Università degli Studi di Sassari

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA
Scienze dei Sistemi Agrari e Forestali
e delle Produzioni Alimentari

Indirizzo Biotecnologie Microbiche Agroalimentari

Ciclo XXIV

Studio dei meccanismi molecolari coinvolti nella transizione dimorfica in *Pichia fermentans*

dr.ssa Maria Lina Sanna

Direttore della Scuola:	prof. Giuseppe Pulina
Referente di Indirizzo	prof.ssa Marilena Budroni
Docente Guida	prof.ssa Ilaria Mannazzu

Triennio accademico 2009- 2011

Università degli Studi di Sassari

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA
Scienze dei Sistemi Agrari e Forestali
e delle Produzioni Alimentari

Indirizzo Biotecnologie Microbiche Agroalimentari

Ciclo XXIV

Studio dei meccanismi molecolari coinvolti nella transizione dimorfica in *Pichia fermentans*

dr.ssa Maria Lina Sanna

Direttore della Scuola: prof. Giuseppe Pulina
Referente di Indirizzo prof.ssa Marilena Budroni
Docente Guida prof.ssa Ilaria Mannazzu

Triennio accademico 2009- 2011

INDICE

1. Introduzione 4

1.1 Principali agenti di marciumi della frutta in post-raccolta 5

1.1.1 Lotta ai funghi in postraccolta 7

1.1.2 Microrganismi antagonisti 8

1.1.3 Meccanismi d'azione di microrganismi antagonisti 9

1.1.3.1 Antibiosi 10

1.1.3.2 Competizione per lo spazio e per i nutrienti 12

1.1.3.3 Parassitismo 14

1.1.3.4 Induzione della resistenza nel tessuto dell'ospite 15

1.1.4 Reperimento di microrganismi antagonisti 16

1.1.4.1 Selezione di antagonisti 16

1.1.5 Strategie impiegate per incrementare l'efficacia di agenti di biocontrollo 17

1.1.5.1 Manipolazione dell'ambiente 17

1.1.5.2 Manipolazione fisiologica degli antagonisti 18

1.1.5.3 Colture miste di antagonisti 18

1.1.5.4 Manipolazione genetica 19

1.1.5.5 Formulazione dell'antagonista microbico 20

1.1.6 Integrazione di lotta biologica e trattamenti chimici e fisici 22

1.2 La transizione dimorfica nei lieviti 23

1.2.1 Vie di trasduzione del segnale che regolano la crescita filamentosa 24

1.2.1.1 Trasduzione del segnale e transizione dimorfica in *S.cerevisiae* 25

1.2.1.2 Trasduzione del segnale e transizione dimorfica in C.albicans 26

1.2.2 Fattori nutrizionali che inducono la transizione dimorfica 27

1.3 Dimorfismo e patogenicità 32

1.4 I biofilm microbici 34

1.5 Bibliografia 37

Scopo del lavoro 58

2 Ricerca delle condizioni nutrizionali in grado di indurre la transizione dimorfica in *Pichia fermentans* 60

Riassunto 61

2.1 Introduzione 62

2.2 Materiali e metodi 63

2.2.1 Ceppi e condizioni colturali 63

2.2.2 Isolamento di singole cellule lievitiformi e pseudoifali 64

2.2.3 Analisi di immagine 64

2.3 Risultati 65

2.3.1 La morfologia in *P. fermentans* DiSAABA 726 è condizionata dalla fonte azotata disponibile 65

2.3.2 Il pH extracellulare interferisce con l'assimilazione dell'ammonio solfato e quindi sulla morfologia delle cellule. 71

2.3.3 La morfologia di *P. fermentans* DiSAABA 726 è influenzata dagli alcoli superiori 74

2.3.4 La formazione di pseudoife in *P. fermentans* DiSAABA 726 è reversibile 77

2.4 Discussione 77

Bibliografia 81

CAPITOLO 3: **Individuazione dei geni coinvolti nella transizione dimorfica in *Pichia fermentans* DiSAABA 726 mediante Rapid Subtraction Hybridization (RaSH)** 85

Riassunto 86

3.1 Introduzione 87

3.2 Materiali e metodi 88

3.2.1 Ceppi e condizioni colturali 88

3.2.2 Rapid Subtraction Hybridization 89

3.2.3 Reverse Northern hybridization 91

3.2.4 Quantitative real time PCR 91
3.2.5 Analisi BLAST delle sequenze 93
3.2.6 Cinetiche di crescita 93
3.3 Risultati 93
3.3.1 Clonaggio dei geni differenzialmente espresso durante la crescita pseudoifale 93
3.3.2 Identificazione delle sequenze clonate 96
3.3.3 Livelli di espressione dei geni clonati in cellule lievitiformi e pseudoife 96
3.3.4 Coinvolgimento della fosfolipasi C di *P. fermentans* DiSAABA 726 durante la transizione dimorfica 98
3.4 Discussione 100
3.5 Bibliografia 103
4 Ipotesi sul ruolo della metionina e della fosfolipasi C nella transizione dimorfica di *P. fermentans* DiSAABA 726 107

1. Introduzione

1.1 Principali agenti di marciumi della frutta in post-raccolta

A dispetto dell'applicazione di moderne tecniche di conservazione i prodotti freschi, quali la frutta e la verdura, vengono facilmente attaccati da microrganismi patogeni a causa sia del loro elevato contenuto di acqua (Harvey, 1978), sia della presenza di ferite superficiali. Nei paesi industrializzati le perdite causate dai patogeni si verificano principalmente nelle fasi di trasporto e di conservazione dei prodotti freschi e possono interessare fino al 25% della produzione totale (Harvey 1978). Nei paesi in via di sviluppo, a causa del mancato utilizzo di metodi di conservazione adeguati, il problema è decisamente più serio e le perdite possono riguardare fino al 50% del prodotto totale (Eckert & Ogawa 1985).

Tra i principali agenti di marciumi in post-raccolta sono da annoverare diversi funghi appartenenti ai generi *Monilinia, Penicillium* e *Botrytis*.

Il genere *Monilinia* è responsabile di gravi alterazioni parassitarie a carattere distruttivo, genericamente indicate come moniliosi, che colpiscono principalmente i frutti ma anche germogli, fiori, rametti. Le *Monilie* possono penetrare all'interno del frutto attraverso stomi e lenticelle, permanere in uno stato di latenza mentre il frutto è in campo e svilupparsi successivamente durante la conservazione del prodotto. Il marciume bruno si manifesta con un'area rotondeggiante, spesso centrata su una ferita, di colore bruno, su cui si differenziano cuscinetti giallo-ocra in cerchi concentrici che costituiscono la caratteristica muffa a circoli. Il marciume bruno dei frutti è attribuibile a 3 specie di *Monilinia: Monilinia fructicola, Monilinia laxa* e *Monilinia fructigena.* In Europa gli agenti che causano la malattia sono *M. fructigena* e *M. laxa*, mentre nel Nord-America, in Giappone e in Australia il marciume bruno è attribuibile principalmente a *M. fructicola* e solo in minor misura a *M. laxa. M. fructicola* e *M. laxa* attaccano principalmente le drupacee, *M. fructigena* si ritrova più frequentemente sulle pomacee pur essendo in grado di attaccare i frutti con il nocciolo.

Tra i funghi del genere *Penicillium*, *Penicillium expansum* è uno dei più comuni patogeni della frutta. E' l'agente responsabile della muffa blu delle pomacee, ma è un patogeno comune in noci, pesche e nocciole. L'attacco di *P. expansum* è facilmente riconoscibile per due caratteristiche fondamentali: il forte odore di marcio e la presenza di ciuffi di conidi sulla superficie di ferite ben sviluppate. I frutti danneggiati durante le fasi di raccolta e di manipolazione rappresentano un sito preferenziale per la crescita di questo fungo in grado di penetrare attraverso le ferite dell'epicarpo. Lo sviluppo dell'infezione è agevolato dalla notevole capacità di sopravvivenza delle spore da una stagione all'altra. La necessità di contenere questo patogeno risiede non solo nelle ingenti perdite di prodotto che derivano da un suo attacco, ma anche nella produzione di circa 50 differenti metaboliti secondari (Andersen et al., 2004) tra i quali, la patulina. Questa è una micotossina prodotta anche da funghi del genere *Aspergillus* spp. che si ritrova principalmente nei succhi di frutta o in altri prodotti ottenuti a partire da materia prima contaminata. La patulina è una tossina, che può avere effetti tossici, cronici ed acuti e che secondo alcuni autori può avere azione cancerogena, mutagena e teratogena (Beretta et al., 2000). La patulina è considerata un contaminante naturale indesiderato dei frutti e può essere utilizzata come indicatore di qualità dei frutti e dei processi di trasformazione. (Burda 1992; US Food and Drug Administration 2001; Andersen et al., 2004). Oltre a *Penicillium expansum*, vi sono altre specie appartenenti al genere *Penicillium* in grado di provocare perdite in post-raccolta quali *Penicillium italicum* e *Penicillium digitatum*, agenti rispettivamente della muffa azzurra e della muffa verde degli agrumi. Tali patogeni attaccano il frutto in seguito a ferite e lesioni provocate accidentalmente o prodotte sui peduncoli al momento della raccolta.

Tra le specie del genere *Botrytis*, assume rilevante importanza *Botrytis cinerea* un fungo parassita che attacca molte varietà di piante quali fragola, vite e pomodoro in fase di deperimento anche se fra i diversi ospiti quello economicamente più rilevante è la vite. L'infezione, nota come marciume grigio o muffa grigia, si manifesta dopo la raccolta e avviene per contatto tra le parti

sane e il micelio presente nelle parti infette. I conidi penetrano nei tessuti attraverso gli stomi o perforando la cuticola. Anche in questo caso però l'infezione è agevolata dalla presenza di lesioni e ferite (Matta 1996; Sholberg e Conway, 2001).

1.1.1 Lotta ai funghi in post-raccolta

I fungicidi di sintesi sono il mezzo più utilizzato per controllare le malattie in post-raccolta poiché rappresentano il principale sistema di lotta contro i funghi patogeni. Tuttavia, l'attenzione per la salvaguardia della salute umana, l'inquinamento ambientale associato all'uso di fungicidi sui frutteti (Wilson and Wisniewski, 1994) e lo sviluppo di patogeni fungicidi-resistenti (Romano et al., 1983; Spotts and Cervantens, 1986), hanno spinto i governi di alcuni paesi a proibirne l'uso o ridurne l'impiego (regolamento (CE) n.1107/2009), e motivato la ricerca di strategie alternative ai fungicidi di sintesi per il controllo dei funghi patogeni in post-raccolta (Gullino and Kuijpers, 1994). Tali strategie si basano sull'induzione della resistenza ai patogeni nei frutti e sull'uso di antifungini naturali e di microrganismi antagonisti. Tra queste, l'utilizzo di microrganismi antagonisti rappresenta una delle alternative più promettenti per ridurre l'uso dei fungicidi di sintesi (Wilson and Wisniewsky, 1994). Alcuni autori hanno infatti messo in evidenza che la presenza di una microflora multispecie sulla superficie dei frutti e sulle parti aeree delle piante può prevenire le alterazioni fungine, tramite il controllo biologico. A conferma di ciò gli stessi autori hanno dimostrato che l'eliminazione della microflora tramite ripetuti lavaggi dei frutti, rendeva questi ultimi maggiormente sensibili ai marciumi rispetto ai frutti non lavati (Blakeman and Fokkema, 1982; Chalutz e Wilson, 1990; Arras *et al*., 2002).

L'utilizzo di antagonisti microbici può avvenire secondo due approcci. Il primo si basa sullo sfruttamento di microrganismi antagonisti già presenti sulla superficie del frutto e dei vegetali; il secondo prevede l'applicazione sui frutti di microrganismi antagonisti alloctoni selezionati (Sharma et al., 2009).

1.1.2 Microrganismi antagonisti

Nel corso degli ultimi vent'anni diversi agenti di biocontrollo sono stati ampiamente utilizzati contro differenti microrganismi patogeni, quali *Aspergillus* spp., *Botrytis*, spp., *Monilia* spp., *Penicillium* spp. and *Rhizopus* spp. (Lima et al., 1997; Vinas et al., 1998; Zahavi et al., 2000; Droby et al., 2002; Northover and Zhou 2002). Numerosi studi mirano a comprendere le modalità di azione e a valutare l'efficacia di alcuni specie batteriche quali ad es. *Brevibacillus subtilis* (Pusey et al., 1986), utilizzabili come agenti di biocontrollo. Nonostante le prime perplessità sull'utilizzo dei batteri come agenti di biocontrollo, l'applicazione di batteri sui frutti è accettata e diversi formulati batterici a base di *Pseudomonas siringae, Bacillus subtilis* e *Pseudomonas fluorescens* sono attualmente in commercio (Tabella 1). Wilson e Wisniewsky (1994) indicano le caratteristiche che un antagonista ideale deve avere: stabilità genetica, efficacia a basse concentrazioni e contro una vasta gamma di patogeni su diversi frutti, richieste nutrizionali semplici, sopravvivenza in condizioni ambientali avverse, crescita su substrati economici in fermentatore, non-patogenicità per la pianta ospite, incapacità di produrre metaboliti potenzialmente tossici per l'uomo, resistenza ai pesticidi di uso comune e compatibilità con altri trattamenti chimici e fisici. I lieviti sembrano possedere un gran numero delle caratteristiche sopra elencate. Per questo già da molti anni numerosi gruppi di ricerca si occupano della selezione e dello studio di questi microrganismi (Chalutz & Droby 1998). Attualmente sono di grande interesse alcune specie ascritte al genere *Pichia* (Druvefors et al., 2005) e le specie *Cryptococcus laurentii* e *Metschnikowia pulcherrima* (Piano et al., 1997; Janisiewicz et al., 2001), *Kloeckera apiculata* (Long et al., 2005), *Candida sake* (Morales et al., 2007), *Candida guillermondii* (Scherm et al., 2003), *Candida oleophila* (Lima et al., 1997; Brown et al., 2000).
Gli studi condotti su batteri e lieviti antagonisti hanno portato a brevettare una serie di preparati commerciali di cui sei a base di batteri e sei a base di lieviti (Tabella 1).

Tabella 1. Preparati commerciali per il biocontrollo in post-raccolta di malattie di frutta e vegetali.

Nome del prodotto	Agente microbico	Frutta/verdura	Bersaglio
AQ10 bio-fungicide	*Ampelomyces quisqualis*	Mele, uva, fragole, pomodori	Mal bianco
Aspire	*Candida oleophila* strain 1-182	Mele, pera e agrumi	Muffa blu, grigia e verde
Biosave 10LP	*Pseudomonas siringae* 10LP	Mele, pera e agrumi ciliegie e patate	Muffa blu e grigia, marciume acido
Biosave110	*Pseudomonas siringae* 110		
Blight Ban A 506	*Pseudomonas fluorescens* A 506	Mele, pere, fragile e patate	Colpo di fuoco batterico e marciume basale
Boni protect	*Aureobasidium pullulans*	Pomacee	Muffa grigia
Messenger	*Erwinia amylovora*	Vegetali	Colpo di fuoco batterico
Nexy	*Candida oleophila* strain O	Pomacee	Muffa blu e grigia
Yeld plus	*Cryptoccocus albidus*	Mele e pere	Muffa blu e grigia
Rhio plus	*Bacillus subtilis* FZB 24	Patate e altri vegetali	Mal bianco e marciume basale
Shemer	*Metschinkowia fructicola*	Agrumi, pomacee, drupacee, uva, fragole e patate dolci	Muffa blu, grigia e nera, marciume basale
Serenade	*Bacillus subtilis*	Mele, pere uva e vegetali	Mal bianco, peronospora, marciume bruno e colpo di fuoco batterico

Adattata da Sharma et al. (2009).

1.1.3 Meccanismi d'azione di microrganismi antagonisti

Le informazioni sui meccanismi d'azione sono incomplete per la maggior parte degli antagonisti studiati a causa delle difficoltà che si incontrano nello studio delle interazioni tra ospite, patogeno, antagonista e altri eventuali microrganismi presenti nel sistema. I meccanismi di biocontrollo efficaci sui marciumi dei frutti includono: l'antibiosi, la competizione per spazio e nutrienti, il parassitismo o l'interazione diretta con il patogeno e infine la resistenza indotta nei tessuti dell'ospite (Droby & Chalutz, 1994). Molti di questi meccanismi consentono agli

agenti di lotta biologica di sopravvivere e colonizzare la superficie dei frutti anche in post-raccolta (Karabulut et al., 2001; Tian et al., 2004). La distinzione tra i vari meccanismi è sostanzialmente teorica poiché più meccanismi possono essere coinvolti contemporaneamente e in nessun caso uno solo di essi è responsabile del controllo biologico (Janisiewicz & Korsten, 2002). Tuttavia, per una migliore comprensione del funzionamento dei microrganismi antagonisti si ritiene utile presentare di seguito i meccanismi fino ad ora descritti.

1.1.3.1 Antibiosi

L'antibiosi è definita come la capacità di alcuni microrganismi di ostacolare lo sviluppo e la proliferazione di altri microrganismi attraverso la produzione di metaboliti, enzimi litici o altri enzimi (Melin et al., 2007). Tra i vari metaboliti prodotti dall'antagonista gli antibiotici, le tossine e gli enzimi sono in grado di inibire o distruggere l'agente patogeno (Heungens & Parke, 2001). Gli antibiotici sono sostanze volatili o non-volatili attive a concentrazioni inferiori a 10 ppm. Alcuni microrganismi producono antibiotici solo quando hanno a disposizione una quantità sufficiente di sostanze nutritive in particolare fonti di carbonio. Altri invece iniziano a produrre antibiotici quando la disponibilità di sostanze nutritive decresce (Jamalizadeh et al., 2011). In ogni modo, gli antibiotici per essere efficaci devono essere prodotti *in situ* in quantità sufficienti durante il periodo di interazione con l'agente patogeno (EL-Ghaouth et al., 2002). Alcuni degli agenti di biocontrollo più attivi (BioControl Agents, BCAs) sono batteri che producono antibiotici, la cui azione determina, almeno in parte, la loro efficacia. *Bacillus subtilis* produce iturina un peptide antifungino (Gueldner et al., 1988) e *Brevibacillus brevis* produce gramicidina efficace contro *Botrytis cinerea* (Edwards & Seddon, 2001). *Pseudomonas cepacia* sintetizza pirrolnitrina, in grado di contrastare lo sviluppo di *Botrytis cinerea* e di *Penicillium expansum* sulle pomacee e di *Monilinia fructicola* sulle drupacee (Janisiewicz et al., 1991). La maggiore preoccupazione in merito all'utilizzo di antibiotici sui prodotti alimentari è il possibile sviluppo di resistenze a questi composti da parte dei

microrganismi patogeni per l'uomo e per i frutti (Melin et al., 2007). Per questo anche se i microrganismi antagonisti produttori di antibiotici sono in grado di contrastare l'infezione di importanti patogeni fungini, a oggi non esiste alcun agente di biocontrollo produttore di antibiotici registrato e utilizzabile sui frutti.

Alcune specie batteriche si caratterizzano anche per la produzione di batteriocine, proteine antibatteriche che uccidono o inibiscono lo sviluppo di altri batteri (Cleveland et al., 2001). L'attività delle batteriocine si esplica sulla membrana plasmatica delle cellule bersaglio attraverso la formazione di pori che causano la dissipazione del potenziale di membrana e la perdita di soluti (Cleveland et al., 2001). Il ceppo K48 di *Agrobacterium tumefaciens* produce agrocina 84, una batteriocina in grado di inibire i ceppi tumorigeni di *Agrobacterium* che colpiscono le pomacee, le drupacee e piccoli frutti come uva e lamponi (Vicedo et al., 1993). Tuttavia l'applicazione di batteri produttori di batteriocine è limitata alla lotta contro batteri patogeni strettamente correlati.

Per quanto riguarda l'antibiosi mediata da composti volatili, *Enterobacter cloacae* inibisce la crescita dei funghi *Pythium ultimum* e *Rhizoctonia solani* attraverso la produzione di ammoniaca. Il saggio di l'attività di questo composto volatile contro *Pythium ultimum* e *Rhizoctonia solani* mostra che entrambi i microrganismi vengono inibiti da basse concentrazioni di ammoniaca e che il primo è più sensibile del secondo (Howell et al., 1988). La tossicità di basse concentrazioni di ammoniaca nei confronti dei microrganismi fungini è stata descritta da Mccallen et al., nel 1940 ed in seguito diversi composti chimici in grado di rilasciare ammoniaca sono stati utilizzati come fungicidi per ridurre la gravità della malattia nei frutti (Gilpatrick, 1969). L'ammoniaca rappresenta un'importante molecola segnale anche in altre specie di lievito quali *Saccharomyces cerevisiae, Candida tropicalis, Rhodotorula glutinis Candida mogii*. Questi lieviti producono e riconoscono l'ammoniaca come molecola *quorum sensing* in grado di guidare lo sviluppo delle colonie. Questo comportamento è importante per la distribuzione spaziale delle colonie che inibiscono transitoriamente la loro crescita verso l'altra colonia crescendo

preferenzialmente verso il lato opposto libero dalla competizione per i nutrienti (Palkovà 1997). In *Candida mogii* l'ammoniaca induce cambiamenti morfologici non solo nelle colonie ma anche nelle cellule (Palkovà et al., 2000)

1.1.3.2 Competizione per lo spazio e per i nutrienti

Diversi microrganismi, in particolare i lieviti, contrastano l'infezione causata da patogeni competendo con questi per l'occupazione dello spazio e l'utilizzo dei nutrienti (Piano et al., 1997, Filonow, 1998). Tale meccanismo si basa sul principio secondo cui il soddisfacimento delle esigenze nutrizionali del patogeno è una condizione fondamentale per il suo sviluppo per cui qualunque microrganismo che competa con il patogeno per l'utilizzo delle risorse nutrizionali (aminoacidi, zuccheri, sali minerali, vitamine), costituisce un potenziale strumento di contenimento (Droby and Chalutz, 1994; Spadaro et al., 2010). La capacità di controllare il patogeno dipende sia dalla concentrazione iniziale dell'antagonista applicato alla ferita, sia dalla sua abilità di crescere velocemente colonizzando il sito di infezione e dalla sua capacità di sopravvivere in condizioni che sono sfavorevoli al patogeno (Droby et al., 1992). In generale gli antagonisti microbici sono più efficaci quando applicati alla concentrazione di 10^7-10^8 CFU ml^{-1} (El-Ghaouth et al., 2004).

La competizione per le sostanze nutritive tra *Pichia guilliermondii* e *Penicilliun digitatum* su terreni sintetici è stata descritta da alcuni autori che hanno osservato che il lievito antagonista è più efficace in condizioni di scarsa disponibilità di sostanze nutritive (Droby et al. 1989). In accordo Filonow (1998) ha mostrato che un forte consumo di zuccheri da parte dei lieviti antagonisti *Sporobolomyces roseus* e *Cryptococcus laurentii* blocca la germinazione dei conidi di *Botrytis cinerea* su mela. Una minore disponibilità di ferro nel substrato in seguito al suo utilizzo da parte di *Metschnikowia pulcherrima* per la produzione di pulcherrimina, inibisce la crescita di *Alternaria alternata* e *Penicillium expansum* (Saravanakumar et al., 2007).

Per quanto riguarda la competizione per lo spazio, è stato osservato che questa è facilitata dalla secrezione di sostanze polimeriche che mediano l'adesione dei microrganismi alla superficie da colonizzare.

Per esempio alcuni batteri e lieviti, come ad esempio *Aureobasidium pullulans* (Andrews et al., 1994), formano una capsula extracellulare di natura polisaccaridica che promuove e facilita la loro adesione alla superficie dei frutti (Spadaro & Gullino, 2003). Altri in ambienti naturali formano biofilm costituiti da comunità di cellule racchiuse in una matrice extracellulare (Davey and O'Toole 2000; Costerton 1995). La natura delle sostanze polimeriche della matrice dei biofilm gioca un ruolo importante nell'adesione dei microrganismi alle superfici di contatto e nella loro capacità di colonizzazione. Per esempio *Bacillus subtilis* produce un biofilm che colonizza la superficie del frutto, agisce da serbatoio per le sostanze nutritive e riduce la disponibilità degli elementi nutritivi per i patogeni (Weller & Thomashow, 1994; Emmert & Handelsman, 1999). Similmente, *Paenibacillus polym*yxa è in grado di produrre un biofilm attivo nel controllo biologico di *Aspergillus niger* (Haggag et al., 2008) la cui azione antagonista è tanto maggiore quanto maggiore è lo spessore del biofilm.

Castoria et al., (2003) suggeriscono che anche la resistenza allo stress ossidativo sia da annoverare tra i fattori che permettono agli antagonisti di competere con successo con microrganismi patogeni quali per esempio *B. cinerea* e *P. expansum.* Infatti gli antiossidanti prodotti dagli antagonisti forniscono al tessuto ospite strumenti di difesa aggiuntivi in grado di contrastare le ROS prodotte dal patogeno (Castoria et al., 2003).

Per il controllo biologico dei prodotti in post-raccolta, l'uso di microrganismi che competono con i patogeni per lo spazio e i nutrienti, è preferibile all'uso di antagonisti produttori di antibiotici per la potenziale tossicità sull'uomo e per lo sviluppo di ceppi antibiotico-resistenti (Droby et al., 1989; Wilson and Wisniewski, 1989).

1.1.3.3 Parassitismo

Quando l'antagonista si nutre del patogeno distruggendo o lisando i propaguli o le strutture cellulari, tra i due si instaura una relazione di parassitismo diretto e l'antagonista prende il nome di micoparassita (Bull et al., 1998). I micoparassiti utilizzano enzimi di degradazione fungini quali chitinasi e glucanasi per lisare le pareti cellulari degli ospiti penetrando nelle cellule (Elad et al., 1983, Saravanakumar et al.,, 2008). Anche la capacità del microrganismo antagonista di aderire alle ife del patogeno sembra un fattore importante per l'attività di biocontrollo come mostrato nel caso delle interazioni tra *Enterobacter cloacae* e *Rhizopus stolonifer* su pesco (Wisnienski et al., 1989), *Pichia guilliermondii* e *Penicillium italicum* sugli agrumi (Arras et al., 1998), o nel processo di lisi di *Botrytis cinerea da parte di Pichia guilliermondii* su mela (Wisnienski et al; 1991). *P. guilliermondii* infatti, aderisce al micelio di *Botrytis cinerea,* probabilmente attraverso un legame mediato da lectine (Wisniewski et al., 1991), e secerne una β-1,3-glucanasi che provoca la degradazione delle pareti della cellula fungina. Studi condotti *in vitro* su questo tipo di interazione rivelano che l'adesione facilita l'acquisizione dei nutrienti da parte dell'antagonista prevenendo così la germinazione delle spore e la crescita del patogeno (Droby et al., 1989, 1998; Wisniewski et al., 1989). Studi ultrastrutturali e citochimici condotti da El-Ghaouth et al. (1998) indicano che le cellule del lievito *Candida saitoana*, in co-coltura con *B. cinerea* attaccano le ife del fungo degradandone la parete e provocano danni citologici che terminano con la degradazione del citoplasma. *Aureobasidium pullula*ns, efficace nel controllare diverse malattie su mela, uva e altri tipi di frutta, produce enzimi extracellulari quali chitinasi e β-1,3-glucanasi verosimilmente coinvolti nella sua attività antagonista (Castoria ed altri, 2001, Vero et al.,, 2009). *Pichia anomala*, efficace nel controllo della muffa grigia della mela, *in vitro* incrementa la produzione di eso β-1,3 glucanasi in presenza di un preparato contenente la parete cellulare di *B. cinerea* e *in vivo* riduce la gravità delle lesioni provocate da questo patogeno (Jijakli & Lepoivre, 1998; Gravese 1998).

1.1.3.4 Induzione della resistenza nel tessuto dell'ospite

Il fatto che alcuni lieviti siano antagonisti più efficaci se applicati prima dell'inoculo del patogeno, suggerisce che i microrganismi antagonisti possano esercitare la loro funzione anche inducendo resistenza nel tessuto ospite. In accordo diversi autori hanno osservato che gli agenti di biocontrollo possono velocizzare il processo di cicatrizzazione delle ferite (Droby and Chalutz, 1994; Droby et al., 2009). Tuttavia esistono numerosi altri meccanismi di induzione di resistenza ai patogeni. Il lievito *Sporobolomyces roseus,* antagonista di *B. cinerea*, riduce l'adesione e la germinazione dei patogeni stimolando la produzione da parte dei frutti di molecole volatili quali ad esempio l'acetato di butile (Filonow, 2001). Diversi ceppi di *Candida* causano alterazioni chimiche ed osmotiche nei tessuti di mela che favoriscono la dominanza dell'antagonista (Mclaughlin et al., 1990). *Candida famata* riduce lo sviluppo della muffa verde causata da *Penicillium digitatum* sulle arance incrementando, di circa dodici volte, la produzione delle fitoalessine scoparone e scopoletina (Arras, 1996). L'accumulo di scoparone e scopoletina è stato osservato anche negli agrumi trattati con *Pichia guilliermondii* in assenza del patogeno (Rodov et al., 1994; Zhu et al., 2010). *P. guilliermondii* stimola inoltre la produzione di etilene, un ormone prodotto dalle uve in grado di attivare a sua volta la fenilalanin-ammonio-liasi, un enzima coinvolto nella sintesi di fenoli, fitoalessine e lignina (Wisnienski et al., 1991).

Gli antagonisti microbici possono inoltre attivare meccanismi di difesa nel tessuto ospite stimolando la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Macarisin et al., 2010). Un esempio di tale meccanismo è fornito dal fungo *Trichoderma virens* che secerne la proteina Sm1 (small protein 1). Questa innesca la produzione di H_2O_2 nel tessuto ospite e induce l'espressione di geni di difesa a livello locale e sistemico contro i microrganismi patogeni (Djonovic et al., 2006).

1.1.4 Reperimento di microrganismi antagonisti

La superficie dei frutti rappresenta la maggiore fonte di antagonisti microbici da utilizzare nella lotta biologica. L'isolamento di specie batteriche e fungine efficaci contro le malattie dei frutti può avvenire sia in campo, sia nei locali nei quali la frutta viene conservata (Wilson and Pusey, 1985; Huang et al., 1992; Tjamos 1992; Arras 1993; Qing and Shiping, 2000; Janiesiewicz at al., 2002). Dal momento che la frutta viene spesso trattata con fungicidi chimici, è preferibile condurre la ricerca di antagonisti microbici su frutta non trattata e verosimilmente caratterizzata da una maggiore biodiversità microbica (Smolka 1992; Janisiewicz, 1996).

I potenziali antagonisti possono essere isolati da fessure sulla superficie del frutto (Janisiewicz, 2002); da ferite esposte alla colonizzazione da parte di microrganismi per un periodo di tempo compreso tra una e quattro settimane; da ferite che non presentano marciume dopo essere state a contatto con il patogeno (Janieswicz et al., 2002) e da soluzioni di lavaggio della superficie dei frutti (Wisniewsky, comunicazione personale).

Benché la superficie dei frutti rappresenti la fonte più abbondante di antagonisti, questi possono provenire anche da altre fonti quali ad esempio la superficie delle foglie, che condivide con i frutti una buona parte della microflora (Zhou et al., 1999), da colture starter utilizzate nell'industria alimentare (Pusey et al., 1991) e da suolo come nel caso del batterio *Bacillus subtilis* in grado di inibire lo sviluppo del marciume bruno causato da *Monilinia fructicola* su pesca e isolato da radici di pesco (Pusey et al., 1984).

1.1.4.1 Selezione di antagonisti

Le condizioni che favoriscono l'antagonista devono essere le stesse o simili a quelle che favoriscono il patogeno. I criteri di selezione includono la capacità di colonizzare il sito di infezione e la superficie dei frutti in diverse condizioni, lo spettro d' azione, l'efficacia, l'utilizzo dei substrati, la capacità di crescere a basse temperature e a 37°C, la resistenza agli stress ambientali e la potenziale

patogenicità degli antagonisti. Infatti alcuni microrganismi tra cui *Aureobasidium pullulans* (Matteson 1997) e *Pichia fermentans* (Giobbe et al., 2007) fungono da agenti di biocontrollo su alcuni frutti ma sono patogeni su altri

Di grande importanza nella selezione degli antagonisti sono anche la facilità di produrre biomassa in quantità elevate, la scelta della formulazione e le modalità di applicazione e di distribuzione commerciale.

1.1.5 Strategie impiegate per incrementare l'efficacia di agenti di biocontrollo

Diverse strategie tra le quali la manipolazione dell'ambiente, l'utilizzo di colture miste di antagonisti, la manipolazione genetica e fisiologica degli antagonisti e l'integrazione con altri metodi, possono essere utilizzate per aumentare l'efficacia degli antagonisti selezionati.

1.1.5.1 Manipolazione dell'ambiente

La manipolazione dell'ambiente consiste principalmente nella distribuzione di fattori nutrizionali in grado di stimolare preferenzialmente la crescita dell'antagonista rispetto a quella del patogeno senza alterare la qualità dei frutti (Usall et al., 2000). In alternativa è possibile aggiungere molecole, quali ad es. 2-Deossi-D-glucosio, che inibiscono la crescita del patogeno e favoriscono l'antagonista come nel caso di *Pseudomonas siringae*, *Sborobolomyces roseus* e *Candida saitoana* che contrastano la crescita di *Penicillium expansum* su mele e agrumi (El-Ghaouth et al., 2000; Janisiewicz et al., 1995). Anche l'aggiunta di siderofori può ridurre la germinazione dei conidi di alcuni patogeni in post-raccolta e stimolare la produzione di siderofori da parte degli antagonisti creando un ambiente ferro-deficiente nel sito di infezione come nel caso di *Rhodotorula glutinis* responsabile del biocontrollo di *P. expansum* su mela (Calvente et al., 1999). Alcuni autori dopo aver studiato l'azione inibente dei chitosani su diversi patogeni delle fragole (El-Ghaouth et al.,(1992), hanno sviluppato un prodotto chiamato ''bioactive coating" costituito dall'associazione

di un antagonista con chitosani glicosilati che sfrutta le proprietà antifungine dei glicochitosani e l'attività biologica dell'antagonista (El- Ghaouth et al., 2000a).

1.1.5.2 Manipolazione fisiologica degli antagonisti.

La manipolazione fisiologica degli antagonisti ha lo scopo di aumentare la loro *fitness*, particolarmente importante in frutteto, dove le condizioni ambientali cambiano improvvisamente. Uno dei metodi più utilizzati per la manipolazione fisiologica dei microrganismi è la selezione di mutanti che mostrano fenotipi caratterizzati da maggiore capacità di adattamento a fattori biotici e abiotici rispetto al parentale (Teixido et al., 2001). Per esempio Bizeau et al. (1989) hanno selezionato lieviti resistenti ad alcuni composti fenolici prodotti dal frutto, tra cui acido benzoico e acido clorogenico, che interferiscono con la crescita dei lieviti.

Un altro metodo prevede la somministrazione ai microrganismi antagonisti di nutrienti che ne migliorino l'efficacia come agenti di biocontrollo. Per esempio la somministrazione di fattori di crescita (purine, pirimidine e vitamine) e di minerali (B^{3+}, Ca^{2+}, $C0^{2+}$, Cu^{2+}, Fe^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}, $M0^{6+}$, Zn^{2+}) migliora l'attività di biocontrollo in alcuni microrganismi antagonisti di fitopatogeni presenti nel suolo. (Slininger et al., 1992). In *Pseudomonas fluore*scens l'aggiunta di zinco favorisce l'aumento della produzione di fenazina, un antibiotico che sopprime la crescita di *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* sul grano (Slininger et al., 1991)

1.1.5.3 Colture miste di antagonisti

I lieviti antagonisti non hanno un ampio spettro di attività e la loro azione è legata a numerose variabili tra le quali il livello di maturità dei frutti. Per ovviare a questi problemi è possibile utilizzare miscele di microrganismi la cui attività antagonista è il risultato della sinergia tra diversi microrganismi. Queste miscele hanno diversi vantaggi (Janisiewicz, 1998), infatti oltre ad avere un più ampio spettro di attività (frutti diversi, cultivar e fasi di maturazione diverse), possono essere più efficaci e più affidabili con una conseguente riduzione dei costi di

trattamento. Per predire le interazioni competitive tra gli antagonisti, e tra gli antagonisti e i patogeni, è necessario conoscere la disponibilità di nutrienti nel frutto colonizzato e le esigenze nutrizionali dei microrganismi coinvolti. Infatti, dopo che un microrganismo ha esaurito i nutrienti, un altro, inizialmente meno competitivo ma che non richiede le stesse sostanze o che magari è in grado di sintetizzarle può prendere il sopravvento e impoverire ulteriormente il substrato a svantaggio del patogeno.

La scarsità di informazioni sulle interazioni tra specie complica notevolmente la costruzione di comunità microbiche multi-specie. Inoltre, i costi di produzione di preparati commerciali misti sono superiori rispetto a quelli contenenti un unico antagonista. Per queste ragioni anche se l'applicazione di miscele di antagonisti potenzia l'efficacia del biocontrollo in molti sistemi (Janisiewicz and Bors, 1995; Schisler et al., 1997; Guetsky et al., 2001) l'espansione commerciale di antagonisti multi-specie è molto limitata.

1.1.5.4 Manipolazione genetica

Uno dei maggiori problemi legati all'utilizzo di antagonisti microbici è la loro scarsa efficienza in condizioni commerciali. La manipolazione genetica degli antagonisti può quindi essere utilizzata per migliorarne sia la capacità di adattamento all'ambiente nel quale devono operare sia l'attività di biocontrollo (Pusey 1994).

La manipolazione genetica che può essere realizzata impiegando tecniche convenzionali di mutagenesi o di ingegneria genetica deve consentire l'ottenimento di antagonisti con caratteristiche stabili nel tempo.

Indubbiamente la tecnologia del DNA ricombinante rappresenta la tecnica di elezione per trasferire caratteristiche importanti per l'attività di biocontrollo, quali la resistenza ai fungicidi e ai metaboliti prodotti dal frutto che potrebbero inibire lo sviluppo dell'antagonista e la sintesi di composti antimicrobici (Pusey 1994). Geni codificanti enzimi che degradano la parete cellulare, come le chitinasi (Chernin et al., 1997) proteasi e glucanasi (De la Cruz et al., 1995)

prodotte da batteri e funghi, possono essere clonati in microrganismi potenziali antagonisti per aumentarne l'efficacia nel biocontrollo dei funghi patogeni. In accordo, il gene per la chitinasi isolato da *Serratia marcescens*, è stato clonato in *Pseudomonas fluorescens* per aumentarne la capacità di biocontrollo su *Rhizoctonia solani* (Downing and Thomson, 2000). Analogamente, il gene codificante la cecropina A, un peptide antimicotico, è stato clonato in *Saccharomyces cerevisiae* (Jones e Prusky, 2002). Il ceppo ricombinante ottenuto inibisce lo sviluppo delle spore di *Colletotrichum coccodes* e ostacola il decadimento causato da questo patogeno nel pomodoro.

E' inoltre di interesse il clonaggio di geni che consentono di studiare le interazioni pianta-microrganismo in natura e permettono di tracciare gli antagonisti nell'ambiente (Nigro et al., 1999). In *Candida oleophila* è stato clonato il gene codificante la β-glucuronidasi di *E. coli* (Chand-Goyal et al. 1998). In mutanti auxotrofi per l'istidina di *Candida oleophila* sono stati clonati i geni HIS3, HIS4 e HIS5 di *S. cerevisiae* (Chand- Goyal et al., 1999) e in *Metschnikowia pulcherrima* è stato clonato il gene codificante la green fluoresent protein (Nigro et al., 1999). In tutti i casi, si è osservato che gli antagonisti mantenevano la loro capacità di biocontrollo e non mostravano differenze di efficacia rispetto ai ceppi parentali.

1.1.5.5 Formulazione dell'antagonista microbico.

La formulazione dell'antagonista è importante e ha profondi effetti sulla sua crescita, sopravvivenza e attività di biocontrollo (Janisiewicz e Jeffers, 1997). Sono attualmente in commercio formulazioni liquide ed essiccate. La formulazione liquida prevede che le cellule siano conservate in acqua o in tampone, con o senza agenti protettivi (Melin et al., 2006). I vantaggi di questa formulazione risiedono nella semplicità di preparazione e nel fatto che le cellule non muoiono durante la preparazione del formulato commerciale. I limiti di queste formulazioni risiedono invece nel peso elevato del prodotto e nella sua *shelf life* che può essere breve, soprattutto in caso di conservazione e applicazione a temperature elevate. Esistono anche formulazioni liquide

costituite da emulsioni di acqua e olio che forniscono maggiore protezione al microrganismo (Pfammatter et al., 1989). Tuttavia anche queste necessitano di basse temperature di conservazione per mantenere le cellule vitali e sono poco maneggevoli a causa della necessaria separazione delle due fasi. Per ottenere formulazioni essiccate si utilizzano diverse tecniche tra le quali l'essiccazione a letto fluido, lo *spray drying*, la liofilizzazione. L'essiccazione a letto fluido (FBD) è fra le tecniche più comuni in cui la biomassa viene essiccata all'interno di una camera d'aria su un fluido caldo di vapore. Questo metodo funziona bene con specie di lievito come *S. cerevisieae* (Bayrock e Ingledew 1997) ed è usato industrialmente in tutto il mondo.

Lo *spray drying* (essiccazione spray) è una tecnica di essiccazione a basso costo utilizzata in particolare nell'industria alimentare, che prevede che il prodotto liquido sia polverizzato ed essiccato con aria calda e secca in pochi secondi. Lo svantaggio di questa tecnica è che nella maggior parte dei casi la sopravvivenza degli agenti di biocontrollo è scarsa (Abadias et al. 2005; Costa et al. 2002).

La liofilizzazione è una tecnica comune che prevede che il congelamento delle cellule in presenza di crioprottettori (Crowe et al. 1998) sia seguito da una liofilizzazione primaria e da una liofilizzazione secondaria. E' considerata la tecnica meno dannosa per l'essiccazione dei microrganismi ma non può essere un'alternativa economicamente valida per applicazioni a basso costo.

La liofilizzazione può essere condotta anche a temperature moderate per mantenere le cellule metabolicamente attive durante il processo (Manzanera et al., 2002, 2004). Anche in questo caso durante la liofilizzazione si utilizzano agenti protettivi delle membrane e reidratanti. Questo perché l'efficacia di molti antagonisti è direttamente correlata al numero di cellule vive inoculate (Hofstein et al., 1994). Costa et al. (2001) hanno riportato che l'aggiunta di trealosio ai preparati da liofilizzare determina la sopravvivenza di oltre il 60% delle cellule di *Pantoea agglomerans*, mentre l'aggiunta di latte scremato al mezzo di reidratazione permette la sopravvivenza del 100 % delle cellule. L'aggiunta di gomma di xantano a *Aeurobasidium pullulans*, applicato alle fragole in campo

migliora la sopravvivenza dell'antagonista e incrementa l'attività di biocontrollo su *B. cinerea* (Ippolito et al., 1998). L'aggiunta di glicerolo e trealosio al mezzo di crescita aumenta la tolleranza osmotica e la capacità di *Candida sakè* di contenere lo sviluppo *di Penicillium expansum* sui frutti di mela (Janisiewicz et al., 1998). Sodio alginato, carbossimetilcellulosa e chitosano favoriscono l'adesione e incrementano l'efficacia di *Metschnikowia pulcherrima* contro *Botrytis cinerea* su mela (Piano et al., 1998).

1.1.6 Integrazione di lotta biologica e trattamenti chimici e fisici

Gli antagonisti microbici non sono in grado di risolvere il problema del deterioramento della frutta in post raccolta, devono perciò essere considerati come strumenti da utilizzare in combinazione con altri. Negli ultimi anni sono state valutate diverse strategie che prevedono la combinazione di trattamenti biologici con: termoterapia (Barkai-Golan e Phillips, 1991), raggi ultravioletti (Chalutz et al., 1992), fungicidi (Pusey et al., 1994) calcio (Janisiewicz et al., 1998), bicarbonato di sodio (Teixido et al., 2001) o etanolo (Spadaro et al. 2002b). La termoterapia ha attività eradicativa su *P. expansum* su mela (Falik et al., 1995) e migliora il biocontrollo basato sull'utilizzo di lieviti termo-tolleranti (Leverentz et al., 2001). Anche l'irradiazione con UV-C (100-280 nm) riduce il decadimento della frutta e induce la resistenza delle radici, come le carote (Mercier et al., 1993) o le patate (Stevens et al., 1990). La combinazione di UV-C e di antagonisti microbici ha un effetto maggiore nel controllare i decadimenti post-raccolta sulle radici che sulla frutta. Il ruolo del UV-C sui frutti sono limitati principalmente alla riduzione dei propaguli dei patogeni**.** Gli agenti di biocontrollo possono essere combinati con fungicidi sia in campo che in post-raccolta (Pusey, 1994). Droby et al. (1993), dimostrano che l'efficacia del lievito *Pichia guilliermondii* aumenta proporzionalmente all'aggiunta di piccole concentrazioni di imazalil e tiabendazolo, raggiungendo un livello di controllo simile a quello ottenuto con l'utilizzo di fungicidi (Droby et al.1993). I lieviti sono generalmente tolleranti a molti dei fungicidi usati in post raccolta:

Metschnikowia pulcherrima (Spadaro et al., 2002a) è tollerante a concentrazioni relativamente alte di benzimidazoli (benomil e tiabendazolo) e dicarbossimidi (vinclozolin e procimidone). Anche l'aggiunta di calcio potenzia il biocontrollo di diversi antagonisti come ad esempio *Candida* spp (McLaughlin et al., 1990) e *Pichia guilliermondi (*Droby et al., 1997) e *Pseudomonas syringae* (Janisiewicz et al., 1998). E' d'altronde possibile l'impiego di approcci sempre più integrati, che consistono nella combinazione di più trattamenti come nel caso del contenimento della muffa blu causata da *Penicillium expansum*. In questo caso il trattamento termico (4 giorni a 38 C°), seguito dall'aggiunta di cloruro di calcio (2%) e di cellule di *Pseudomonas syringae* determina una risposta significativamente migliore rispetto a quella ottenuta con l'uso dei vari trattamenti singolarmente (Conway et al., 1999). Anche l'efficacia di *Pantoea agglomerans* e di *Metschnikowia pulcherrima* aumenta con la combinazione di altri trattamenti (Teixido et al., 2001; Spadaro et al., 2002b)

1.2 La transizione dimorfica nei lieviti

Nonostante l'enorme diversità di forme e dimensioni, molti lieviti hanno una caratteristica morfogenetica comune, ovvero la capacità di alternare lo sviluppo unicellulare (lievitiforme) a quello pseudoifale o ifale (pseudomiceliale/miceliale). La transizione dimorfica avviene in risposta a diversi fattori ambientali tra i quali le variazioni di pH, di temperatura, la disponibilità di fonti nutrizionali (Reynolds e Fink, 2001; Zaragoza e Gancedo 2000; Sánchez-Martínez e Pérez-Martín 2001; Nadal *et al*., 2008). Le due tipologie di sviluppo sono interconvertibili e rappresentano uno dei meccanismi di adattamento più interessanti tra quelli attuati dai microrganismi in risposta a stimoli di varia natura. Le cellule lievitiformi si dividono mitoticamente attraverso il processo di gemmazione o di fissione in relazione alla specie, per formare due cellule figlie indipendenti. Nel caso della crescita pseudoifale, le cellule figlie formano strutture multicellulari complesse costituite da catene ramificate di cellule o ife che formano un micelio (Gancedo et al., 2001; Kron & Gow, 1995; Zaragoza e

Gancedo, 2000; Sánchez-Martínez e Pérez-Martín 2001; Nadal *et al*., 2008; Sudbery *et al*., 2004). Dopo la divisione nucleare infatti, le cellule non si separano ma rimangono fisicamente attaccate e come in *Saccharomyces cerevisiae* è possibile osservare la parete cellulare nel punto di giunzione fra le cellule. Nel caso della crescita ifale invece nel punto di giunzione tra le cellule non è presente alcuna costrizione e, come osservato in *Ustilago maydis,* viene prodotto un lungo tubo liscio chiamato ifa. I filamenti possono essere invasivi e penetrare la superficie sulla quale crescono, suggerendo che l'abilità di transitare dalla morfologia lievitiforme a quella filamentosa rappresenti un determinante importante per la patogenicità dei funghi che colonizzano piante e animali (Lengeler et al., 2000). Tuttavia, nonostante molte delle specie patogene siano dimorfiche, non esiste una correlazione obbligata tra il dimorfismo e la patogenicità (Rooney et al., 2002). Inoltre in molti casi la patogenicità è associata alla crescita filamentosa come nel caso di *C. albicans, S cerevisiae* e *U. maydis*, in altri invece è associata alla morfologia lievitiforme come nel caso di *Histoplasma capsulatum* e *Blastomyces dermatitidis* (Justice et al., 2008). E' invece evidente che la capacità di cambiare morfologia sia un'importante risposta adattativa. In generale la morfologia lievitiforme permette la disseminazione di singole cellule e quindi la colonizzazione dell'ambiente a microrganismi privi di motilità cellulare. La morfologia filamentosa, permette invece una più ampia esplorazione dell'ambiente con minore dispendio energetico e la ricerca di nutrienti in condizioni di carenza nutrizionale (Lee & Elion, 1999). L'aderenza cellula-cellula e la crescita polarizzata promuovono invasione e colonizzazione dell'ospite. Inoltre l'alto rapporto superficie-volume dei filamenti facilita il trasporto dei nutrienti (Palacek et al., 2002).

1.2.1 Vie di trasduzione del segnale che regolano la crescita filamentosa

Benché differenti e molteplici segnali inducano la transizione dimorfica, i lieviti utilizzano meccanismi ampiamente condivisi per rispondere a questi segnali (Madhani & Fink, 1998).

Le principali vie di trasduzione del segnale che regolano la crescita filamentosa sono la cAMP-PKA e la MAPK (Mitogen-Activated-Protein-Kinase). In *S. cerevisiae,* sebbene entrambe le vie controllino la crescita pseudoifale, la via di trasduzione del segnale MAPK attivata dalla proteina Ras2p attraverso stadi intermedi è la più importante. Al contrario in *C. albicans* la via di trasduzione del segnale più importante è la cAMP-PKA.

1.2.1.1 Trasduzione del segnale e transizione dimorfica in *S.cerevisiae*

Il dimorfismo in *S.cerevisiae* è controllato sia dalla via di trasduzione del segnale della MAPK sia da quella della cAMP-PKA.

La via della MAPK è composta da 4 chinasi: Ste20p (PAK), Ste11p(MEKK), Ste7p (MEK) e Kss1p (MAPK) (Madhani et al., 1998). La cascata delle chinasi (MAPK), agisce sul fattore di trascrizione composto dalla proteina Ste12p e dalla proteina Tec1p. Questo fattore lega specifiche sequenze di DNA chiamate FREs (filamentation/invasion response elements) (Madhani et al., 1997). Allo stato attuale non è noto come questa via venga attivata, ma la proteina Ras2p è sicuramente coinvolta in questa fase. L'attivazione della via di trasduzione del segnale della MAPK con Ras2p avviene tramite la GTPase Cdc42p, le proteine Bmh1p e Bmh2p e la PAK Ste20p (Roberts et al., 1997). Anche la via di trasduzione del segnale cAMP-PKA controlla la crescita pseudoifale in *S.cerevisiae*. Due differenti meccanismi che coinvolgono le proteine G Ras2p e Gpa2p provocano un incremento dei livelli di cAMP che può attivare l'adenilato ciclasi Cyr1p (Pan et al., 1999). Il cAMP lega la subunità regolatoria (Bcy1p) della proteina chinasi A (PKA) causandone la dissociazione dalla subunità catalitica Tpk2p, che può attivare i suoi bersagli a valle. A monte di Ras2p e di Gpa2p ci sono due putativi sensori delle condizioni nutrizionali: Gpr1p e Mep2p. Gpr1p è un recettore di membrana associato alla proteina G Gpa2p (Lorenz et al., 2000). Gpr1p è un sensore del glucosio ma la sua espressione è controllata anche da basse concentrazioni di fonti azotate, a suggerire un ruolo di doppio sensore sia di abbondanza di fonti carboniose che di carenza azotata. La proteina Mep2p è

un ammonio permeasi ad alta affinità localizzata a monte di Ras2p e di Gpa2p (Lorenz et al., 1998).

Gli effettori a valle del secondo messaggero cAMP includono diversi fattori di trascrizione. Sok2p è un fattore di trascrizione appartenente alla famiglia di fattori trascrizionali essenziali per la differenziazione dei lieviti (Ward et al., 1995). Anche Phd1p ha effetti sulla crescita pseudoifale benché non sembri essere un bersaglio della PKA (Gimeno et al., 1994). Un altro fattore regolato dalla PKA è il regolatore trascrizionale Flo8p in grado di attivare le flocculine sulla superficie delle cellule (Liu et al., 1997). Esistono altri fattori che influenzano la crescita pseudoifale come ad esempio Ash1p, un fattore di trascrizione con struttura a dito di zinco a monte di Ras2p anche se non è del tutto chiaro se sia coinvolto nella via del cAMP-PKA (Chandarlapaty et al., 1998). Un secondo fattore di trascrizione interessante è Ime2p, una proteina chinasi essenziale per l'inizio della meiosi e la sporulazione e attiva come regolatore negativo della crescita pseudoifale. In presenza di abbondanti concentrazioni di carbonio ma in carenza di azoto, il fattore di trascrizione Ime2p viene represso dall'interazione con la proteina Gpa2p. La repressione di Ime2p favorisce la crescita pseudoifale, ed evita la sporulazione (Donzeau et al., 1999).

1.2.1.2 Trasduzione del segnale e transizione dimorfica in *C.albicans*

Come *S. cerevisiae* anche *C. albicans* è in grado di cambiare reversibilmente la sua morfologia da lievitiforme a ifale o pseudoifale. La flessibilità morfologica appare essere un importante fattore di virulenza in *C. albicans* che può dar luogo a crescita filamentosa in seguito ad alterazioni di pH, elevata temperatura, carenza di nutrienti, disponibilità di siero.

Anche in *C. albicans* così come in *S. cerevisiae* le vie di trasduzione del segnale coinvolte nella filamentazione sono quella della MAPK e del cAMP-PKA. I componenti della via della MAPK comprendono due differenti PAK (Cst20p e Cla4p), una MEK (Hst7p) ed una MAPK (Cek1p). Sono invece assenti gli omologhi delle proteine MEKK e di Tec1p di *S. cerevisiae*. L'attivazione della via della MAPK

attiva il fattore di trascrizione Cph1p (Brown et al., 1999) responsabile dell'attivazione trascrizionale dei geni coinvolti nello sviluppo ifale. La fosforilazione di Cek1p è regolata negativamente dalla proteina fosfatasi Cpp1p (Csank et al., 1997). L'inattivazione di *CPP1* porta alla l'attivazione costitutiva dello sviluppo ifale in tutte le condizioni di crescita. Oltre alla via della MAPK, anche il cAMP influenza lo sviluppo ifale. L'aggiunta di cAMP induce la crescita ifale (Niimi et al., 1996). Il clonaggio di una delle tre sub unità catalitiche della PKA (Tpk2) chiaramente dimostra che anche la via del cAMP è coinvolta nel dimorfismo (Sonneborn et al., 2000). La proteina Efg1p (omologa di Sok2p e Phd1p) sembra agire a valle della PKA (Stoldt et al., 1997). La perdita di funzione della proteina Efg1p, suggerisce che Efg1p è un bersaglio diretto dell'attività della PKA similmente a quanto avviene per Sok2p in *S. cerevisiae*, benché il ruolo di Efg1p nell'attivare la trascrizione dei geni responsabili della crescita ifale sia positivo rispetto a quello di Sok2p. In *C. albicans* similmente a quanto accade in *S. cerevisiae* con Ras2p, la crescita pseudoifale è regolata anche da Ras1p (Feng et al., 1999).

1.2.2 Fattori nutrizionali che inducono la transizione dimorfica

La carenza di fonti nutrizionali è tra i fattori maggiormente coinvolti nell'attivazione della transizione dimorfica. Su terreni colturali complessi, cioè contenenti fonti azotate e carboniose in abbondanza, le cellule adottano morfologia lievitiforme e crescono rapidamente. L'assenza e la scarsa disponibilità di nutrienti inducono invece l'arresto della crescita cellulare e la formazione o di organi di resistenza, quali le spore, in grado di tollerare un ampio range di stress ambientali (Palacek at al., 2002), o di pseudoife. La filamentazione è quindi una risposta adattativa alternativa alla sporificazione.

Tra le fonti nutrizionali, quelle maggiormente coinvolte nella transizione dimorfica sono quelle azotate. In carenza di azoto e presenza di fonti di carbonio fermentabili alcuni lieviti rallentano la loro crescita vegetativa e cambiano morfologia (Gimeno et al., 1992). In *S. cerevisiae* le cellule diploidi transitano da

una forma lievitiforme a una invasiva o filamentosa, mentre le cellule aploidi adottano un fenotipo di crescita invasiva (Gimeno et al., 1992) per cui il biofilm che si forma sulla superficie del substrato solido penetra all'interno del substrato. L'ammonio è la fonte azotata preferenzialmente utilizzata dai lieviti ed è in grado di supportare la crescita a livelli ottimali. Tutti i funghi studiati, contengono almeno due ammonio permeasi appartenenti alla famiglia delle proteine AmtB/Mep/Rh in grado di percepire la disponibilità di azoto. In *S. cerevisiae* sono state individuate tre ammonio permeasi chiamate Mep1p, Mep2p, Mep3p che trasportano lo ione ammonio attraverso la membrana plasmatica. La delezione di tutti e tre i geni *MEP* rende *S. cerevisiae* incapace di crescere su mezzi colturali contenenti concentrazioni di ammonio inferiori a 5mM, come unica fonte azotata (Marini et al., 1997). Lorenz e Heitman (1998a) hanno individuato in Mep2p l'ammonio permeasi che regola la differenziazione cellulare in *S. cerevisiae* quando la sola fonte azotata disponibile è l'ammonio presente a basse concentrazioni (Lorenz & Heitman, 1998a).

I ceppi che mancano del gene *MEP2* possono acquisire ammonio dall'ambiente esterno e crescere, ma non sono in grado di formare filamenti in risposta a carenza di azoto (Lorenz & Heitman, 1998b). Mep2p rileva quindi la carenza di ammonio e genera un segnale, a monte di Gpa2p, Ras2p e cAMP, capace di indurre la crescita pseudoifale in *S. cerevisiae*. Anche il recettore Mep1p sembra avere un ruolo nel rilevare l'azoto dato che la delezione del gene *MEP1* permette di attivare la formazione dei filamenti anche nei ceppi che mancano di *MEP2* (Lorenz & Heitman, 1998b). Probabilmente i segnali di Mep1p e Mep2p sono integrati per un controllo più accurato della disponibilità di azoto. Anche in *C. albicans* Mep2p, ma non Mep1p, ha un ruolo centrale nell'indurre la crescita filamentosa in carenza di azoto. Quando l'ammonio è assente o presente a basse concentrazioni, Mep2p attiva sia la via di trasduzione del segnale delle MAPK, sia quella del cAMP-PKA attraverso la proteina Cph1p e la proteina Ras1p rispettivamente. In presenza di elevate concentrazioni di ammonio che ne richiedono l'assorbimento, Mep2p funziona come trasportatore e in qualche

modo viene bloccata la sua funzione segnale, così che il lievito continui a crescere con una morfologia lievitiforme. Mep2p è un trasportatore meno efficiente di Mep1p ed è espresso a livelli molto più alti, una caratteristica importante per la sua funzione segnale.

In *C. albicans* Mep2p è la sola ammonio permeasi richiesta per la differenziazione pseudoifale. Un modello alternativo propone per *MEP2* una possibile funzione secretoria di ammonio o di un composto correlato che abbia funzione di segnale extracellulare.

Anche la qualità e la quantità degli aminoacidi influisce sulla crescita filamentosa (Palecek at al., 2002). I lieviti *S. cerevisiae* e *C. albicans* sono in grado di rilevare gli aminoacidi presenti nel mezzo colturale grazie a un sistema di sensori molto sofisticato che consta del complesso Ssy1p-Ptr3p-Ssy5p (SPS). Ssy1p è un sensore degli aminoacidi. Ssy5p è una proteasi. Il legame degli aminoacidi a Ssy1p attiva Ssy5p che a sua volta determina la maturazione proteolitica dei fattori di trascrizione Stp1p e Stp2p. L'attivazione di Stp1p e Stp2 induce la trascrizione di geni codificanti una permeasi e gli enzimi preposti al metabolismo degli aminoacidi (Bahn et al., 2007). Klasson et al hanno mostrato che mutazioni nei geni *SSY1 e PTR3* inducono l'allungamento e la crescita invasiva in ceppi aploidi (Klasson et al., 1999).

Mutazioni nel gene *SRH3*, richiesto per l'assorbimento degli aminoacidi, si manifestano con un fenotipo pseudoifale (Gimeno et al., 1992).

In *S. cerevisiae* i ceppi che mancano del gene *GPR1*, codificante un recettore di membrana accoppiato alla proteina G Gpa2p (Xue et al., 1998; Yun et al., 1998) hanno difetti sia nella formazione dei filamenti nei ceppi diploidi, sia nella crescita invasiva in quelli aploidi (Lorenz et al., 2000b). La carenza di fonti azotate induce la trascrizione di *GPR1* (Xue et al., 1998). Anche se la funzione primaria di Gpr1p in *S. cerevisiae* sembra essere quella di rilevare il glucosio, l'espressione del gene *GPR1* è controllata dalla presenza di basse concentrazioni di azoto. Gpr1p è una proteina che non solo lega il glucosio, ma rileva e integra i segnali derivanti dalla presenza di glucosio e di azoto. Gpr1p attiva il segnale a cascata

del cAMP-PKA attraverso la proteina G Gpa2p (Lorenz et al., 2000b; Rolland et al., 2000; Yun et al., 1998). Maidan et al. (2005) hanno osservato che in *C. albicans,* a differenza di *S. cerevisiae,* il recettore accoppiato alla proteina G Gpr1p rileva la presenza di metionina e dà inizio ad un processo che controlla la filamentazione mediato dalla cascata del cAMP-PKA.

S. cerevisiae e *C. albicans* sono in grado di produrre dal catabolismo degli aminoacidi diversi metaboliti conosciuti con il nome di alcoli superiori in grado di influenzare la morfologia cellulare (Ceccato-Antonini & Sudbery 2004; Dickinson et al., 1997, 1998, 2000, 2003). La transizione dimorfica in risposta alla presenza di alcoli superiori si verifica quando i lieviti non avendo più a disposizione le risorse azotate preferenziali quali ammonio, glutammina, asparagina catabolizzano aminoacidi meno "graditi", quali leucina, isoleucina, valina o aminoacidi aromatici quali fenilalanina, triptofano e tirosina.

L'assimilazione di fenilalanina, metionina e valina avviene attraverso la via di Erlich e comporta la produzione da ciascun aminoacido, dei corrispondenti alcoli superiori in seguito a reazioni di transaminazione, decarbossilazione e riduzione (Jones & Pierce, 1964; Henry et al., 2007, Hazelwood et al., 2008). Gli alcoli superiori sono noti induttori dello sviluppo pseudoifale in *S. cerevisiae* e *C. albicans.* In particolare l'alcol isoamilico, derivante dalla leucina, stimola la crescita pseudoifale in *S. cerevisiae* (Chen & Fink, 2006).

Tutti gli alcoli superiori sembrano avere un ruolo come molecole segnale e influiscono sulla morfologia del lievito: il 2-feniletanolo (il prodotto finale del catabolismo della fenilalanina) e il triptofolo (il prodotto finale del catabolismo del triptofano) inducono la transizione da lievitiforme a pseudoifale nelle cellule diploidi di *S. cerevisiae* (Chen & Fink, 2006); il tirosolo (il prodotto finale del catabolismo della tirosina) agisce come molecola appartenente ad un sistema di quorum sensing in *C. albicans* (Chen et al., 2004); il 2-metil1-butanolo (il prodotto finale del catabolismo della isoleucina), l'1-pentanolo ("n-amil alcool": derivante dalla treonina) e il 2 metil-1 propanolo (il prodotto finale del catabolismo della valina) inducono la formazione di filamenti nel lievito *S.*

cerevisiae durante la crescita su terreni colturali ricchi e complessi (Dickinson, 1996).

Anche le fonti di carbonio presenti nel mezzo di crescita, al pari di quelle azotate, sembrano avere un importante ruolo nel determinare la crescita e la morfologia delle cellule.

Il recettore Gpr1p il cui ruolo nella rilevazione delle fonti azotate è stato discusso, è preposto alla rilevazione della concentrazione extracellulare del *glucosio*. Gpr1p infatti, lega il glucosio con bassa affinità ed attiva la via del cAMP-PKA in modo Gpa2p dipendente in assenza di glucosio inducendo la filamentazione (Lorenz et al., 2000b; Yun et al., 1998).

Gpr1p può monitorare i livelli di glucosio necessari per la crescita filamentosa oppure può integrare i segnali del glucosio e dell'azoto nella pathway pseudoifale. Non è stato identificato alcun ruolo per i trasportatori del glucosio durante la crescita filamentosa. Tuttavia, le mutazioni a carico di proteine coinvolte nell'utilizzo del mannosio e di proteine coinvolte nei processi di glicosilazione attivano una proteina chinasi (MAPK) coinvolta nella via di trasduzione del segnale utilizzata durante la filamentazione e la crescita aploide (Cullen et al., 2000). Inoltre, anche gli enzimi coinvolti nel catabolismo degli zuccheri possono regolare i fenotipi filamentosi (Wilkinson et al., 1996). Mutazioni in geni che codificano la fosfoglucosio isomerasi (*PGI1*), la 6-fosfogluconato deidrogenasi (*GND1*) e l'alcool deidrogenasi (*ADH1*) stimolano la crescita invasiva nelle cellule aploidi e favoriscono lo sviluppo pseudoifale nei ceppi diploidi in carenza di azoto (Palecek et al., 2000). Negli aploidi la regolazione della crescita invasiva da fonte di carbonio richiede il gene repressore *SNF1* (Carlson, 1999; Gancedo, 1998). Snf1p è necessaria per l'espressione di geni repressi da glucosio, responsabili della crescita invasiva in assenza di glucosio, forse attraverso il fattore di trascrizione Sip4p (Cullen & Sprague, 2000). Resta da determinare quali geni siano regolati da Snf1p e quali di questi possano contribuire alla crescita invasiva. Anche la degradazione dell'amido sembra essere in qualche modo correlata allo sviluppo pseudoifale. La

trascrizione dei geni *STA1-3*, codificanti per glicoamilasi, è repressa da *STA10*, ma è ripristinata dalla sovra-espressione di *MSN1* (Lambrechts et al., 1996). Interessante è il fatto che la sovra-espressione di *MSN1* induca la crescita filamentosa e invasiva. Pertanto *STA1-3* potrebbero essere dei co-regolatori della crescita filamentosa (Gagiano et al., 1999), a suggerire uno sviluppo evolutivo della crescita invasiva basata sul metabolismo del carbonio.

1.3 Dimorfismo e patogenicità

I cambiamenti morfologici sono spesso associati o correlati a alla patogenicità di diverse specie fungine. Le spore di alcuni funghi filamentosi quali *Aspergillus, Fusarium e Zygomycota* germinano e producono ife nei polmoni dell'ospite. Le ife di *Scopulariopsis brevicaulis*, un fungo che provoca dermatiti, crescono nella pelle e sulle unghie e si frammentano poi in artroconidi o altri tipi di conidi. Le cellule di *Coccidioides immitis* si sviluppano in sferule settate nell'ospite. Altri funghi, quali *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Penicillium marneffei*, formano miceli filamentosi nell'ambiente, ma quando vengono a contatto con l'ospite transitano verso una morfologia lievitiforme. Nei lieviti la capacità di transitare tra le diverse morfologie sembra essere associata alla virulenza (Pfaller, 1996) (Tabella 2). Molte specie di *Candida* formano pseudoife e ife nei tessuti, e in *Candida albicans* la transizione dimorfica verso la forma pseudoifale è chiaramente correlata alla capacità di invadere e infettare i tessuti (Sudbery et al., 2004). Le ragioni che spingono i lieviti a cambiare morfologia sono diverse. La formazione di pseudoife oltre a facilitare il trasporto dei nutrienti e l'esplorazione dell'ambiente circostante, facilita la penetrazione meccanica delle superfici solide per effetto della pressione generata dalla estremità delle ife sul tessuto sottostante (Gow et al., 2002). Inoltre, l'estremità delle ife è il sito di secrezione di enzimi, capaci di degradare proteine, lipidi e altri componenti cellulari che facilitano quindi l'ingresso dei lieviti in substrati solidi e tessuti (Hube et al., 2001; Palkova & Vachova, 2006).

Tabella 2. I più importanti patogeni fungini per l'uomo e la loro morfologia durante la malattia.

Specie	Morfologia associata alla patogenicità
Blastomyces dermatitidis	Cellule lievitiformi
Candida albicans	Ife, pseudoife, cellule lievitiformi
Candida dubliniensis	Ife, pseudoife, cellule lievitiformi
Candida tropicalis	Cellule lievitiformi e pseudoife
Coccidioidies immitis	Cellule lievitiformi con sferule piene di endospore
Cryptococcus neoformans	Cellule lievitiformi rivestite da una capsula
Histoplasma capsulatum	Cellule lievitiformi
Paracoccidioides brasiliensis	Cellule lievitiformi
Penicilium marneffei	Cellule lievitiformi con setti trasversi
Sporothrix Schenkii	Cellule lievitiformi
Wangiella dermatitidis	Cellule lievitiformi

Adattata da Gow et al. (2002)

In *C. albicans* la morfologia filamentosa fornisce maggiore resistenza alla fagocitosi da parte dei macrofagi e dei leucociti (Cutler et al., 1991; Lo et al., 1997). Nonostante i vantaggi che la morfologia filamentosa apporta ai lieviti, è interessante notare che per la maggior parte dei patogeni dimorfici tra cui *Paraccocidioides brasiliensis, Penicillium marneffei Histoplasma capsulatum, Blastomyces dermatitidis,* la morfologia associata alla patogenicità è quella lievitiforme. Anche in *C. albicans*, in cui la conversione ifale è stata a lungo considerata come essenziale per l'invasione dei tessuti, ci sono prove che suggeriscono che anche le cellule lievitiformi possono essere in grado di avviare l'invasione e il danneggiamento del tessuto ospite. *Candida glabrata*, la seconda in ordine di importanza tra le specie di *Candida,* in relazione alla capacità di

causare infezioni (Sanglard et al., 2002), ha un limitata capacità di formare pseudoife (Csank et al., 2000).

Sembra quindi che la morfologia pseudoifale non sia essenziale per la patogenesi, anche tra le specie ascritte al genere *Candida*. Le cellule di lievito infatti, possono avere importanti caratteristiche che promuovono la patogenesi. Per esempio, *C. albicans* in forma di lievito produce un secreto di aspartil proteasi coinvolte nella virulenza (Hube et al., 2001). Inoltre, *Histoplasma capsulatum* e *Cryptococcus neoformans* resistono alla fagocitosi in forma di lievito. Pertanto sembra che nei funghi patogeni per l'uomo sia la morfologia lievitiforme a contribuire maggiormente alla patogenesi.

1.4 I biofilm microbici

I microrganismi crescono in molti ecosistemi acquatici e terrestri in strutture complesse e diversificate che prendono il nome di biofilm. I biofilm sono costituiti da comunità di cellule microbiche appartenenti alla stessa specie (biofilm monospecie) o a più specie (biofilm multispecie), circondate da una matrice extracellulare di natura polimerica. Si sviluppano su superfici biotiche e abiotiche e rappresentano un modello naturale di vita e di sopravvivenza per numerose specie batteriche e fungine. Lo studio di queste strutture ha evidenziato non solo la loro complessità ma anche la loro diversità. Infatti i biofilm sono caratterizzati da resistenza ad una vasta gamma di fattori fisici, chimici e biologici e le interazioni che si verificano all'interno di queste strutture determinano, in larga misura, la sopravvivenza delle cellule in ambienti ostili e la resistenza ad agenti antimicrobici (Darren et al., 1999). La complessità strutturale e fisiologica dei biofilm suggerisce che questi siano costituiti da gruppi cooperativi, analogamente agli organismi pluricellulari. Secondo Nadell et al. (2000) l'organizzazione dei biofilm non dipende necessariamente da un coordinamento di tipo attivo. Vale a dire, che proprietà quali la differenziazione fenotipica, la stratificazione delle specie e la formazione di canali non necessariamente richiedono che le cellule comunichino tra loro utilizzando

specifiche molecole segnale. In effetti mentre la cooperazione tra batteri è piuttosto comune, la cooperazione tra tutte le cellule del biofilm è improbabile. All'interno di un biofilm si possono verificare anche conflitti tra ceppi di una stessa specie o tra specie diverse. Il biofilm è quindi il risultato di un equilibrio tra cooperazione e concorrenza la cui comprensione è fondamentale per costruire un modello completo e predittivo della sua formazione.

La crescita del biofilm avviene per tappe (Stoodley et al., 2002), e ha inizio quando le cellule planctoniche, sia in modo casuale o a causa di stimoli chimici, vengono a contatto con una superficie (Freter & Obrien, 1981; Pratt & Kolter, 1998; Meibom et al., 2004). All'inizio l'adesione è spesso reversibile in modo che le cellule possano cambiare superficie qualora le condizioni non fossero più ottimali. Alcuni batteri possono attaccarsi utilizzando pili extracellulari (Chiusa et al., 2003; O'Toole & Kolter, 1998), altri attraverso specifiche molecole quali le adesine (Hinsa et al, 2003.; Latasa et al., 2005). Le cellule tipicamente producono una matrice costituita da sostanze polimeriche extracellulari (EPS) composta principalmente da polisaccaridi e da molecole più piccole quali proteine e DNA (Beenken et al., 2004; Hall Stoodley et al., 2004; Braxton et al., 2005; Flemming et al., 2007). Le funzioni della matrice non sono ancora del tutto chiare. Tuttavia sembra che la matrice promuova l'adesione alle superfici e fornisca un supporto strutturale, tanto che i mutanti non in grado di produrre matrice sono spesso incapaci di formare biofilm (Davies et al., 1993;. Danese et al., 2000;. Hammer & Bassler, 2003; Kearns et al., 2005). La matrice potrebbe inoltre conferire protezione da minacce esterne quali composti antimicrobici e gli organismi predatori (Mah & O'Toole, 2001; Stewart, 2002; Fux et al., 2005;. Matz et al., 2005). Infatti i biofilm sono più resistenti agli antibiotici rispetto alle cellule planctoniche e sono responsabili di molte malattie, (Mah et al., 2003; Fux et al., 2005; Obst et al., 2006). Naturalmente le cellule del biofilm devono anche essere in grado di "fuggire" dalla matrice. Il distacco delle cellule può avvenire attraverso processi passivi come il flusso dei fluidi (Telgmann et al., 2004), o tramite processi attivi come la secrezione di enzimi che degradano la struttura

della matrice circostante (Hammer & Bassler, 2003; Zhu & Mekalanos, 2003; Heithoff & Mahan, 2004; Liu et al., 2007).

Molti fenomeni cellulari importanti per la formazioni dei biofilm, quali la capacità di aderire alle superficie (Dunne, 2002), la motilità (Schuster & Greenberg, 2006), la produzioni di matrice (Davies et al., 1998;. Hammer & Bassler, 2003; Sakuragi & Kolter, 2007), e la dispersione delle cellule (Allison et al., 1999;.. Dow et al.,2003) sono mediati da meccanismi di *quorum sensing* (Hall Stoodley et al., 2004).

La risposta *quorum se*nsing è mediata dalla secrezione di piccole molecole diffusibili, note come autoinduttori. I batteri e i lieviti variano la concentrazioni di molecole *quorum sensing* per regolare la densità della popolazione cellulare e di conseguenza il loro comportamento secondo la densità cellulare (Miller & Bassler, 2001; Reynolds et al., 2001; Waters & Bassler, 2005; Bassler & Losick, 2006).

Alcuni biofilm fungini, come quelli formati da *Candida albicans* e *Candida glabrata*, sono causa di infezioni acute e croniche particolarmente dannose per individui immunocompromessi, come pazienti affetti da HIV o soggetti sotto trattamento chemioterapico (Molero et al., 1998; Sudbery et al., 2004). Il biofilm di *C. albicans* è costituito da un network di cellule lievitiformi, ife e pseudoife (Baillie et al., 1999). La transizione tra le diverse morfologie può essere osservata in vitro in risposta a fattori ambientali come pH, temperatura e presenza di sostanze come N-acetilglucosammina o prolina (Molero *et al*., 1998). Lo sviluppo pseudoifale di *C. albicans* è stato rilevato su dispositivi medici impiantati quali protesi dentali, cateteri urinari, cateteri venosi, dispositivi endotracheali e altri che possono fungere da supporto per la produzione di biofilm. (Chandra et al., 2001). La capacità di effettuare la transizione dimorfica sembra contribuire alla patogenicità di questo microrganismo, oltre ad influire sullo sviluppo del biofilm (Sudbery et al., 2004; Nadal et al., 2008).

Anche *S. cerevisiae* come *C. albicans* è un lievito dimorfico capace di alternare lo sviluppo lievitiforme quello pseudoifale e produce biofilm (Budroni et al., 2000).

Questo lievito è generalmente ritenuto non patogeno (*GRAS*) per l'uomo anche se può colonizzare le superfici delle mucose e provocare occasionalmente fungemie in adulti immunocompromessi e nei neonati (Smith et al., 2002; Casalone et al., 2004). Recentemente, l'abilità di formare biofilm è stata indicata come un possibile meccanismo di biocontrollo (Scherm et al., 2003; Ortu et al., 2005). Alcuni autori hanno infatti dimostrato l'efficacia di un ceppo di *S. cerevisiae* capace di formare biofilm (ceppo *flor*) su terreno liquido, nel biocontrollo di *P. expansum* (Ortu et al., 2005). L'attività antagonista del ceppo *flor* è stata correlata chiaramente alla produzione di biofilm, infatti, solo le cellule di lievito prelevate dal biofilm erano efficaci nel limitare la crescita del patogeno, essendo in grado di colonizzare con più efficienza la superficie interna di ferite sul frutto.

1.12 Bibliografia

Abadias M, Teixido N, Usall J, Solsona C, Vinas I (2005) Survival of the postharvest biocontrol yeast *Candida sake* CPA-1 after dehydration by spray-drying. *Biocontrol Sci Technol* 15: 835–846.

Andrews JH, Harris RF, Spear RN, Lau GW, Nordheim EV (1994) Morphogenesis and adhesion of *Aureobasidium pullulans*. *Can J Microbiol* 40: 6 – 17.

Arras G (1993) Inhibition of postharvest fungal pathogens by *Bacillus subtilis* strains isolated from citrus fruit. *Adv Hortic Sci* 7: 123–27.

Arras G, De Cicco V, Arru S, Lima G (1998) Biocontrol by yeasts of blue mold of citrus fruits and the mode of action of an isolate of *Pichia guilliermondii*. *J Hortic Sci Biotech* 73: 413–418.

Bahn YS, Xue C, Idnurm A, Rutherford JC, Heitman J, Cardenas ME (2007) Sensing the environment: lessons from fungi. *Nat Revs Microbiol.* 5: 57-69.

Barkai-Golan R, Phillips DJ (1991) Postharvest heat treatment of fresh fruits and vegetables for decay control. *Plant Dis* 75: 1085–1089.

Bayrock D, Ingledew WM (1997) Mechanism of viability loss during fluidized bed drying of baker's yeast. *Food Res Inter* 30: 417–425

Braxton EE, Ehrlich GD, Hall-Stoodley L (2005) Role of biofilms in neurosurgical device-related infections. *Neurosurg Rev* 28: 249–255.

Brown AJP, Gow NAR (1999) Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis. *Trends Microbiol* 7: 333-338.

Brown GE, Davis C e Chambers M (2000) Control of citrus green mold with Aspire is impacted by the type of injury. *Postharvest Biol Tec* 18: 57-65.

Brush L, Money NP (1999) Invasive hyphal growth of *Blastomyces dermatitidis* is induced by stab-inoculation and shows dependence on melanin biosynthesis. *Fung Genet Biol* 26:190-200.

Budroni M, Giordano G, Pinna G, Farris GA (2000) A genetic study of natural flor strain of *Saccharomyces cerevisiae* isolated during biological ageing Sardinian wines. *J Appl Microbiol* 89: 657-662.

Carlson M (1999) Glucose repression in yeast. *Curr Opin Microbiol* 2: 202-207

Casalone E, Barberio C, Cappellini L, Polsinelli M (2005) Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* natural populations for pseudohyphal growth and colony morphology. *Res Microbiol*156: 191-200.

Ceccato-Antonini S, Sudbery PE (2004) Filamentous growht in *Saccharomyces cerevisiae*. *Braz J Microbiol* 35: 173-181

Chalutz E, Droby S (1998) Biological control of postharvest disease. In: Boland GJ, Kuykendall LD (Eds.), Plant –Microbe Interactions and Biological Control. Marcel Dekker, New York, USA, 157– 170.

Chalutz E, Droby S, Wilson CL, Wisniewski ME (1992) UV induced resistance to postharvest diseases of *Citrus* fruit. *J Phytochem Phytobiol* 15: 367-374.

Chandarlapaty S, Errede B (1998) Ash1, a daughter cell-specific protein, is required for pseudohyphal growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 18: 2884-2891.

Chand-Goyal T, Eckert JW, Droby S, Atkinson K (1998) A method for studying the population dynamics of *Candida oleophila* on oranges in the grove, using a selective isolation medium and PCR technique. *J Microbiol Res* 153: 265–270.

Chand-Goyal T, Eckert JW, Droby S, Glickmann E, Atkinson K (1999) Transformation of *Candida oleophila* and survival of a transformant on orange fruit under field conditions. *Curr Genet* 35: 51–57.

Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA (2001) Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J of Bacteriology* 183: 5385–5394.

Chen H, Fujita M, Feng Q, Clardy J, Fink GR (2004) Tyrosol is a quorum-sensing molecule in Candida albicans. *Pnas* 101: 5048-5052

Chen HC, Fink GR (2006) Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. *Genes. Dev.* 20: 1150–1161.

Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML (2001) Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int J Food Microbiol* 71: 1–20.

Conway WS, Janisiewicz WJ, Klein JD, Sams CE (1999) Strategy for combining heat treatment, calcium infiltration, and biological control to reduce postharvest decay of ‘‘Gala’’apples. *HortScience* 34: 700-704

Corner BE, Magee PT (1997) *Candida* pathogenesis: unravelling the threads of infection. *Curr Biol* 7: 691-694.

Costa E, Teixido N, Usall J, Fons E, Gimeno V, Delgado J, Vinas I (2002) Survival of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 in a spray-drying process. *J Food Prot* 65: 185–191.

Costa E, Usall J, Teixido N, Garcia N, Vinas I (2000) Effect of protective agents, rehydration media and initial cell concentration on viability of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 subjected to freeze drying. *J Appl Microbiol* 89: 793–800.

Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM (1995) Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 49: 711–745.

Crowe JH, Carpenter JF, Crowe LM (1998) The role of vitrification in anhydrobiosis. *Ann Rev Physiol* 60:73–103.

Csank C, Haynes K (2000) *Candida glabrata* displays pseudohyphal growth. *FEMS Microbiol Lett* 189: 115-120.

Csank C, Makris C, Meloche S, Schroppel K, Rollinnghoff M, Dignard D, Thomas DY, Whiteway M (1997) Derepressed hyphal growth and reduced virulence in a VH1 family-related protein phosphatase mutant of the human pathogen *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* 8: 2539-2551.

Cullen PJ, Sprague GFJr (2000) Glucose depletion causes haploid invasive growth in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 13619-13624.

Cutler JE (1991) Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol* 45: 187-218.

Dickinson JR (1994) Irreversible formation of pseudohyphae by haploid *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* 119: 99-104.

Dickinson JR (1996) Fusel alcohols induce hyphal-like extensions and pseudohyphal formation in yeast. *Microbiol* 142: 1391-1397.

Dickinson JR, Harrison SJ, Dickinson JA, Hewlins MJE (2000) An investigation of the metabolism of isoleucine to active amyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 275: 10937–10942.

Dickinson JR, Harrison SJ, Hewlins MJE (1998) An investigation of the metabolism of valine to isobutyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 273: 25751–25756.

Dickinson JR, Lanterman MM, Danner DJ, Pearson BM, Sanz P, Harrison SJ, Hewlins MJE (1997) A ^{13}C nuclear magnetic resonance investigation of the metabolism of leucine to isoamyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 272: 26871–26878.

Dickinson JR, Salgado LEJ, Hewlins MJE (2003) The catabolism of amino acids to long-chain and complex alcohols in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 278: 8028–8034.

Donzeau M, Bandlow W (1999) The yeast trimeric guanine nucleotidebinding protein α subunit, Gpa2p, controls the meiosis-specific kinase Ime2p activity in response to nutrients. *Mol Cell Biol* 19: 6110-6119.

Dow JM, Crossman L, Findlay K, He YQ, Feng JX, Tang JL (2003) Biofilm dispersal in *Xanthomonas campestris* is controlled by cell-cell signaling and is required for full virulence to plants. *P Natl Acad Sci USA* 100: 10995–11000.

Droby S, Chalutz E (1994) Mode of action of biocontrol agents of postharvest diseases. In: Wilson CL, Wisniewski ME (Eds.), Biological Control of Postharvest Diseases. Theory and Practice. CRC Press, Boca Raton, USA, 63–75.

Droby S, Chalutz E, Wilson CL, Wisniewski ME (1989) Characterization of the biocontrol activity of *Debaryomices hansenii* in the control of *Penicillium digitatum* on grapefruit. *Can J Microbiol* 35: 794–800.

Droby S, Chalutz E, Wilson CL, Wisniewski ME (1992) Biological control of postharvest diseases: a promising alternative to the use of synthetic fungicides. *Phytoparasitica* 20: 1495–1503.

Droby S, Cohen A, Weiss B, Horev B, Chalutz E, Katz H, Keren-Tzur M, Shachnai A (1998) Commercial testing of aspire: a yeast preparation for the biological control of postharvest decay of citrus. *Biological Control* 12: 97–100.

Droby S, Hofstein R, Wilson CL, Wisniewski M, Fridlender B (1993) Pilot testing of *Pichia guilliermondii*: a biocontrol agent of postharvest diseases of citrus fruit. *Biol. Control* 3: 47–52.

Droby S, Vinokur V, Weiss B, Cohen L, Daus A, Goldschmidt EE, Porat R (2002) Induction of resistance to *Penicillium digitatum* in grapefruit by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. *Phytopathol* 92: 393–399.

Droby S, Wisniewski ME, Cohen L, Weiss B, Touitou D (1997) Influence of CaCl2 on *Penicillium digitatum*, grapefruit peel tissue, and biocontrol activity of *Pichia guilliermondii*. *Phytopathol* 87: 310–15.

Druvefors UA, Passoth V, Schnürer J (2005) Nutrient Effects on Biocontrol of *Penicillium roqueforti* by *Pichia anomala* J121 during Airtight Storage of Wheat. *Appl Env Microbiol* 71: 1865–1869.

Dunne WM (2002) Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev* 15: 155–166.

Eckert JM, Ogawa JM (1985) The chemical control of postharvest diseases: subtropical and tropical fruits. *Annu Rev Phytopathol* 23: 421-454.

Edwards SG, Seddon B (2001) Mode of antagonism of *Brevibacillus brevis* against *Botrytis cinerea* in vitro. *J Appl Microbiol* 91: 652– 659.

El-Ghaouth A (1998) Use of elicitors to control postharvest diseases in fruits and vegetables. See Ref. 101a, pp. 131–35.

El-Ghaouth A, Arul J, Grenier J, Asselin A (1992) Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. *Phytopathol* 82: 398–402.

El-Ghaouth A, Smilanick JL, Brown GE, Ippolito A, Wisniewski M, Wilson CL (2000a). Application of *Candida saitoana* and glycolchitosan for the control of postharvest diseases of apple and citrus fruit under semi-commercial conditions. *Plant Dis*. 84: 243– 248.

El-Ghaouth A, Wilson CL, Wisniewski M, Droby S, Smilanick JL, Korsten L (2002) Biological control of post-harvest diseases of citrus fruit. In: Biological Control of Crop Diseases (Ed. Gnanamanickam SS) Dekker Inc, New York, 289–312.

El-Ghaouth A, Wilson CL, Wisniewski ME (2004) Biologically based alternatives to synthetic fungicides for the postharvest diseases of fruit and vegetables. In: Naqvi, S.A.M.H. (Ed.), Diseases of Fruit and Vegetables, vol. 2. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 511–535.

Falik ES, Grinberg S, Gambourg M, Lurie S (1995) Prestorage heat treatment reduces pathogenicity of *Penicillium expansum* in apple fruit. *Plant Pathol* 45: 92–97.

Feng Q, Summers E, Guo B, Fink GR (1999) Ras signaling is required for serum-induced hyphal differentiation in *Candida albicans*. *J Bacteriol* 181: 6339-6346.

Filonow AB (1998) Role of competition for sugars by yeasts in the biocontrol of grey mould of apple. *Biocontrol Sci Technol* 8: 243– 256.

Flemming H-C, Neu TR, Wozniak DJ (2007) The EPS matrix: the ‘‘House of biofilm cells’’. *J Bacteriol* 189: 7945–7947.

Freter R, Obrien PCM (1981) Role of chemotaxis in the association of motile bacteria with intestinal-mucosa chemotactic responses of *Vibrio cholerae* and description of motile non chemotactic mutants. *Infect Immun* 34: 215–221.

Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P (2005) Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol* 13: 34–40.

Gagiano M, Bauer FF, Pretorius IS (2002) The sensing of nutritional status and the relationship to filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae. FEMS Yeast Res* 2: 433-470.

Gagiano M, van Dyk D, Bauer FF, Lambrechts M G, Pretorius IS (1999) Msn1p/Mss10p, Mss11p and Muc1p/Flo11p are part of a signal transduction pathway downstream of Mep2p regulating invasive growth and pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 31: 103-116.

Gancedo JM (1998) Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 334-361.

Gancedo JM (2001) Control of pseudohyphae formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microb Rev* 25: 107-123.

Gibbs PA, Seviour RJ, Schmid F (2000) Growth of filamentous fungi in submerged culture : problems and possible solutions. *Crit Rev Biotechnol* 20: 17-48.

Gilpatrick JD (1969) Role of ammonia in the control of avocado root rot with alfalfa meal soil amendment. *Phytopathol* 59: 973-978.

Gimeno CJ, Fink GR (1994) Induction of pseudohyphal growth by overexpression of *PHD1*, a *Saccharomyces cerevisiae* gene related to transcriptional regulators of fungal development. *Mol Cell Biol* 14: 2100-2112.

Gimeno CJ, Ljungdahl PO, Styles CA, Fink GR (1992) Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell* 68: 1077-1090.

Giobbe S, Marceddu S, Scherm B, Zara G, Mazzarello V, Budroni M, Migheli Q (2007) The strange case of a biofilm-forming strain of *Pichia fermentans* which controls *Monilinia* brown rot on apple but is pathogenic on peach fruit. *Fems Yeast Res* 7: 1389–1398.

Gow NAR, Brown AJP, Odds FC (2002) Fungal morphogenesis and host invasion. *Curr Opin Microbiol* 5: 366-371.

Gueldner RC, Reilly CC, Pusey RL, Costello CE, Arrendale RF, Cox RH, Himmelsbach DS, Crumley FG, Cutler HG (1988) Isolation and identification of iturins as antifungal peptides in biological control of peach brown rot with *Bacillus subtilis*. *J Agric Food Chem* 36: 366–370.

Guetsky R, ShtienbergD, EladY, Dinoor A (2001) Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control. *Phytopathol* 91: 621–27.

Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P (2004) Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2: 95–108.

Hammer BK, Bassler BL (2003) Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol* 50: 101–104.

Harvey JM (1978) Reduction of lesses in fresh market fruits and vegetables. Annu. Rev. *Phytopathol* 16: 321-341.

Hazelwood LA, Daran JM, Van Maris AJA, Pronk JT, Dickinson RJ (2008). The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Appl Environ Microbiol* 74: 2259–2266.

Heithoff D, Mahan M (2004) Vibrio cholerae biofilms: stuck between a rock and a hard place. *J Bacteriol* 186: 4835–4837.

Henry CS, Broadbelt LJ, Hatzimanikatis V (2007) Thermodynamics based metabolic flux analysis. *Biophys J* 92: 1792–1805.

Heungens K, Parke JL (2001) Postinfection biological control of oomycete pathogens of pea by Burkholderia cepacia AMMD. *Phytopathol* 91: 383–391.

Hinsa SM, Espinosa-Urgel M, Ramos JL, O'Toole GA (2003) Transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365 requires an ABC transporter and a large secreted protein. *Mol Microbiol* 49: 905–918.

Huang Y, Wild BL, Morris C (1992) Postharvest biological control of *Penicillium digitatum* decay on citrus fruit by *Bacillus pumilus*. *Ann Appl Biol* 120: 367–372.

Hube B, Naglik J (2001) *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiol* 147: 1997-2005.

Ippolito A, Nigro F, Romanazzi G, Campanella V (1998) Field application of *Aureobasidium pullulans* against *Botrytis* storage rot of strawberry. Bertolini P, Sijmons PC, Guerzoni ME, Serra F (1998) COST 914—COST 915 Joint Workshop—Non Conventional Methods for the Control of Postharvest Disease and Microbial Spoilage. Luxembourg: Publ. Eur. Community

Jamalizadeh M, Etebarian HR, Aminian H, Alizadeh A (2011) A review of mechanisms of action of biological control organisms against post-harvest fruit spoilage. Journal compilation 2011 OEPP/EPPO, Bulletin 41: 65–71.

Janisiewicz WJ (1996) Ecological diversity, niche overlap, and coexistence of antagonists used in developing mixtures for biocontrol of postharvest diseases of apples. *Phytopathol* 86: 473–479.

Janisiewicz WJ, Conway WS, Glenn DM, Sams CE (1998) Integrating biological control and calcium treatment for controlling postharvest decay of apples. *HortScience* 33: 105–109.

Janisiewicz WJ, Conway WS, Glenn DM, Sams CE (1998) Integrating biological control and calcium treatment for controlling postharvest decay of apples. *HortScience* 33: 105–109.

Janisiewicz WJ, Korsten L (2002) Control of postharvest diseases of vegetables by application of microbes. In *Postharvest Physiology of Vegetables*, ed. J Bredt, J Bartz, New York: Marcel Dekker, 543–562..

Janisiewicz WJ, Tworkoski TJ, Kurtzman CP (2001) Biocontrol potential of *Metschnikowia pulcherrima* against blue mold of apple. *Phytopathol* 91: 1098-1108.

Janisiewicz WJ, Yourman L, Roitman J, Mahoney N (1991) Postharvest control of blue mold and gray mold of apples and pears by dip treatments with pyrrolnitrin, a metabolite of *Pseudomonas cepacia*. *Plant Dis* 75: 490– 494.

Jones M, Pierce JS (1964) Absorption of amino acids from wort by yeasts. *J Inst Brew* 70: 307–315.

Kearns DB, Chu F, Branda SS, Kolter R, Losick R (2005) A master regulator for biofilm formation by *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 55: 739–749.

Klasson H, Fink GR, Ljungdahl PO (1999) Ssy1p and Ptr3p are plasma membrane components of a yeast system that senses extracellular amino acids. *Mol Cell Biol* 19: 5405-5416.

Klausen M, Heydorn A, Ragas P, Lambertsen L, Aaes-Jorgensen A, Molin S, Tolker-Nielsen T (2003b) Biofilm formation by Pseudomonas aeruginosa wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol Microbiol* 48: 1511–1524.

Korber DR, Wolfaardt GM, Brozel V, MacDonald R, Niepel T (1999) Reporter System for Microscopic Analysis of Microbial Biofilms in Methods in Enzymology. Ed Doyle RJ Vol 310: 3-20.

Kron SJ, Gow NA (1995) Budding yeast morphogenesis: signalling, cytoskeleton and cell cycle. *Curr Opin Cell Biol* 7: 845-855.

Lambrechts MG, Bauer FF, Marmur J, Pretorius IS (1996) Muc1, a mucin-like protein that is regulated by Mss10, is critical for pseudohyphal differentiation in yeast. *Proc Natl Acad Sci U SA* 93: 8419-8424.

Latasa C, Roux A, Toledo-Arana A, Ghigo J, Gamazo C, Penades J, Lasa I (2005) BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Mol Microbiol* 58: 1322–1339.

Leberer E, Ziegelbauer K, Schmidt A, Harcus D, Dignard D, Ash J (1997) Virulence and hyphal formation of *Candida albicans* require the Ste20p-like protein kinase CaCla4p. *Curr Biol* 7: 539-546.

Lee BN, Elion EA (1999) The MAPKKK Ste11 regulates vegetative growth through a kinase cascade of shared signalling components. *Pnas* 96: 12679-12684.

Lengeler KB, Davidson RC, D'Souza C, Harashima T, Shen WC, Wang P, Pan X, Waugh M., Heitman J (2000) Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 746-785.

Leverentz B, Janisiewicz WJ, Conway WS, Saftner RA (2001) Effect of combining biocontrol, heat treatment, and MCP treatment on the reduction of postharvest decay of 'Delicious' apples. *Phytopathol* 23: 221-233.

Leverentz B, Janisiewicz WJ, Conway WS, Saftner RA, Fuchs Y, Sams CE, Camp MJ (2000) Combining yeasts or a bacterial biocontrol agent and heat treatment to reduce postharvest decay of 'Gala' apples. *Postharvest Biol Technol 21:87–94.*

Lima G, Ippolito A, Nigro F, Salerno M (1997) Effectiveness of *Aureobasidium pullulans* and *Candida oleophila* against postharvest strawberry rots. *Postharvest Biol Technol* 10: 169–178.

Liu H, Styles CA, Fink GR (1996) *Saccharomyces cerevisiae* S288C has a mutation in *FLO8*, a gene required for filamentous growth of diploids. *Genetics* 144: 967-978.

Liu Z, Stirling F, Zhu J (2007) Temporal quorum-sensing induction regulates *Vibrio cholerae* biofilm architecture. *Infect Immun* 75: 122–126.

Lo HJ, Kohler JR, DiDomenico B, Loebenberg D, Cacciapuoti A, Fink GR (1997) Non filamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* 90: 939-949.

Long CA, Wu Z, Deng BX (2005) Biological control of *Penicillium italicum* of citrus and *Botrytis cinerea* of Grape by Strain 34-9 ok *Kloeckera apiculata*. *Eur Food Res Technol* 221: 197-201.

Lorenz MC, Cutler NS, Heitman J (2000a) Characterization of alcohol-induced filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 11: 183-199.

Lorenz MC, Heitman J (1998) The MEP2 ammonium permease regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 17: 1236-1247.

Lorenz MC, Heitman J (1998a) Regulators of pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae* identified through multicopy suppressor analysis in ammonium permease mutant strains. *Genetics* 150: 1443-1457.

Lorenz MC, Pan X, Harashima T, Cardenas ME, Xue Y, Hirsch JP, Heitman J (2000) The G protein-coupled receptor Gpr1 is a nutrient sensor that regulates

pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 154: 609-622.

Madhani HD, Fink GR (1997) Combinatorial control required for the specificity of yeast MAPK signaling. *Science* 275: 1314-1317.

Madhani HD, Fink GR (1998) The control of filamentous differentiation and virulence in fungi. *Trends Cell Biol* 8:3 48-353.

Mah TF, Pitts B, Pellock B, Walker GC, Stewart PS, O'Toole GA (2003) A genetic basis for Pseudomonas aeruginosa biofilm antibiotic resistance. *Nature* 426: 306–310.

Maidan MM, Thevelein JM, Van Dijck P (2005) Carbon source induced yeast-to-hypha transition in *Candida albicans* is dependent on the presence of amino acids and on the G-protein-coupled receptor Gpr1. *Biochem SocTrans* 33: 291-293.

Manzanera M, de Castro AG, Tondervik A, Rayner-Brandes M, Strom AR, Tunnacliffe A (2002) Hydroxyectoine is superior to trehalose for anhydrobiotic engineering of *Pseudomonas putida* KT2440. *Appl Environ Microbiol* 68: 4328–4333.

Manzanera M, Vilchez S, Tunnacliffe A (2004) High survival and stability rates of *Escherichia coli* dried in hydroxyectoine. *FEMS Microbiol Lett* 233: 347–352.

Marini AM, Soussi-Boudekou S, Vissers S, Andre B (1997) A family of ammonium transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 17: 4282-4293.

Matteson Heidenreich MC, Corral-Garcia MR, Momol EA, Burr TJ (1997) Russet of apple fruit caused by *Aureobasidium pullulans* and *Rhodotorula glutinis*. *Plant Dis*. 81: 339–342.

Matz C, McDougald D, Moreno AM, Yung PY, Yildiz FH, Kjelleberg S (2005) Biofilm formation and phenotypic variation enhance predation-driven persistence of *Vibrio cholerae*. *P Natl Acad Sci USA* 102: 16819–16824.

McFadden DC, Casadevall A (2001) Capsule and melanin synthesis in *Cryptococcus neoformans*. *Med Mycol* 39: 19-30.

McLaughlin RJ, Wisniewski ME, Wilson CL, Chalutz E (1990) Effect of inoculum concentration and salt solutions on biological control of postharvest diseases of apple with *Candida* sp. *Phytopathol* 80: 456–461.

Meibom KL, Li XB, Nielsen AT, Wu CY, Roseman S, Schoolnik GK (2004) The *Vibrio cholerae* chitin utilization program. *P Natl Acad Sci USA* 101: 2524–2529.

Melin P, Hakansson S, Eberhard TH, Schnurer J (2006) Survival of the biocontrol yeast *Pichia anomala* after long-term storage in liquid formulations and different temperature, assessed by flow cytometry. *J Appl Microbiol* 100: 264-271.

Melin P, Sundh I, Hakansson S, Schnurer J (2007) Biological preservation of plant derived animal feed with antifungal organisms: safety and formulation aspects. *Biotechnol Lett* 298: 1147–1154.

Molero G, Díez-Orejas R, Navarro-García F, Monteoliva L, Pla J, Gil C, Sánchez-Pérez M, Nombela C (1998) *Candida albicans*: genetics, dimorphism and pathogenicity. *Internat Microbiol* 1: 95–106.

Money NP (2001) Biomechanics of invasive hyphal growth. In *The Mycota VIII*. Edited by Howard RJ, Gow NA: Berlin, Springer-Verlag, 3-17.

Morales H, Sanchis V, Usall J, Ramos AJ, Marín S (2007*)* Effect of biocontrol agents *Candida sake* and *Pantoea agglomerans* on *Penicillium expansum* growth and patulin accumulation in apples. *Int J Food Microbiol* 122: 61–67.

Mosch HU, Kubler E, Krappmann S, Fink GR, Braus GH (1999) Crosstalk between the Ras2p-controlled mitogen-activated protein kinase and cAMP pathways during invasive growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 10: 1325-1335.

Nadal M, García-Pedrajas MD, Gold SE (2008) Dimorphism in fungal plant pathogens*. FEMS Microbiol Lett* 284: 127–134.

Nadell CD, Xavier JB, Foster KV (2009) The socio-biology of biofilms. *FEMS Microbiol Rev* 1–19

Nigro F, Finetti Sialer MM, Gallitelli D (1999) Transformation of *Metschnikowia Pulcherrima* 320, Biocontrol Agent Of Storage Rot, with the Green Fluorescent Protein Gene. *J Plant Pathol* 81: 205-208.

Niimi M (1996) Dibutyryl cyclic AMP-enhanced germ tube formation in exponential growing *Candida albicans* cells. *Fungal Genet Biol* 20: 79-83.

Northover J, Zhou T (2002) Control of rhizopus rot of peaches with postharvest treatments of tebuconazole, fludioxonil, and *Pseudomonas syringae*. *Can J Plant Pathol* 24: 144– 153.

O'Toole GA, Kolter R (1998) Flagellar and twitching motility are necessary for Pseudomonas aeruginosa biofilm development. *Mol Micro*biol 30: 295–304.

Obst U, Schwartz T, Volkmann H (2006) Antibiotic resistant pathogenic bacteria and their resistance genes in bacterial biofilms. *Int J Artif Organs* 29: 387–394.

Ortu G, Demontis MA, Budroni M, Goyard S, d'Enfert C, Migheli Q (2005) Study of biofilm formation in *Candida albicans* may help understanding the biocontrol capability of a *flor* strain of *Saccharomyces cerevisiae* against the phytopathogenic fungus *Penicillium expansum*. *J Plant Pathol* 87: 300.

Palecek SP, Parikh AS, Kron SJ (2000) Genetic analysis reveals that *FLO11* upregulation and cell polarization independently regulate invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 156: 1005-1023.

Palecek SP, Parikh AS, Kron SJ (2002) Genetic analysis reveals that *FLO11* upregulation and cell polarization independently regulate invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 156: 1005-1023.

Palkova Z, Forstova J (2000) Yeast colonies synchronise their growht and development. *J Cell Sci* 113: 1023-1928.

Palkova Z, Janderova B, Gabriel J, Zikanova B, Pospisek M, Forstova J (1997) Ammonia mediates communication between yeast colonies. *Nature* 390: 532–536.

Palkova Z, Vachova L (2006) Life within a community: benefit to yeast long-term survival. *FEMS Microbiol Rev* 30: 806–824.

Pan X, Heitman J (1999) Cyclic AMP-dependent protein kinase regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 19: 4874-4887.

Pfaller MA (1996) Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs and modes of transmission. *Clin Infect Dis* 22 : 89-94.

Pfammatter N, Guadalupe AA, Luisi PL (1989) Solubilization and activity of yeast cells in water-in-oil microemulsion. *Biochem Biophys Research Com* 161: 1244–1251.

Piano S, Cerchio F, Migheli Q, Gullino ML (1998) Effetto di diverse sostanze sull'attività dell'antagonista *Metschnikowia pulcherrima* 4.4 contro *Botrytis cinerea* e sulla sua sopravvivenza sulle mele. Atti Giorn. Fitopatol. 3 –7 maggio, 495–500.

Piano S, Neyrotti V, Migheli Q e Gullino ML (1997) Biocontrol capability of *Metschnikowia pulcherrima* against Botrytis postharvest rot of apple. *Postharvest Biol Tec* 11: 131-140.

Piano S, Neyrotti V, Migheli Q, Gullino ML (1997) Characterization of the biocontrol capability of *Metschnikowia pulcherrima* against *Botrytis* postharvest rot of apple. *Postharvest Biol Tec* 11: 131– 140.

Posas F, Takekawa M, Saito H (1998) Signal transduction by MAP kinase cascades in budding yeast. *Curr Opin Microbiol* 1: 175-182.

Pratt LA, Kolter R (1998) Genetic analysis of Escherichia coli biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol* 30: 285–293.

Prusty R, Grisafi P, Fink GR (2004) The plant hormone indolacetic acid induces invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Pnas* 12: 4153-4157.

Pusey PL (1991) Antibiosis as mode of action in postharvest biological control. Wilson CL, Chalutz E, eds. 1991. *Biological Control of Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables,Workshop Proc*. Washington, DC: US GPO 127-141.

Pusey PL (1994) Enhancement of biocontrol agents for postharvest diseases and their integration with other control strategies. In: Wilson CL, Wisniewski ME (Eds.), Biological Control of Postharvest Diseases. Theory and Practice. CRC Press, BocaRaton, WV, USA, 77–88.

Pusey PL, Wilson CL (1984) Postharvest biological control of stone fruit brownrot by *Bacillus subtilis*. *Plant Dis* 68753–56.

Pusey PL, Wilson CL, Hotchkiss MW, Franklin JD (1986) Compatibility of *Bacillus subtilis* for postharvest control of peach brown with commercial fruit waxes, dicloran and coldstorage conditions. *Plant Dis* 70: 622– 626.

Qing F, Shiping T (2000) Postharvest biological control of rhizopus rot of nectarine fruits by *Pichia membranefaciens*. *Plant Dis* 84: 1212–1216.

Reynolds TB, Fink GR (2001) Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science* 291: 878–881.

Rist DL, Rosenberger DA (1995) A storage decay of apple fruit caused by *Aureobasidium pullulans*. *Plant Dis* 79: 425-431.

Roberts RL, Fink GR (1994) Elements of a single MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: mating and invasive growth. *Genes* & *Dev* 8: 2974–2985.

Roberts RL, Mosch H, Fink GR (1997) 14-3-3 proteins are essential for RAS/MAPK cascade signaling during pseudohyphal development in *S. cerevisiae*. *Cell* 89: 1055-1065.

Rolland F, De Winde JH, Lemaire K, Boles E, Thevelein JM, Winderickx J (2000) Glucose-induced cAMP signalling in yeast requires both a G-protein coupled receptor system for extracellular glucose detection and a separable hexose kinasedependentsensing process. *Mol Microbiol* 38: 348-358.

Romano ML, Gullino ML, Garibaldi A (1983) Evaluation of the sensitivity to several fungicides of post-harvest pathogens in North-western Italy. Meded. Fac. Landbouwwet. *Gent* 48: 591-602.

Rua D, Tobe BT, Kron SJ (2001) Cell cycle control of yeast filamentous growth. *Curr Opin Microbiol* 4: 720-727.

Russell M, Bradshaw-Rouse J, Markwardt D, Heideman W (1993) Changes in gene expression in the Ras-adenylate cyclise system of *Saccharomyces cerevisiae* : correlation with cAMP levels and growth arrest. *Mol Biol Cell* 4: 757-765.

Ryley JF, Ryley NG (1990) *Candida albicans* do mycelia matter?. *J Med Vet Mycol* 28: 225-239.

Sakuragi Y, Kolter R (2007) Quorum-sensing regulation of the biofilm matrix genes (pel) of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 189: 5383–5386.

Sanchez-Martinez C, Perez-Martin J (2001) Dimorphism in fungal pathogens: *Candida albicans* and *Ustilago maydis* - similar inputs, different outputs. *Curr Opin Microbiol* 4: 214-221.

Sanglard D, Odds FC (2002) Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet* 2: 73-84.

Saravanakumar D, Ciavorella A, Spadaro D, Garibaldi A, Gullino ML (2008) *Metschnikowia pulcherrima* strain MACH1 outcompetes *Botrytis cine*rea, *Alternaria alternata* and *Penicillium expansum* in apples through iron depletion. *Postharvest Bioland Tec* 49: 121–128.

Saravanakumar D, Spadaro D, Garibaldi A, Gullino ML (2009) Detection of enzymatic activity and partial sequence of a chitinase in *Metschnikowia pulcherrima* strain MACH1 used as postharvest biocontrol agent. *Eur J Plant Pathol* 123: 183–193.

Saravanakumar D, Vijayakumar C, Kumar N, Samiyappan R (2007) PGPR-induced defense responses in the tea plant against blister blight disease. *Crop Prot* 26: 556–565.

Scherm B, Ortu G, Muzzu A, Budroni M, Arras G, Migheli Q (2003) Biocontrol activity of antagonistic yeasts against *Penicillium expansum* on apple. *J Plant Pathol* 85: 205–213.

Scherm B, Ortu G, Muzzu A, Budroni M, Arras G, Migheli Q (2003) Biocontrol activity of antagonistic yeasts against *Penicillium expansum* on apple. *J Plant Pathol* 85: 205–213.

Schisler DA, Slininger PJ, Bothast RJ (1997) Effects of antagonist cell concentration and two-strain mixtures on biological control of *Fusarium* dry rot of potatoes. *Phytopathol* 87:177–83.

Schuster M, Greenberg EP (2006) A network of networks: quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa. Int J Med Microbiol* 296: 73–81.

Sharma RR, Singh D, Singh R (2009) Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: a review. *Biol Control* 50: 205–221.

Shepherd MG (1985) Pathogenicity of morphological and auxotrophic mutants of *Candida albicans* in experimental infections. *Infect Immun* 50: 541-544.

Slininger PJ, Jackson MA (1991) Nutritional factors regulating growth and accumulation of phenazine 1-carboxylic acid by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *Appl Microbiol Biotechnol* 37: 388–392.

Slininger PJ, Jackson MA (1999) Nutritional factors regulating growth and accumulation of phenazine I-carboxylic acid by *Pseudomonas fluorescens 2-79. Appl Microbiol Biotechnol* 37: 388-392.

Smith D, Metzgar D, Wills C, Fierer J (2002) Fatal *Saccharomyces cerevisiae* aortic graft infection. *J Clin Microbiol* 40: 2691-2692.

Smolka S (1992) Methods for in vitro assessment of pesticide effects on microorganisms of the phyllosphere. *Nachrichtenbl Dtsch Pflanzenschutzdienst* 44: 252–64.

Sobel JD, Muller G, Buckley HR (1984) Critical role of germ tube formation in the pathogenesis of Candidal vaginitis. *Infect Immun* 44: 576-580.

Sonneborn A, Bockmuhl DP, Gerads M, Kurpanek K, Sanglard D, Ernst JF (2000) Protein kinase A encoded by *TPK2* regulates dimorphism of *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 35: 386-396.

Spadaro D, Ciavorella A, Dianpeng Z, Garibaldi AML (2010) Effect of culture media and pH on the biomass production and biocontrol efficacy of a *Metschnikowia pulcherrima* strain to be used as a biofungicide for postharvest disease control. *Can J Microbiol* 56: 128– 137.

Spadaro D, Gullino ML (2003) State of the art and future prospects of biological control of post-harvest fruit diseases. *Int J Food Microbiol* 24: 1–10.

Spadaro D, Piano S, Duverney C, Gullino ML (2002b) Use of microorganisms, heat treatment, and natural compounds against *Botrytis* rot on apple. Proc. 2nd International Conference on the Alternative Control Methods Against Plant Pests

and Diseases, Lille, France, 4 – 7 March 2002. Ed. AFPP, Paris,France, pp. 446–453. sulle mele. Atti Giorn. Fitopatol. 3 –7 maggio, 495–500

Spadaro D, Vola R, Piano S, Gullino ML (2002a) Mechanisms of action and efficacy of four isolates of the yeast *Metschnikowia pulcherrima* active against postharvest pathogens on apples. *Postharvest Biol Technol* 24: 123– 134.

Spotts RA, Cervantes LA (1986) Population, pathogenicity, and benomyl resistance of *Botrytis* spp., *Penicillium* spp., and *Mucor piriformis* in packinghouses. *Plant Dis* 70: 106-108.

Stoldt VR, Sonneborn A, Leuker C, Ernst JF (1997) Efg1, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen *Candida albicans*, is a member of a conserved class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi. *EMBO J*, 16: 1982-1991.

Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW (2002) Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* 56: 187–209.

Sudbery P, Gow N, Berman J (2004) The distinct morphogenic states of *Candida albicans Trends in Microbiol* 12: 317-324.

Sudbery P, Gow N, Berman J (2004) The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 12: 317–324.

Tamaki H, Miwa T, Shinozaki M, Saito M, Yun CW, Yamamoto K, Kumagai H (2000) *GPR1* Regulates Filamentous Growth through *FLO11* in Yeast *Saccharomyces cerevisiae. Biochem Biophys Res Commun* 267: 164-168.

Teixido N, Usall J, Palou L, Asensio A, Nunes C, Vinas I (2001) Improving control of green and blue molds of oranges by combining *Pantoea agglomerans* (CPA-2) and sodium bicarbonate. *Eur J Plant Pathol* 107: 685–694.

Telgmann U, Horn H, Morgenroth E (2004) Influence of growth history on sloughing and erosion from biofilms. *Water Res* 38: 3671–3684.

Tjamos C, Papavizas GC, Cook RJ (1992) *Biological Control of Plant Diseases: Progress and Challenges for the Future.* Adv. Res. Works. New York:Plenum

Usall J, Teixido N, Fons E,Vinas I (2000) Biological control of blue mould on apple by a strain of *Candida sake* under several controlled atmosphere conditions. *Int J Food Microbiol* 58: 83–92.

Van Leeuwen GCM, Baayen RP, Holb IJ, Jeger MJ (2002) Distinction of the asiatic brown rot fungus *Monilia polystroma* sp. nov. from *M. fructigena*. *Mycol Res* 106: 444-451.

Vicedo B, Penalver R, Asins MJ, Lopez M (1993) Biological Control of *Agrobacterium tumefaciens*, Colonization, and pAgK84 Transfer with *Agrobacterium radiobacter* K48 and the Tra$^-$ Mutant Strain K1026. *Appl Environl Microbiol* 59: 309-315.

Vinas I, Usall J, Teixido N, Sanchis V (1998) Biological control of major postharvest pathogens on apple with *Candida sake*. Int J Food Microbiol 40: 9–16.

Vopàlenskà I, Stovicek V, Janderova B, Vàchovà L, Palkova Z (2010) Role of distinct dimorphic transitions in territory colonizing and formation of yeast colony architecture. *Env Microbiol* 12: 264-277.

Ward MP, Gimeno CJ, Fink GR, Garret S (1995) *SOK2* may regulate cyclic AMP-dependent protein kinase-stimulated growth and pseudohyphal development by repressing transcription. *Mol Cell Biol* 15: 6854-6863.

Waters CM, Bassler BL (2005) Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev* Bi 21: 319–346.

Wilkinson BM, Critchley AJ, Stirling CJ (1996) Determination of the transmembrane topology of yeast Sec61p; an essential component of the ER translocation complex. *J Biol Chem* 271: 25590–25597.

Wilson C, Pusey PL (1985) Potential for biological control of postharvest plant diseases. *Plant Dis* 69: 375–78.

Wilson CL, Wisniewski M (1994) Biological Control of Postharvest Diseases. Theory and Practice. CRC Press, Boca Raton, USA.

Wisniewski M, Biles C, Droby S, Mc- Laughlin R, Wilson C, Chalutz E (1991) Mode of action of the postharvest biocontrol yeast, *Pichia guilliermondii* I.

Characterization of attachment to *Botrytis cinerea. Physiol Mol Plant Pathol* 39: 245–58.

Wisniewski M, Wilson CL, Hershberger W (1989) Characterization of inhibition of *Rhizopus stolonifer* germination and growth by *Enterobacter cloacae*. *Plant Disease* 81: 204–210.

Xue Y, Batlle M, Hirsch JP (1998) *GPR1* encodes a putative G protein-coupled receptor that associates with the Gpa2p Gα subunit and functions in a Ras-independent pathway. *EMBO J* 17: 1996–2007.

Yu T, Zhang H, Li X, Zheng X (2008) Biocontrol of *Botrytis cinerea* in apple fruit by *Cryptococcus laurentii* and indole-3-acetic acid. *Biological Control* 46: 171-177.

Yun CW, Tamaki H, Nakayama R, Yamamoto K, Kumagai H (1998) Gpr1p, a putative G-protein coupled receptor, regulates glucose-dependent cellular cAMP level in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* 252: 29-33.

Zahavi T, Cohen L, Weiss B, Schena L, Daus A, Kaplunov T, Zutkhi J, Ben-Arie R, Droby S (2000) Biological control of *Botrytis*, *Aspergillu*s and *Rhizopus* rots on table and wine grapes in Israel. *Postharvest Biol Technol* 20: 115– 124.

Zaragoza O, Gancedo JM (2000) Pseudohyphal growth is induced in *Saccharomyces cerevisiae* by a combination of stress and cAMP signaling. *Antonie van Leeuwenhoek* 78: 187–194.

Zhou T, Northover J, Schneider KE (1999) Biological control of postharvest diseases of peach with phyllosphere isolates of *Pseudomonas syringae*. *Can J Plant Pathol* 21: 375-381.

2. Scopo del lavoro

Pichia fermentans DISAABA 726 rappresenta il primo caso riportato in letteratura di un lievito che, se utilizzato in post-raccolta, agisce come antagonista di fitopatogeni o come patogeno distruttivo a seconda del frutto sul quale viene inoculato. Infatti, pur essendo in grado di contenere *Monilinia fructicola* su mela (cv Golden Delicious e Renetta), manifesta un comportamento patogeno su pesca (cv Springcrest) e pesca-noce (cv Big top) (Giobbe et al., 2007). Le due azioni, antagonista e patogena, sono mediate dalla formazione di biofilm sulla superficie dei frutti. Tuttavia mentre su mela il biofilm è costituito da cellule lievitiformi, su pesca prevalgono le pseudoife. *Pichia fermentans* DISAABA 726 costituisce quindi un modello biologico per lo studio dei fattori che determinano la transizione dal fenotipo antagonista a quello patogeno.

In tale contesto, nell'ambito di un progetto che mira a comprendere se la transizione dimorfica sia da considerare un fattore di rischio associato all'utilizzo di antagonisti microbici in post-raccolta, la presente tesi aveva il duplice scopo di: i) individuare i fattori nutrizionali in grado di indurre e separare la morfologia lievitiforme da quella pseudoifale; ii) isolare i geni coinvolti nella transizione lievito/pseudoifa in *P. fermentans* e valutare se la patogenicità mostrata da questo lievito è sempre associata alla crescita pseudoifale.

La ricerca è stata finanizata dal Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca, Progetto di Ricerca di Interesse Nazionale, anno 2007-Prot. 2007FRBK9N.

2. Ricerca di fattori nutrizionali in grado di indurre e separare la morfologia lievitiforme da quella pseudoifale

Riassunto

Con l'obiettivo di individuare i fattori nutrizionali in grado di indurre e separare la morfologia pseudoifale da quella lievitiforme, in condizioni controllate di laboratorio, è stato condotto uno studio sulle fonti di carbonio e azoto in grado di provocare la transizione dimorfica in *P. fermentans* DiSAABA 726. I risultati ottenuti mostrano che per quanto la maggior parte delle fonti carboniose e azotate saggiate risulti in una morfologia mista, costituita da pseudoife e cellule lievitiformi, alcune fonti azotate sono in grado di indurre cambiamenti reversibili nella morfologia di *P. fermentans* DiSAABA 726. In particolare, questo lievito produce cellule lievitiformi su terreni contenenti concentrazioni mM di urea e di diammonio fosfato, e pseudoife in presenza di concentrazioni µM dei due sali. L'ammonio solfato induce la morfologia pseudoifale o lievitiforme a seconda sia della concentrazione sia del pH del terreno di coltura, mentre aminoacidi come la metionina, valina e fenilalanina inducono la morfologia pseudoifale, indipendentemente dalla loro concentrazione e dal pH del mezzo di coltura. Per quanto riguarda gli alcoli superiori, noti induttori della transizione dimorfica, si è osservato che metionolo, 1-butanolo, isopropanolo e isobutanolo inducono la crescita pseudoifale, mentre feniletanolo e alcool isoamilico non inducono la filamentazione. Sulla base dei risultati ottenuti si può dedurre che la morfogenesi di DiSAABA 726 dipende più dal tipo di fonte azotata che dalla concentrazione di azoto ed è regolata da molecole quorum sensing prodotte dalla assimilazione degli aminoacidi in carenza di azoto.

2.1 Introduzione

Numerosi funghi tra i quali *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Ustilago maydis*, *Pichia fermentans, Schizosaccharomyces japonicus*, *Yarrowia lypolitica*, transitano da una morfologia lievitiforme a una pseudoifale o ifale in risposta a stimoli nutrizionali e ambientali (Madhani & Fink, 1998; Sipiczki et al., 1998; Dominguez, 2000; Sánchez-Martínez & Pérez-Martín 2001). Nel caso della morfologia lievitiforme, cellule singole si dividono per gemmazione o scissione e producono cellule figlie indipendenti, dotate quindi di sviluppo planctonico. Nel caso della morfologia pseudoifale le cellule figlie rimangono fisicamente attaccate alle cellule madri, assumono una forma allungata e producono catene ramificate di cellule separate da setti. La morfologia ifale invece è caratterizzata da cellule allungate prive di setti. Le pseudoife e le ife penetrano facilmente la superficie sulla quale crescono e la loro produzione permette l'esplorazione di nuovi ambienti e conferisce ai lieviti un vantaggio selettivo poiché facilita la ricerca di nutrienti e l'allontanamento da sostanze tossiche o da condizioni colturali inidonee. Lo sviluppo pseudoifale o ifale è associato al comportamento patogeno di alcuni funghi (Saville et al., 2003; Whiteway & Oberholzer, 2004). Per questa ragione, i fattori nutrizionali e ambientali che inducono la crescita ifale/pseudoifale sono stati ampiamente studiati in diversi modelli fungini tra i quali *S. cerevisiae* e *C. albicans*. I risultati ottenuti da diversi autori indicano che entrambi i microrganismi cambiano morfologia, principalmente in risposta alla carenza di fonti azotate (Gimeno et al., 1992; Wickes et al., 1996; Csank & Haynes 2000; Biswas & Morschhauser 2005). E' inoltre stato ampiamente descritto il coinvolgimento dell'ammonio e degli amminoacidi durante la crescita ifale in *S. cerevisiae* e in *C. albicans* (Lorenz & Heitman, 1998; Klasson et al., 1999; Pan et al., 2000; Biswas & Morschhauser, 2005). In particolare, in *S. cerevisiae,* si è osservato che, in carenza di ammonio, l'ammonio permeasi MEP2p è coinvolta nella trasduzione del segnale che induce la transizione dimorfica (Lorenz & Heitman, 1998). Analogamente, in *C. albicans* CaMep2p induce la filamentazione in risposta a carenza di ammonio e amminoacidi (Biswas & Morschhauser, 2005).

Tuttavia, anche la carenza di fonti carboniose, i cambiamenti di pH, di temperatura e la produzione di molecole *quorum sensing* tra le quali gli alcoli superiori, inducono la transizione dimorfica (Dickinson, 1994; Dickinson, 1996; Lorenz et al., 2000; Maidan et al., 2005; Chen & Fink, 2006).

Nonostante la numerosità e la varietà dei segnali che stimolano lo sviluppo pseudoifale, le vie di trasduzione del segnale coinvolte nella transizione dimorfica sono ben conservate anche tra funghi filogeneticamente molto lontani (Madhani & Fink, 1998; Sudbery et al., 2004). In particolare le vie di trasduzione del segnale MAPK e cAMP-PKA sono coinvolte nell'induzione della crescita ifale sia in *C. albicans* sia in *S. cerevisiae* e, in *S. cerevisiae* il target finale delle due vie di trasduzione del segnale è il gene *FLO*11 (Lo & Dranginis, 1998; Rupp et al., 1999).

Giobbe et al., (2007) hanno dimostrato che anche il lievito filmogeno *Pichia fermentans* DiSAABA 726 è soggetto a transizione dimorfica e hanno ipotizzato che la morfologia pseudoifale sia associata al comportamento patogeno di questo lievito su pesca. Con lo scopo di contribuire a delucidare i meccanismi coinvolti nella transizione dimorfica di *P. fermentans*, è stato condotto uno studio sui fattori nutrizionali che in condizioni controllate di laboratorio sono in grado di indurre e separare la morfologia pseudoifale da quella lievitiforme.

2. 2 Materiali e metodi

2.2.1 Ceppi e condizioni colturali

P. fermentans DiSAABA 726 (DBVPG3627) è stato conservato a breve termine in YEPD (2% glucosio, 2% peptone, 1% estratto di lievito, 2% agar) a 4°C e a lungo termine in YEPDGLY (YEPD+ 20% glicerolo) at 80°C. Altri terreni colturali utilizzati sono YNB (0.67% Yeast Nitrogen Base (Difco) addizionato di 0.5, 2 e 5% di glucosio e di fruttosio), SLAD (0.2% Yeast nitrogen Base w/o amminoacidi e ammonio solfato, 50 µM ammonio solfato, 2% glucosio) e YCB (1,17% Yeast Carbon Base addizionato di urea, diammonio fosfato, ammonio solfato oppure

amminoacidi nelle quantità indicate nel testo, come sola fonte azotata). Tutti i terreni colturali sono stati addizionati di agar al 2% se non differentemente specificato. Metionolo, isobutanolo, alcool isoamilico, isopropanolo, 1-butanolo sono stati addizionati a YEPD, YCBU e SLAD alle concentrazioni indicate. Quando richiesto, il pH dei terreni a base di YCB addizionati di metionina, urea, ammonio solfato e diammonio fosfato è stato tamponato utilizzando un tampone citrato (0,1 M acido citrico, 0,1M sodio citrato, pH 6).

DiSAABA 726 è stato precoltivato overnight a 25° C in YEPD in agitazione (180 r.p.m.). Le cellule sono state lavate in acqua distillata sterile, inoculate su terreno solido (5×10^6 cellule) o su terreno liquido in micro piastre (Iwaki, codice 3820-024) (5×10^6 cell ml^{-1}) e incubate in statico a 25°C.

2.2.2 Isolamento di singole cellule lievitiformi e pseudoifali

Cellule singole lievitiformi e singole pseudoife sono state separate utilizzando il micromanipolatore MSM (Singer Instruments Co. Ltd, Somerset, UK), coltivate su YCBU e YCBM, incubate a 25°C e osservate per 3 giorni.

2.2.3 Analisi di immagine

Le cellule sono state osservate con un microscopio Olympus BX61 equipaggiato con una fotocamera XM10 con ingrandimenti. Almeno 500 cellule di tre colture indipendenti per ciascuna condizione di crescita sono state osservate e fotografate con ingrandimento 20X e 100X.

2.3 Risultati

2.3.1 La morfologia in *P. fermentans* DiSAABA 726 è condizionata dalla fonte azotata disponibile

Con lo scopo di individuare i fattori nutrizionali che inducono la transizione dimorfica in *P. fermentans,* DiSAABA 726 è stato coltivato su una varietà di terreni colturali che differiscono per le fonti carboniose e azotate. In particolare, i terreni utilizzati sono YEPD, un terreno colturale ricco che contiene nutrienti complessi quali estratto di lievito e peptone; SLAD, un terreno sintetico povero contenente glucosio e ammonio solfato in concentrazione pari a 50 µM; YNB contenente 37 mM di ammonio solfato e addizionato di glucosio o fruttosio; YCB, addizionato di diammonio fosfato, ammonio solfato, urea e amminoacidi come sola fonte di azoto.

Sulla maggior parte di questi terreni colturali (tutti i terreni a base di YNB e quelli a base di YCB addizionati di alanina, glicina, isoleucina, istidina, treonina, arginina, asparagina, prolina, trans-prolina) *P. fermentans* DiSAABA 726 mostrava una morfologia mista costituita da pseudoife e cellule lievitiformi (Tabella 1). Solo pochi terreni, tra quelli testati, permettevano la separazione delle due morfologie. In particolare, su YEPD, YCB urea (YCBU) e YCB diammonio fosfato (YCBphos) DiSAABA 726 produceva principalmente cellule lievitiformi (Figura 1). Su SLAD e YCB addizionati di ammonio solfato (YCBsulph), metionina (YCBM), fenilalanina (YCBP) e valina (YCBV) DiSAABA 726 cresceva con morfologia pseudoifale (Figura 1). Quindi, in accordo con quanto osservato per altri lieviti, *P. fermentans* DiSAABA 726 produceva principalmente cellule lievitiformi su terreni contenenti fonti azotate prontamente assimilabili, come l'estratto di lievito e il peptone, l'urea e il diammonio fosfato, e pseudoife su terreni contenenti ammonio solfato (SLAD, YCBsulph) e alcuni amminoacidi (Gimeno et al., 1992; Wickes et al., 1996; Csank & Haynes, 2000; Biswas & Morschhauser, 2005).

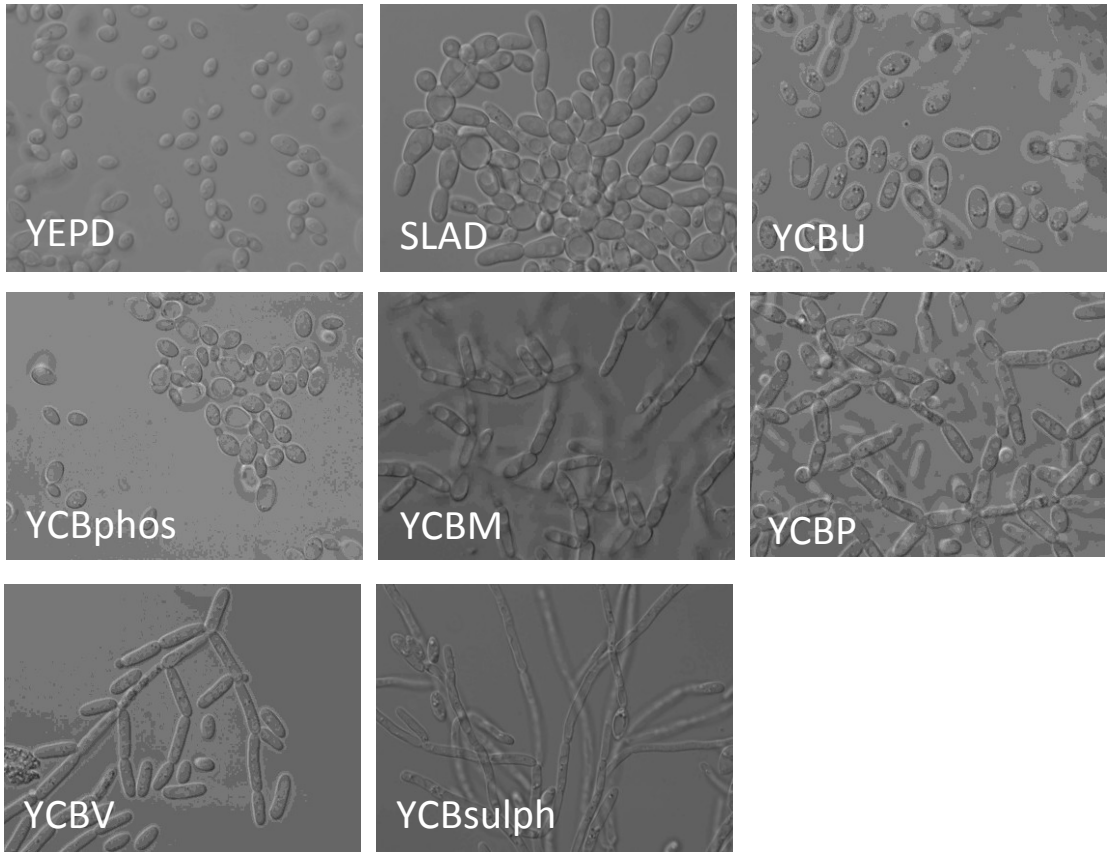
Per valutare se la concentrazione, al pari della natura, della fonte azotata fosse coinvolta nella morfogenesi di *P. fermentans*, DiSAABA 726 è stato coltivato su terreni a base di YCB contenenti concentrazioni crescenti di fonti azotate in grado di stimolare la crescita pseudoifale (ammonio solfato, metionina, valina e

fenilalanina) o lievitiforme (diammonio fosfato e urea). Le concentrazioni scelte erano: 50 µM, corrispondente alla concentrazione del solfato di ammonio nello SLAD, e 13,5 mM e 37 mM corrispondenti approssimativamente alla media delle molarità che gli aminoacidi e l'ammonio solfato avevano nei terreni colturali nei quali venivano aggiunti alle concentrazioni di 0,2% e 0,5%, rispettivamente. Su YCB contenente 50 µM di ciascuna delle fonti azotate saggiate *P. fermentans* DiSAABA 726 cresceva con morfologia pseudoifale. Su YCB addizionato di ammonio solfato, metionina, fenilalanina e valina la crescita pseudoifale persisteva anche a concentrazioni più elevate (13,5 mM e 37 mM).

Tabella 1. Morfologia di *P. fermentans* DiSAABA 726 su differenti terreni colturali.

Terreno colturale	**Supplemento**	**Morfologia cellulare**
YEPD	-	Cellule lievitiformi e pseudoife
SLAD	-	Pseudoife
YNB[a]	Glucosio: 0.5%, 2.0%	Cellule lievitiformi e pseudoife
	Fruttosio: 0.5%, 2.0%	Cellule lievitiformi e pseudoife
YCB[b]	Urea: 0.2%, 0.5%	Cellule lievitiformi
	Diammonio fosfato: 0.2%, 0.5%	Cellule lievitiformi
	Ammonio solfato: 0.2%, 0.5%	Pseudoife
	Alanina, arginina, asparagina, glicina; isoleucina, istidina, treonina, serina, lisina: 0.2%, 0.5%	Cellule lievitiformi e pseudoife
	Metionina, valina, fenilalanina: 0.2%, 0.5%	Pseudoife

[a]YNB contiene 0.5% ammonio solfato
[b]YCB contiene 1% glucosio



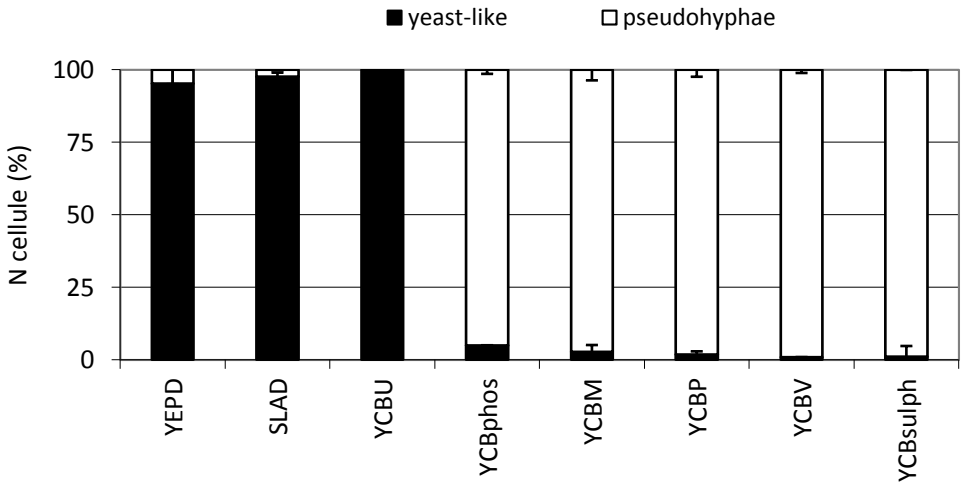


Figura 1. **Morfologia di *P. fermentans* DiSAABA 726 su terreni colturali contenenti differenti fonti azotate**. 5×10^6 cellule precoltivate su YEPD sono state inoculate sulla superficie del terreno solido, incubate a 25°C e osservate dopo 3 giorni. L'istogramma mostra la percentuale di cellule lievitiformi e di pseudoife per ciascun terreno colturale. I dati sono relativi ad almeno tre replicati biologici indipendenti.

Al contrario, una maggiore disponibilità di diammonio fosfato e urea inibiva la formazione di pseudoife e stimolava la morfologia lievitiforme (Figura 2). Sulla base di questi risultati si è ipotizzato che l' effetto esercitato dalle diverse fonti azotate sulla morfologia cellulare fosse concentrazione-dipendente nel caso del diammonio fosfato e dell'urea e concentrazione-indipendente nel caso di ammonio solfato, metionina, fenilalanina e valina. Tuttavia, è da considerare che terreni colturali addizionati di quantità equimolari delle diverse fonti azotate contengono concentrazioni differenti del macronutriente N (Tabella 2).

In particolare, la quantità di N contenuta in YCBphos e YCBU 37 mM è decisamente più alta di quella contenuta in YCBM, YCBP e YCBV 37 mM. Si è quindi ipotizzato che la morfologia lievitiforme osservata su YCBphos e YCBU potesse essere dovuta ad una maggiore concentrazione del macronutriente N fornita da queste fonti azotate e non alla loro natura. Tale ipotesi sembrava contrastare con la morfologia assunta da *P. fermentans* DiSAABA 726 su YCBsulph 37 mM che contiene la stessa quantità di azoto del YCBphos 37 mM. Ciò nonostante si è deciso di somministrare a *P. fermentans* DiSAABA 726 le diverse fonti azotate in concentrazione tale da fornire quantità equimolari del macronutriente N e valutarne l'effetto sulla morfologia cellulare. Considerato che il terreno colturale YCBphos 37 mM contiene 7,8 mM del macronutriente N e che questa quantità è sufficiente per indurre la crescita lievitiforme, *P. fermentans* DiSAABA 726 è stato coltivato su terreni di coltura contenenti diammonio fosfato, ammonio solfato, urea, valina, fenilalanina e metionina in concentrazioni tali da fornire al lievito 7,8 mM di N. Si è così osservato che *P. fermentans* DiSAABA 726 manteneva la morfologia lievitiforme su YCBU e quella pseudoifale su YCBM, YCBP e YCBV. Si confermava quindi che in *P. fermentans* DiSAABA 726 è il tipo di fonte azotata, più della sua concentrazione, ad influenzare la morfologia cellulare (Figura 3). L'effetto concentrazione infatti si rileva solo quando le fonti azotate sono disponibili in quantità pari a 50 µM come atteso in condizioni di carenza di azoto.

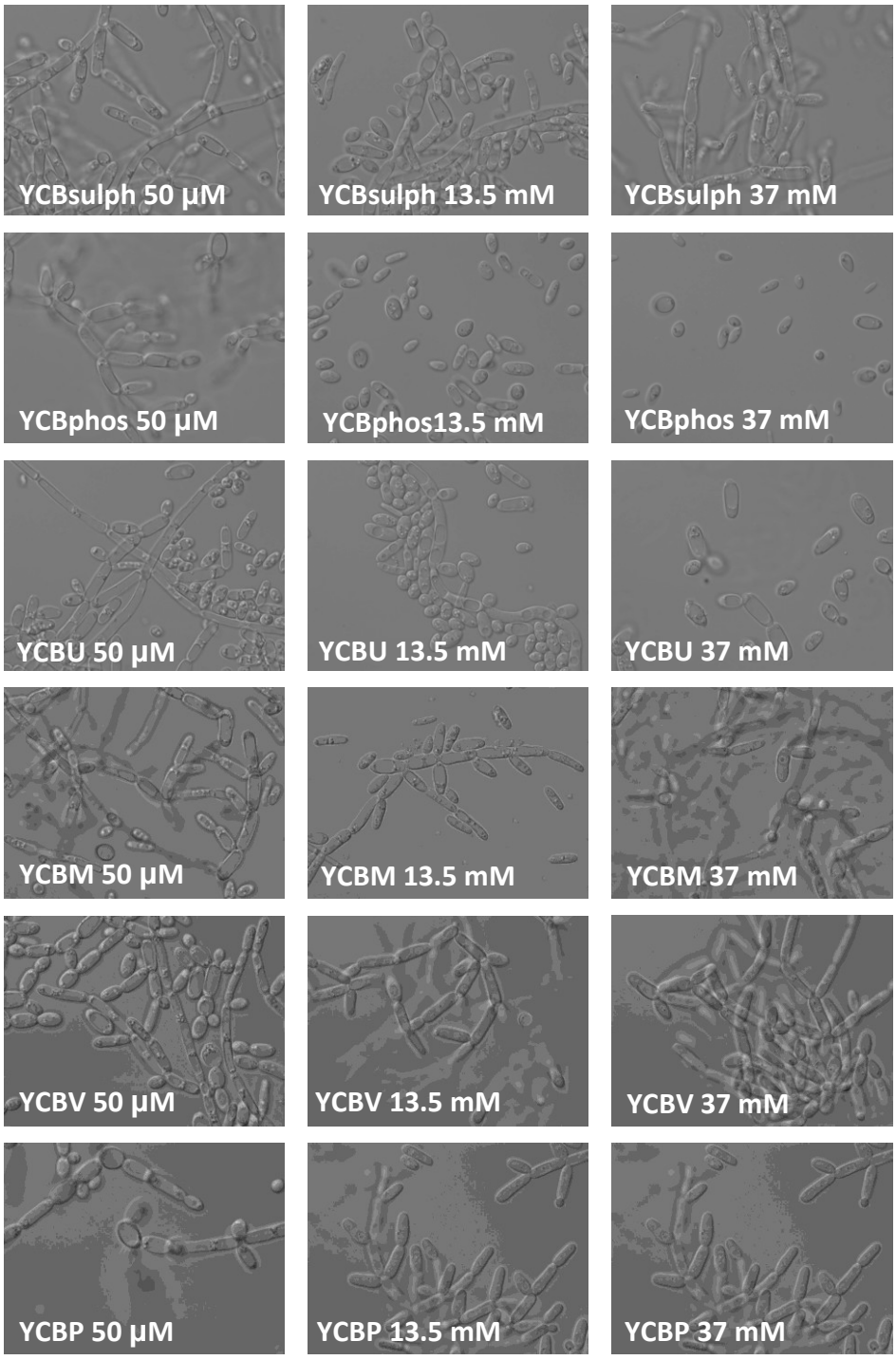
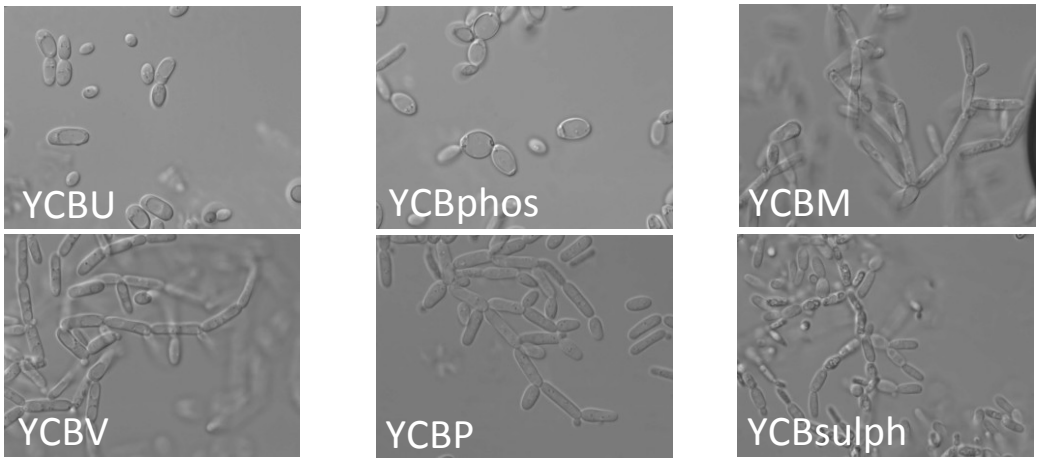


Figura 2. Morfologia di *P. fermentans* DiSAABA 726 coltivato su YCB contenente concentrazioni crescenti di ammonio solfato (YCBsulph), diammonio fosfato (YCBphos), urea (YCBU), metionina (YCBM), valina (YCBV) e fenilalanina (YCBP). 5×10^6 cellule ml^{-1} precoltivate su YEPD sono state inoculate in terreno liquido, incubate a 25°C in statico e osservate dopo 3 giorni. Le immagini sono rappresentative di almeno due replicati biologici indipendenti.

Tabella 2. Concentrazione del macronutriente N in terreni colturali contenenti differenti fonti azotate alla concentrazione di 37 mM.

Fonte azotata	**Azoto**	
(37 mM)	**(%)**	**(mM)**
Urea	46.6	17.25
Diammonio fosfato	21.2	7.84
Ammonio solfato	21.7	7.84
Metionina	9.4	3.47
Valina	12.0	4.42
Fenilalanina	8.5	3.14



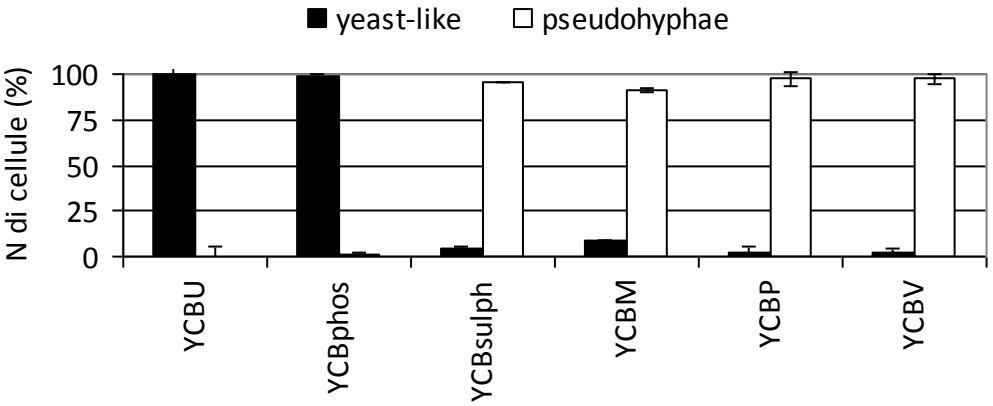


Figura 3. Morfologia di *P. fermentans* DiSAABA 726 su YCBU, YCBphos, YCBM, YCBV, YCBP and YCBsulph contenenti ciascuno 7,8 mM di N. 5×10^6 cellule ml^{-1} precoltivate su YEPD sono state inoculate in terreno liquido, incubate a 25°C in statico e osservate dopo 3 giorni. L'istogramma mostra la percentuale di cellule lievitiformi e pseudoife per ciascun terreno colturale. I dati sono relativi a due replicati biologici indipendenti.

2.3.2 Il pH extracellulare interferisce con l'assimilazione dell'ammonio solfato e influisce quindi sulla morfologia delle cellule.

Secondo i risultati riportati in figura 2 e in figura 3 l'ammonio solfato e il diammonio fosfato esercitano effetti diversi sulla morfologia di *P. fermentans* DiSAABA 726. Considerato che l'azoto presente nei sali di ammonio è facilmente assimilabile dai lieviti (Bamforth, 2005) e che i due sali contengono la stessa quantità di N, è stato postulato che questo effetto potesse essere dovuto alla diversa capacità tamponante dei due sali. Per valutare questa ipotesi, *P. fermentans* DiSAABA 726 è stato coltivato su terreni liquidi a base di YCB contenenti ammonio solfato e diammonio fosfato alle diverse concentrazioni precedentemente utilizzate, senza e con l'aggiunta di tampone citrato (pH 6,0). La morfologia cellulare e il pH sono stati valutati per tre giorni. I risultati ottenuti hanno confermato che la capacità tamponante dell'ammonio solfato è decisamente inferiore a quella del diammonio fosfato (Tabella 3). Inoltre è stato osservato che nel terreno tamponato YCBsulph, *P. fermentans* DiSAABA 726 mantiene la morfologia lievitiforme suggerendo che una forte acidificazione del mezzo di crescita può interferire con l'assimilazione dell'ammonio in YCBsulph (Fig. 4). Per verificare se il calo del pH extracellulare interferisse con l'assimilazione delle altre fonti azotate, lo stesso esperimento è stato ripetuto su YCBM, YCBU, YCBP e YCBV tamponati e non tamponati. Anche su questi terreni si osservava, in assenza del tampone, una progressiva diminuzione del pH extracellulare. Tuttavia, contrariamente a quanto osservato in YCBsulph, nei terreni tamponati *P. fermentans* DiSAABA 726 manteneva la morfologia indotta dalla fonte di azoto utilizzata (Figura 4). Così per quanto concerne YCBM, YCBU, YCBP e YCBV la morfologia di *P. fermentans* DiSAABA 726 dipende unicamente dalla natura della fonte azotata e non dal pH del mezzo colturale.

Tabella 3. pH dei terreni colturali liquidi non tamponati e tamponati immediatamente dopo l'inoculo (Tempo 0) e dopo 72 ore di crescita (Tempo 72).

Terreno colturale	Conc. fonte azotata	pH			
		Non-tamponato		Tamponato	
		Time 0	Time 72	Time 0	Time 72
YCBU	-	6.08	4.63	6.00	5.82
YCBM	-	5.97	3.49	6.00	5.25
YCBphosph	50 µM	5.84	4.03	6.00	5.83
	13.5 mM	7.00	5.83	6.00	5.28
	37 mM	7.48	6.75	6.00	4.83
YCBsulph	50 µM	5.74	4.15	6.00	5.94
	13.5 mM	5.68	2.52	6.00	4.93
	37 mM	5.74	4.15	6.00	5.94
YCBV	50 µM	5.50	3.37	6.00	5.30
	13.5 mM	5.52	3.41	6.00	5.57
	37 mM	5.55	3.70	6.00	5.73
YCBP	50 µM	5.75	4.50	6.00	5.90
	13.5 mM	5.60	3.44	6.00	5.14
	37 mM	5.64	3.56	6.00	5.10

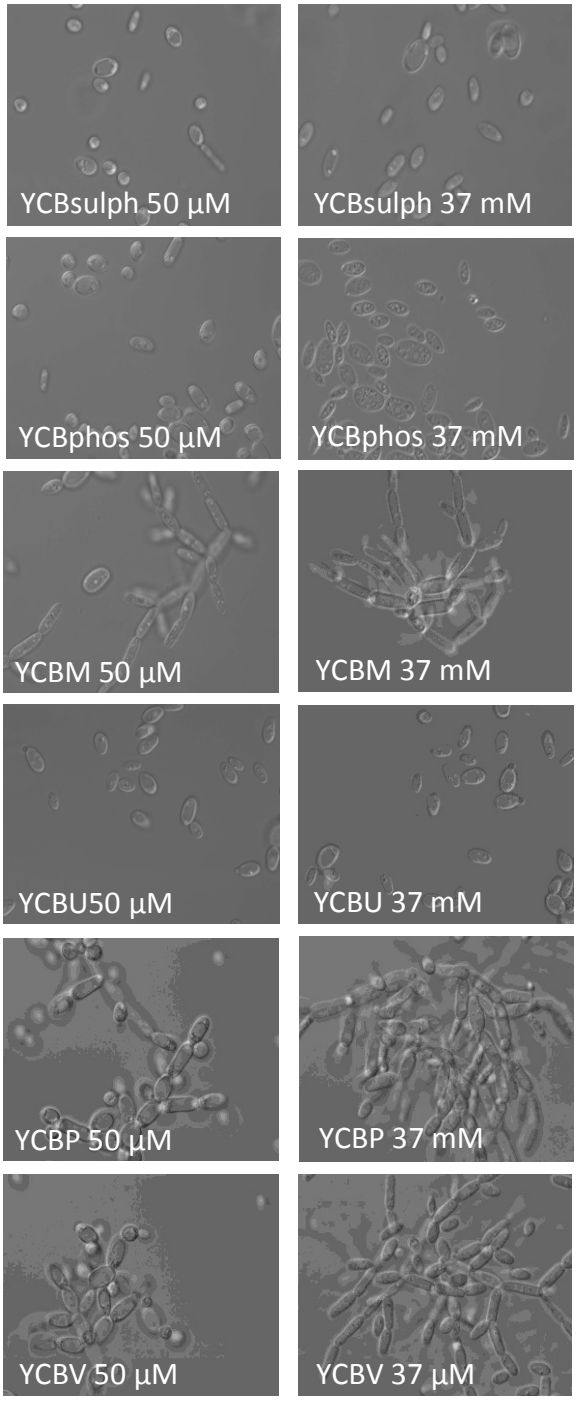


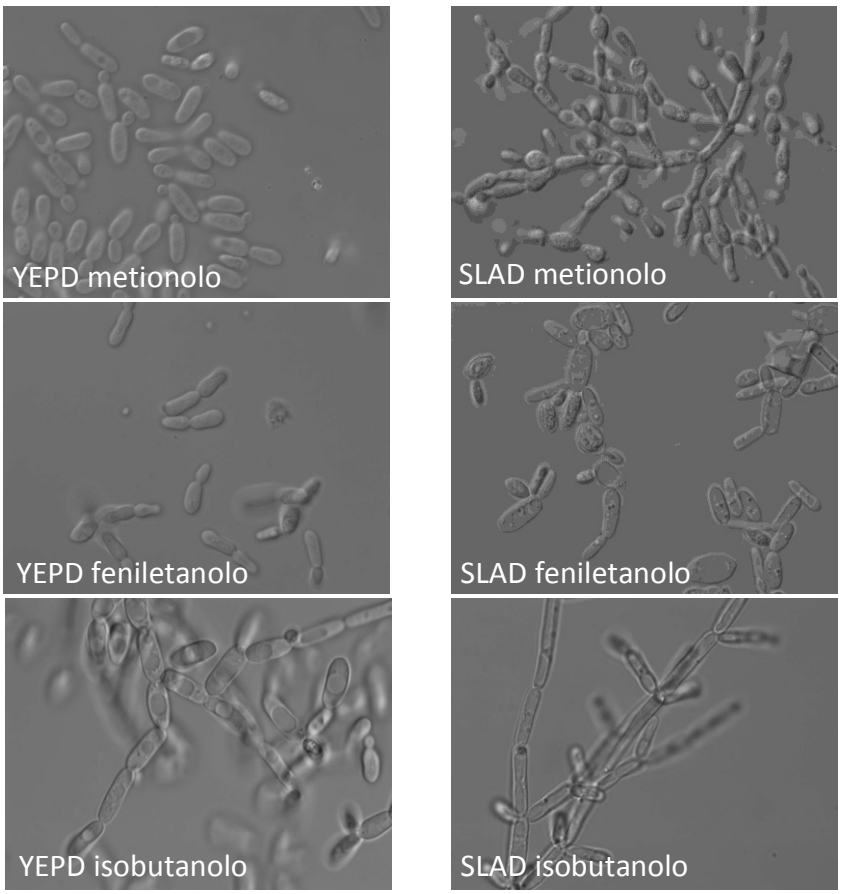
Figura 4. Morfologia di *P. fermentans* DiSAABA 726 su YCBU, YCBphos, YCBM, YCBV, YCBP and YCBsulph tamponati a pH 6. 5×10^6 cellule ml^{-1} precoltivate su YEPD sono state inoculate in terreno liquido, incubate a 25°C in statico e osservate dopo 3 giorni. Le immagini sono rappresentative di almeno due replicati biologici indipendenti.

2.3.3 La morfologia di *P. fermentans* DiSAABA 726 è influenzata dagli alcoli superiori

L'assimilazione di metionina, fenilalanina e valina avviene attraverso la via di Erlich e può portare alla produzione di metionolo, feniletanolo e isobutanolo rispettivamente. Similmente a quanto osservato per altri lieviti, gli alcoli superiori derivanti dal catabolismo degli amminoacidi, potrebbero essere coinvolti nella formazione di pseudoife anche in *P. fermentans* DiSAABA 726. Per valutare questa ipotesi *P. fermentans* DiSAABA 726 è stato coltivato su SLAD e YEPD addizionati di metionolo, feniletanolo e isobutanolo. Inoltre per investigare meglio sul ruolo di altri alcoli superiori il cui effetto su *S. cerevisiae* è stato ampiamente documentato da Lorenz et al. (2000) alcol-isoamilico, 1-butanolo e isopropanolo sono stati addizionati ai terreni YEPD e SLAD.

La morfologia di *P. fermentans* DiSAABA 726 appariva differente su terreni colturali contenenti metionolo, feniletanolo e isobutanolo. Il metionolo stimolava l'allungamento cellulare e risultava nella produzione di vere pseudoife su SLAD ma non su YEPD. Il feniletanolo, benché in grado di indurre un leggero allungamento e una lieve aggregazione cellulare non risultava in una chiara morfologia pseudoifale su SLAD e YEPD. L'isobutanolo induceva crescita pseudoifale su entrambi i terreni (Figura 5). Così, almeno per metionina e valina ma non per fenilalanina, è possibile ipotizzare che il loro effetto sulla morfologia pseudoifale sia mediato dagli alcoli superiori derivanti dalla loro assimilazione.

Inaspettatamente l'alcol isoamilico, che scatena la filamentazione in *S. cerevisiae* (Martinez-Anaya et al., 2003), non induceva la crescita pseudoifale in *P. fermentans* DiSAABA 726. Poiché l'alcol isoamilico è il prodotto della assimilazione della leucina attraverso la via di Erlich, questo risultato è in accordo con l'inabilità della leucina di indurre la crescita pseudoifale in *P. fermentans* DiSAABA 726. Al contrario, 1-butanolo e l'isopropanolo inducevano la crescita pseudoifale su SLAD, (Figura 6) e YEPD.



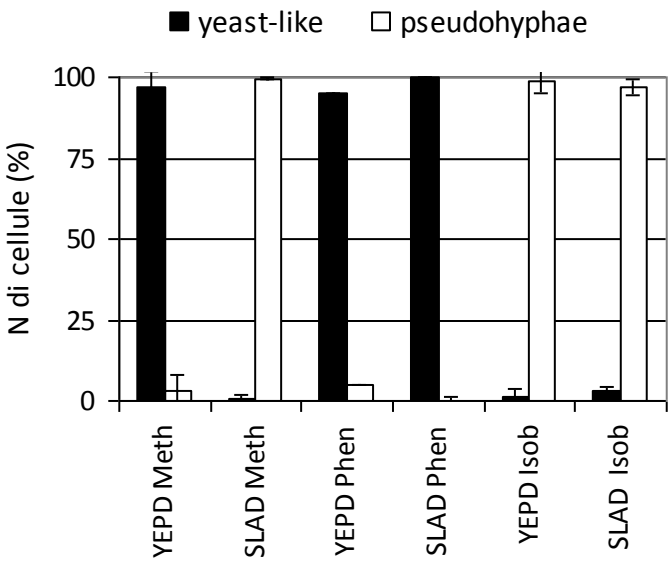
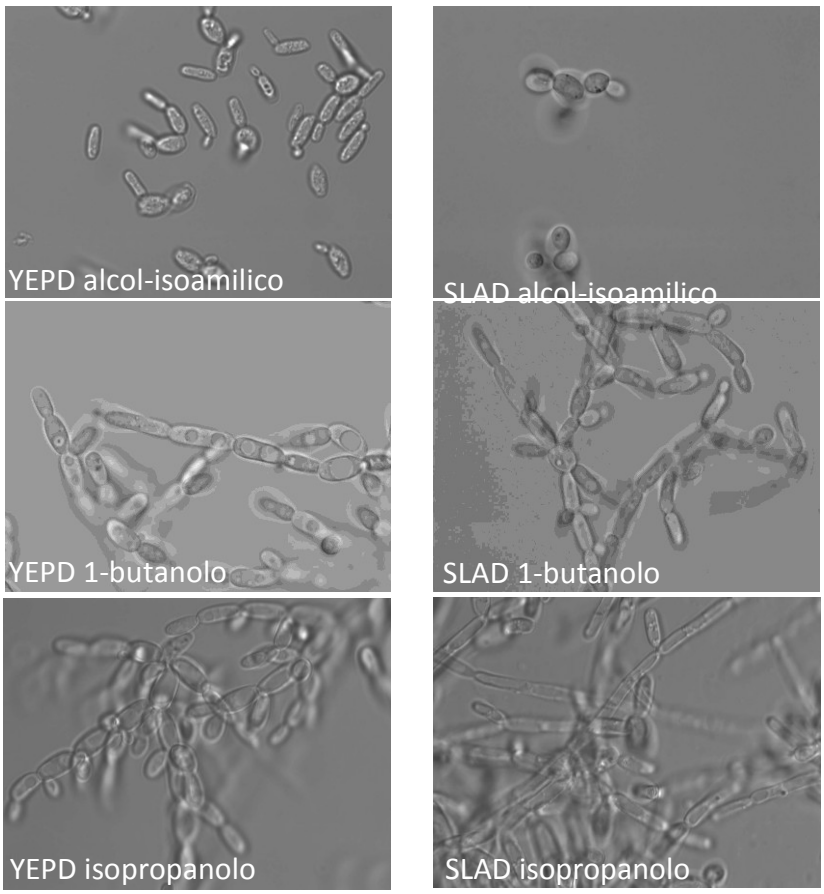


Figura 5. Morfologia di *P. fermentans* DiSAABA 726 su YEPD e SLAD addizionato di metionolo, feniletanolo e isobutanolo. Le cellule sono state osservate dopo 3 giorni di crescita su terreno solido. L'istogramma mostra la percentuale di cellule lievitiformi e pseudoife per ciascun terreno colturale. I dati sono relativi a tre replicati biologici indipendenti.



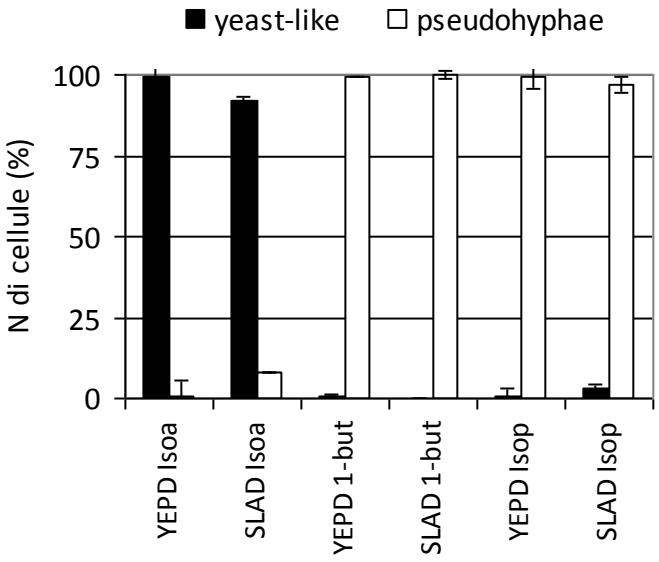


Figura 6. Morfologia di *P. fermentans* DiSAABA 726 su YEPD e SLAD addizionato di alcol-isoamilico, 1-butanolo e isopropanolo. Le cellule sono state osservate dopo 3 giorni di crescita su terreno solido. L'istogramma mostra la percentuale di cellule lievitiformi e pseudoife per ciascun terreno colturale. I dati sono relativi a tre replicati biologici indipendenti.

2.3.4 La formazione di pseudoife in *P. fermentans* DiSAABA 726 è reversibile

Per valutare se, come in altri lieviti, anche in *P. fermentans* DiSAABA 726 la transizione dimorfica è reversibile, singole cellule lievitiformi e pseudoife cresciute su YCBU e YCBM, rispettivamente, sono state separate con il micromanipolatore e inoculate sia in YCBU sia in YCBM. E' risultato che le cellule lievitiformi mantenevano tale morfologia su YCBU ma originavano pseudoife in YCBM. Allo stesso modo le cellule pseudoifali mantenevano la loro morfologia su YCBM e assumevano morfologia lievitiforme su YCBU. Quindi la transizione dimorfica in *P. fermentans* DiSAABA 726 è completamente reversibile e strettamente dipendente dalla fonte azotata presente nel terreno di crescita.

2.4 Discussione

La coesistenza di cellule lievitiformi e pseudoife sulla maggior parte dei terreni di coltura testati, suggerisce che la crescita con morfologia mista sia una condizione naturale per *P. fermentans* DiSAABA 726 e che, analogamente a quanto osservato in altri lieviti, anche in *P. fermentans* DiSAABA 726, il dimorfismo sia funzionale alla necessità di favorire la disseminazione del lievito o la ricerca di nutrienti. Tuttavia, poiché in *P. fermentans* DiSAABA 726 la crescita pseudoifale sembra essere associata al comportamento patogeno (Giobbe et al., 2007), si è ritenuto importante indagare sui fattori che la innescano.

I risultati ottenuti indicano che la somministrazione di alcune fonti azotate permette la separazione delle due morfologie di sviluppo e l'induzione di una o dell'altra morfologia in modo completamente reversibile, come già osservato per il patogeno opportunista *C. albicans* (Sanchez -Martinez & Perez-Martin, 2001). Tuttavia, mentre l'induzione della morfologia lievitiforme da parte del diammonio fosfato e di altre fonti azotate complesse (estratto di lievito e peptone) è compatibile con la loro facilità di utilizzo da parte del lievito, l'effetto esercitato da urea, solfato di ammonio, metionina, fenilalanina e valina richiede una spiegazione.

Per quanto riguarda l'urea, la formazione di pseudoife a concentrazioni di questa fonte azotata pari a 50 µM è in accordo con il noto effetto della carenza di azoto sulla morfogenesi dei lieviti. E' parso invece interessante che questa fonte azotata inducesse la morfologia lievitiforme se somministrata in concentrazioni nell'ordine del mM. L'urea è infatti generalmente considerata una fonte azotata povera tant'è vero che in *C. albicans* e in altri lieviti patogeni induce la filamentazione (Gosh et al., 2009). In *C. albicans* la transizione lievito/pseudoifa indotta dall'urea è mediata dalla CO_2 prodotta durante l'assimilazione di questa fonte azotata. La CO_2 dopo essere stata trasformata in bicarbonato per mezzo dell'anidrasi carbonica, attiva in sequenza l'adenilato ciclasi, la proteina chinasi A e i geni responsabili della crescita ifale (Bahn & Mühlschlegel, 2006; Elleuche & Pöggler, 2010).

La mancata di filamentazione di *P. fermentans* DiSAABA 726 durante la crescita su YCB addizionato di concentrazioni mM di urea suggerisce che il meccanismo descritto in *C. albicans* non sia funzionante in *P. fermentans* DiSAABA 726. Questo potrebbe essere dovuto a produzioni di CO_2 insufficienti a scatenare la crescita pseudoifale durante la crescita su YCBU e/o al fatto che l'anidride carbonica prodotta potrebbe essere utilizzata a fini metabolici (Aguilera et al., 2005; Elleuche & Pöggler, 2010).

Anche l'effetto esercitato da concentrazioni mM di diammonio fosfato e ammonio solfato sulla morfologia del lievito è piuttosto interessante. Un risultato simile era già stato osservato in *Aureobasidium pullulans* che in presenza di ammonio solfato subisce la transizione dimorfica da cellule lievitiformi a clamidospore e in presenza di diammonio fosfato mantiene la morfologia lievitiforme (Bermejo et al., 1981) come effetto della diversa capacità tamponante dei due sali. In effetti, durante la crescita di *P.fermentans* DiSAABA 726 su YCBsulph liquido, si osserva una drastica riduzione del pH extracellulare. Se si considera che a bassi valori di pH l'assorbimento dell'ammonio avviene per antiporto protonico con consumo di ATP (Bogonez et al., 1979), è possibile ipotizzare che la risposta cellulare di *P. fermentans* DiSAABA 726 al solfato di ammonio sia la conseguenza di una diminuzione della assimilazione di ammonio.

Per quanto riguarda l'effetto della metionina, fenilalanina e valina, è ben noto che in carenza di azoto la loro assimilazione può avvenire attraverso la via di Erlich portando così alla produzione di alcoli superiori (Jones & Pierce, 1964; Henry et al., 2007; Hazelwood et al., 2008). Questi possono regolare la morfogenesi del lievito, seppure con differenze significative tra i lieviti (Lorenz et al., 2000; Martins et al., 2007). Per esempio isobutanolo, feniletanolo e triptofolo derivanti da valina, fenilalanina e triptofano, rispettivamente, innescano la morfogenesi in *S. cerevisiae* (Lorenz et al, 2000;. Chen & Fink, 2006) mentre il tirosolo derivante dalla tiramina, ha lo stesso effetto sulla *C. albicans* (Chen et al., 2004). L'effetto esercitato dal metionolo e dall'isobutanolo sembra compatibile con l'ipotesi che metionina e valina inducano la crescita pseudoifale attraverso la trasformazione nei corrispondenti alcoli superiori. Tuttavia l'effetto esercitato dall'isobutanolo è evidente sia nei terreni poveri d'azoto sia in quelli ricchi di azoto, forse a causa della sua capacità di "mascherare" la presenza di azoto in *P. fermentans* DiSAABA 726 (Lorenz et al., 2000). Al contrario il metionolo, similmente a quanto osservato in *S. cerevisiae* per altri alcoli superiori (Chen & Fink, 2004) agisce come una molecola *quorum sensing* esclusivamente in carenza di azoto (SLAD) e non nel terreno ricco (YEPD).

Secondo Lorenz et al., (2000) la crescita rapida su terreno ricco può mascherare la possibile formazione pseudoife e spiegare quindi il comportamento di questo lievito in terreni complessi addizionati di metionolo. Tuttavia, il coinvolgimento della metionina nel dimorfismo di *P. fermentans* DiSAABA 726 potrebbe essere mediato anche da altri meccanismi. E 'noto che la metionina viene rilevata dal recettore Gpr1p (Maidan et al., 2005a e b) e Gpr4p accoppiati alla proteina G Gpa2p in *C. albicans* e *C. neoformans*, rispettivamente, e innesca la formazione di pseudoife attraverso l'attivazione della via di trasduzione del segnale cAMP-PKA (Xue et al., 2006). Quindi, la crescita pseudoifale potrebbe dipendere dall'interazione tra la metionina e un recettore putativo accoppiato alla proteina G, e dalla conseguente attivazione della via di trasduzione del segnale cAMP-PKA

Il feniletanolo, similmente a quanto riportato per *C. albicans* e *C. dubliniensis* non induce la crescita pseudoifale in *P. fermentans* DiSAABA 726 (Martins et al., 2007). *P. fermentans* è un naturale produttore di questo alcol superiore ma la sua produzione non è mai stata relazionata alla crescita pseudoifale (Jolly et al., 2006; Domizio et al., 2011). Così l'effetto esercitato dalla fenilalanina sulla morfologia di *P. fermentans* potrebbe non essere mediato dalla produzione di feniletanolo.

P. fermentans DiSAABA 726 mostra comportamenti simili a *C. albicans* e *C. dubliniensis* anche per quanto concerne la sua risposta cellulare all'alcol isoamilico. In *S. cerevisiae* l'alcol isoamilico induce la filamentazione attraverso la fosforilazione di Cdc28p da parte di Swe1p (Martinez-Anaya et al., 2003). Quest'ultima proteina non è coinvolta nella filamentazione in *C. albicans* (Wightman et al., 2004) che come *P. fermentans* DiSAABA 726 mantiene la morfologia lievitiforme anche in presenza di alcol isoamilico.

Similmente a quanto osservato da Lorenz et al. (2000) nelle cellule aploidi di *S. cerevisiae*, l'1-butanolo e l'isopropanolo inducono la filamentazione in *P. fermentans* DiSAABA 726 sia in mezzi colturali poveri di azoto sia in terreni ricchi di azoto in conformità con l'effetto esercitato da diversi alcoli superiori sul dimorfismo nei lieviti.

In conclusione, *P. fermentans* DiSAABA 726 cambia reversibilmente la sua morfologia in funzione della fonte azotata disponibile probabilmente a causa della necessità di adattarsi rapidamente al variare condizioni nutrizionali.

Il fatto che quantità equimolari di N risultino in cellule lievitiformi o pseudoifali a seconda della fonte azotata utilizzata è compatibile con l'ipotesi che la morfogenesi di *P. fermentans* DiSAABA 726 dipenda dalla natura della fonte azotata e non dalla sua concentrazione nel terreno colturale. L'effetto esercitato dagli alcoli superiori indica che anche in questo lievito la morfogenesi è regolata, in modo specie-specifico, da molecole *quorum sensing* generalmente prodotte dall'assimilazione degli amino acidi in condizioni di carenza di azoto.

2.5 Bibliografia

Aguilera J, van Dijken JP, de Winde JH, Pronk JT (2005) Carbonic anhydrase (Nce103p): an essential biosynthetic enzyme for growth of *Saccharomyces cerevisiae* at atmospheric carbon dioxide pressure. *Biochem J* 391: 311-316.

Bahn YS, Mühlschlegel FA (2006) CO_2 sensing in fungi and beyond. *Curr Opin Microbiol* 9: 572-578.

Bamforth CW (2005) Food, fermentation and microorganisms. Blackwell Science Ltd Oxford, 1 – 38.

Bermejo JM, Dominguez JB, Goni FM, Uruburu F (1981) Influence of pH on the transition from yeast-like cells to chlamydospores in *Aureobasidium pullulans***.** *Ant van Leeuwenhoek* 47**:** 385-392.

Biswas K, Morschhäuser J (2005) The Mep2p ammonium permease controls nitrogen starvation-induced filamentous growth in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 56: 649-669.

Bogoneze E, Satrustegui J, Machado A (1979) Evidence for degradation in the carbon-starvation induced inactivation of yeast NADP-glutamate dehydrogenase. *FEMS Microbiol Lett* 6: 151- 154.

Chen H, Fujita M, Feng Q, Clardy J, Fink GR (2004) Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. *Pnas* 101: 5048-5052.

Chen HC, Fink GR (2006) Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. *Genes Dev* 20: 1150–1161.

Csank C, Haynes K (2000) *Candida glabrata* displays pseudohyphal growth**.** *FEMS Microbiol Lett* 189: 115-120.

Dickinson JR (1994) Irreversible formation of pseudohyphae by haploid *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* 119: 99-104.

Dickinson JR (1996) Fusel alcohols induce hyphal-like extensions and pseudohyphal formation in yeast. *Microbiol* 142: 1391-1397.

Domizio P, Romani C, Lencioni L, Comitini F, Gobbi M, Mannazzu I, Ciani M (2011) Outlining a future for non-*Saccharomyces* yeasts: selection of putative spoilage

wine strains to be used in association with *Saccharomyces cerevisiae* for grape juice fermentation. *Int J Food Microbiol* 143: 170-180.

Elleuche S, Pöggeler S (2010) Carbonic anhydrases in fungi. *Microbiol* 156: 23 29.

Gimeno CJ, Ljungdahl PO, Styles CA & Fink GR (1992) Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell* 68: 1077-1090.

Giobbe S, Marceddu S, Scherm B, Zara G, Mazzarello V, Budroni M, Migheli Q (2007) The strange case of a biofilm-forming strain of *Pichia fermentans* which controls *Monilinia* brown rot on apple but is pathogenic on peach fruit. *Fems Yeast Res* 7: 1389–1398.

Ghosh S, Navarathna DHMLP, Roberts DD, Cooper JT, Atkin AL, Petro TM, Nickerson KW (2009) Arginine-induced germ tube formation in *Candida albicans* is essential for escape from murine macrophage line RAW 264.7. *Infect Immun* 77: 1596-1605.

Hall RA, De Sordi L, MacCallum DM, Topal H, Eaton R, Bloor JW, Robinson GK, Levin LR, Buck J, Wang Y, Gow NAR, Steegborn C, Mühlschlegel FA (2010) CO_2 acts as a signalling molecule in populations of the fungal pathogen *Candida albicans*. *PLoS Pathog* 6: e1001193.

Hazelwood LA, Daran JM, Van Maris AJA, Pronk JT, Dickinson RJ (2008) The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Appl Environ Microbiol* 74: 2259–2266.

Henry CS, Broadbelt LJ e Hatzimanikatis V (2007) Thermodynamics based metabolic flux analysis. *Biophys J* 92: 1792–1805.

Herrera JR, Sentandreu R (2002) Different effectors of dimorphism in *Yarrowia lipolytica. Arch Microbiol* 178: 477-483.

Jolly NP, Augustyn OPH, Pretorius IS (2006) The Role and Use of Non-*Saccharomyces* Yeasts in Wine Production. *S Afr J Enol Vitic* 27: 15-39.

Jones M e Pierce JS (1964) Absorption of amino acids from wort by yeasts. *J Inst Brew* 70: 307–315.

Klasson H, Fink GR, Ljungdahl PO (1999) Ssy1p and Ptr3p are plasma membrane components of a yeast system that senses extracellular amino acids. *Mol Cell Biol* 19: 5405-5416.

Lo WS, Dranginis AM (1998) The cell surface flocculin Flo11 is required for pseudohyphae formation and invasion by Saccharomyces cerevisiae. *Mol Biol Cell* 9: 161-171

Lorenz MC, Cutler NS & Heitman J (2000a) Characterization of alcohol-induced filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 11: 183-199.

Lorenz MC, Heitman J (1998) The MEP2 ammonium permease regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 17: 1236-1247.

Madhani HD, Fink GR (1998) The control of filamentous differentiation and virulence in fungi. *Trends Cell Biol* 8: 348-353.

Maidan MM, Thevelein JM, Van Dijck P (2005) Carbon source induced yeast-to-hypha transition in *Candida albicans* is dependent on the presence of amino acids and on the G-protein-coupled receptor Gpr1. *Biochem Soc Trans* 33: 291-293.

Martinez-Anaya CJ, Dickinson R, Sudbery PE (2003) In yeast the pseudohyphal phenotype induced by isoamyl alcohol results from the operation of the morphogenesis checkpoint. *J Cell Sci* 116: 3423-3431.

Martins M, Henriques M, Azeredo J, Rocha SM, Coimbra MA, Oliveira R (2007) Morphogenesis control in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* through signalling molecules produced by planktonic and biofilm cells. *Eukaryot Cell* 6(12): 2429-2436.

Pan X, Harashima T, Heitman J (2000) Signal transduction cascades regulating pseudohyphal differentiation of Saccharomyces cerevisiae. *Curr Opin Microbiol* 3: 567-572.

Rupp S, Summers E, Lo HJ, Madhani H and Fink GR (1999) MAP kinase and cAMP filamentation signaling pathways converge on the unusually large promoter of the yeast *FLO11* gene. *EMBO J 18*: 1257–1269.

Sanchez-Martinez C, Perez-Martin J (2001) Dimorphism in fungal pathogens: *Candida albicans* and *Ustilago maydis* - similar inputs, different outputs. *Curr Opin Microbiol* 4: 214-221.

Saville SP, Lazzell AL, Monteagudo C and Lopez-Ribot JL (2003) Engineered Control of Cell Morphology In Vivo Reveals Distinct Roles for Yeast and Filamentous Forms of *Candida albicans* during Infection. *Eukaryotic Cell* 2: 1053-1060

Sipiczki M, Takeo K (1998) The effect of caffeine on cell cycle progression and polar growth in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biologia* 53: 295–300.

Sudbery P, Gow N, Berman J (2004) The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 12: 317-324.

Whightman R, Bates S, Amornrrattanapan P, Sudbery PE (2004) In *Candida albicans* the Nim1 kinases Gin4 and Asl1 negatively regulate pseudohyphae formation and Gin4 also controls septin organization. *J Cell Biol* 164: 581-591.

Whiteway M, Oberholzer U (2004) Candida morphogenesis and host-pathogen interactions. *Curr Opin Microbiol* 7: 350–357.

Wickes BL, Mayorga ME, Edman U, Edman JC (1996) Dimorphism and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*: association with the α-mating type. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 7327–7331.

Xue C, Bahn YS, Cox GM, Heitman J (2006) G protein-coupled receptor Gpr4 senses amino acids and activates the cAMP–PKA pathway in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Biol Cell* 17**:** 667–679.

3. Ricerca di geni coinvolti nella transizione dimorfica in *Pichia* fermentans DiSAABA 726

Riassunto

Con l'intento di isolare i geni coinvolti nella transizione lievito/pseudoifa in *P. fermentans* per valutare se la patogenicità mostrata da questo lievito è sempre associata alla crescita pseudoifale, il ceppo DiSAABA 726 è stato coltivato su YCBM e YCBU, terreni colturali in grado di indurre e separare la morfologia liefitiforme da quella pseudoifale. La ricerca dei geni differenzialmente espressi dalla morfologia pseudoifale è stata condotta mediante Rapid Subtraction Hybridization (RaSH). Questa tecnica ha permesso di isolare 12 cloni contenenti sequenze maggiormente espresse durante la crescita pseudoifale. L'analisi BLAST ha indicato che cinque delle 12 sequenze mostrano il 67% di identità con il gene codificante la fosfolipasi C (*PLC1*) di *C. albicans*; quattro dall'84 al 98% di identità con geni che codificano fattori di allungamento della traduzione. Le rimanenti tre sequenze mostrano identità con geni codificanti il citocromo C (67%), una glicosidasi di parete coinvolta nella formazione del biofilm (72%) e l'aldoso 1-epimerasi (65%). La sovraespressione dei 6 geni nella morfologia pseudoifale è stata confermata mediante qRTPCR. Sebbene, fatta eccezione per l'aldoso 1 epimerasi, sia possibile ipotizzare il coinvolgimento di tutti i geni individuati nella transizione levito/pseudoifa, quello che ha suscitato maggiore interesse è il gene codificante la putativa fosfolipasi C di *P. fermentans* DiSAABA 726. Infatti, sia la frequenza con la quale la sequenza codificante la putativa fosfolipasi C è stata ritrovata nella popolazione di cloni, sia la funzione di questa proteina in *C. albicans* e *S. cerevisiae* suggeriscono il potenziale coinvolgimento della fosfolipasi C nella transizione dimorfica in *P. fermentans* DiSAABA 726. Il gene *PLC1* di *P. fermentans* DiSAABA 726 rappresenta quindi un possibile bersaglio molecolare di interesse per capire se il comportamento patogeno manifestato da questo lievito su pesca è da associare alla formazione di pseudoife.

3.1 Introduzione

L'isolamento di geni coinvolti in importanti processi cellulari quali invecchiamento, differenziazione, e altri, viene effettuato attraverso l'uso di approcci sperimentali diversi (Liang et al., 1992; Iyer et al., 1999; Fambrough et al., 1999). Tra questi, quelli utilizzati per l'isolamento e la clonazione di geni espressi differenzialmente in risposta a fattori nutrizionali e ambientali comprendono: l'ibridazione sottrattiva (Jang et al., 1993; Sagerstrom et al., 1997), il differential display (Lianget al., 1992, Shen et al., 1995), il sequenziamento delle sequenze EST (Adams et al., 1991, Bartoluzzi, 2000), l'analisi seriale dell'espressione genica (SAGE) (Velculescu et al., 1995; Zhang et al., 1997) e l'ibridazione con microarray (Schena et al., 1995). L'ibridazione sottrattiva viene utilizzata per identificare geni differenzialmente espressi dei quali non si conoscono la funzione o le caratteristiche biochimiche. Il metodo tradizionale comporta l'ibridazione di un singolo filamento di cDNA generato dal mRNA di una delle forme cellulari sotto studio con quello ottenuto dal mRNA dell'altra forma cellulare. I filamenti di cDNA non ibridati, e quindi espressi differenzialmente, vengono poi selezionati utilizzando metodi di estrazione con colonna cromatografica di idrossilapatite e utilizzati per sintetizzare il filamento complementare. Questo metodo però ha un'importante limitazione da attribuire alle difficoltà tecniche di esecuzione della procedura (Sagerstrom et al., 1997, Reddy et al., 1993). Inoltre, poiché non prevede un passaggio di amplificazione del cDNA prima dell'ibridazione, richiede grandi quantità di mRNA e necessita di procedure lunghe e laboriose. Per aggirare alcuni di questi problemi ed aumentare la quantità di materiale da sottoporre ad ibridazione sottrattiva, diversi autori hanno proposto la costruzione di banche di cDNA delle popolazioni cellulari da confrontare in vettori plasmidici (Jiang et al., 1998; Rubenstein et al., 1990, Herfort et al., 1991). Tuttavia, anche la costruzione di banche di cDNA in vettori plasmidici risultava laboriosa. Per facilitare la costruzione delle banche di cDNA altri autori hanno proposto l'amplificazione del cDNA a doppio filamento mediante PCR (Diatchenko et al., 1996; Hubank et al., 1994). Nel 2000 è stata descritta la Rapid Subtraction Hybridization (RaSH) che semplifica notevolmente il processo di sottrazione del cDNA espresso differenzialmente rispetto ad altre metodologie

(Jiang et al., 2000). Nel caso della RaSH le banche di cDNA differenzialmente espressi vengono ottenute a partire da cDNA a doppio filamento ottenuto da forme cellulari diverse. Questo viene digerito enzimaticamente in piccoli frammenti, legato ad adattatori specifici e amplificato tramite PCR prima di essere sottoposto ad ibridazione sottrattiva e clonato in plasmide. Questo protocollo è tecnicamente più semplice di quelli precedentemente descritti e secondo Jiang e collaboratori (2000) porta all'identificazione di un numero elevato di sequenze geniche differenzialmente espresse, relative sia a geni noti sia a geni non descritti in banche dati.

Con l'intento di contribuire a delucidare i possibili meccanismi coinvolti nella transizione dimorfica di *P. fermentans* DiSAABA 726 e valutare se la patogenicità mostrata da questo lievito sia sempre associata alla crescita pseudoifale, è stato condotto uno studio sui geni maggiormente espressi da *P. fermentans* durante la crescita pseudoifale rispetto alla crescita lievitiforme. La messa a punto di terreni colturali in grado di separare la morfologia lievitiforme (YCBU) da quella pseudoifale (YCBM) e di indurre la transizione lievito/pseudoifa (capitolo 2) costituiva il punto di partenza per l'esecuzione di studi *in vitro* in condizioni controllate di laboratorio. Poiché il genoma di *P. fermentans* DiSAABA 726 non è stato sequenziato, e questo lievito è poco caratterizzato dal punto di vista genetico, per l'isolamento dei geni differenzialmente espressi durante la crescita pseudoifale è stata utilizzata la Rapid Subtraction Hybridization.

3.2 Materiali e metodi

3.2.1 Ceppi e condizioni colturali

Pichia fermentans DiSAABA 726 (DBVPG3627) è stato conservato a breve termine in YEPD (2% glucosio, 2% peptone, 1% estratto di lievito, 2% agar) a 4°C, e a lungo termine in YEPDGLY (YEPD + 20% glicerolo) a -80°C. Altri terreni colturali utilizzati sono YCBU (1,17% Yeast Carbon Base; 2% urea) e YCBM (1,17% Yeast Carbon Base, 0.2% metionina). 1 x 10^6 cellule di DiSAABA 726 precoltivate per 20 h in YEPD

liquido in agitazione (180 r.p.m.) alla temperatura di 25°C sono state inoculate in YCBU e YCBM e coltivate in statico per 24 h a 25°C. Le cellule del biofilm formatosi all'interfaccia aria-liquido sono state prelevate per aspirazione utilizzando una pompa a vuoto e impiegate per gli esperimenti successivi. Cellule competenti di *Escherichia coli* DH5α (One Shot TOP10 Chemically Competent *E. coli* cat no C4040-03, Invitrogen, USA) sono state mantenute per lungo termine in LBGLY (LB + 20% glicerolo) a -80°C e coltivate a 37°C su terreno LB (1% triptone, 0,5% estratto di lievito, 1% cloruro di sodio) addizionato di ampicillina (100μg/ml) e di X-gal (40 μg/ml) quando richiesto.

3.2.2 Rapid Subtraction Hybridization

L' RNA totale è stato estratto impiegando il kit Pure Link^{tm} RNA Mini Kit (cat no 12183-018, Invitrogen, USA) e retrotrascritto in cDNA utilizzando il kit Super SMART PCR cDNA Synthesis kit (cat no 635000, Clontech, USA) secondo le istruzioni fornite dalle case produttrici. I cDNA ottenuti da cellule lievitiformi (driver) e da pseudoife (tester) sono stati digeriti con l'enzima *EcoR*II (Sigma-Aldrich, USA) e 2 μg di ciascun cDNA sono stati legati a specifici adattatori (XE-14, XEA-13 e XET-13, Tabella 1) utilizzando il Kit DNA Ligation Ver 2.1 (cat no 6022, Takara, Japan). In breve, i cDNA e gli adattatori sono stati incubati a 55°C per 3 min, la miscela è stata lentamente raffreddata a 8°C e la ligazione degli adattatori è avvenuta overnight a 4°C. I frammenti di cDNA sono stati amplificati mediante reazione di PCR utilizzando i primer XEA-18 e XET-18 (Tabella 1) le cui sequenze corrispondono alle sequenze degli adattatori, in un volume totale di 25 μl contenente: 1X PCR-buffer 2,5 mM di MgCl2, 0,2 mM di dNTP, 1 μM di XEA-18, 1 μM di XET-18, 0,1U di TopTaq DNA Polymerase (cat no 200201, Qiagen, Italy) e 1 μl di cDNA. Il protocollo di amplificazione prevedeva 1 ciclo a 72°C per 5 min seguito da 25 cicli a 94°C per 1 min, 55°C per 1 min e 72°C per 1 min e 10 min 72°C per l'estensione finale. Gli amplificati sono stati purificati utilizzando QIAquick^{R} PCR Purification Kit (cat no 28104, Qiagen, Italy). Il cDNA del tester è stato digerito con *Xho*I (Sigma-Aldrich, USA) a 37°C per 4 ore e ibridato con i frammenti di cDNA del driver. In particolare,

100 ng di cDNA del tester sono stati ibridati con 3 µg di cDNA del driver (rapporto 1:30) in 10 µl di soluzione di ibridazione [0,5 M NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,2% (w/v) SDS, 40% (v/v) formamide], portati ad ebollizione per 5 minuti e incubati a 42°C per 48 ore. La miscela di ibridazione è stata diluita con acqua sterile fino a un volume di 100 µl, purificata utilizzando QIAquick^{R} PCR Purification Kit (cat no 28104, Qiagen, Italy) e 8 µl sono stati clonati nel vettore pBlueScript SK (+/-), precedentemente digerito con l'enzima *Xho*I e defosforilato, con la fosfatasi alcalina (Antarctic Phosphatase cat no M0289L, New England BioLabs, UK) utilizzando il Kit DNA Ligation Ver 2.1 (cat no 6022, Takara, Japan). La miscela di ligazione è stata impiegata per trasformare le cellule competenti di di *E. coli* DH5*α* come indicato da Sambrook et al., (1989) e i ricombinanti sono stati selezionati con il metodo blu bianco.

Tabella 1. Primer utilizzati

	Sequenza		**Sequenza**
Adattatori			
XE-14	5'-CTGATCACTCGAGA-3'	XET-13	5'-CCTGGTCTCGAG-3'
XEA-13	5'-CCAGGTCTCGAG-3'		
RaSH			
RaSH-F	5'-ACTCACTATAGGGCGATTG-3'	RaSH-R	5'-GGAATTCGATATCAAGCTTATC-3'
qPCR			
actFOR	5'-CCATGTTCCCAGGTATTGCT-3'	eloFOR	5'-GACAAGCAACTGGTGGTCAA-3'
actREV	5'-AGAAGATGGAGCCAAAGCAG-3'	eloREV	5'-GCTTGGTGGAAACGTCAGTT-3'
aldFOR	5'-TCGGAAGGCGCTAAACTAGA-3'	citFOR	5'-GTGGGAGAGCACCTTGGTTA-3'
aldREV	5'-CTTCTTCCGACTTGCCAAAG-3'	citREV	5'-CGACCTCGAGACCAGGTAA-3'
tranFOR	5'-TCTTGGAGTCACCACAGACG-3'	tranREV	5'-CCTCGAGACCAGGTGACAAT-3'
cellFOR	5'-AACCGTCGATGAGGATGACT-3'	cellREV	5'-AGACACCTGCATTGTTGACG-3'
plcFOR	5'-CATTGCAGCTTGAAAATGGA-3'	plcREV	5'-TGGGTATCATATGCAGCATCAC-3'

3.2.3 Reverse Northern hybridization

Le colonie batteriche contenenti i plasmidi ricombinanti sono state coltivate in LB-AMP per 2 ore a 37°C e 1 µl di coltura batterica è stato utilizzato come templato in reazioni di PCR con i primer RaSH-F and RaSH-R (Tabella 1). In particolare la miscela di reazione conteneva: 1X PCR-buffer, 2,5 mM di $MgCl_2$, 0,2 mM di dNTP, 2 µM di RaSH1F, 2 µM di RaSH1R, 0,1U di TopTaq DNA Polymerase (cat no 200201, Qiagen, Italy) e 1 µl di sospensione batterica. Il protocollo di amplificazione prevedeva 1 ciclo a 94°C per 15 min seguito da 30 cicli a 94°C per 1 min, 55°C per 1 min e 72°C per 1 min e 10 min 72°C per l'estensione finale. I prodotti di PCR sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio e trasferiti su membrana Hybond-N^+ (Positively CHGD Nylon Transfer Membrane, cat no: RPN 203B, GE Healthcare, UK). Tre µg di cDNA del tester e del driver sono stati marcati con digoxigenin-dUTP utilizzando il kit DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (cat no 11585614910, Roche, USA) ed utilizzati come sonde per la ibridizzazione. L'analisi densitometrica delle immagini delle membrane è stata effettuata utilizzando il programma Quantity One 4.6.7 del ChemiDoc. I cloni di interesse sono stati sequenziati (www.bmr-genomics.it/)

3.2.4 Quantitative Real Time PCR

I primer utilizzati in qRT PCR, (Tabella 1) sono stati disegnati utilizzando il software Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/primer3/) sulla base delle sequenze dei cloni A1 (Cytochrome C1, citFor e citRev), A2 (GTPase cytoplasmic elongation factor 1-alpha, eloFor e eloRev), D9 (Putative Phospholipase C, plcFor e plcRev), E7 (Aldose 1-epimerase, aldFor e aldRev), F1 (Putative cell wall glycosidase, cellFor e cellRev) e del clone T1 (Translation elongation factor 1-alpha, tranFor e tranRev). I primer specifici per il gene codificante l'actina, impiegato come gene housekeeping (Tabella 1) sono stati progettati utilizzando sempre lo stesso software sulla base delle porzioni conservate del gene dell'actina nei seguenti microrganismi: *C. albicans, Candida dubliniensis, Candida glabrata, Candida flamata, S. cerevisiae e Pichia manshurica* (Figura 1).

L'RNA è stato estratto dalle cellule lievitiformi (driver) e dalle pseudoife (tester) come specificato sopra (par. 3.2.2) e 100 ng di RNA sono stati retro-trascritti in cDNA utilizzando il kit iScript® cDNA Sythesis Kit (cat no 170-8890, Bio-Rad, USA) in accordo con le istruzioni del produttore. Per ciascuna reazione sono stati effettuati 4 replicati tecnici da 3 replicati biologici indipendenti utilizzando un termociclatore "*i Cycler iQ Real-Time PCR detection system instrument*" (Bio-Rad, Milano) e il SYBR® Green qPCR Supermix for iCycler® (cat no 11761-100, Invitrogen, USA). La miscela di reazione conteneva, in un volume totale di 25 µl: 1 µl di cDNA templato (corrispondente a 50 ng), 12.5 µl di SYBR® Green qPCR Supermix for iCycler®, 200 nM primer Forward e 200 nM primer Reverse. I cicli termici sono stati impostati come segue: 52° C for 2 min, 95°C for 3 min, 40 cicli a 95°C for 15 s e 54°C for 60 s. La fluorescenza è stata misurata durante la fase di estensione. Al termine della reazione è stata effettuata una curva di melting misurando il livello di fluorescenza dei campioni durante variazioni di temperatura comprese fra 50°C e 95°C.

```
Ca    TTATACGGTAACATTGTTATGTCTGGTGGTACTACCATGTTCCCAGGTATTGCTGAACGT-892
Cd    TTATACGGTAACATTGTTATGTCTGGTGGTACTACCATGTTCCCAGGTATTGCTGAACGT-940
Cg    TTGTACGGTAACATCGTCATGTCCGGTGGTACCACCATGTTCCCAGGTATTGCTGAAAGA-1859
Sc    TTATACGGTAACATCGTTATGTCCGGTGGTACCACCATGTTCCCAGGTATTGCCGAAAGA-1245
Pmans TTATACGGTAACATTGTCATGTCTGGTGGTACTACCATGTTCCCAGGTATTGCTGAAAGA-845
Cfl   TTATATGGTAACATTGTTATGTCTGGTGGTACTACCATGTTCCCAGGTATTGCTGAGAGA-1278
      ** ** ******** ** ***** ******** ******************** **  *

Ca    ATGCAAAAGGAAATTACTGCTTTGGCTCCATCTTCTATGAAAGTTAAGATTATTGCTCCA-951
Cd    ATGCAAAAGGAAATTACTGCTTTGGCTCCATCTTCTATGAAAGTTAAGATTATTGCTCCT-999
Cg    ATGCAAAAGGAAATTACCGCTTTGGCTCCATCTTCTATGAAGGTCAAGATCATTGCTCCA-1918
Sc    ATGCAAAAGGAAATCACCGCTTTGGCTCCATCTTCCATGAAGGTCAAGATCATTGCTCCT-1304
Pmans ATGCAAAAGGAAATTACTGCTTTGGCACCATCTTCAATGAAGGTGAAGATCATTGCACCA-904
Cfl   ATGCAAAAGGAAATTACTGCTTTGGCTCCTTCCTCTATGAAGGTCAAGATCATTGCTCCT-1337
      ************** ** ******** ** ** ** ***** ** ***** ***** **
```

Figura 1. Allineamento multiplo di regioni conservate del gene codificante l'actina di *C. albicans* (Ca); *C. dubliniensis* (Cd); *C. glabrata* (Cg); *S. cerevisiae* (Sc); *P. manshurica* (Pmans) e *C. flamata* (Cfl). Per l'allineamento è stato utilizzato il software Clustal W disponibile online al sito http://www.genome.jp/tools/clustalw/ .

3.2.5 Analisi BLAST delle sequenze

L'analisi delle sequenze è stata condotta utilizzando l'applicazione BLAST (Altschul et al 1997) disponibile online ai siti (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/; http://www.yeastgenome.org/; http://www.candidagenome.org/).

3.2.6 Cinetiche di crescita

La cinetica di crescita di *P. fermentans* DISAABA 726 è stata monitorata su YCBM tal quale e YCBM addizionato di concentrazioni crescenti (20, 100 e 150 µM) di 1-O-octadecyl-2-O-methyl-racglycero-3-phosporylcholine (Et-o-18), inibitore della fosfolipasi C. 5 x 10^6 cellule ml^{-1} sono state inoculate in 200 µl di terreno in microtiter da 96 pozzetti (cat no 5530100, Orange Scientific, Belgium). La densità ottica della coltura (OD_{600}) è stata valutata ad intervalli regolari di 15 minuti per 48 ore utilizzando lo SPECTROstar Nano (BMG LABTECH, Germany). I dati sono espressi come media ± deviazione standard di 4 repliche indipendenti.

3.3 Risultati

3.3.1 Clonaggio dei geni differenzialmente espressi durante la crescita pseudoifale

Poiché 24 h di incubazione in statico su YCBU e YCBM sono sufficienti per ottenere biofilm costituiti da cellule lievitiformi o pseudoife, rispettivamente, l'RNA totale di *P. fermentans* DiSAABA 726 è stato estratto dopo 24 ore di crescita sui due terreni e retro-trascritto in cDNA. Per il clonaggio delle sequenze geniche espresse differenzialmente da cellule e pseudoife è stata utilizzata la Rapid Subtraction Hybridization (RaSH) descritta da Jiang et al. (2000) e adattata da Scherm et al., (2009). Secondo tale metodo i cDNA ottenuti da *P. fermentans* DiSAABA 726 lievitiforme (driver) e pseudoifale (tester) sono stati legati ad adattatori specifici che ne consentissero l'amplificazione per PCR. Quindi il solo cDNA del tester è stato sottoposto a restrizione con *Xho*I e ibridato con i frammenti del driver per consentire l'appaiamento delle sequenze comuni alle due morfologie, lievitiforme e pseudoifale e quindi la loro mutua esclusione dalle fasi successive. Infatti, nel corso dell'ibridazione si possono ottenere: doppi filamenti prodotti dall'ibridazione di

cDNA del tester e del driver relativi a sequenze espresse nelle due morfologie; doppi filamenti di cDNA del driver relativi a sequenze espresse maggiormente o esclusivamente da cellule lievitiformi; doppi filamenti costituiti da cDNA del tester relativi a sequenze espresse maggiormente o esclusivamente dalle pseudoife. I doppi filamenti appartenenti alle prime due categorie non possono essere clonati dato che il cDNA del driver non ha estremità coesive con quelle del plasmide. Al contrario i doppi filamenti costituiti da cDNA del tester che non trovano un complementare del driver al quale appaiarsi, perché espresse esclusivamente o maggiormente nella forma pseudoifale, hanno estremità coesive con quelle del plasmide pBlueScript SK (+/-) utilizzato per la clonazione. Quindi la miscela di ibridazione viene clonata in plasmide e trasformata in *E. coli* (Figura 2).

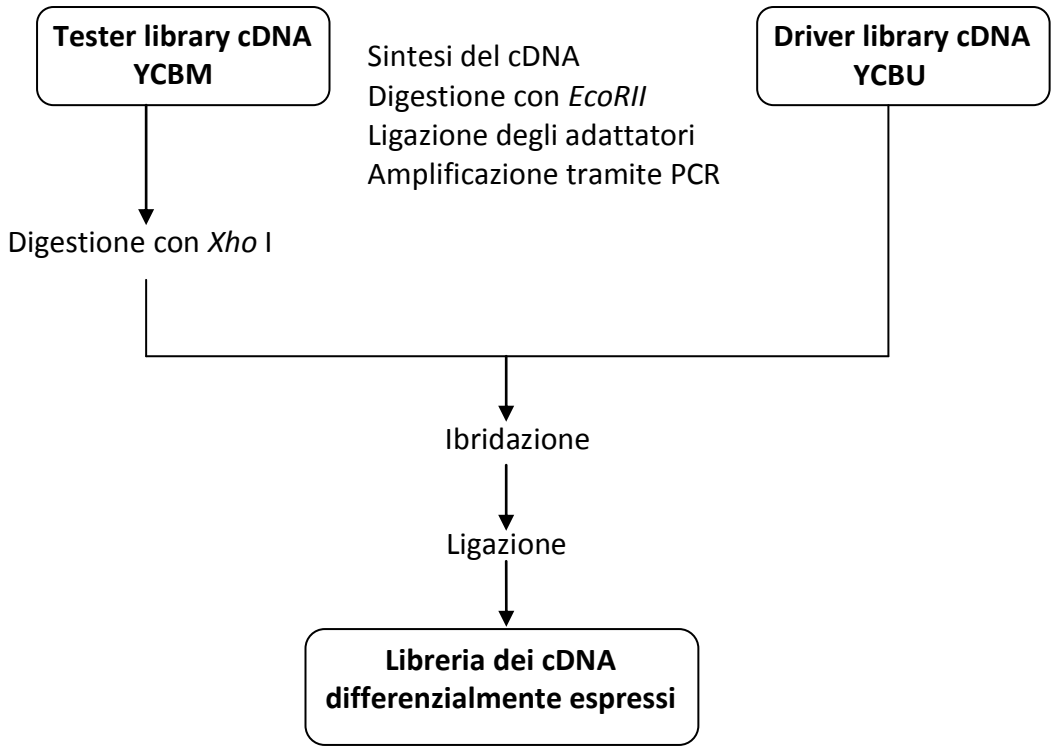


Figura 2. Schema della Rapid Subtraction Hybridization (RaSH). Adattata Jiang et al. (2000).

Utilizzando questa procedura sono stati ottenuti 639 trasformanti potenzialmente contenenti sequenze di DNA sovraespresse da *P. fermentans* DiSAABA 726 nella forma pseudoifale. I trasformanti sono stati analizzati mediante PCR utilizzando i primer RaSHF e RaSHR per verificare la presenza e la dimensione del frammento clonato (Figura 3).

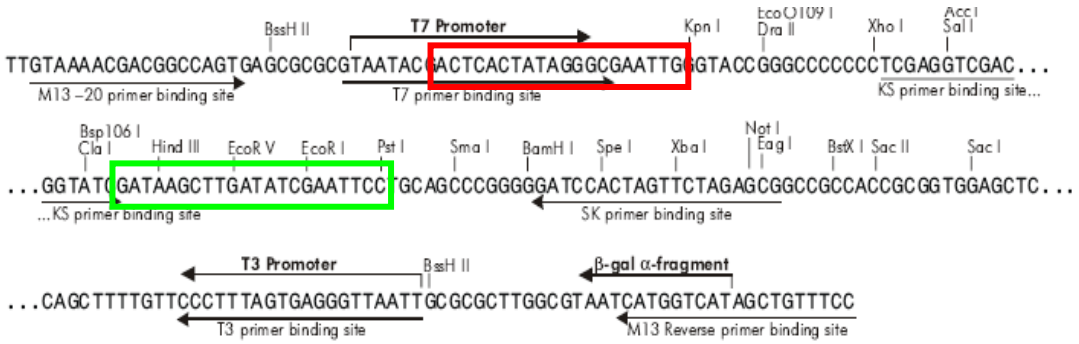


Figura 3. Sito di clonazione multipla di Pbluescript SK(+/-) e regione di allineamento dei primer RaSH-F (riquadro rosso) e RaSH-R (riquadro verde).

In seguito a migrazione elettroforetica dei prodotti di amplificazione su gel di agarosio è stato possibile osservare che dei 639 trasformanti, 349 contenevano il plasmide ricombinante contenente frammenti di dimensioni comprese tra 100 e 600 bp (Figura 4).

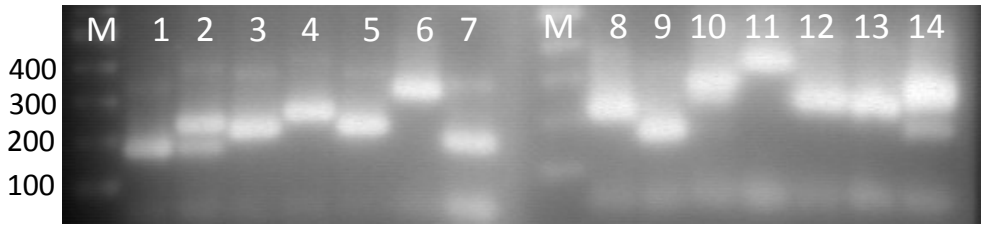


Figura 4. Profilo di amplificazione dei cloni ottenuti mediante RaSH. M DNA Ladder 100bp, corsie 1-14 ampliconi relativi a 14 cloni.

I plasmidi ricombinanti sono stati analizzati mediante Reverse Northern Hybridization contro i cDNA del tester (YCBM) e del driver (YCBU) per individuare quelli contenenti sequenze espresse maggiormente durante la crescita pseudoifale (Figura 5). L'analisi densitometrica delle membrane di ibridazione ha evidenziato 12 cloni che mostravano un segnale di ibridazione più intenso con il cDNA delle cellule pseudoifali (YCBM). Poiché si trattava di sequenze geniche presumibilmente connesse con lo sviluppo pseudoifale si è deciso di indicarle con l'acronimo prg (paseudohyphae related genes) seguito da un numero identificativo.

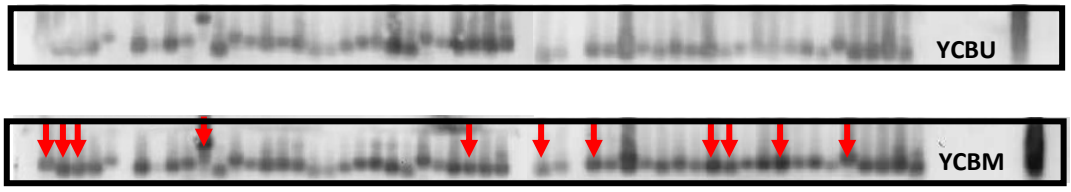


Figura 5. Ibridazione della banca di cDNA con i cDNA del driver (YCBU) e del tester (YCBM). Le frecce indicano i frammenti contenenti sequenze maggiormente espresse durante la crescita pseufdoifale (YCBM).

3.3.2 Identificazione delle sequenze clonate

I 12 cloni sono stati sequenziati e le sequenze sottoposte ad analisi BLAST. I risultati, riportati in tabella 2, indicano che una sola sequenza mostrava identità con il gene codificante un fattore di allungamento della traduzione (GTPase cytoplasmic elongation factor 1-alfa) di *P. fermentans*. Le altre 11 sequenze mostravano identità con geni di *C. albicans*. In particolare le sequenze, prg1, prg2, prg3, prg4 e prg5 mostravano il 66% di identità di sequenza con il gene codificante la fosfolipasi C e le sequenze prg10, prg11, prg12 l'80% di identità con un fattore di allungamento della traduzione di *C. albicans* (translation elongation factor 1-alpha). Le restanti tre sequenze, prg9, prg6 e prg7 mostravano identità con il gene codificante il citocromo c1 (67%), una putativa glicosidasi di parete (72%) e l'aldoso 1-epimerasi (65%), rispettivamente. Quindi l'analisi delle 12 sequenze ha portato all'identificazione di sei geni.

Tabella 2. Caratteristiche e funzioni predette delle sequenze clonate con la RaSH.

Clone	Gene	Identità (%)	e value	Funzioni predette
prg1	*Ca PLC1*	66	2.2e-08	Putative Phospholipase C
prg2	*Ca PLC1*	67	2.6e-06	Putative Phospholipase C
prg3	*Ca PLC1*	67	9.7e-11	Putative Phospholipase C
prg4	*Ca PLC1*	67	5.0e-09	Putative Phospholipase C
prg5	*Ca PLC1*	66	2.2e-08	Putative Phospholipase C
prg6	*SUN41*	72	2.9e-11	Putative cell wall glycosidase involved in biofilm formation
prg7	*Ca* ORF 19.1946	65	1.1e-07	Putative Aldose 1-epimerase
prg8	*Pf TEF1*	98	2e-18	GTPase cytoplasmic elongation factor 1-alpha
prg9	*Ca CYTC*	67	5e-41	Cytochrome c1
prg10	*Ca TEF1*	88	1.8 e-12	Translation elongation factor 1-alpha
prg11	*Ca TEF1*	87	1.5e-16	Translation elongation factor 1-alpha
prg12	*Ca TEF1*	84	2.0e-14	Translation elongation factor 1-alpha

Ca: Candida albicans; Pf: Pichia fermentans

3.3.3 Livelli di espressione dei geni clonati in cellule lievitiformi e pseudoife

I livelli di espressione dei 6 geni sono stati valutati mediante qRTPCR, in cellule lievitiformi e in pseudoife ottenute dopo 24 h di crescita in YCBU e in YCBM, rispettivamente. I livelli di espressione di ciascun gene per le due morfologie di sviluppo, sono stati normalizzati rispetto ai livelli di espressione del gene codificante l'actina. Per la normalizzazione è stata utilizzata la formula: Espressione Relativa = $2 -[(Ct\ YFG \times Eff\ YFG)-(Ct\ HKG \times Eff\ HKG)]$. Dove Ct YFG = ciclo soglia determinato per il gene di interesse; Eff YFG = efficienza di reazione calcolata per il gene di interesse; Ct HKG = ciclo soglia determinato per il gene housekeeping; Eff HKG = efficienza di reazione calcolata per il gene housekeeping. I rapporti tra i livelli

di espressione dei sei geni durante la crescita pseudoifale e lievitiforme (livello di espressione cellule pseudoifali/cellule lievitiforme) sono riportati in figura 6. La qRTPCR ha confermato che i sei geni sono sovra espressi durante la crescita pseudoifale.

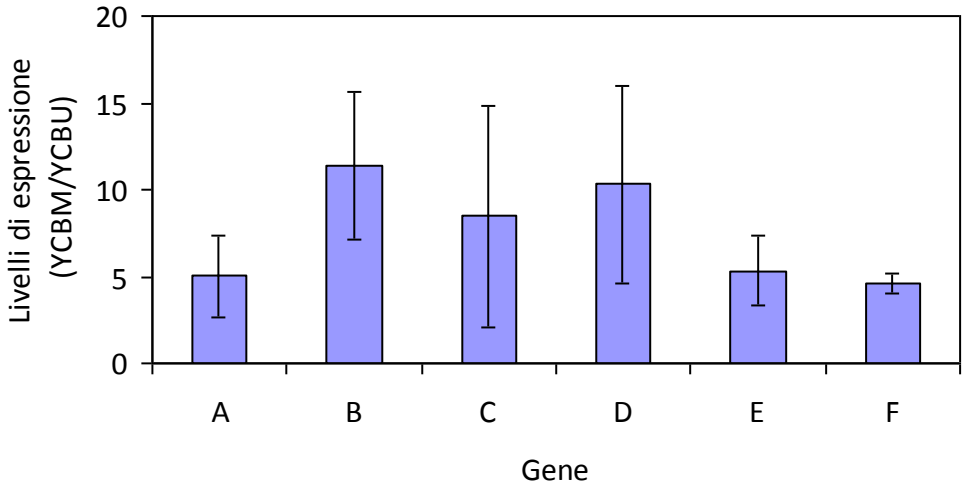


Figura 6**.** Rapporto dei livelli di espressione dei 6 geni identificati. I primer sono stati disegnati sulle sequenze prg1: Phospholypase C; prg10: Translation elongation factor 1-alpha; prg8: GTPase cytoplasmic translation elongation factor 1-alpha; prg9: Cytochrome C1; prg6: Putative cell wall glycosidase; prg7:Aldose 1-epimerase. I livelli di espressione sono stati valutati in pseudoife (YCBM) e in cellule lievitiformi (YCBU), normalizzati rispetto a quelli del gene housekeeping (ACT1) ed espressi come rapporto. I risultati sono relativi a 4 replicati tecnici di 3 replicati biologici indipendenti.

3.3.4 Coinvolgimento della fosfolipasi C di *P. fermentans* DiSAABA 726 durante la transizione dimorfica

Dato che 5 delle 12 sequenze mostravano identità con il gene codificante la putativa fosfolipasi C di *C. albicans* e dato il ruolo che questa proteina riveste nella transizione dimorfica di *C. albi*cans e *S. cerevisiae,* si è deciso di studiare il coinvolgimento della fosfolipasi C nella transizione dimorfica in *P. fermentans.* A tale scopo *P. fermentans* DiSAABA 726 è stato coltivato su YCBM in assenza e in

presenza di concentrazioni crescenti di Et-o-18, noto inibitore della fosfolipasi C (Kunze et al., 2005) e la cinetica di crescita e la morfologia cellulare sono state monitorate nel tempo. L'aumentata concentrazione dell'inibitore della fosfolipasi C, pur determinando una diminuzione della velocità di crescita (Tabella 3), non influiva negativamente sulla produzione di biomassa che su YCBM + 100 µM Et-o-18 e su YCBM + 150 µM Et-o-18 appariva addirittura superiore rispetto a quella ottenuta su YCBM (Figura 7). D'altra parte, la morfologia di *P. fermentans* DiSAABA 726 sui terreni addizionati di Et-o-18 tendeva verso la morfologia lievitiforme al crescere della concentrazione dell'inibitore (Figura 8).

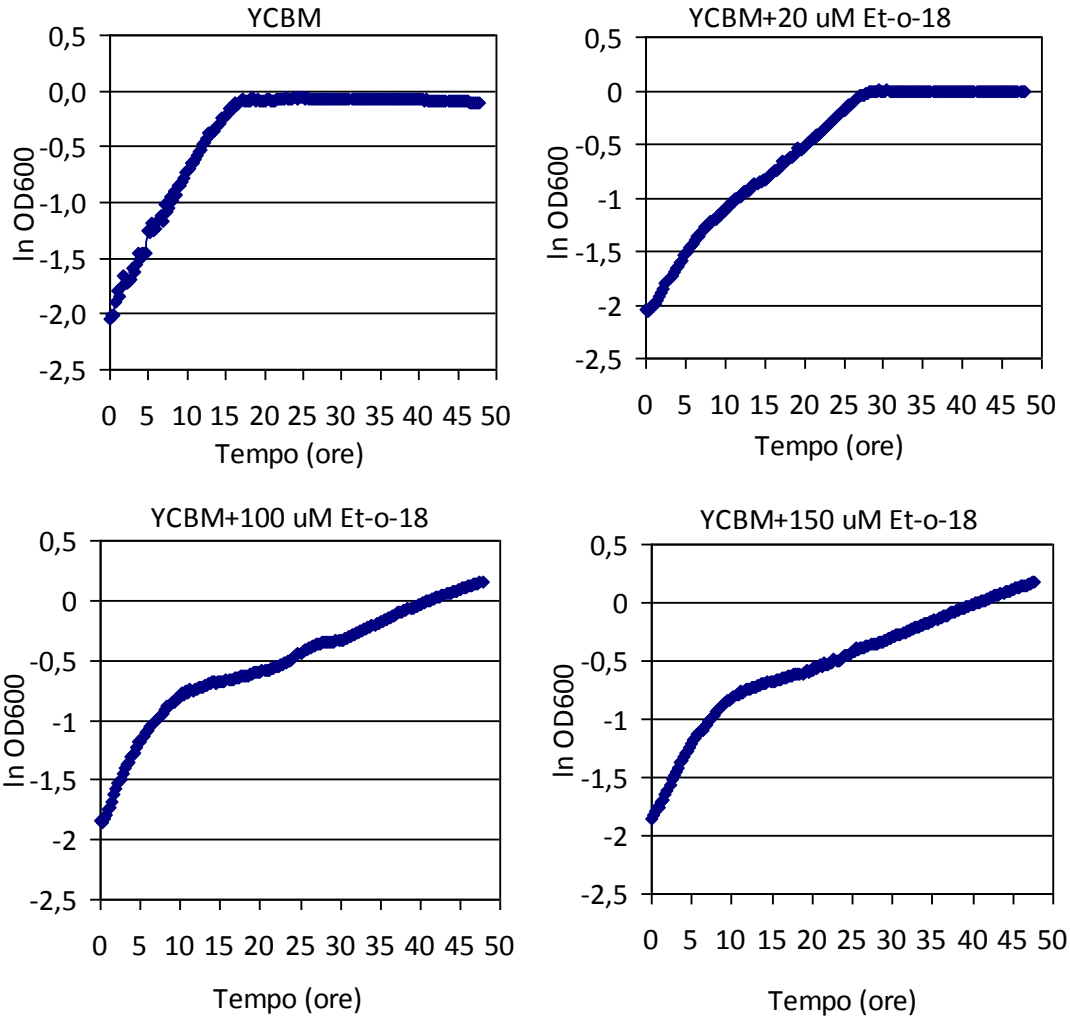


Figura 7. Curve di crescita di *P. fermentans* DiSAABA 726 su YCBM con concentrazioni crescenti di Et-o-18. La OD_{600} è stata valutata ad intervalli regolari di 15 minuti per 48 ore. I dati sono espressi come media ± deviazione standard di 4 replicati biologici indipendenti.

Tabella 3. Velocità di crescita di *P. fermentans* DiSAABA726 in YCBM contenente concentrazioni crescenti di Et-o-18.

Terreno colturale	Velocità specifica di crescita (h^{-1})	R^2
YCBM	0,11	0,99
YCBM + 20 µM Et-o-18	0,08	0,99
YCBM + 100 µM Et-o-18	0,10	0,99
YCBM + 150 µM Et-o-18	0,10	1,00

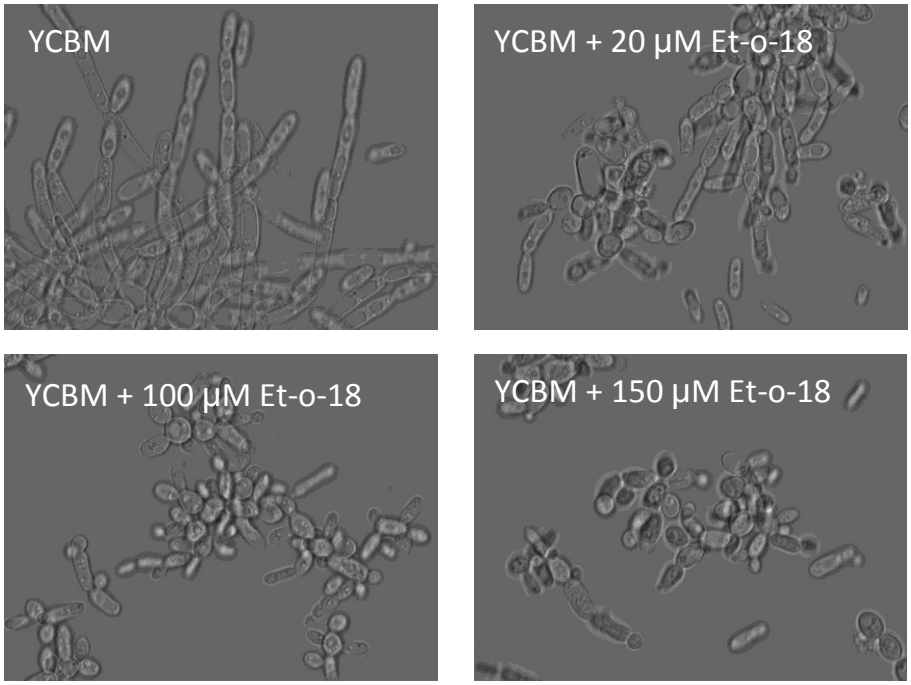


Figura 8. Morfologia di *P. fermentans* DiSAABA 726 su YCBM e YCBM addizionato di Et-o-18 in concentrazioni pari a 20 µM, 100 µM e 150 µM**.**

3.4 Discussione

La penetrazione meccanica delle superfici solide è più semplice per le cellule pseudoifali a causa sia della pressione generata dalla estremità delle ife sul tessuto sottostante (Gow et al., 2002), sia del fatto che l'estremità delle ife è il sito di secrezione di enzimi capaci di degradare proteine, lipidi e altri componenti cellulari in grado di facilitare la penetrazione dei lieviti in substrati solidi e tessuti (Hube et al., 2001; Palkova & Vachova, 2006). Nonostante ciò, in molti lieviti patogeni

dimorfici la morfologia invasiva è quella lievitiforme ad indicare che lo sviluppo pseudoifale non sempre può o deve essere associato alla patogenesi.

Nel caso di *P. fermentans* DiSAABA 726, Giobbe et al., (2007) hanno osservato che il comportamento patogeno di questo lievito si accompagna alla morfologia pseudoifale. Tuttavia, per dimostrare in maniera chiara e univoca l'esistenza di una relazione tra crescita pseudoifale e patogenicità in *P. fermentans* DiSAABA 726 occorre contribuire alla delucidazione dei meccanismi molecolari alla base del dimorfismo e alla individuazione dei geni coinvolti nella transizione lievito/pseudoifa. Per questo, una volta individuate le condizioni nutrizionali e colturali che consentono di indurre e separare la morfologia lievitiforme da quella pseudoifale (capitolo 2) si è proceduto con la ricerca dei geni sovraespressi nella morfologia pseudoifale.

La scarsità di strumenti molecolari disponibili per *P. fermentans* DiSAABA 726, ha imposto la scelta della metodica da utilizzare per la ricerca di geni differenzialmente espressi e, sulla base delle esperienze riportate da altri autori si è deciso di optare per la RaSH (Jiang et al., 2000; Scherm et al., 2009). Questa è una metodica piuttosto complessa, che prevede numerosi passaggi e altrettante purificazioni del cDNA, con conseguenti perdite di materiale genetico. Inoltre, le condizioni prescritte per l'ibridazione del cDNA del tester e del driver (rapporto 1:30) risultano nella produzione di una popolazione eterogenea di frammenti nella quale quelli differenzialmente espressi dal tester sono certamente sottorappresentati. A questo consegue una bassa efficienza di ligazione e di trasformazione. Nonostante ciò, l'applicazione della tecnica ha consentito di ottenere una banca di cDNA costituita da 349 cloni e di individuare 12 sequenze geniche che, in analogia a quanto riportato da Scherm et al. (2009), sono espresse maggiormente, ma non esclusivamente, nella morfologia pseudoifale. Quattro dei 12 cloni mostravano più dell'80% di identità di sequenza con geni codificanti proteine coinvolte nella sintesi proteica. Questo risultato sembra compatibile con un aumento della sintesi proteica, necessario per la riorganizzazione strutturale e funzionale delle cellule durante la transizione dimorfica.

Considerato che in *C. albicans* il sistema mitocondriale di trasporto degli elettroni, di cui il citocromo C è parte integrante, è coinvolto nella crescita ifale (Watanabe et al., 2006), anche in *P. fermentans* DiSAABA 726 può essere plausibile il coinvolgimento del citocromo C nella formazione di pseudoife.

Anche il coinvolgimento della sequenza prg6 che mostra il 72% di identità con *SUN41*, codificante una putativa glicosidasi di parete di *C. albicans* può essere spiegato sulla base dei risultati riportati da altri autori. Infatti CaSun41p così come il suo omologo in *S. cerevisiae*, codifica una glicosidasi coinvolta in importanti processi cellulari quali citocinesi, formazione della parete cellulare, adesione al tessuto ospite e formazione di biofilm (Mouassite et al., 2000; Hiller et al., 2007, Norice et al., 2007). Inoltre, il mutante *SUN41*Δ di *C. albicans* non è in grado di formare ife su terreni solidi (Hiller et al; 2007).

Non è invece possibile al momento formulare ipotesi sul coinvolgimento della putativa aldoso1-epimerasi nella transizione dimorfica.

Di grande interesse è stato l'isolamento delle sequenze prg1, prg2, prg3, prg4 e prg5, che mostrano identità di sequenza con il gene codificante la fosfolipasi C (CaPLC1) di *C. albicans*. Infatti, sia la frequenza con la quale la putativa fosfolipasi C è stata ritrovata nella popolazione di cloni, sia la funzione di questa proteina in *C. albicans* e *S. cerevisiae*, suggeriscono il suo potenziale coinvolgimento durante la transizione dimorfica in *P. fermentans* DiSAABA 726. In *C. albicans* ridotti livelli di espressione di questo gene determinano difetti nella crescita filamentosa (Kunze et al., 2005). In *S. cerevisiae* la fosfolipasi C interagisce con il recettore Gpr1p e controlla la transizione dimorfica attraverso la via di trasduzione del segnale cAMP-PKA (Ansari et al., 1999). A causa della mancanza di strumenti molecolari da utilizzare in *P. fermentans* DiSAABA 726 l'unico modo per valutare il coinvolgimento della presunta fosfolipasi C nella transizione dimorfica di *P. fermentans* DiSAABA 726 è stato l'utilizzo dell'Et-o-18 (Kunze et al., 2005). In effetti l'Et-o-18 interferisce con la formazione di pseudoife in *P. fermentans* DiSAABA 726 in crescita su YCBM, a confermare il coinvolgimento della fosfolipasi C nella transizione pseudoifale.

3.5 Bibliografia

Adams MD, Kelley JM, Gocayne JD, Dubnick M, Polymeropoulos MH, Xiao H, Merril CR, Wu A, Olde B, Moreno RF, Kerlavage AR, McCombie WR, Venter JC (1991) Complementary DNA Sequencing: Expressed Sequence Tags and Human Genome Project. *Science* 252: 1651-1656.

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389–3402.

Ansari K, Martin S, Farkasovsky M, Ehbrecht IM, Kuntzel H (1999) Phospholipase C Binds to the Receptor-like *GPR1* Protein and Controls Pseudohyphal Differentiation in *Saccharomyces cerevisiae. jbc* 274: 30052–30058.

Bartolozzi F, Warburton ML, Arulsekar S, Gradziel TM (1998) Genetic characterization and relatedness among California almond cultivars and breeding lines detected by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *J Am Soc Hort Sci* 123: 381–387.

Diatchenko, L, Lau YFC, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov E, Siebert D (1996) Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 6025–6030.

Fambrough D, McClure K, Kazlauskas A, Lander ES (1999) Diverse signaling pathways activated by growth factor receptors induce broadly overlapping, rather than independent, sets of genes. *Cell* 97: 727–741.

Giobbe S, Marceddu S, Scherm B, Zara G, Mazzarello V, Budroni M, Migheli Q (2007) The strange case of a biofilm-forming strain of *Pichia fermentans* which controls *Monilinia* brown rot on apple but is pathogenic on peach fruit. *Fems Yeast Res* 7: 1389–1398.

Gow NAR, Brown AJP, Odds FC (2002) Fungal morphogenesis and host invasion. *Curr Opin Microbiol* 5: 366-371.

Herfort MR, Garber AT (1991) Simple and efficient subtractive hybridization screening. *BioTechniques* 11: 598–603.

Hiller E, Heine S, Brunner H, Rupp S (2007) *Candida albicans* Sun41p, a Putative Glycosidase, Is Involved in Morphogenesis, Cell Wall Biogenesis, and Biofilm Formation. *Eukaryotic cell* 6: 2056–2065.

Hubank M, Schatz DG (1994) Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acids Res* 22: 5640–5648.

Hube B, Naglik J (2001) *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiol* 147: 1997-2005.

Iyer VR, Eisen MB, Ross DT, Schuler G, Moore T, Lee JCF, Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M (1996) The transcriptional program in the response of human fibroblasts amide gelsto serum. *Science* 283: 83–87.

Jiang H, Fisher PB (1993) Use of a sensitive and efficient subtraction hybridization protocol for the identification of genes differentially regulated during the induction of differentiation in human melanoma cells. *Mol Cell Different* 1: 285–299.

Jiang H, Kang DC, Alexandre D, Fisher PB (2000) RaSH, a rapid subtraction hybridization approach for identifying and cloning differentially expressed genes *PNAS* 97: 12684–12689.

Jiang H, Su ZZ, Boyd J, Fisher PB (1993) Gene expression changes associated with reversible growth suppression and the induction of terminal differentiation in human melanoma cells. *Mol Cell Different* 1: 41–66.

Kunze D, Melzer I, Bennet D, Sanglard D, MacCallum D, Norskau J, Coleman DC, Odds FC, Schafer W, Hube B (2005) Functional analysis of the phospholipase C gene *CaPLC1* and two unusual phospholipase C genes, CaPLC2 and CaPLC3*,* of *Candida albicans*. *Microbiol* 151: 3381-3394.

Liang P, Pardee AB (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257: 967–971.

Mouassite M, Camougrand N, Schwob E, Demaison G, Laclau M, Guerin M (2000) The “SUN” family: yeast *SUN4/SCW3* is involved in cell septation. *Yeast* 16: 905–919.

Norice CT, Smith FJ Jr, Solis N, Filler SG, Mitchell AP (2007) Requirement for *Candida albicans* Sun41 in Biofilm Formation and Virulence. *Eukaryot cell* 6: 2046–2055.

Palkova Z, Vachova L (2006) Life within a community: benefit to yeast long-term survival. *FEMS Microbiol Rev* 30: 806–824.

Reddy PG, Su ZZ, Fisher PB (1993) Chromosomes and Genetic Analysis*:* Methods in Molecular Genetics*,* ed. Adolph KW Academic Press Inc Orlando FL 1: 68–102.

Rubenstein JLR, Brice AEJ, Ciaranello RD, Denney D, Porteus MH, Usdin TB (1990) Subtractive hybridization system using single-stranded phagemids with directional inserts. *Nucleic Acids Res* 18: 4833–4842.

Sagerstrom CG, Sun BI, Sive HL (1997) Subtractive Cloning: Past, Present, and Future. *Annu Rev Biochem* 66: 751-783.

Sanchez-Martinez C, Perez-Martin J (2001) Dimorphism in fungal pathogens: *Candida albicans* and *Ustilago maydis* – similar inputs, different outputs. *Curr Opin Microbiol* 4: 214-221.

Saville SP, Lazzell AL, Monteagudo C, Lopez-Ribot JL (2003) Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection. *Eukaryot Cell* 2: 1053-60.

Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270: 467–470.

Scherm B, Schmol M, Balmas V, Kubicek CP, Migheli Q (2008) Identification of potential marker genes for *Trichoderma harzianum* strains with high antagonistic potential against *Rhizoctonia solani* by a rapid subtraction hybridisation (RaSH) approach. *Curr Genet* 55: 81–91.

Shen R, Su Z, Olsson CA, Fisher PB (1995) Identification of the Human prostatic carcinoma oncogene PTI-1 by rapid expression cloning and differential RNA display. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 6778–6782.

Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW (1995) Serial analysis of gene expression. *Science* 270: 484-487.

Watanabe T, Ogasawara A, Mikami T, Matsumoto T (2006) Hyphal formation of *Candida albicans* is controlled by electron transfer system. *Biochem Biophys Res Commun* 348: 206-211.

Zhang L, Zhou W, Velculescu VE, Kern SE, Hruban RH, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW (1997) Gene expression profiles in normal and cancer cells. *Science* 276: 1268-1272.

4. Ipotesi sul ruolo della metionina e della fosfolipasi C nella transizione dimorfica di *P. fermentans* DiSAABA 726

Lo studio della letteratura riguardante la transizione dimorfica in *C. albicans* e in *S. cerevisiae* e i risultati qui presentati, consentono di avanzare alcune ipotesi sulla regolazione della morfogenesi in *P. fermentans* e in particolare sul coinvolgimento della metionina e sul ruolo della fosfolipasi C nella transizione lievito/pseudoifa.

Il fatto che il metionolo accentui la formazione di pseudoife in carenza di fonti azotate (SLAD), suggerisce che la metionina induca la formazione di pseudoife attraverso i prodotti del suo catabolismo. In altre parole, la produzione di metionolo dovuta alla dissimilazione della metionina attraverso la via di Erlich, può essere una essere una delle cause della transizione dimorfica di *P. fermentans* su terreni colturali poveri di azoto.

Tuttavia, il fatto che in *P. fermentans* l'inibizione della fosfolipasi C risulti nella inibizione della formazione di pseudoife su terreno colturale contenente metionina come unica fonte azotata, porta ad ipotizzare anche un altro meccanismo.

In *S. cerevisiae* la fosfolipasi C media l'interazione tra il recettore di membrana Gpr1p e la proteina G Gpa2p che attiva la via di trasduzione del segnale cAMP-PKA. Questa a sua volta attiva la trascrizione dei geni coinvolti nella crescita pseudoifale (Ansari et al., 1999). In *S. cerevisiae* il recettore Gpr1p rileva la concentrazione extracellulare di glucosio, ma funziona anche come sensore di azoto quando la cellula si trova in carenza di fonti azotate. Quindi la carenza di azoto scatena la crescita pseudoifale attraverso la via di trasduzione del segnale cAMP-PKA attivata dal sistema Gpr1p-Plc1p-Gpa2p (Figura 1)

In *C. albicans* il recettore di membrana Gpr1p lega la metionina che, attraverso l'interazione con la proteina G Gpa2p, attiva la via di trasduzione del segnale cAMP-PKA che a sua volta attiva la trascrizione dei geni coinvolti nella crescita pseudoifale (Kunze et al., 2005) (Figura 1).

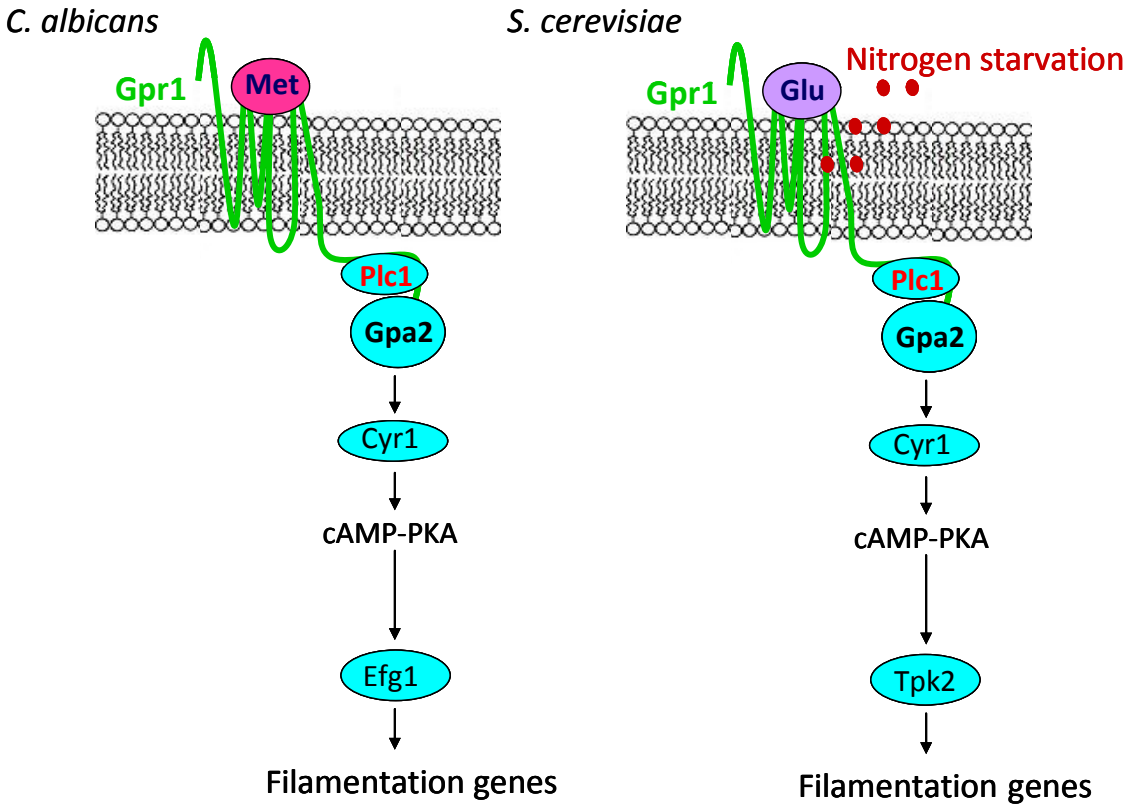


Figura 1. Meccanismo di rilevazione di: A) metionina in *C. albicans* e B) glucosio e fonti azotate in *S. cerevisiae.* Adattato da Ansari et al. (1999).

Sulla base di queste evidenze è possibile ipotizzare che anche in *P. fermentans* DiSAABA 726 così come in *S. cerevisiae* e in *C. albicans* esista un recettore omologo a Gpr1p in grado di rilevare la presenza della metionina e di interagire con la proteina G Gpa2p attraverso la fosfolipasi C, attivando la via di trasduzione del segnale cAMP-PKA (Figura 2). L'inibitore della fosfolipasi C (Et-o-18) inibisce la formazione di pseudoife a confermare il ruolo di questa proteina nella transizione dimorfica di *P. fermentans* DiSAABA 726. La fosfolipasi C è quindi un bersaglio molecolare utilizzabile per verificare se la formazione di pseudoife in questo lievito sia sempre associata alla patogenicità. Se così fosse, la capacità di un lievito di transitare da una morfologia lievitiforme a una pseudoifale sarebbe da considerare tra i fattori di rischio associati all'uso di antagonisti microbici.

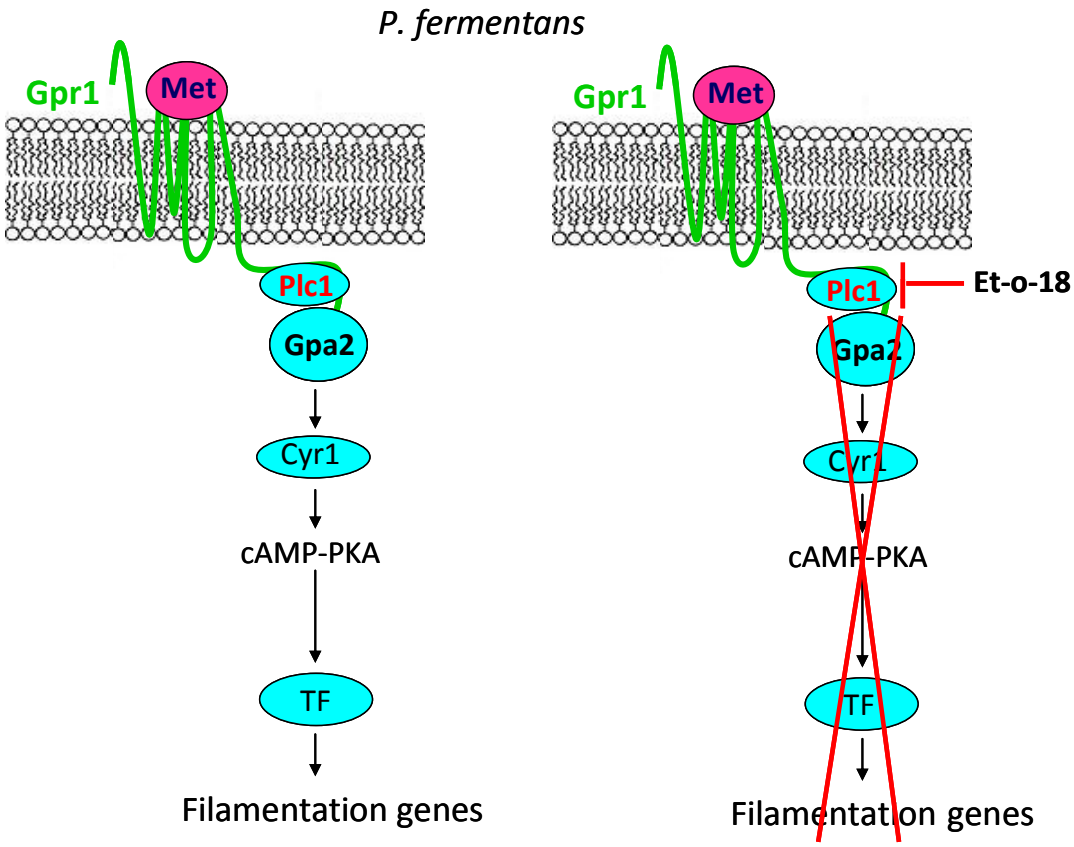


Figura 2. Ruolo ipotizzato per la metionina e la fosfolipasi C nella transizione dimorfica di *P. fermentans* DiSAABA 726. Et-o-18 inibitore della fosfolipasi C. TF fattore della trascrizione.