

## 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 simbiote, 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 simbiote 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 simbiote 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 simbiotici 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 congenere, 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 simbionte 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 simbionte 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 simbiotici e gli artropodi che li ospitano sottolineano la forte influenza esercitata dal microbiota sul sistema complesso costituito dall'olobionte. Svistati 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 phytoplasmoses*, 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.

