PICCIARELLI P., PINTO B., REALI D., SBRANA C., SCARPATO R. (2012): *Nutraceutical value and safety of tomato fruits produced by mycorrhizal plants*, «British Journal of Nutrition», 107, pp. 242-251.
- GIOVANNETTI M., BALESTRINI R., VOLPE V., GUETHER M., STRAUB D., COSTA A., LUDWIG U., BONFANTE P. (2012): *Two putative-aquaporin genes are differentially expressed during arbuscular mycorrhizal symbiosis in Lotus japonicus*, «BMC Plant Biology», 12, p. 186.
- GIRLANDA M., SELOSSE M.A., CAFASSO D., BRILLI F., DELFINE S., FABBIAN R., GHIGNONE S., PINELLI P., SEGRETO R., LORETO F., COZZOLINO S., PEROTTO S. (2005): *Inefficient photosynthesis in the Mediterranean orchid Limodorum abortivum is mirrored by specific association to ectomycorrhizal Russulaceae*, «Molecular Ecology», 15, pp. 491-504.

- GUETHER M., BALESTRINI R., HANNAH M., He J., UDVARDI M.K., BONFANTE P. (2009): *Genome-wide reprogramming of regulatory networks, transport, cell wall and membrane biogenesis during arbuscular mycorrhizal symbiosis in Lotus japonicus*, «New Phytologist», 182, pp. 200-212.
- GUETHER M., NEUHÄUSER B., BALESTRINI R., DYNOWSKI M., LUDEWIG U., BONFANTE P. (2009): *A mycorrhizal-specific ammonium transporter from Lotus japonicus acquires nitrogen released by arbuscular mycorrhizal fungi*, «Plant Physiology», 150, pp. 73-83.
- GUETHER M., VOLPE V., BALESTRINI R., REQUENA N., WIPF D., BONFANTE P. (2011): *LjLHT1.2 - a mycorrhiza-inducible plant amino acid transporter from Lotus japonicus*, «Biology and Fertility of Soils», 47, pp. 925-936.
- GUTJAHR C., NOVERO M., GUETHER M., MONTANARI O., UDVARDI M., BONFANTE P. (2009): *Presymbiotic factors released by the arbuscular mycorrhizal fungus Gigaspora margarita induce starch accumulation in Lotus japonicus roots*, «New Phytologist», 183, pp. 53-61.
- HALARY S., MALIK S.B., LILDHAR L., SLAMOVITS C.H., HIJRI M., CORRADI N. (2011): *Conserved meiotic machinery in Glomus spp., a putatively ancient asexual fungal lineage*, «Genome Biology and Evolution», 3, pp. 950-958.
- HOGKAMP C., ARNDT D., PEREIRA P.A., BECKER J.D., HOHNJEC N., KUSTER H. (2011): *Laser-microdissection unravels cell-type specific transcription in arbuscular mycorrhizal roots, including CAAT-box TF gene expression correlating with fungal contact and spread*, «Plant Physiology», 157, pp. 2023-2043.
- HOHNJEC N., VIEWEG M.E., PUHLER A., BECKER A., KUSTER H. (2005): *Overlaps in the transcriptional profiles of Medicago truncatula roots inoculated with two different Glomus fungi provide insights into the genetic program activated during arbuscular mycorrhiza*, «Plant Physiology», 137, pp. 1283-1301.
- JAVOT H., PENMETS R.V., TERZAGHI N., COOK D.R., HARRISON M.J. (2007): *A Medicago truncatula phosphate transporter indispensable for the arbuscular mycorrhizal symbiosis*, «Proceedings of the National Academy of Sciences USA», 104, pp. 1720-1725.
- KIERS E.T., DUHAMEL M., BEESSETTY Y., MENSAH J.A., FRANKEN O., VERBRUGGEN E., FELLBAUM C.R., KOWALCHUK G.A., HART M.M., BAGO A., PALMER T.M., WEST S.A., VANDENKOORNHUYSE P., JANS A.J., BÜCKING H. (2011): *Reciprocal rewards stabilize co-operation in the mycorrhizal symbiosis*, «Science», 333, pp. 880-882.
- KOSUTA S., CHABAUD M., LOUGNON G., GOUGH C., DÉNARIÉ J., BARKER D.G., BECARD G. (2003): *A diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi induces symbiosis-specific MtENOD11 expression in roots of Medicago truncatula*, «Plant Physiology», 131, pp. 952-962.
- KUHN H., KÜSTER H., REQUENA N. (2010): *Membrane Steroid Binding Protein 1 induced by a diffusible fungal signal is critical for mycorrhization in Medicago truncatula*, «New Phytologist», 185, pp. 593-595.
- LANFRANCO L., YOUNG J.P.W. (2012): *Genetic and genomic glimpses of the elusive arbuscular mycorrhizal fungi*, «Current Opinion in Plant Biology», 15, pp. 454-461.
- LEE J., YOUNG J.P. (2009): *The mitochondrial genome sequence of the arbuscular mycorrhizal fungus Glomus intraradices isolate 494 and implications for the phylogenetic placement of Glomus*, «New Phytologist», 183, pp. 200-211.
- LIBAULT M., JOSHI T., BENEDITO V.A., XU D., UDVARDI M.K., STACEY G. (2009): *Legume transcription factor genes: what makes legumes so special?*, «Plant Physiology», 151, pp. 991-1001.

- LIU J., BLAYLOCK L.A., ENDRE G., CHO J., TOWN C.D., VANDEN BOSCH K.A., HARRISON M.J. (2003): *Transcript profiling coupled with spatial expression analyses reveals genes involved in distinct developmental stages of an arbuscular mycorrhizal symbiosis*, «Plant Cell», 15, pp. 2106-2123.
- LIU J., MALDONADO-MENDOZA I., LOPEZ-MEYER M., CHEUNG F., TOWN C.D., HARRISON M.J. (2007): *Arbuscular mycorrhizal symbiosis is accompanied by local and systemic alterations in gene expression and an increase in disease resistance in the shoots*, «Plant Journal», 50, pp. 529-544.
- LORITO M., WOO S.L., HARMAN G.E., MONTE E. (2010): *Translation research on Trichoderma: from 'omics to the field*, «Annual Review of Phytopathology», 48, pp. 395-417.
- LUMINI E., BIANCIOTTO V., BONFANTE P. (2011): *La biodiversità fungina nel suolo: un approccio di metagenomica*, in *La biodiversità e il metagenoma del terreno agrario: La biodiversità nel terreno agrario* (Firenze, 19 novembre 2010); *Il metagenoma del suolo: problematiche di ricerca e prospettive applicative* (Firenze, 6 dicembre 2010), «I Georgofili. Quaderni», 2010-IX, pp. 35-48.
- MAILLET F., POINSOT V., ANDRÉ O., PUECH-PAGÈS V., HAOUY A., GUEUNIER M., CROMER L., GIRAUDET D., FORMEY D., NIEBEL A., MARTINEZ E.A., DRIGUEZ H., BECARD G., DÉNARIÉ J. (2011): *Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza*, «Nature» 469, pp. 58-63.
- MARTIN F., GIANINAZZI-PEARSON V., HIJRI M., LAMMERS P., REQUENA N., SANDERS I.R., SHACHAR-HILL Y., SHAPIRO H., TUSKAN G.A., YOUNG J.P.W. (2008): *The long hard road to a completed Glomus intraradices genome*, «New Phytologist», 180, pp. 747-750.
- MUKHERJEE A., ANÉ J. (2011): *Germinating spore exudates from arbuscular mycorrhizal fungi: molecular and developmental responses in plants and their regulation by ethylene*, «Mol Plant Microb Interact», 24, pp. 260-270.
- NADIMI M., BEAUDET D., FORGET L., HIJRI M., LANG B.F. (2012): *Group I Intron-Mediated Trans-splicing in Mitochondria of Gigaspora rosea and a Robust Phylogenetic Affiliation of Arbuscular Mycorrhizal Fungi with Mortierellales*, «Molecular Biology and Evolution», doi: 10.1093/molbev/mss088.
- NAUMANN M., SCHÜSSLER A., BONFANTE P. (2010): *The obligate endobacteria of arbuscular mycorrhizal fungi are ancient heritable components related to the Mollicutes*, «ISME Journal» 4, pp. 862-871.
- OP DEN CAMP R., STRENG A., DE MITA S., CAO Q., POLONE E., LIU W., AMMIRAJU J.S.S., KUDRNA D., WING R., UTERGASSER A et al. (2011): *LysM-type mycorrhizal receptor recruited for Rhizobium symbiosis in non legume Parasponia*. Science doi: 10.1126/science.1198181.
- ÖPIK M., VANATOA A., VANATOA E., MOORA M., DAVISON J., KALWIJ J.M., REIER Ü., ZOBEL M. (2010): *The online database MaarjAM reveals global and ecosystemic distribution patterns in arbuscular Mycorrhizal fungi (Glomeromycota)*, «New Phytologist», 188, pp. 223-241.
- ORGIAZZI A., LUMINI E., NILSSON R.H., GIRLANDA M., VIZZINI A., BONFANTE P., BIANCIOTTO V. (2012): *Unravelling soil fungal communities from different Mediterranean land-use backgrounds*, PLoS One 7(4) e34847.
- ORTU G., BALESTRINI R., PEREIRA P.A., BECKER J.D., KÜSTER H., BONFANTE P. (2012): *Plant genes related to gibberellin biosynthesis and signaling are differentially regulated during the early stages of AM fungal interactions*, «Molecular Plant», 5, pp. 951-954.
- PARNISKE M. (2004): *Molecular genetics of the arbuscular mycorrhizal symbiosis*, «Current Opinion in Plant Biology», 7, pp. 414-421.

- PARNISKE M. (2008): *Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses*, «Nature Reviews Microbiology», 6, pp. 763-775.
- PELIN A., POMBERT J.F., SALVIOLI A., BONEN L., BONFANTE P., CORRADI N. (2012): *The mitochondrial genome of the arbuscular mycorrhizal fungus Gigaspora margarita reveals two unsuspected trans-splicing events of group I introns*, «New Phytologist», 194, pp. 836-845.
- PEYRONEL B. (1923): *Prime ricerche sulle micorrize endotrofiche e sulla micofiora radicolare normale delle fanerogame*, «Riv. di Biologia», 5, pp. 463-485.
- POZO, M.J., AZCÓN-AGUILAR C. (2007): *Unravelling mycorrhiza-induced resistance*, «Current Opinion in Plant Biology», 10, pp. 393-398.
- PUMPLIN N., ZHANG X., NOAR R.D., HARRISON M.J. (2012): *Polar localization of a symbiosis-specific phosphate transporter is mediated by a transient reorientation of secretion*, «Proceedings of the National Academy of Sciences», 109, pp. 665-672.
- PUMPLIN N., MONDO S.J., TOPP S., STARKER C.G., GANTT J.S., HARRISON, M.J. (2010): *Medicago truncatula Vapyrin is a novel protein required for arbuscular mycorrhizal symbiosis*, «Plant Journal», 61, pp. 482-494.
- READ D.J., DUCKETT J.G., FRANCIS R., LIGRONE R., RUSSELL A. (2000): *Symbiotic fungal associations in 'lower' land plants*, «Philosophical Transactions of the Royal Society of London series B-Biological Sciences», 355, pp. 815-830.
- SALVIOLI A., ZOUARI I., CHALOT M., BONFANTE P. (2012): *The arbuscular mycorrhizal status has an impact on the transcriptome profile and amino acid composition of tomato fruit*, «BMC Plant Biology», 12, p. 44.
- SCHUSSLER A., SCHWARZOTT D., WALKER C. (2001): *A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution*, «Mycol. Res.», 105, pp. 1413-1421.
- SICILIANO V., GENRE A., GENRE A., BALESTRINI R., CAPPELLAZZO G., deWIT P.J.G.M., BONFANTE P. (2007): *Transcriptome analysis of arbuscular mycorrhizal roots during development of the prepenetration apparatus*, «Plant Physiology», 144, pp. 1455-1466.
- SINGH S., PARNISKE M. (2012): *Activation of calcium- and calmodulin-dependent protein kinase (CCaMK), the central regulator of plant root endosymbiosis*, «Current Opinion in Plant Biology», 15, pp. 444-453.
- SMITH S.E., READ D.J. (2008): *Mycorrhizal symbiosis*, London, UK, Elsevier.
- TANSENGCO M.L., HAYASHI M., KAWAGUCHI M., IMAIZUMI-ANRAKU H., MUROOKA Y. (2003): *Crinkle, a novel symbiotic mutant that affects the infection thread growth and alters the root hair, trichome, and seed development in Lotus japonicus*, «Plant Physiology», 131, pp. 1054-1063.
- TANSENGCO M.L., IMAIZUMI-ANRAKU H., YOSHIKAWA M., TAKAGI S., KAWAGUCHI M., HAYASHI M., MUROOKA Y. (2004): *Pollen development and tube growth are affected in the symbiotic mutant of Lotus japonicus, crinkle*, «Plant Cell Physiology», 45, pp. 511-520.
- TISSERANT E., KOHLER A., DOZOLME-SEDDAS P., BALESTRINI R., BENABDELLAH K., COLLARD A., CROLL D., DA SILVA C., GOMEZ S.K., KOUL R., FERROL N., FIORILLI V., FORMEY D., FRANKEN P., HELBER N., HIJRI M., LANFRANCO L., LINDQUIST E., LIU, Y., MALBREIL M., MORIN E., POULAIN J., SHAPIRO H., TUINEN D. van, WASCHKE A., AZCÓN-AGUILAR C., BÉCARD G., BONFANTE P., HARRISON M.J., KÜSTER H., LAMMERS P., PASZKOWSKI U., REQUENA N., RENSING S.A., ROUX C., SANDERS I.R., SHACHAR-HILL Y., TUSKAN G., YOUNG J.P.W., GIANINAZZI-PEARSON V., MARTIN F. (2012): *The transcriptome of the arbuscular mycorrhizal fungus Glomus intraradices (DAOM 197198) reveals functional tradeoffs in an obligate symbiont*, «New Phytologist», 193, pp. 755-769.

VOLPE V., DELL'AGLIO E., GIOVANNETTI M., RUBERTI C., COSTA A., GENRE A., GUETHER M., BONFANTE P. (2012): *An AM induced-MYB-family gene of Lotus japonicus (LjMAMI) affects root growth in an AM-independent manner*, «The Plant Journal» (in press).

XIE X., YONEYAMA K., YONEYAMA K. (2010): *The strigolactone story*, «Annual Review of Phytopathology», 48, pp. 93-117.



## Simbiosi nell'uomo e potenziali applicazioni

### I BATTERI E IL CORPO UMANO

I batteri sono una delle forme di vita più antica sulla terra. Grazie alle pressoché infinite capacità metaboliche, i batteri sono in pratica ubiquitari e dominano qualunque ambiente. Sono riusciti ad adattarsi alle più diverse condizioni ambientali e interagiscono con qualunque forma vivente sul nostro pianeta (Mc Arthur, 2006). L'esempio principale d'interazione tra batteri e ospite è l'uomo. Questa vastissima comunità microbica è composta di circa diecimila miliardi di cellule (un fattore 10 in più rispetto al numero di cellule umane), più di mille differenti specie che interagiscono con il nostro corpo stimolando il sistema immunitario, collaborando nel processo digestivo, proteggendoci da eventuali patogeni, producendo sostanze che possono promuovere il nostro benessere o al contrario possono risultare dannose per l'organismo. La massa di batteri nel nostro corpo pesa all'incirca 1.5 kg. Fondamentalmente è corretto descrivere l'uomo come un'associazione di materiale genetico presente nel genoma dell'uomo stesso (circa 30.000 geni) e nel genoma dei batteri (2-4 milioni di geni) che vivono nel nostro corpo (microbioma). Questa profonda relazione prende il nome di mutualismo (Parfrey et al., 2011). È interessante notare come, nonostante una certa variabilità tra individui, esiste una definita comunità di batteri che si ritrova in tutti gli individui indipendentemente dalla dieta che questi consumano, dal loro stile di vita o dal luogo della terra in cui vivono. In pratica, nei millenni l'uomo si è co-evoluto con delle forme batteriche creando una vera e propria simbiosi in cui entrambe le parti traggono un beneficio reciproco.

\* *Laboratory of Microbial Ecology and Technology (LabMET), Ghent University*

Qualunque distretto corporeo è colonizzato da batteri a partire dal momento stesso in cui veniamo al mondo (Blackburn et al., 2007). In questa introduzione riporteremo qualche esempio di come i batteri colonizzino il nostro corpo e di quale ruolo possano avere. Ci focalizzeremo poi specificamente sul tratto gastrointestinale una degli ambienti con la più alta concentrazione di batteri.

La colonizzazione della pelle, così come quella del cavo orale, da parte dei batteri inizia al momento del parto attraverso il passaggio nel canale vaginale. Sebbene nei primi giorni di vita la pelle risulti essere scarsamente popolata, dopo sole 6 settimane alcune aree del corpo (es. ascelle o basso ventre) hanno una comunità microbica paragonabile a quella di un adulto. Dal punto di vista dei microorganismi, i bulbi piliferi e i follicoli rappresentano la via principale d'ingresso nell'epidermide, anche se in questa regione diverse ghiandole sono in grado di produrre sostanze antibatteriche e acidificanti. In generale comunque la pelle non è una superficie semplice da colonizzare per i batteri grazie alla barriera formata dal continuo strato di cheratina, la disponibilità di acqua limitata, il pH acido e il fatto di essere costantemente esposta a stress meccanici e ambientali. Per questa ragione, la pelle è principalmente colonizzata da batteri Gram+ (tra questi *Staphylococcus epidermidis* è il dominante) in grado di resistere meglio alle condizioni ambientali descritte. Al contrario, i batteri Gram- non sono normalmente identificati sulla pelle, con l'eccezione di *Acinetobacter* spp. nelle zone più umide. In generale comunque la composizione e la densità dei batteri sulla pelle è molto variabile se si considerano diversi siti anatomici. Un fattore chiave che determina la concentrazione di batteri sulla pelle sono le ghiandole sebacee e sudorifere in grado di secernere nutrienti e acqua per i batteri. Una caratteristica fondamentale della comunità microbica della cute è l'azione di prevenzione nei confronti di potenziali patogeni. Quest'azione avviene attraverso una competizione diretta per spazio e nutrienti e la produzione di sostanze antibatteriche ( $H_2O_2$ , acido lattico, acido acetico, antibiotici, batteriocine...) (Wilson, 2005).

Come la pelle, anche il cavo orale, con una superficie di circa 200 cm<sup>2</sup> (di cui il 20% è rappresentato dai denti), è abitato da una vasta comunità microbica associata alla mucosa orale. Dal momento che la funzione della bocca è legata alla masticazione dei cibi, la relativa comunità microbica è soggetta a notevoli stress meccanici e idrodinamici. Inoltre, la saliva è ricca di proteine in grado di coagulare i batteri presenti nel cibo che, restando in sospensione, sono quindi ingeriti. Inoltre la saliva contiene numerose sostanze antimicrobiche e immunoglobulina A. Da ultimo l'epitelio del cavo orale è ricco di linfociti e cellule di Langerhans, pronti a iniziare una specifica difesa

immunitaria. Pertanto, la comunità microbica della bocca è adattata a vivere sotto la pressione selettiva di numerosi fattori ambientali: stress meccanico, nutrienti derivati dalla saliva e dalla mucosa, stress fisico-chimico (cambiamenti in pH o temperatura durante l'assunzione di cibo). Nonostante ciò, più di 200 differenti specie batteriche sono state isolate dalla cavità orale e tecniche molecolari hanno mostrato la presenza di circa 700 filotipi. Tra questi i più abbondanti sono le specie batteriche in grado di aderire efficientemente ai recettori presenti nella mucosa, sul tratto gengivale e la superficie dei denti: *Streptococcus sanguis*, *Strep. Oralis*, *Strep. mitis* biovar 1, *Neisseria* spp., *Haemophilus* spp., *Actinomyces* spp., e streptococchi. Questi colonizzatori principali hanno un importante ruolo ecologico in quanto sono in grado di consumare l'ossigeno presente degradando le macromolecole prodotte dall'ospite. In questo modo creano le condizioni ambientali necessarie per i colonizzatori secondari, come *Fusobacterium nucleatum*, in grado di aderire agli altri batteri presenti nel biofilm batterico creando strette interazioni metaboliche (Wilson, 2005).

Anche il tratto respiratorio è colonizzato da batteri. In media un adulto respira circa 10.000 litri di aria al giorno e con essa un enorme numero di particelle e batteri. Dal momento che questo sistema è molto sensibile, numerosi sistemi di difesa agiscono a sua protezione. In primis, l'azione meccanica delle mucocilie imprigiona i batteri in un sottile strato di muco che viene in seguito ingerito o eliminato. A quest'azione meccanica, si aggiunge la produzione costitutiva di peptidi ad azione anti-microbica (es: lisozima e lattoferrine) e acido nitrico. Nonostante questi meccanismi, numerose sono le specie batteriche che vivono nell'apparato respiratorio riuscendo ad aderire sulla superficie ricoperta di muco. Tra queste, Streptococchi, *Strep. pyogenes*, *Strep. pneumoniae*, *Neisseria* spp., *Haemophilus* spp., *Moraxella* spp., *Staph. aureus*, *Corynebacterium* spp., *Propionibacterium* spp., *Prevotella* spp., Mollicutes (*Mycoplasma* spp. e *Ureaplasma* spp.), e *Porphyromonas* spp. (Wilson, 2005).

Da ultimo, un altro interessante esempio è rappresentato dal sistema riproduttivo femminile in cui, la comunità batterica associata alla vagina gioca un ruolo fondamentale per la salute della donna. Infatti, questi microorganismi – per la maggior parte lactobacilli – grazie a una corposa produzione di acido lattico contribuiscono a mantenere il pH vaginale acido, creando un ambiente ostile per l'invasione di patogeni. Inoltre la presenza di pH acido è anche dovuta al metabolismo del glicogeno presente nelle cellule epiteliali. Quando questa comunità batterica viene disturbata è facile incorrere in possibili infezioni che portano alla cosiddetta vaginosi batterica. La comu-

nità batterica di donne sane è principalmente formata dai seguenti generi: *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Can. albicans*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Veillonella* e *Gardnerella vaginalis* (Wilson, 2005).

Da questi brevi esempi, è evidente che i batteri vivono associati al corpo umano e che hanno un ruolo fondamentale in numerose attività. L'esempio più eclatante di ciò sarà analizzato nelle pagine successive: il tratto gastrointestinale, l'ambiente caratterizzato dalla più alta concentrazione di batteri nell'uomo.

#### IL TRATTO GASTROINTESTINALE

Il tratto gastrointestinale ospita una vastissima comunità microbica. Tutto il canale digestivo è massivamente colonizzato da batteri con una concentrazione crescente a partire dallo stomaco (circa  $10^2$ - $10^3$  cellule batteriche per mL), dove la crescita dei batteri è limitata per la presenza di un ambiente particolarmente acido, fino al colon con una concentrazione di circa  $10^{11}$ - $10^{12}$  cellule batteriche per grammo di materiale fecale. Il tratto gastrointestinale di un adulto contiene organismi appartenenti a tutti e tre i domini della vita: batteri, archea ed eucarioti. Sebbene siano state descritte 55 divisioni batteriche, solo 8 di queste sono state individuate fino a ora nel tratto gastrointestinale e due sono i phyla dominanti (Bacteroidetes e Firmicutes). A livello di divisioni batteriche, le comunità microbiche di tutti gli esseri umani appaiono molto simili. Tuttavia, se la stessa comunità viene analizzata a livello delle singole specie, il microbiota intestinale diventa a livello individuale personalizzato come un'impronta digitale.

Per molti anni si è pensato che la funzione principale del colon fosse esclusivamente di assorbimento di acqua e sali e preparazione del materiale fecale per essere espulso. Tuttavia, la ricerca condotta negli ultimi anni ha chiaramente dimostrato che questa fosse una visione estremamente semplificata del colon. Infatti, l'altissimo numero di batteri che risiedono nel colon ha un ruolo fondamentale per l'uomo, codificando per funzioni metaboliche coinvolte nella fermentazione di substrati che non possono essere digeriti dall'uomo, produzione di biomassa, di segnali molecolari o di molecole con funzione antimicrobica per aumentare la resistenza verso specifici patogeni, sintesi di vitamine fondamentali, stimolazione del sistema immunitario. In pratica, il microbiota intestinale è un organo aggiuntivo all'interno dell'uomo

che, sotto la pressione di una selezione naturale si è co-evoluto con l'uomo, diventando in grado di codificare specifici percorsi metabolici che non si sono mai sviluppati nell'uomo stesso. D'altro canto, esistono prove che specifiche conformazioni del microbioma e specifici microorganismi possono essere correlati con situazioni negative per la salute umana, come per esempio obesità, allergie o gravi stati d'infiammazione (Possemiers et al., 2009).

La composizione unica di questo ecosistema è in relazione alla specifica organizzazione funzionale e la selezione naturale che avviene sia a livello microbico che dell'ospite. Questa selezione tende a promuovere una cooperazione mutuale tra le parti alla ricerca di una stabilità funzionale, in analogia con la teoria dell' 'Evolutionary Stable Strategy' (Blaser e Kirschner, 2007; Van den Abbeele et al., 2011). I batteri devono riuscire a superare le difese dell'ospite senza però arrecare un danno, fatto che ridurrebbe la possibilità per i batteri di prosperare nel nuovo *habitat*. Questa costante selezione avviene primariamente a livello della mucosa intestinale attraverso un costante scambio di segnali tra batteri e ospite. Il risultato è che solo quei batteri che vengono riconosciuti come amichevoli sono tollerati e riescono a interagire con l'ospite aderendo alla mucosa e secernendo specifici fattori solubili (es. analoghi di ormoni, omoserin lattone o altre molecole coinvolte nei processi di *quorum sensing*) che riescono a modulare la risposta immunitaria dell'ospite stesso impegnato a riconoscere i cosiddetti MAMPs (Microbe-Associated Molecular Patterns).

#### 'GASTROINTESTINAL RESOURCE MANAGEMENT' (GRM)

Lo sviluppo di tecniche molecolari avanzate ha permesso negli ultimi anni di approfondire la conoscenza del ruolo che i batteri possono avere all'interno del corpo umano. In termini economici, la comunità microbica può essere vista a seconda delle situazioni sia come *asset* o *liability*. Infatti, come descritto nel paragrafo precedente il rapporto tra comunità microbica e ospite è soggetto a un fine bilanciamento tra possibili aspetti positivi e negativi (fig. 1). Da qui l'importanza di riuscire a modificare queste interazioni – a livello sia di composizione che di attività metabolica della comunità microbica – in modo da favorire le possibili interazioni mutualistiche. Strategie atte a modificare queste interazioni possono basarsi sull'introduzione di una specie specifica o sul tentativo di modulare in generale l'ecosistema microbico. Un tipico esempio potrebbe essere l'uso di specifici ceppi batterici ingegnerizzati per produrre specifiche proteine immuno-modulatorie e che funzionano quindi come veicoli di vaccini a livello

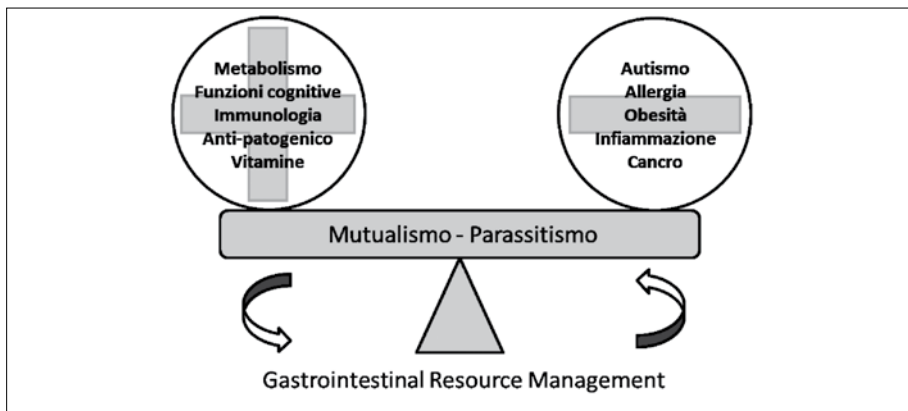


Fig. 1 Visualizzazione del concetto di *Gastrointestinal Resource Management*, la modulazione del microbiota intestinale al fine di ottenere un effetto positivo per la salute dell'ospite

della mucosa intestinale (Braat et al., 2006). In molti casi comunque, l'effetto finale sulla salute dell'uomo non può essere attribuito a una specie in particolare ma è il risultato di un'azione complessa che coinvolge diversi gruppi batterici che interagiscono con l'ospite a diversi livelli.

La capacità di modificare la struttura e l'attività della comunità microbica inducendo modifiche che possano essere positive per la salute dell'ospite è stata recentemente definita come 'Gastrointestinal Resource Management' (GRM), gestione delle risorse microbiche intestinali (Marzorati et al., 2010a). Il concetto di GRM è in stretta assonanza con il ben più noto 'Human Resource Management' (gestione delle risorse umane): all'interno di un'azienda si deve cercare di favorire le migliori interazioni possibili tra i dipendenti in modo che tutti possano rendere al massimo, massimizzando il ritorno economico per l'azienda stessa. Allo stesso modo, il concetto di GRM implica la capacità di ottimizzare i percorsi metabolici della comunità microbica intestinale al fine di ottenere un effetto positivo per la salute dell'ospite.

Se il corpo umano viene considerato con il suo complesso microbioma, le possibilità "terapeutiche" diventano molteplici. Da un lato il gruppo di geni presenti nel microbioma intestinale è coinvolto nel metabolismo di quei prodotti che non vengono assorbiti durante la digestione, dall'altro codifica per una serie di fattori direttamente coinvolti nell'interazione con l'ospite, influenzandone la risposta immunitaria. Esistono molteplici possibilità per influenzare e modificare l'interazione tra batteri e ospite nel tratto gastrointestinale. L'approccio più comune risiede nel consumare i cosiddetti cibi funzionali (es: prebiotici, probiotici o sinbiotici). I prebiotici sono ingredienti alimentari, non digeribili, in grado di

stimolare selettivamente la crescita o l'attività di una o di un limitato numero di specie batteriche utili nel colon, esercitando in questo modo un'azione benefica (Roberfroid, 2007). Tipici prebiotici sono fibre alimentari e oligosaccaridi che, non essendo digeriti dall'uomo, giungono nel colon intatti e possono essere fermentati dai batteri, producendo sostanze (acidi grassi a catena corta - SCFA) benefiche per l'organismo. Due SCFA sono di particolare interesse: il butirrato che agisce come fonte di energia per le cellule dell'epitelio intestinale e ha effetti protettivi contro infiammazione e cancro del colon; il propionato che ha un'azione locale simile al butirrato e inoltre, una volta assorbito, viene trasportato al fegato dove svolge un'azione di abbassamento del colesterolo e controllo della glicemia (Wong et al., 2006). Secondo la definizione ufficiale di FAO e OMS, i probiotici sono "organismi vivi che, somministrati in quantità adeguata, apportano un beneficio alla salute dell'ospite" (FAO/WHO, 2001). Per la maggior parte si tratta di batteri lattici e bifidobatteri ma anche alcuni lieviti e bacilli possono essere utili. In generale questi batteri devono resistere alle difficili condizioni del tratto superiore del canale digestivo (pH acido dello stomaco e alta concentrazione di sali biliari nell'intestino tenue) per poter svolgere le loro funzioni benefiche nell'ileo e colon. La combinazione di un prebiotico e un probiotico prende il nome di sinbiotico. Un prodotto sinbiotico è caratterizzato dalla presenza di una fibra o fonte di carbonio altamente selettiva per il probiotico, massimizzando in questo modo l'azione di quest'ultimo.

È importante sottolineare il fatto che al di là di singole specie batteriche che possono direttamente avere un effetto positivo sulla salute dell'ospite, la struttura stessa della comunità microbica (diversità e abbondanza relativa delle singole specie) e la fitte rete di interazioni metaboliche giocano un ruolo fondamentale nell'attività del microbiota intestinale. Prova di ciò è il fatto che, in seguito a trattamenti con antibiotici che alterano il normale equilibrio della flora intestinale, numerose patologie o stati di malessere possono insorgere nell'ospite. L'esempio più eclatante sono le infezioni ospedaliere di *Clostridium difficile*, un patogeno in grado di causare diarrea e colite e in situazioni specifiche anche la morte del paziente (nel 2004, 23 casi di morte ogni milione di pazienti). *C. difficile* non è normalmente un patogeno di grande importanza in quando non riesce a mantenersi e competere contro un microbiota intestinale sano. Tuttavia, quando in seguito a trattamenti antibiotici consistenti la normale struttura del microbiota intestinale viene distrutta, *C. Difficile* riesce a prendere il sopravvento. In questi casi, un ulteriore trattamento antibiotico per debellare il patogeno può non essere sufficiente. Infatti, se da un lato la concentrazione del patogeno diminuisce in seguito all'azione dell'antibiotico, dall'altro permane la situazione di una comunità microbica altamente modificata (disbiosi) e quindi

prona a nuove infezioni. Una possibile soluzione al problema è il trapianto del microbiota intestinale (attraverso uno o più enteroclistmi di un campione fecale) da un individuo sano nel paziente che soffre di un'infezione ricorrente di *C. difficile*. Ristabilendo la normale microflora intestinale si ricreano le condizioni di competizioni tra microorganismi, *C. difficile* non è più in grado di proliferare e si raggiunge la remissione di tutti i sintomi clinici (Bakken et al., 2011). Il trapianto del microbiota intestinale è stato applicato con successo anche in casi di colite, costipazione grave e nella sindrome dell'intestino irritabile (Borody et al., 1989).

#### METODI DI STUDIO: IN VITRO/IN VIVO

Nel paragrafo precedente è stato introdotto il concetto di modificare il microbiota intestinale al fine di garantire un effetto positivo per la salute dell'ospite. Tuttavia, per modificare la microflora intestinale bisogna prima di tutto poter studiare l'ecologia e capire come i batteri si comportano in determinate situazioni. Le domande fondamentali cui dare una risposta sono tre:

- Chi c'è? Le innovative tecniche molecolari attualmente disponibili permettono di analizzare in dettaglio la composizione del microbiota intestinale.
- Chi fa cosa? Non è solo importante sapere quale specie batteriche siano presenti. Bisogna anche capire quale di queste specie sono potenzialmente coinvolte nei percorsi metabolici che devono essere modificati per ottenere l'effetto sperato.
- Chi fa cosa con chi? Questa è la parte più complicata del lavoro perché spesso i giocatori coinvolti in un determinato processo sono molteplici e molteplici fattori devono essere presi in considerazione al fine di indurre un cambiamento metabolico che possa rappresentare un beneficio per l'ospite.

Nel momento in cui è possibile fornire una risposta a queste 3 domande si riesce a comprendere e quindi anche potenzialmente a gestire la comunità microbica intestinale e quei fattori che determinano il rispettivo agire mutualistico.

Esistono diverse possibilità per poter studiare l'effetto di un determinato prodotto sulla composizione e attività metabolica della comunità microbica intestinale. Lo standard di riferimento è rappresentato ovviamente da studi clinici su uomo. È intuitivo comprendere che, se si vuole immettere sul mercato un prodotto caratterizzato da una specifica attività sulla salute dell'uomo



(*health claim*), si debba prima dimostrare la reale efficacia del prodotto nel contesto in cui verrà applicato. Tuttavia, questo genere di approccio è senza dubbio costoso e dispendioso in termini di tempo. Stesso discorso vale per gli studi condotti su animali con in aggiunta l'aspetto negativo che spesso la fisiologia dell'apparato digerente e la composizione della comunità microbica dell'animale impiegato nello studio (es. topo) sono totalmente diversi da quelle dell'uomo. Inoltre, entrambi gli approcci hanno una limitazione fondamentale in termini di comprensione del potenziale meccanismo d'azione di un determinato prodotto nel tratto gastrointestinale a causa della difficoltà intrinseca di collezionare campioni rappresentativi. Si parla quindi di *black box approach* ossia di un approccio in cui si riesce ad analizzare quello che viene inserito nel sistema e quanto ne esce ma senza sapere cosa accade esattamente nelle zone meno accessibili del tratto gastrointestinale (Marzorati et al., 2009).

Per poter sopperire a queste limitazioni degli studi in vivo, sono state sviluppate specifiche tecnologie in vitro, veri e propri simulatori del tratto gastrointestinale. Questi possono essere utilizzati in maniera complementare agli studi in vivo e l'operatore ha il vantaggio di poter semplicemente collezionare campioni per qualunque tipo di analisi. Ovviamente meglio un simulatore riesce a riprodurre la reale diversità e complessità del tratto gastrointestinale maggiore è il valore scientifico e commerciale dei risultati ottenuti. Tra tutti i simulatori sviluppati, il *Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem* (SHIME) è già stato impiegato più volte con successo in studi finalizzati alla comprensione del meccanismo di azione di un determinato prodotto e al suo impiego in termini di GRM (fig. 2). I dati ottenuti in questi studi sono stati poi validati anche con studi in vivo fornendo pertanto una prova della validità scientifica di questo sistema.

La piattaforma tecnologica dello SHIME è un modello dinamico del tratto gastrointestinale composto da 5 reattori che simulano in sequenza stomaco (diminuzione sigmoidale del pH e aggiunta di pepsina), intestino tenue (aggiunta di sali biliari, succo pancreatico, pH a 6.8/7 e simulazione dei processi di assorbimento di zuccheri semplici, aminoacidi e grassi) e le tre aree principali del colon: colon ascendente, trasverso e discendente (Marzorati et al., 2009). Gli ultimi tre reattori sono inoculati con una comunità microbica originata da un campione fecale. Attraverso un attento controllo dei parametri ambientali è possibile ottenere una comunità microbica stabile e altamente rappresentativa delle diverse zone del colon in vivo, sia in termini di composizione sia di attività metabolica. Un tipico esperimento tende a riprodurre i tempi e le condizioni caratteristiche de-



Fig. 2 *Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME)*

gli studi clinici in vivo: due settimane di controllo, con una dieta base, in cui si misurano tutti i parametri di base; tre settimane di trattamento per valutare l'impatto di un determinato prodotto (es: prebiotico, probiotico, ingrediente funzionale, farmaco...) sull'attività e composizione del microbiota intestinale; infine, due settimane di *washout* in cui si riutilizza la dieta base per valutare se i cambiamenti indotti dal trattamento restano o meno stabili nel tempo.

Da ultimo, recenti sviluppi tecnologici hanno permesso di espandere le possibilità di studio con lo SHIME al fine di poter valutare l'interazione tra ospite e microbiota. Due sono i fattori chiave da analizzare: da un lato la capacità dei batteri di aderire alla parete intestinale (normalmente protetta da uno strato di mucosa), dall'altro la capacità dei medesimi batteri di modulare la risposta dell'ospite in termini di stimolazione del sistema immunitario, pro- anti-infiammazione e permeabilità. Sono stati quindi sviluppati dei sistemi aggiuntivi che possono essere utilizzati in combinazione con lo SHIME al fine di valutare l'interazione tra ospite e microbiota: M-SHIME (Mucus-SHIME) e modulo HMI (*Host-Microbiota Interaction*). L'M-SHIME contiene un numero elevato di microcosmi in plastica ricoperti con uno strato di agar e mucina. In questo modo viene a formarsi una superficie simile alla mucosa intestinale su cui i batteri possono aderire. È così possibile studiare l'effetto di specifici trattamenti sulla frazione di batteri a maggior contatto con l'ospite (Van den Abbeele

et al., 2012). Il modulo HMI è invece un reattore caratterizzato da due compartimenti separati da una membrana semipermeabile ricoperta con uno strato di agar e mucina. Il compartimento superiore è una simulazione del lume intestinale e può essere utilizzato per studiare la formazione del biofilm batterico nel tratto gastrointestinale. Il compartimento inferiore rappresenta l'ospite tramite linee cellulari di enterociti (Caco-2 o simili) e può essere utilizzato per studiare la potenziale risposta dell'ospite ai metaboliti batterici che permeano dal compartimento superiore. In questo modo è possibile investigare l'adattamento dell'ospite nei confronti di uno specifico trattamento per un periodo di circa 48 h, il tempo in cui normalmente un enterocita è esposto sui villi al contenuto del lume intestinale (Marzorati et al., 2010b).

L'utilizzo combinato di queste tecnologie in vitro permette pertanto di aumentare il valore scientifico e commerciale dei risultati ottenuti e, come già detto, permette di comprendere il potenziale meccanismo di azione di determinati prodotti in un'area del corpo umano non facilmente raggiungibile. Nel prossimo paragrafo presenteremo alcuni esempi.

#### RUOLO DEL MICROBIOTA INTESTINALE: DATI IN VITRO E IN VIVO

In questo paragrafo finale riporteremo tre esempi (un prebiotico, un probiotico e un polifenolo estratto dalle piante) del potenziale ruolo positivo che i batteri ricoprono nel tratto gastrointestinale e di come l'uso combinato di studi in vivo e in vitro ha permesso di elucidare quest'attività.

##### *Prebiotico*

EpiCor (Embria, USA), un prodotto derivante dalla fermentazione del lievito *Saccharomyces cerevisiae*, è stato associato, in alcuni studi clinici, alla modulazione del sistema immunitario. Tuttavia, nonostante si conoscesse l'effetto sistemico, il meccanismo d'azione a livello del tratto digerente rimaneva in gran parte sconosciuto. Uno studio di diverse settimane con lo SHIME, ha dimostrato che l'assunzione di dosi ripetute del prodotto (0.63 grammi/giorno) è in grado di modificare la comunità batterica intestinale sia a livello del lume che della mucosa intestinale (diminuzione di potenziali patogeni, aumento della concentrazione di lattobacilli e bifidobatteri). Inoltre, il trattamento è anche associato a un aumento della produzione di butirrato, un

acido grasso a catena corta con riconosciuta attività immuno-protettiva. Studi con linee cellulari umane combinate con campioni prelevati dallo SHIME nel corso della sperimentazione hanno, in effetti, dimostrato una diminuita produzione di interleuchina 8, una citochina pro-infiammatoria. In conclusione, il microbiota autoctono è in grado di utilizzare il fermentato di lievito, producendo dei metaboliti che hanno un potenziale effetto positivo sulla salute dell'ospite (Possemiers et al., 2012).

### *Probiotico*

Nel campo dei probiotici, un esempio interessante di utilizzo combinato di studi in vitro/in vivo è il caso dell'attività di abbassamento del colesterolo da parte di un ceppo di *Lactobacillus reuteri*, caratterizzato da un'alta attività idrolasica specifica per i sali biliari. Studi con lo SHIME hanno dimostrato che questo ceppo, quando aggiunto al sistema come un probiotico, è in grado di metabolizzare il colesterolo nell'ileo, modificandone quindi in teoria i livelli di assorbimento. Studi in vivo su maiali hanno, in effetti, dimostrato che quando *L. reuteri* viene addizionato alla dieta dell'animale è possibile osservare una diminuzione significativa di colesterolo totale e LDL (De Smet et al., 1998; De Boever et al., 2000).

### *Polifenoli*

I fitoestrogeni sono composti di origine vegetale con attività estrogenica. Tuttavia le piante spesso contengono solo i precursori delle molecole con reale effetto biologico. È il caso dell'estratto di luppolo spesso utilizzato per alleviare gli effetti collaterali della menopausa. Questo estratto non sempre è efficace e vi è una alta variabilità individuale. Studi *in vitro* hanno elucidato il perché: il precursore deve essere attivato per esercitare la necessaria attività biologica e questo avviene per opera di specifici microorganismi presenti nel tratto gastrointestinale. Non tutte le donne possiedono nel loro microbiota i microorganismi necessari alla conversione metabolica e questo spiega la diversa efficacia del medesimo prodotto (Possemiers et al., 2006). Studi in vivo su animali e uomo hanno poi confermato che l'esposizione finale alle molecole bioattive originate dai fitoestrogeni è strettamente dipendente dall'attività del microbiota intestinale (Bolca et al., 2007a; Bolca et al., 2007b).

## CONCLUSIONI

I batteri e l'uomo si sono co-evoluti nei millenni stabilendo uno stretto rapporto di mutualismo e svolgendo funzioni fondamentali per il benessere dell'ospite. Tuttavia, i ritmi stressanti della vita moderna, una cattiva alimentazione, l'insorgere di specifiche malattie possono alterare questo sottile equilibrio rendendo il nostro microbiota uno scomodo ospite all'interno dell'uomo. Comprendere i meccanismi che supportano questo equilibrio a livello di segnali biochimici e molecolari è un passo fondamentale per riuscire a gestire e migliorare l'interazione tra microbiota e ospite in termini di gastrointestinal resource management. A questo scopo, la possibilità di effettuare indagini scientifiche con studi *in vivo* e *in vitro* che si complementano a vicenda è una grande opportunità che l'avanzamento della tecnologia offre oggi giorno allo scopo di riuscire a comprendere quei processi gastrointestinali fondamentali per la nostra salute.

## RINGRAZIAMENTI

Massimo Marzorati e Tom Van de Wiele sono finanziati dal FWO (Fondazione Fiamminga per la Ricerca - Belgio).

## RIASSUNTO

Qualunque distretto corporeo (es. pelle, cavo orale, apparato respiratorio e riproduttivo...) è colonizzato da batteri fin dal momento della nascita. L'esempio più eclatante è il tratto gastrointestinale, ambiente caratterizzato da una concentrazione di batteri pari a  $10^{11}$ - $10^{12}$  cellule per grammo di materiale fecale. Questo organo addizionale all'interno del corpo umano ha un ruolo fondamentale codificando per funzioni metaboliche coinvolte nella fermentazione di substrati che non possono essere digeriti dall'uomo, produzione di biomassa, segnali molecolari o anti-microbici, sintesi di vitamine fondamentali, stimolazione del sistema immunitario. La possibilità di modificare il fine bilanciamento esistente tra ospite e microbiota al fine di ottenere un effetto positivo per la salute dell'ospite è stato recentemente definita come 'Gastrointestinal Resource Management'. Per poter gestire la comunità microbica intestinale e quei fattori che determinano il rispettivo agire mutualistico, è fondamentale poter rispondere a domande chiave come "Chi c'è?", "Chi fa cosa?" e "Chi fa cosa con chi?". La possibilità di effettuare indagini scientifiche con studi *in vivo* e *in vitro* che si complementano a vicenda è una grande opportunità che l'avanzamento della tecnologia offre oggi giorno allo scopo di riuscire a comprendere quei processi gastrointestinali fondamentali per la nostra salute.

## ABSTRACT

Any body district (i.e. skin, mouth, respiratory tract, vagina...) is heavily colonized by bacteria since the birth. The most astonishing example is the gastrointestinal tract, which hosts a microbial community with a concentration of approx.  $10^{11}$ - $10^{12}$  cells per gram of fecal matter. This additional organ within the human body plays a key role, coding for metabolic functions involved in the catabolism of otherwise indigestible compounds, biomass production as well as production of molecular signals or anti-pathogenic peptides, synthesis of vitamins and stimulation of the immune system. The possibility of modulating the fine tuning that exists between the microbiota and its host - with the aim of obtaining a positive outcome for the host's health - has been recently defined as 'Gastrointestinal Resource Management'. In order to be able to manage such a complex ecosystem it is necessary to answer to some key questions: 'Who is there?'; 'Who is doing what?'; and 'Who is doing what with whom?'. The possibility of using complex and complementary *in vivo* and *in vitro* techniques to simulate and understand these key gastrointestinal processes is an opportunity that the technological advancement of the last years is offering to improve the human health.

## BIBLIOGRAFIA

- BAKKEN J.S., BORODY T., BRANDT L.J., BRILL J.V., DEMARCO D.C., FRANZOS M.A., KELLY C., KHORUTS A., LOUIE T., MARTINELLI L.P., MOORE T.A., RUSSELL G., SURAWICZ C., FECAL MICROBIOTA TRANSPLANTATION WORKGROUP. (2011): *Treating Clostridium difficile infection with Fecal Microbiota Transplantation*, «Clinical Gastroenterology and Hepatology», 9, pp. 1044-1049.
- BLASER M.J., KIRSCHNER D. (2007): *The equilibria that allow bacterial persistence in human hosts*, «Nature», 449, pp. 843-849.
- BOLCA S., POSSEMIERS S., MAERVOET V., HUYBRECHTS I., HEYERICK A., VERVARCKE S., DEPYPERE H., DE KEUKELEIRE D., BRACKE M., DE HENAUW S., VERSTRAETE W., VAN DE WIELE T. (2007): *Microbial and dietary factors associated with the 8-prenylnaringenin producer phenotype: a dietary intervention trial with fifty healthy post-menopausal Caucasian women*, «British Journal of Nutrition», 98, pp. 950-959.
- BOLCA S., POSSEMIERS S., HERREGAT A., HUYBRECHTS I., HEYERICK A., DE VRIESE S., VERBRUGGEN M., DEPYPERE H., DE KEUKELEIRE D., BRACKE M., DE HENAUW S., VERSTRAETE W., VAN DE WIELE T. (2007b): *Microbial and dietary factors are associated with the equal producer phenotype in healthy postmenopausal women*, «Journal of Nutrition», 137, pp. 2242-2246.
- BORODY T.J., GEORGE L., ANDREWS P., BRANDL S., NOONAN S., COLE P., HYLAND L., MORGAN A., MAYSEY J., MOORE-JONES D. (1989): *Bowel-flora alteration: a potential cure for inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome?*, «Medical Journal of Australia», 150, p. 604.
- FAO/WHO (2001): *Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria*. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation ([http://www.who.int/foodsafety/publications/fs\\_management/probiotics/en/](http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/probiotics/en/)).

- BRAAT H., ROTTIERS P., HOMMES D.W., HUYGHEBAERT N., REMAUT E., REMON J.P., VAN DEVENTER S.J., NEIRYNCK S., PEPPELENBOSCH M.P., STEIDLER L. (2006): *A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease*, «Clinical Gastroenterology and Hepatology», 4, pp. 754-759.
- DE BOEVER P., WOUTERS R., VERSCHAEVE L., BERCKMANS P., SCHOETERS G., VERSTRAETE W. (2000): *Protective effect of the bile salt hydrolase-active Lactobacillus reuteri against bile salt cytotoxicity*, «Applied Microbiology and Biotechnology», 53, pp. 709-714.
- DE SMET I., DE BOEVER P., VERSTRAETE W. (1998): *Cholesterol lowering in pigs through enhanced bacterial bile salt hydrolase activity*, «British Journal of Nutrition», 79, pp. 185-194.
- MARZORATI M., POSSEMIERS S., VERSTRAETE W. (2009): *The use of the SHIME-related technology platform to assess the efficacy of pre- and probiotics*, «Agro Food Industry Hi-Tech», 20, pp. S50-S53.
- MARZORATI M., VERHELST A., LUTA G., SINNOTT R., VERSTRAETE W., VAN DE WIELE T., POSSEMIERS S. (2010a): *In vitro modulation of the human gastrointestinal microbial community by plant-derived polysaccharide-rich dietary supplements*, «International Journal of Food Microbiology», 139, pp. 168-176.
- MARZORATI M., POSSEMIERS S., VAN DEN ABEELE P., VAN DE WIELE T., VANHOECKE B., VERSTRAETE W. (2010b): *Technology and method to study microbial growth and adhesion to host-related surfaces and the host-microbiota interactions*, WIPO Patent Application WO/2010/118857.
- MC ARTHUR J.V. (2006): *Microbial Ecology: An Evolutionary Approach*, Oxford Academic Press.
- PARFREY L.W., WALTERS W.A., KNIGHT R. (2011): *Microbial eukaryotes in the human microbiome: ecology, evolution, and future directions*, «Frontiers in Microbiology», 2, p. 153.
- POSSEMIERS S., BOLCA S., GROOTAERT C., HEYERICK A., DECROOS K., DHOOGHE W., DE KEUKELEIRE D., RABOT S., VERSTRAETE W., VAN DE WIELE T. (2006): *The prenyl-flavonoid isoxanthohumol from hops (Humulus lupulus L.) is activated into the potent phytoestrogen 8-prenylnaringenin in vitro and in the human intestine*, «Journal of Nutrition», 136, pp. 1862-1867.
- POSSEMIERS S., GROOTAERT C., VERMEIREN J., GROSS G., MARZORATI M., VERSTRAETE W., VAN DE WIELE T. (2009): *The intestinal environment in health and disease - recent insights on the potential of intestinal bacteria to influence human health*, «Current Pharmaceutical Design», 15, pp. 2051-2065.
- POSSEMIERS S., VERHELST A., VAN DEN ABEELE P., Maignen L., REEVES STUART G., ROBINSON L., RAAS T., PLUVINAGE P., SCHNEIDER Y., VAN DE WIELE T., MARZORATI M. (2012): *A dried yeast fermentate selectively modulates both the luminal and mucosal gut microbiota, enhances butyrate production and protects against inflammation, as studied in an integrated in vitro approach*, Submitted.
- ROBERFROID M. (2007): *Prebiotics: the concept revisited*, «Journal of Nutrition», 137, pp. 830S-837S.
- BLACKBURN S. (2007): *Maternal, Fetal, & Neonatal Physiology: A Clinical Perspective*, Elsevier Health Sciences, p. 495.
- VAN DEN ABEELE P., VAN DE WIELE T., VERSTRAETE W., POSSEMIERS S. (2011): *The host selects mucosal and luminal associations of coevolved gut microorganisms: a novel concept*, «FEMS Microbiology Reviews», 35, pp. 681-704.

- VAN DEN ABEELE P., ROOS S., EECKHAUT V., MACKENZIE D.A., DERDE M., VER-  
STRAETE W., MARZORATI M., POSSEMIERS S., VANHOECKE B., VAN IMMERSEEL F.,  
VAN DE WIELE T. (2012): *Incorporating a mucosal environment in a dynamic gut model  
results in a more representative colonization by lactobacilli*, «Microbial Biotechnology»,  
5, pp. 106-115.
- WILSON M. (2005): *Microbial inhabitants of humans*, Cambridge University Press.





Finito di stampare in Firenze  
presso la tipografia editrice Polistampa  
nel marzo 2013