

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 (H_2PO_4^-), e lo ione biacido (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, β -(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 drososila *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 drososila 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 drososila 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 drososila 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 drososila (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 7th 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., KOGELO 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., MAURHOFFER 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., MAURHOFFER 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.
- KESMANN 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.

