



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 XXIII

*Pichia angusta* e *Pichia fermentans*: due modelli per lo studio  
dell'interazione antagonistica tra lieviti, frutti e patogeni in  
post-raccolta

Stefano Fiori

*Direttore della Scuola:* prof. Giuseppe Pulina

*Referente di Indirizzo:* prof.ssa Marilena Budroni

*Docenti Guida:* prof. Quirico Migheli  
prof.ssa Marilena Budroni

*Docente tutor:* dott.ssa Barbara Scherm

## INDICE

<b>1. Introduzione</b> .....	4
<b>1.1. Introduzione alla lotta biologica</b> .....	4
1.1.1. La lotta biologica.....	4
1.1.2. Meccanismi d'azione.....	6
1.1.2.1. Micoparassitismo.....	7
1.1.2.2. Antibiosi.....	8
1.1.2.3. Competizione.....	9
1.1.2.4. Induzione di resistenza.....	10
1.1.3. L'antagonista ideale.....	10
<b>1.2. I lieviti</b> .....	12
1.2.1. Generalità.....	12
1.2.2. Applicazioni biotecnologiche dei lieviti.....	13
1.2.3. Lieviti come agenti antagonisti.....	14
1.2.4. Dimorfismo e patogenicità nei lieviti.....	17
<b>2. Scopo della tesi</b> .....	19
<b>3. <i>Pichia angusta</i> è un efficace lievito antagonista contro il marciume in post-raccolta delle mele causato da <i>Botrytis cinerea</i> e <i>Monilia fructicola</i></b> .....	20
<b>3.1. Introduzione</b> .....	20
<b>3.2. <i>Pichia angusta</i> is an effective biocontrol yeast against postharvest decay of apple fruit caused by <i>Botrytis cinerea</i> and <i>Monilia fructicola</i></b> .....	21

<b>4. <i>Pichia fermentans</i>: identificazione dei geni differenzialmente espressi da un ceppo dimorfico, antagonista su mela ma patogeno su pesca</b> .....	24
<b>4.1. Introduzione</b> .....	24
<b>4.2. Identification of genes differentially expressed by a dimorphic strain of <i>Pichia fermentans</i>, antagonistic on apple but pathogenic on peach fruit</b> .....	26
<b>5. Conclusioni</b> .....	40
<b>6. Bibliografia</b> .....	48

## 1. Introduzione

### 1.1. Introduzione alla lotta biologica

#### 1.1.1. La lotta biologica

La specializzazione delle colture basata su un numero limitato di specie coltivate su larghe aree, tipica dell'agricoltura moderna, ha favorito lo sviluppo di ecosistemi particolarmente suscettibili alla diffusione di malattie epidemiche. Per malattia si intende l'interazione che si sviluppa tra patogeno, pianta ed ambiente, compresi tutti gli organismi ad esso associati e conosciuti come affiliati (Matta, 1996; Agrios, 2005). Da tempo immemore l'uomo ha cercato di sviluppare misure di difesa appropriate per prevenire e combattere tali malattie in modo da ridurre, il più possibile, le perdite nel raccolto.

La lotta alle malattie biotiche delle piante è basata su tre possibili interventi, che possono integrarsi tra loro:

- interventi indiretti volti a modificare, tramite le tecniche colturali, l'habitat in cui vive il vegetale, al fine di sfavorire il patogeno;
- interventi diretti sull'ospite vegetale, per renderlo più resistente al patogeno, ad esempio con il miglioramento genetico;
- interventi diretti sul parassita, per debellarlo ancor prima che instauri rapporto con l'ospite, o anche quando questo si sia già verificato.

Dalla seconda metà dell'ultimo secolo la difesa delle piante dai loro parassiti si è basata, prevalentemente, sull'uso di anticrittogamici di sintesi che, se da un lato portavano ad un sostanziale incremento del raccolto, hanno col tempo provocato diversi effetti collaterali sfavorevoli, come l'inquinamento ambientale, lo scompenso negli equilibri biologici, lo sviluppo di specie resistenti agli stessi prodotti di sintesi ed effetti dannosi sulla salute umana. Questi problemi hanno sollecitato la ricerca dell'identificazione di tecniche alternative per la difesa delle produzioni, e la lotta biologica è una di quelle che ha trovato maggiori consensi ed applicazioni.

Nel 1991 Smith fu il primo a coniare il termine "lotta biologica" riferendosi all'uso di insetti esotici per contrastare la presenza di insetti dannosi locali; molti

studiosi in seguito hanno dato diverse definizioni di lotta biologica: ad esempio per Baker e Cook (1974) la lotta biologica è “*la riduzione della densità di inoculo o delle attività patogeniche del patogeno o del parassita nel suo stato attivo dormiente, ottenuta attraverso l’impiego di uno o più organismi, sia naturalmente, che attraverso la manipolazione dell’ambiente, dell’ospite o dell’antagonista, od attraverso l’introduzione massale di uno o più organismi*”.

Nel 1983 gli stessi autori modificarono tale definizione descrivendo la lotta biologica come “*la riduzione della densità di inoculo o delle attività patogeniche del patogeno ottenuta per mezzo di uno o più organismi diversi dall’uomo*”.

Per organismi diversi dall’uomo si intendevano ceppi avirulenti o ipovirulenti dello stesso patogeno e l’ospite reso meno suscettibile attraverso il miglioramento genetico e le pratiche agronomiche, o ancora grazie all’attività di microrganismi associati. Nello stesso anno Deacon (1983) precisò che la lotta biologica si attuava anche con l’introduzione, nell’ambiente preso in considerazione, di un altro organismo che non fosse la pianta ospite, il patogeno o l’uomo. Tale organismo, che può essere un microrganismo (fungo o batterio), viene indicato con il termine di “antagonista”, ed agisce contrastando il patogeno “bersaglio”, interferendo con il suo ciclo biologico o sviluppandosi a sue spese (Baker e Cook, 1974).

Ad esempio, batteri appartenenti al genere *Bacillus* (Swalding e Jeffries, 1998) e *Pseudomonas* (Janisiewicz *et al.*, 1992) sono capaci di azione antagonista contro diversi funghi patogeni delle piante, ma anche alcune specie fungine sono in grado di limitare la diffusione di patogeni.

L’antagonismo rappresenta dunque l’opposizione allo sviluppo del patogeno e si esplica con diversi meccanismi, che possono manifestarsi anche contemporaneamente. Tra questi ricordiamo il micoparassitismo, l’antibiosi e la competizione per spazio e nutrienti, ed anche forme dirette di sfruttamento del patogeno quali predazione e iperparassitismo.

Nell’ambito della lotta biologica va evidenziata anche la combinazione di antagonisti, quando cioè si utilizzano due o più microrganismi per ottenere un effetto antagonista maggiore di quanto ottenibile con la somma di singoli interventi (effetto sinergico): ad esempio si sono ottenuti risultati apprezzabili

contro la fusariosi combinando l'azione antagonista di *Fusarium oxysporum* non patogeno (ceppo Fo47) con quella di *Pseudomonas fluorescens* (ceppo C7) (Olivain *et al.*, 2004).

Il concetto di lotta biologica ben si integra con quello di lotta integrata che si pone come fine non la completa “distruzione” del patogeno ma il suo “contenimento” entro determinati limiti di tolleranza economica, utilizzando quindi tutte le tecniche fitoiatriche disponibili (con priorità per i fattori limitanti naturali quali microrganismi parassitoidi e predatori) per mantenere le popolazioni dannose al di sotto di densità tali da arrecare danno economico alle produzioni (Amano e Haseeb, 2001).

La lotta biologica rappresenta un'efficace alternativa all'utilizzo dei fungicidi di sintesi (Janisiewicz e Korsten, 2002; Passoth *et al.*, 2006), dannosi per la salute dell'uomo e spesso sempre meno attivi a causa dell'insorgere di ceppi patogeni resistenti a questi, non soltanto in campo ma anche durante la conservazione di frutta fresca per evitare le malattie del post-raccolta causate da una ampia varietà di funghi patogeni (Barkai - Golan, 2001).

Diversi autori hanno, infatti, dimostrato che la presenza di diverse specie tra la microflora della superficie dei frutti e delle parti aeree delle piante può prevenirne il deterioramento causato dai funghi, svolgendo un'azione di contenimento biologico: eliminando questa microflora con ripetuti lavaggi dei frutti, questi diventavano molto più suscettibili ai marciumi rispetto alla frutta non lavata (Blakeman e Fokkema, 1982; Chalutz e Wilson, 1990; Arras *et al.*, 2002). Nel 1985, Wilson and Pusey furono i primi ad evidenziare le potenzialità della lotta biologica contro i patogeni della frutta in post-raccolta, mettendo in evidenza come un ceppo di *Bacillus subtilis* fosse in grado di controllare lo sviluppo del marciume bruno su pesca causato da *Monilinia fructicola* (Droby *et al.*, 2009).

### 1.1.2. Meccanismi d'azione

I meccanismi d'azione dei microrganismi agenti di contenimento biologico nel post raccolta non sono stati ancora completamente spiegati: tra i meccanismi finora proposti sono stati individuati il micoparassitismo (Matta, 1996), l'antibiosi (Blakeman e Fokkema, 1982), la competizione per spazio e nutrienti (Chand-

Goyal e Spotts, 1996; Spadaro *et al.*, 2002; Restuccia *et al.*, 2006), la formazione di biofilm (Scherme *et al.*, 2003) ma anche l'induzione di resistenza del frutto e della pianta (Yao e Tian, 2005). Grazie a questi meccanismi gli agenti di contenimento biologico sono in grado di colonizzare la superficie dei frutti a discapito di altri organismi patogeni anche nel post raccolta (Karabulut *et al.*, 2001; Tian *et al.*, 2004). La distinzione fra i vari meccanismi è comunque piuttosto teorica, in quanto spesso più meccanismi possono essere coinvolti simultaneamente (Janisiewicz e Korsten, 2002).

#### 1.1.2.1. Micoparassitismo

Con questo termine si fa riferimento ad una serie di alterazioni sulle ife e sugli sclerozi dei funghi fitopatogeni, dovute alla penetrazione, alla lisi e all'avvolgimento provocati da un fungo antagonista. Questo si può verificare tramite un attacco biotrofico durante il quale l'antagonista, grazie all'utilizzo di austori si nutre della cellula ospite, o tramite attacco necrotrofico, durante il quale l'organismo parassita rilascia enzimi in grado di degradare la parete cellulare del patogeno prima di poterlo invadere. Alcuni lieviti possono aderire, per poi parassitizzarle, alle ife del patogeno (Wisniewski *et al.*, 1991) producendo chitinasi ed altri enzimi capaci di causare la lisi della parete cellulare dei funghi o di quella dei batteri patogeni (Matta, 1996). Ad esempio diverse specie del genere *Pichia* sono in grado di limitare lo sviluppo di *Botrytis cinerea* producendo  $\beta$ -1,3 glucanasi (Masih e Paul, 2002). Questi fenomeni sono stati osservati quasi esclusivamente in laboratorio ed è piuttosto difficile accertarne l'effettiva efficienza in condizioni naturali. Affinché questo meccanismo d'azione si possa manifestare è comunque necessario lo sviluppo seppur limitato del patogeno che costituisce il substrato nutrizionale del fungo antagonista micoparassita. L'interazione tra i micoparassiti e i loro funghi bersaglio si articola in quattro fasi:

- 1) la crescita chemiotropica, durante la quale l'antagonista è attratto da un segnale chimico emesso dal patogeno;
- 2) il riconoscimento specifico mediato da lectine presenti sulla superficie cellulare del patogeno;

- 3) il contatto e lo sviluppo del parassita attorno alle ife dell'ospite patogeno;
- 4) la secrezione di enzimi litici, da parte del parassita che degradano la parete cellulare dell'ospite.

Gli enzimi rilasciati una volta che il contatto si è verificato (chitinasi, glucanasi, proteasi e lipasi), così come antibiotici quali i peptaiboli (Schirmbock *et al.*, 1994), riducono le possibili reazioni di difesa del patogeno, il cui lume cellulare viene penetrato dall'antagonista che ne ricava quindi i nutrienti.

#### 1.1.2.2. Antibiosi

Questo termine fa riferimento alla produzione da parte di un microorganismo non patogeno (fungo o batterio) di sostanze antibiotiche che svolgono un'azione dannosa nei confronti di organismi patogeni (Sivasithamparam e Ghisalberti, 1991; Arras e Maltoni, 2004). Gli antibiotici e gli antimicotici si dividono principalmente in due categorie:

- antibiotici volatili, che svolgono un ruolo chiave nelle relazioni ecologiche tra gli organismi (Mowe, 1984; Hamilton-Kemp *et al.*, 1992; Andersen *et al.*, 1994). Alcuni di questi composti sono capaci di inibire la crescita di diversi patogeni delle piante. Infatti Bruce *et al.* (1984) dimostrarono che alcuni composti volatili erano da soli responsabili dell'inibizione e della lisi delle cellule del patogeno, avendo escluso con accurata indagine al microscopio l'interazione ifale e la penetrazione del micelio. E' stato inoltre dimostrato che la produzione di composti volatili è strettamente correlata al terreno di crescita: terreni ricchi di nutrienti determinano una produzione di un numero più ampio e di una maggior quantità di ciascun composto volatile (Wheatley *et al.*, 1997).

- antibiotici non volatili: anch'essi molto importanti per l'azione antagonista, consistono in peptidi idrofobici, estraibili in ambiente acquoso. E' stato dimostrato che l'iturina, prodotta da *Bacillus subtilis* (Gueldner *et al.*, 1988), e la pirrolnitrina, prodotta da *Pseudomonas cepacia* (Janisiewicz *et al.*, 1988), sono capaci di ridurre, *in vitro*, la germinazione dei conidi del patogeno delle drupacee *M. fructicola* e di quelli delle pomacee *Penicillium expansum* e *B. cinerea*.

### 1.1.2.3. Competizione

La soddisfazione del fabbisogno nutrizionale del patogeno è un prerequisito fondamentale per permettere la colonizzazione di un frutto o di una pianta, quindi la competizione per lo spazio e i nutrienti può essere ragionevolmente considerata uno dei più importanti meccanismi di azione dei microrganismi antagonisti. La competizione comporta un effetto dannoso che un organismo può esercitare su un altro attraverso la rimozione o la sottrazione di spazio, ossigeno e nutrienti quali l'azoto, il carbonio ed il ferro necessari al patogeno per portare a termine il suo sviluppo ed eventualmente l'infezione; il contenimento del patogeno è quindi realizzato attraverso l'introduzione di microrganismi che competono con questo per lo spazio e i nutrienti, fattori limitanti sui frutti, sulle ferite delle piante, nella rizosfera e nei terreni di coltura. Quando l'antagonista è capace di superare il patogeno nell'approvvigionamento delle sostanze nutritive, quest'ultimo sarà limitato nel suo sviluppo a vantaggio della pianta ospite e la competizione sarà ovviamente tanto più forte quanto maggiore è la carenza dei nutrienti richiesti (Janisiewicz *et al.*, 2000).

Se però diversi microrganismi antagonisti sono in grado di limitare lo sviluppo dei patogeni sottraendo loro spazio e nutrienti, è possibile che tra antagonisti diversi possa crearsi un equilibrio, e che l'azione dell'uno non inibisca quella dell'altro, e che anzi la amplifichi. Diversi studi hanno, infatti, dimostrato che i microrganismi possono svolgere la loro azione di agenti di contenimento biologico delle malattie parassitarie non soltanto ove siano applicati singolarmente (Nuñez *et al.*, 2002, Calvo *et al.*, 2003, He *et al.*, 2003, Quin *et al.*, 2003; Torres *et al.*, 2005) ma anche in combinazione, svolgendo quindi un'azione antagonistica sinergica (Fukui *et al.*, 1999; Guetsky *et al.*, 2001; Nuñez *et al.*, 2002).

Tra i meccanismi d'azione recentemente proposti, in relazione alla competizione per lo spazio, c'è anche la capacità dei microrganismi di creare biofilm sulla superficie dei frutti e delle loro eventuali ferite, proteggendole quindi dall'attacco dei fitopatogeni (Scherin *et al.*, 2003; Ortu *et al.*, 2005).

#### 1.1.2.4. Induzione di resistenza

L'interazione tra ospite e patogeno può indurre reazioni di resistenza attraverso la produzione di elicitori, molecole che scatenano reazioni di ipersensibilità nella pianta. Questa è l'ultima risorsa di difesa attiva da parte della pianta ospite e consiste in una rapida risposta all'infezione, che si traduce in una necrosi del tessuto infetto, in modo da isolare il patogeno, grazie alla produzione di lignina e all'accumulo di fitoalessine (Matta, 1996).

E' stata anche evidenziata l'importanza di specie reattive dell'ossigeno (ROS) nelle risposte delle piante contro alcuni patogeni (Bolwell e Wojtaszek, 1997; Bolwell *et al.*, 1999, 2002) e si è anche osservato che alcuni microrganismi antagonisti possono indurre una consistente produzione di ROS nelle ferite della frutta, che portano a risposte di difesa, sia locali che sistemiche, contro i patogeni del post raccolta (Droby *et al.*, 2009; Macarasin *et al.*, 2010).

#### 1.1.3. L'antagonista ideale

Le restrizioni all'utilizzo di diversi fungicidi, imposte da molti Paesi, hanno ormai aperto interessanti prospettive all'utilizzo dei nuovi metodi di contenimento tramite microrganismi (Wilson e Wisniewski, 1989). Formulati di *Trichoderma* sono, ad esempio, utilizzati con successo come agenti antagonisti in agricoltura in varie parti del mondo (Migheli e Gullino, 1990; Daffonchio e Casella, 2008), ma nonostante questo le limitazioni e gli iter burocratici da affrontare per produrre e commercializzare antagonisti microbici sono ancora piuttosto farraginosi in diverse parti del mondo, tra cui l'Europa. Anche i costi per la ricerca scientifica e i test di sicurezza richiesti per la loro produzione e commercializzazione sono elevati e spesso le più grosse compagnie agronomiche non intravedono ancora profitti tali da spingere un aumento del loro impiego, relegando la loro produzione a compagnie più piccole che fanno fatica ad imporsi sul mercato, ancora orientato sulla produzione di agenti chimici (Droby *et al.*, 2009).

E' quindi importante sensibilizzare produttori e consumatori riguardo l'utilità e l'efficacia di questo metodo di lotta biologica, evidenziando il loro utilizzo in alternativa o come coadiuvanti dei fungicidi di sintesi riducendo quindi il loro impiego. Diversamente dal controllo delle malattie in campo, quello della malattie

del post raccolta deve essere estremamente efficace, con una riuscita commerciale del 95-98%, e al momento tale obiettivo può essere raggiunto solo affiancando ai microrganismi antagonisti con basse quantità di fungicidi di sintesi (Droby *et al.*, 2009).

Le principali caratteristiche che portano alcuni microrganismi a candidarsi quali antagonisti ideali sono: la stabilità genetica, l'efficacia a basse concentrazioni contro un ampio spettro di patogeni di differenti specie e cultivar vegetali, le richieste nutrizionali alquanto semplici, la sopravvivenza a differenti e avverse condizioni ambientali, la resistenza ai fungicidi più utilizzati con cui verranno a contatto una volta diffusi nell'ambiente e l'incapacità di produrre metaboliti secondari tossici per l'uomo e per le piante (Wilson *et al.*, 1994). Tutte queste caratteristiche, che influenzano positivamente la facilità di produzione diminuendone di conseguenza i costi, candidano diverse specie di lieviti tra i microrganismi antagonisti più interessanti, non soltanto perché tra i più efficaci contro i patogeni da debellare ma anche tra quelli meno pericolosi per la salute del consumatore. La loro efficacia può essere inoltre aumentata grazie alla possibilità di essere distribuiti in combinazione con additivi naturali, sali e acidi organici (Droby *et al.*, 1997, 2002) o sottoposti precedentemente a trattamenti fisici (Zheng *et al.*, 2008).

## 1.2. I lieviti

### 1.2.1. Generalità

I lieviti sono microrganismi eucarioti facenti parte del regno dei Funghi, con 1500 specie attualmente descritte, considerate l'1% di tutte le specie fungine (Kurtzman e Piškur, 2006). Sono microrganismi molto diffusi nell'ambiente, vengono isolati in associazione con il suolo (Botha, 2011) ma si riscontrano anche nelle acque marine (Kutty e Philip, 2008), diverse specie vivono sia sull'epidermide e sulle mucose dei mammiferi (Blanco e Garcia, 2008) sia nell'apparato digerente dei mammiferi (Chaucheyras-Durand *et al.*, 2008) e degli insetti (Gibson e Hunter, 2010). Vengono prevalentemente isolati però su superfici ricche di zuccheri: esempi più comuni sono i lieviti che si ritrovano sulla superficie della frutta o sugli essudati delle piante. I lieviti sono infatti organismi chemio-organotrofi in quanto utilizzano composti organici come fonte di energia e di carbonio. Il carbonio è ottenuto prevalentemente da esaccaridi, come glucosio e fruttosio, o da disaccaridi, come saccarosio e maltosio. Alcune specie sono in grado di metabolizzare anche alcoli, acidi organici e pentasaccaridi come il ribosio. Esistono specie di lieviti che richiedono ossigeno per la respirazione cellulare aerobica (aerobi obbligati), altre sono invece anaerobiche facoltative.

Diversamente dai batteri, infatti, non sono conosciute specie anaerobiche obbligate. La grandezza, così come la morfologia, delle cellule di lievito, che comunque misurano in media attorno ai 3-4  $\mu\text{m}$ , varia a seconda della specie e in relazione allo stato fisiologico della cellula stessa (Tibayrenca *et al.*, 2010). Le condizioni ottimali di pH per la loro crescita sono generalmente quelle neutre o leggermente acide, diverse specie infatti vanno incontro a stress in ambienti troppo acidi (Piper *et al.*, 2011), mentre i *range* di temperatura, entro i quali le cellule si sviluppano, variano parecchio a seconda delle specie; alcune riescono a svilupparsi con temperature limite di minimo  $-2^{\circ}\text{C}$  ed altre sino a temperature massime di  $45^{\circ}\text{C}$  (Arthur e Watson, 1976).

Nonostante alcune specie possano riprodursi sessualmente dopo meiosi, la maggior parte dei lieviti si moltiplica vegetativamente con un processo di divisione asimmetrica chiamato gemmazione. Tramite questo processo alcuni

lieviti, pur essendo organismi unicellulari, sono capaci di assumere un aspetto pluricellulare grazie alla formazione di catene di cellule gemmate, connesse le une con le altre, chiamate pseudoife o false ife, che rende l'organizzazione morfologica di tali lieviti simile a quella delle muffe (Kurtzman e Fell, 2005). Lo sviluppo pseudoifale consente al lievito una maggior mobilità e facilità nell'esplorazione dei substrati di crescita e nel raggiungere quindi i nutrienti necessari (Ceccato-Antonini e Sudbery, 2004). A prescindere dall'aspetto morfologico delle cellule, anche i lieviti, come tutti i microrganismi, si ritrovano in natura sotto la forma del più comune tipo di aggregazione cellulare, chiamato biofilm. Questo consiste in una sottile pellicola formata da migliaia di cellule tra loro aggregate, grazie alla secrezione di una matrice extracellulare in cui poi si ritrovano immerse (Nett e Andes, 2006), e tale struttura permette ai lieviti non soltanto una migliore capacità colonizzatrice dei substrati di crescita ma anche una maggior resistenza alle avversità ambientali (d'Enfert, 2006). La formazione di biofilm avviene in seguito alla secrezione di molecole *quorum sensing* da parte delle cellule stesse e che agiscono da induttori segnale che governano risposte fisiologiche e morfologiche a seconda dei cambiamenti della densità delle cellule, funzionando quindi come degli ormoni che possono influenzare il comportamento della popolazione del lievito (Sprague and Winans, 2006).

Si ipotizza inoltre che proprio la formazione di biofilm possa costituire un ulteriore meccanismo di antagonismo contro i patogeni della frutta nel post-raccolta, in quanto tale pellicola sembrerebbe coprire le ferite dei frutti proteggendole quindi dall'eventuale penetrazione degli austeri dei funghi patogeni (Scherf *et al.*, 2003; Ortu *et al.*, 2005).

### 1.2.2. Applicazioni biotecnologiche dei lieviti

Grazie alle loro proprietà fisiologiche, l'utilizzo dei lieviti è da sempre parte delle biotecnologie. La fermentazione degli zuccheri è la loro più antica e diffusa applicazione per la produzione di alimenti e bevande (pane, vino, birra, insaccati, formaggi ecc.) ma col tempo i lieviti sono diventati indispensabili anche per la produzione di farmaci, di nutraceutici e di combustibili (Österlund *et al.*, 2011).

Negli ultimi 15 anni però alcuni lieviti hanno assunto anche l'importantissima funzione di organismi modello per studi biologici e genetici riguardanti il ciclo della cellula, la sua divisione, il metabolismo, la replicazione del DNA e la sua ricombinazione, non soltanto in relazione ai lieviti stessi ma anche agli eucarioti superiori, incluso l'uomo, con cui hanno in comune diversi caratteri altamente conservati (Österlund *et al.*, 2011). Questo ha permesso di studiare anche la relazione evolutiva tra specie diverse, indagando, in base alla somiglianza delle sequenze, sul grado di conservazione dei geni o delle proteine, o individuando interi *pathway* metabolici che potrebbero essere conservati o mancanti a seconda delle specie in esame (Österlund *et al.*, 2011).

L'esempio principale è quello di *Saccharomyces cerevisiae*, il primo eucariote ad avere il proprio genoma, costituito da 12.000.000 paia di basi, completamente sequenziato (Goffeau *et al.*, 1996) e che grazie a tali conoscenze biomolecolari (unite a quelle cellulari) e alle diverse tecniche genetiche applicabili efficacemente su un organismo così facile da coltivare in laboratorio, ha permesso di individuare importanti principi riguardanti la biologia, l'ecologia e l'evoluzione degli eucarioti (Landry *et al.*, 2006).

### 1.2.3. Lieviti come agenti antagonisti

I lieviti possono essere utilizzati anche come agenti antagonisti contro differenti tipi di marciumi causati da patogeni (Wisniewski *et al.*, 2007), e questa loro attività generalmente non dipende dalla produzione di metaboliti tossici, che potrebbero avere un impatto negativo per l'ambiente o per gli animali (Smilanick *et al.*, 1994; Spadaro *et al.*, 2002), ma dalla loro abilità di sopravvivere sulla superficie dei frutti e di colonizzare velocemente loro eventuali ferite, competendo con i patogeni per lo sfruttamento di spazio e nutrienti (Janisiewicz e Korsten, 2002). E' stato ipotizzato che altri meccanismi di antagonismo coinvolti nel processo facciano riferimento alla produzione di idrolasi o altri enzimi extracellulari, all'induzione di una risposta di resistenza da parte della pianta ospite (Wisniewski *et al.*, 2007), finanche alla formazione di biofilm capaci di coprire, proteggendole, le ferite dei frutti (Severinatne *et al.*, 2008; Scherm *et al.*, 2003).

Al momento però non sono ancora molti i prodotti per il post-raccolta a base di lievito ad esser stati registrati e quindi utilizzati regolarmente; è il caso di “Biosave” (*Pseudomonas syringae*), registrato in USA e utilizzato per controllare le malattie di patata e patata dolce (Stockwell and Stack, 2007), e di “Shemer” (*Metschnikowia fructicola*), registrato in Israele e utilizzato contro le malattie nel post-raccolta di carota e patata dolce (Kurtzman e Droby, 2001; Blachinsky et al., 2007).

Tuttavia sono ancora pochi gli studi volti a verificare l’influenza dei processi di produzione del formulato commerciale (disidratazione, aggiunta di adesivi o emulsionanti) sulla efficacia dei lieviti antagonisti (Droby *et al.*, 2009) e la stabilità della attività antagonistica in campo o nei siti di post-raccolta. E, soprattutto, rimangono ancora inesplorati, a livello molecolare, la maggior parte dei meccanismi di antagonismo proposti e questa mancanza di informazioni, unita ad una ancora non chiara relazione tra il complesso antagonista-patogeno-ospite, può tradursi in una considerevole limitazione nella scelta e nella selezione degli antagonisti.

Una profonda conoscenza della biologia e del comportamento dei lieviti, così come le loro interazioni con ospiti e patogeni è infatti essenziale per valutare il loro potenziale, non solo come efficaci antagonisti ma anche come organismi sicuri da diffondere nell’ambiente ad elevate concentrazioni. Non è da sottovalutare infatti lo scetticismo che molti agricoltori e consumatori nutrono nei confronti della lotta biologica e quindi nell’utilizzare microrganismi ad alte concentrazioni su frutta e ortaggi da consumare freschi, e che verrebbero quindi ingeriti, nonostante si tratti di antagonismi non geneticamente modificati che vengono selezionati proprio dall’epicarpo dei frutti (fanno già parte della microflora epifitica e quindi vengono già ingeriti) e la loro densità sulla superficie dei frutti si riduca ai normali livelli, concentrandosi prevalentemente su eventuali ferite, nel giro di pochi giorni (Droby *et al.*, 2009).

Tuttavia non si può dare per scontata l’ipotesi che tutto ciò che è naturale sia allo stesso tempo sano e sicuro, e per questo motivo gli antagonisti prescelti dovrebbero essere completamente valutati sotto il profilo del potenziale rischio biologico prima della loro registrazione e del loro impiego come agenti di lotta

(Gullino, 2005; Migheli, 2001). Per rischio si intendono tutte quelle conseguenze indesiderate di una particolare attività in relazione alla probabilità che queste possano verificarsi ma non essendo standardizzato, per quanto riguarda i microrganismi, un metodo scientifico che permetta la valutazione sistematica dei possibili pericoli correlati al loro utilizzo i produttori di agenti antagonisti fanno riferimento al regolamento 1107/2009/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio, che ha modificato la precedente direttiva europea 91/414/CE, che regola la commercializzazione di tutti i prodotti utilizzati per la protezione della piante e prescrive tutti i test a cui deve essere sottoposto un microrganismo per poter essere registrato (Migheli, 2001).

Tra i possibili effetti negativi da considerare nella valutazione del rischio biologico associato all'uso dei microrganismi ci sono l'allergenicità e la tossicità nei confronti dell'uomo e di altri animali, le mutazioni genetiche a seguito di trasferimenti orizzontali di geni da specie a specie, che potrebbe favorire resistenze o imprevedibili e incontrollabili comportamenti, la possibile presenza all'interno di una specie apparentemente antagonista di popolazioni patogene per le piante, per l'uomo o altri microrganismi e la possibilità che un potenziale antagonista, innocuo per il suo ospite target, possa comportarsi da patogeno nei confronti di altri ospiti con cui potrebbe venire, accidentalmente o meno, a contatto (Gullino, 2005; Cook *et al.*, 1996). Di conseguenza, un seppur minimo rischio è sempre presente nell'applicazione di un antagonista biologico (van Elsas and Migheli, 1999). E' quindi necessario svolgere test di patogenicità sul più alto numero possibile di specie, varietà e cultivar (target e non) con cui il microrganismo prescelto potrebbe venir a contatto una volta liberato nell'ambiente, e ovviamente saggiare la sua eventuale patogenicità su uomo e animali con test, *in vitro* e *in vivo*, volti ad escludere l'eventuale produzione di metaboliti secondari tossici (Migheli *et al.*, 2001). In relazione alla possibile patogenicità dei microrganismi e, nello specifico, dei lieviti va tenuta sotto stretta osservazione la capacità che diverse specie hanno di cambiare morfologia a seconda delle condizioni ambientali in cui si ritrovano e che può essere legata anche a gravi fenomeni di patogenicità per l'uomo e gli animali.

#### 1.2.4. Dimorfismo e patogenicità nei lieviti

Diversi lieviti riconducibili ai generi *Candida*, *Cryptococcus*, *Pichia*, *Saccharomyces*, sono caratterizzati da sviluppo dimorfico, avendo la capacità di mostrare, in modo interconvertibile, sia una crescita tipicamente lievitifforme unicellulare che una pseudoifale (Zaragoza e Gancedo, 2000; Sánchez-Martínez e Pérez-Martín 2001, Nadal *et al.*, 2008). Questo fenomeno avviene quando, durante la riproduzione per gemmazione, la cellula figlia non si separa dalla cellula madre e, a sua volta, dà vita ad altre cellule figlie che restano attaccate l'una all'altra. Inoltre, l'allungamento di queste cellule e la formazione di una struttura ramificata, secondaria e terziaria, conferisce alla colonia un aspetto miceliale (Sudbery *et al.*, 2004). I lieviti che si sviluppano con morfologia pseudoifale presentano anche delle cellule specializzate più piccole, con funzione riproduttiva, situate o nelle parti terminali dello pseudo-micelio (blastospore) o lateralmente su brevi rami (blastoconidi). Tale dimorfismo si verifica in risposta a differenti fattori ambientali, quali la disponibilità di nutrienti, la temperatura e il pH (Reynolds e Fink, 2001), ma anche in risposta a specifiche molecole *quorum sensing* (Sprague e Winans, 2006).

Alcune specie di lieviti sono patogene e spesso questo loro comportamento è direttamente correlato alla transizione dimorfica a cui questi lieviti possono andare incontro a seconda delle condizioni ambientali. L'ascomicete *Paracocidioides brasiliensis*, ad esempio, è capace di trasformarsi da muffa non patogena presente nel terreno a grave patogeno, con morfologia lievitifforme, per il sistema respiratorio (e in seguito con ben più gravi infezioni sistemiche) dell'uomo e di altri mammiferi nel momento in cui le sue spore vengono inalate (Felipe *et al.*, 2005). Anche l'agente della meningite *Cryptococcus neoformans* può differenziarsi in diverse morfologie, intermedie tra quella lievitifforme e ifale, ma si è osservato che durante le infezioni a carico dei tessuti umani e animali si riscontra solitamente sotto forma di lievito (Lin e Heitman, 2006; Lin, 2009).

Alcuni di questi lieviti sono opportunistici in quanto possono causare infezioni su individui su cui vivono normalmente nel momento in cui il loro sistema immunitario risulta compromesso. *Candida albicans* ad esempio è generalmente presente nell'ospite umano, particolarmente sulle mucose ma la sua crescita è

controllata dal sistema immunitario e da altri microrganismi che occupano la stessa nicchia ecologica (d'Enfert, 2009). Una riduzione della flora batterica e un indebolimento del sistema immunitario dovuto a malattie, anche metaboliche come il diabete, e allo stress, predispongono l'individuo allo sviluppo delle cosiddette "candidiasi" (Wingard *et al.*, 1979), in cui le cellule del lievito iniziano a svilupparsi in maniera ifale e ramificata, penetrando nelle mucose e causando irritazioni e disfacimento dei tessuti (Rooney e Klein, 2002).

Tale patogenicità a spese delle cellule epiteliali è dovuta alla secrezione di fosfolipasi o di altri enzimi litici che contribuiscono al disfacimento dell'epitelo (Naglik *et al.*, 2003; Theiss *et al.*, 2006), ma probabilmente anche ad altri meccanismi quali l'induzione di endocitosi delle cellule epiteliali che potrebbe portare a fenomeni di apoptosi (Zhu e Filler, 2009).

## 2. Scopo della tesi

Per inquadrare un nuovo punto di vista sulla lotta biologica che vada oltre il solo saggiare un antagonista in modo da valutarne l'efficacia nel post-raccolta si è voluto, con uno studio più approfondito anche a livello molecolare, focalizzare l'attenzione su due specie, appartenenti ad un unico genere di lievito, che mostrassero entrambi interessanti aspetti riguardo la competizione antagonistica nel post-raccolta.

Le due specie oggetto dell'indagine sono *Pichia angusta* (Teun., H.H. Hall & Wick.) Kurtzman (*Hansenula polymorpha* Morais & M.H. Maia) noto modello per lo studio dei lieviti in virtù del suo genoma interamente sequenziato, e che potrebbe quindi spiegare come effettivamente un'antagonista "funziona" a livello molecolare, e *Pichia fermentans* Lodder [anamorph: *Candida lambica* (Lindner & Genoud) Uden & H.R. Buckley ex S.A. Mey. & Ahearn (1983)] strain (DISAABA 726 = DBVPG 3627), un antagonista tanto efficace quanto imprevedibile; il suo comportamento antitetico tra antagonismo e patogenicità, che richiama la dualità raccontata ne "Lo strano caso del dottor Jekyll e del signor Hyde" (Stevenson, 1886) potrebbe infatti aprire nuovi scenari nell'utilizzo dei microrganismi antagonisti, ponendo maggiormente l'attenzione sulla sicurezza e sul valore etico in riferimento alla loro selezione.

### **3. *Pichia angusta* è un efficace lievito antagonista contro il marciume in post-raccolta delle mele causato da *Botrytis cinerea* e *Monilia fructicola***

#### **3.1. Introduzione**

Il motivo principale per cui i meccanismi di antagonismo precedentemente menzionati sono ancora largamente inesplorati a livello molecolare è dovuto non soltanto al fatto che i sistemi antagonistici sono difficili da riprodurre in laboratorio ma, soprattutto, perché gli strumenti di ricerca genetici e molecolari, come ad esempio i *database* genomici, sono ancora poco sviluppati per la maggior parte delle specie utilizzate in lotta biologica.

Per provare ad aggirare questo ostacolo si è valutata la capacità antagonistica di diversi ceppi di *P. angusta*, un naturale colonizzatore dei tessuti delle piante, spesso isolato nei marciumi di Cactacee, e, soprattutto, un modello di lievito piuttosto conosciuto, utilizzato per lo studio di diversi meccanismi cellulari, metabolici e genetici, tra cui la biogenesi e proliferazione dei perossisomi (Vallini *et al.*, 2000) e il metabolismo dell'azoto (Rossi *et al.*, 2005). Questa sua funzionalità è resa ancor più interessante da diversi aspetti: la possibilità di poter manipolare geneticamente questa specie, il suo genoma completamente sequenziato (Ramezani-Rad *et al.*, 2003), e il suo utilizzo, da tempo diffuso, a livello industriale per l'espressione e la produzione industriale di geni eterologhi su larga scala (Gellissen, 2002; Boekhout *et al.*, 2007).

La comprovata efficacia antagonistica del lievito *P. angusta* contro *M. fructicola* e *B. cinerea* su mela, così come quella di un ceppo mutante auxotrofico per l'amminoacido leucina, che ripristina completamente la propria efficacia antagonista solo se inoculato insieme ad una sospensione di leucina esogena, candida questa specie quale promettente modello di studio per poter comprendere meglio i meccanismi di antagonismo a livello molecolare.

## ***Pichia angusta* is an effective biocontrol yeast against postharvest decay of apple fruit caused by *Botrytis cinerea* and *Monilia fructicola***

Stefano Fiori<sup>1</sup>, Angela Fadda<sup>2</sup>, Sara Giobbe<sup>1</sup>, Enrico Berardi<sup>3</sup> & Quirico Migheli<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Protezione delle Piante – Center for Biotechnology Development and Biodiversity Research and Unità di ricerca Istituto Nazionale Biostrutture e Biosistemi, Università degli Studi di Sassari, Sassari, Italy; <sup>2</sup>C.N.R. Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari, Sezione di Sassari, Sassari, Italy; and <sup>3</sup>Laboratorio di Genetica Microbica, Dipartimento di Scienze Alimentari, Università Politecnica delle Marche, Ancona, Italy

**Correspondence:** Quirico Migheli, Dipartimento di Protezione delle Piante, Center for Biotechnology Development and Biodiversity Research and Unità di ricerca Istituto Nazionale Biostrutture e Biosistemi, Università degli Studi di Sassari, Via Enrico De Nicola 9, I – 07100 Sassari, Italy. Tel.: +39 079 229295; fax: +39 079 229316; e-mail: qmigheli@uniss.it

Received 22 May 2008; revised 12 June 2008; accepted 27 June 2008.  
First published online 25 July 2008.

DOI:10.1111/j.1567-1364.2008.00424.x

Editor: Teun Boekhout

### **Keywords**

*Hansenula polymorpha*; *Ogataea polymorpha*; *Botryotinia fuckeliana*; *Monilinia fructicola*; biological control; fruit decay.

### **Abstract**

The efficacy of eight isolates of *Pichia angusta* against three common postharvest pathogens of apple fruit was evaluated for the first time. All tested strains showed significant biocontrol activity against both *Botrytis cinerea* and *Monilia fructicola*, whereas efficacy against *Penicillium expansum* was poor. A leucine-auxotrophic mutant had no significant biocontrol activity against brown rot of apple, while the addition of 0.6–1.2 g L<sup>-1</sup> leucine in the fruit wound fully restored the biocontrol activity of this mutant against *M. fructicola*. Given the extremely well-developed classical and molecular genetics, the availability of genomic libraries, and its complete genomic sequence, this species can serve to elucidate the mechanisms related to biocontrol capacity.

Storage of fresh fruit is frequently limited by postharvest decay caused by a wide range of fungal pathogens (Barkai-Golan, 2001). Control of these pathogens mainly relies on fungicide treatment, but the development of fungicide-resistant fungal populations and the public demand for chemical-free commodities have driven attention towards the development of alternative control methods. Biological control may represent a promising alternative to fungicide application.

In recent years, various antagonistic yeasts have been selected as biocontrol agents against postharvest fruit disease (for a review see Janisiewicz & Korsten, 2002; Spadaro & Gullino, 2004; Mari *et al.*, 2007).

Several mechanisms have been proposed to act during antagonistic interactions between biocontrol yeast, pathogen and fruit tissue: survival ability on fruit surface and

adaptability to postharvest storage conditions, competition for space and nutrients, production of extracellular hydrolases and induction of resistance response at wounded sites (Wisniewski *et al.*, 2007). Recently, the ability to form biofilms has been proposed to represent both an effective mechanism of action and a safety issue (Giobbe *et al.*, 2007). However, these mechanisms remain largely unexplored at the molecular level, not only because antagonistic systems are difficult to tackle in the laboratory but also because genetic and molecular investigation tools, as well as genomic data, are still poorly developed for most of the biocontrol species.

In order to fill this gap, we have investigated for the first time the biocontrol potential of several isolates of *Pichia angusta* (Teun., H.H. Hall & Wick.) Kurtzman [formerly *Hansenula polymorpha* Morais & M.H. Maia; syn. *Ogataea polymorpha* (Morais & M.H. Maia) Y. Yamada, K. Maeda &

Mikata], a natural colonizer of plant tissues that is often isolated in rotten *Cactaceae* wounds. This is a well-known yeast model used for studying various cellular, metabolic and genetic issues, including peroxisome biogenesis and proliferation, C1 metabolism and nitrate assimilation. It is amenable to genetic manipulation (both classical and molecular), its genome has been sequenced (Ramezani-Rad et al., 2003) and it has a long-standing industrial tradition that includes large-scale use for heterologous gene expression (Gellissen, 2002; Boekhout et al., 2007).

The aim of this study was to evaluate the efficacy of several isolates of *P. angusta* in controlling three common postharvest pathogens of apple fruit, namely: *Penicillium expansum* Link., causal agent of blue mould, *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel (*Botrytis cinerea* Pers.), causing Botrytis rot, and *Monilinia fructicola* (G. Winter) Honey (*M. fructicola* L.R. Batra), cause of brown rot. We propose to use this yeast as a model organism to elucidate the mechanisms underlying biocontrol of postharvest pathogens at the molecular level.

All *P. angusta* strains used in this work are from the Ancona Yeast Collection. Strain RW was obtained from the National Collection of Yeast Culture, which labels it NCYC495. L1 is an auxotrophic mutant (*Ieu1*) obtained from NCYC495 (Gleeson et al., 1986). Yeast strains were stored in NYDA at 4 °C and in 50% glycerol at -80 °C.

Cultures of *P. angusta* were prepared as described by Giobbe et al. (2007), counted with a haemocytometer and brought to a final concentration of  $1 \times 10^6$  cells mL<sup>-1</sup>.

Isolates PE-1 of *P. expansum* Link, MEL of *B. cinerea* Pers.:Fr. and PVS-M01 of *M. fructicola* (G. Winter) Honey were obtained from decayed apple, aubergine and sweet cherry, respectively, and kept in the collection of the Center for Biotechnology Development and Biodiversity Research, University of Sassari. These pathogenic strains were stored as described by Giobbe et al. (2007).

Conidial suspensions of pathogenic fungi were prepared as described by Giobbe et al. (2007) by growing the pathogenic fungi on the following media: potato dextrose agar (PDA; Merck & Co., Whitehouse Station, NY) for *P. expansum*; a medium composed of 300 g L<sup>-1</sup> ground fresh tomato leaves, 20 g L<sup>-1</sup> agar for *B. cinerea*; and a medium composed of 200 mL L<sup>-1</sup> filtered Campbell's V8 Vegetable juice, 2.25 g L<sup>-1</sup> CaCO<sub>3</sub>, 2% bacto-agar, amended with 100 µg mL<sup>-1</sup> of each streptomycin sulphate and tetracycline hydrochloride (Sigma) for *M. fructicola*.

Golden Delicious apples (*Malus domestica* Borkh), free from defects, were selected, disinfected in sodium hypochlorite (0.8% as chlorine) and wounded (3–4 mm depth, three or four wounds per fruit) at three locations at the equatorial regions. Biological assays and the evaluation of disease incidence were performed as described previously (Giobbe et al., 2007).

**Table 1.** Biological control activity of different isolates of *Pichia angusta* against *Monilinia fructicola*, *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum* on artificially inoculated apple (cv. Golden Delicious) after 8 days of incubation at 25 °C

Treatment	Lesion diameter (mm)*			
	<i>M. fructicola</i>	<i>M. fructicola</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>P. expansum</i>
Inoculated control	28.3 ± 29.2	34.5 ± 10.3	41.9 ± 10.4	31.9 ± 3.6
ANY-32	0**	4.9 ± 6.5**	0**	11.7 ± 8.9
ANY-34	0**	0.8 ± 2.2**	0**	19.4 ± 8.8
ANY-38	0**	3.3 ± 5.8**	0**	22.9 ± 6.3
ANY-39	1.1 ± 1.9**	NT	0**	14.2 ± 9.9
ANY-41	0**	2.4 ± 3.1**	0**	7.7 ± 6.8
ANY-43	0**	1.6 ± 3.9**	0**	10.8 ± 2.6
ANY-67	0**	4.6 ± 4.5**	1.0 ± 1.7**	9.2 ± 13.4

\*Results are expressed as lesion diameter (mm) ± SD.

†Values in each column followed by two asterisks are significantly different from inoculated control by Dunnett's test ( $P < 0.001$ ).

NT, not tested.

In the experiments carried out with *P. angusta* strain RW (NCYC495) and its derivative leucine-auxotrophic mutant L1, both the fungal conidia and the yeast cells were suspended in Ringer's solution or in Ringer's solution+leucine (0.6 or 1.2 g L<sup>-1</sup>).

There were 5–10 fruit per treatment, the treatments were arranged in a completely randomized block design and each experiment was repeated at least twice. Data were subjected to one-way ANOVA, followed by multiple comparison by Dunnett's test, using MINITAB<sup>®</sup> for Windows release 12.1.

The biocontrol potential of eight *P. angusta* isolates against *M. fructicola*, *B. cinerea* and *P. expansum* on apple cv. Golden Delicious was evaluated for the first time. All the tested isolates were effective in reducing brown rot caused by *M. fructicola*, with a reduction of the lesion diameter ranging from 86% to 100% (Table 1). The high biocontrol potential of all the isolates has also been confirmed against *B. cinerea*, resulting in the complete control of decay, except for isolate 67, which showed a decay reduction of 98% of the inoculated control (Table 1). Conversely, the biological control activity of *P. angusta* against *P. expansum* was inadequate, and resulted in a nonsignificant decay reduction for all tested isolates (Table 1).

A wide range of yeast species has been evaluated for their antagonistic activity (Janisiewicz & Korsten, 2002; Wisniewski et al., 2007). Despite these efforts, yeast formulations, even when available, are not widely applied in the postharvest chain, mostly due to the inconsistent performance of the antagonist (Mari et al., 2007). Knowledge of the molecular mechanisms underlying biocontrol efficacy is an essential step to improve the commercial application of these microorganisms. *Pichia angusta* could be a promising organism to understand the mechanisms of biocontrol at

**Table 2.** Biological control activity of *Pichia angusta* wild-type strain RW (NCYC495) and of its leucine-auxotrophic mutant L1 against *Monilinia fructicola* on artificially inoculated apple (cv. Golden Delicious) after 8 days of incubation at 25 °C

Treatment	Lesion diameter (mm)*	
	Experiment 1	Experiment 2
Inoculated control	38.6 ± 20.0	41.8 ± 19.5
Inoculated control (+leucine)	40.9 ± 21.8	36.1 ± 8.1
RW	1.6 ± 2.7*	4.7 ± 9.5**
RW+leucine	0.6 ± 1.3*	0.7 ± 1.5**
L1	26.9 ± 23.8	25.1 ± 17.7
L1+leucine	4.1 ± 8.0*	0**

\*Results of two separate experiments are expressed as lesion diameter (mm) ± SD.

†Values in each column followed by one ( $P < 0.005$ ) or two ( $P < 0.001$ ) asterisks are significantly different from inoculated control by Dunnett test.

Yeast cells were suspended in sterile Ringer's solution or in Ringer's solution with 0.6 (experiment 1) or 1.2 g L<sup>-1</sup> (experiment 2) leucine.

the molecular level. It is a well-defined yeast from a physiological, biochemical (Gellissen, 2002; Boekhout *et al.*, 2007) and genetic point of view (Ramezani-Rad *et al.*, 2003), and it has been widely used as a model organism to study the metabolism of various carbon and organic nitrogen sources used for growth (Van der Klei & Veenhuis, 2006). Studies on *P. angusta* were largely focused on the biogenesis and proliferation of peroxisomes (Vallini *et al.*, 2000) and nitrogen metabolism (Rossi *et al.*, 2005). Methylophilic yeasts, such as *P. angusta*, are known to have a large amount of peroxisomes when growing in methanol or in certain nitrogen sources, such as methylamine. In nature, methanol is released from pectin degradation, for instance in rotten fruits. For postharvest (but also preharvest) purposes this characteristic might be very important, as it allows studies on attacked fruit tissues. Interactions between *P. angusta* and plant pathogens are, to our knowledge, very limited. In this respect, *Pichia* mutants could represent useful research tools in the genetic analysis of the physiological relationships between pathogens and *P. angusta* and to investigate the role of different metabolites and enzymes in the biocontrol activity.

Additional experiments aimed at preliminarily evaluating the suitability of a largely used, easily transformable *P. angusta* haploid strain, to isolate mutants and to screen them to identify biocontrol-minus mutant clones.

Thus, while the wild-type strain RW confirmed the ability to reduce brown rot lesion caused by *M. fructicola*, its derivative leucine-auxotrophic mutant L1 had no significant effect in controlling the pathogen. Adding exogenous leucine at a concentration of 0.6 or 1.2 g L<sup>-1</sup> was sufficient to fully restore the biocontrol capability of mutant L1, while as a stand-alone treatment (leucine+Ringer solution) it had no significant biocontrol effect (Table 2).

Future attempts will concentrate on the systematic identification, via mutant isolation, of key factors involved in these complex interacting webs (antagonist, fruit tissue and pathogens).

## Acknowledgements

This work was carried out within the framework of the Research Program MiPAAF – CIPE 'FRU.MED.' – Project 'DAFME', publication no. 51.

## References

- Barkai-Golan R (2001) *Postharvest Disease of Fruits and Vegetables. Development and Control*. Elsevier, Amsterdam, the Netherlands.
- Boekhout T, Veenhuis M & Gellissen G (2007) *Hansenula polymorpha* – progress in fundamental and applied research. *FEMS Yeast Res* 7: 1081.
- Gellissen G (2002) *Hansenula polymorpha: Biology and Applications*. Wiley-VCH, Weinham.
- 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.
- Gleeson MA, Ortori GS & Sudbery PE (1986) Transformation of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *J Gen Microbiol* 132: 3459–3465.
- Janisiewicz WJ & Korsten L (2002) Biological control of post-harvest diseases of fruits. *Annu Rev Phytopathol* 40: 411–441.
- Mari M, Neri F & Bertolini P (2007) Novel approaches to prevent and control postharvest diseases of fruits. *Stewart Postharvest Rev* 6: 4.
- Ramezani-Rad M, Hollenberg CP, Lauber J *et al.* (2003) The *Hansenula polymorpha* (strain CBS 4732) genome sequencing and analysis. *FEMS Yeast Res* 4: 207–215.
- Rossi B, Manasse S, Serrani F & Berardi E (2005) *Hansenula polymorpha* NMR2 and NMR4 two new loci involved in the nitrogen metabolite repression. *FEMS Yeast Res* 5: 1009–1017.
- Spadaro D & Gullino ML (2004) State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit disease. *Int J Food Microbiol* 91: 185–194.
- Vallini V, Berardi E & Strabbioli R (2000) Mutation affecting the expression of the MOX gene encoding the peroxisomal methanol oxidase in *Hansenula polymorpha*. *Curr Genet* 38: 163–170.
- Ven der Klei IJ & Veenhuis M (2006) Yeast and filamentous fungi as model organism in microbody research. *Biochim Biophys Acta* 1763: 1364–1373.
- Wisniewski ME, Wilson CL, Droby S, Chalutz E, El-Ghaouth A & Stevens C (2007) Postharvest biocontrol: new concepts and applications. *Biological Control: A Global Perspective* (Vincent C, Goettel MS & Lazarovits G, eds), pp. 262–273. CAB International, Boca Raton, FL.

## 4. *Pichia fermentans*: identificazione dei geni differenzialmente espressi da un ceppo dimorfico, antagonista su mela ma patogeno su pesca

### 4.1. Introduzione

Un'altra specie del genere *Pichia* che manifesta interessanti ma anche imprevedibili implicazioni riguardo la lotta biologica è *P. fermentans*. Isolata su burro da Lodder nel 1932, questa specie si differenzia dalla simile *P. membranifaciens* per la capacità di fermentare energicamente, ma molto rapidamente, il glucosio, dando quindi origine a quantità d'alcool relativamente modeste (Rosemberg, 1959). *P. fermentans* è stata inoltre isolata da cacao in fermentazione e, a volte, dal mosto d'uva.

In un precedente studio (Giobbe *et al.*, 2007) è stato osservato che un ceppo del lievito *P. fermentans*, capace di secernere una matrice extracellulare e di formare biofilm sulla superficie dei frutti, era in grado di svolgere, durante prove in laboratorio condotte con mele (*Malus × domestica* “Golden delicious “ e “Renetta”) su cui erano state praticate artificialmente delle ferite, una notevole attività antagonista sia contro il marciume bruno e grigio causati rispettivamente da *M. fructicola* e da *B. cinerea* al punto da impedire completamente il loro sviluppo, ma anche di limitare discretamente lo sviluppo di marciume blu causato da *P. expansum*. Lo stesso lievito però, utilizzato in prove *in vivo* su frutto di pesca (*Prunus × persica*, prevalentemente cultivar “nettarina”), cambiava drasticamente il suo comportamento, trasformandosi da agente antagonista ad agente patogeno, causando il rapido e completo marciume del frutto anche in assenza di *M. fructicola* o altri patogeni (Giobbe *et al.*, 2007). In questo studio osservazioni condotte con il microscopio ottico e a scansione elettronica, mostravano che *P. fermentans* si sviluppa con cellule tipicamente lievitiformenti durante la colonizzazione del tessuto della mela, mentre esibisce una crescita pseudoifale sui tessuti di pesca. Questo dimorfismo suggerisce che la crescita pseudoifale potrebbe svolgere un ruolo chiave nel comportamento patogeno di *P. fermentans* sul frutto di pesca; e ciò pone un grosso quesito alla valutazione dell'impatto ambientale degli antagonisti microbici.

Per capire da cosa sia regolato questo comportamento antitetico si è, pertanto, investigato su quali siano i geni espressi da *P. fermentans* associati alla sua transizione dimorfica e differenzialmente espressi tra le due morfologie. Per conseguire tale risultato si sono intrapresi due approcci complementari di ibridazione sottrattiva, una *Rapid Subtractive Hybridization* (Jiang *et al.*, 2000) e una sottrazione genica basata sul kit *PCR-Select cDNA Subtraction* (Clontech). Le funzioni dei geni individuati grazie a questo studio possono essere ricondotte, più o meno, alla risposta allo stress, alla glicolisi, alla biosintesi di aminoacidi e alla fermentazione alcolica. Sorprendentemente però nessuna di queste è correlata all'espressione di enzimi litici che farebbero facilmente intuire il perché *P. fermentans* causi marciume su pesca.

# Identification of genes differentially expressed by a dimorphic strain of *Pichia fermentans*, antagonistic on apple but pathogenic on peach fruit

Stefano Fiori<sup>1</sup>, Barbara Scherm<sup>1</sup>, Jia Liu<sup>2,3</sup>, Robert Farrell<sup>4</sup>, Michael E. Wisniewski<sup>3</sup>, Ilaria Mannazzu<sup>5</sup>, Marilena Budroni<sup>5</sup>, Quirico Migheli<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Plant Protection - Unità di ricerca Istituto Nazionale Biostrutture e Biosistemi, University of Sassari, Via E. De Nicola 9, I-07100 Sassari, Italy; <sup>2</sup>Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing, China; <sup>3</sup>USDA-ARS, Appalachian Fruit Research Station, Kearneysville, WV, USA; <sup>4</sup>Department of Biology, Pennsylvania State University-York, PA, USA; <sup>5</sup>Dipartimento di Scienze Ambientali Agrarie e Biotecnologie Agroalimentari, University of Sassari, Viale Italia 39, I-07100 Sassari, Italy

## Abstract

*Pichia fermentans* strain DISAABA 726 is an effective biocontrol agent against *Monilinia fructicola* or *Botrytis cinerea* when inoculated in artificially wounded apple fruit but displays an aggressive pathogenic behavior when inoculated on peach fruit, causing tissue rot, even in the absence of other pathogens. *P. fermentans* grows with yeast like morphology on apple-fruit, while exhibits pseudohyphal growth on peach-fruit, suggesting that dimorphism may be associated to pathogenicity. Two complementary suppressive subtractive hybridization strategies, i.e., rapid subtraction hybridization (RaSH) and PCR-based subtraction, were performed to identify genes differentially expressed by *P. fermentans* after 24-h growth on apple versus peach fruit. Several of the fragments obtained, significantly more expressed on peach than on apple tissue, or vice-versa, were sequenced and compared to the available genome sequence databases. Among the genes whose expression was significantly higher on peach, many can be related to stress response, glycolysis, amino acid metabolism, and alcoholic fermentation but none of them to lytic enzyme production, suggesting that *P. fermentans* may not be directly pathogenic on peach and that its invasive growth could be stimulated by a linked series of commodity-related events. This emphasizes the need for a thorough risk analysis of potential antagonists so to avoid unpredictable results that could harm the effectiveness and safety of post-harvest biocontrol strategies.

## Keywords

Biocontrol; subtractive hybridization; yeast pathogenicity; postharvest; risk assessment; morphogenesis.

## Introduction

Biological control represents an effective alternative to fungicide application during fresh fruit storage to avoid the postharvest decay caused by a wide range of fungal pathogens (Barkai-Golan, 2001; Janisiewicz and Korsten, 2002; Passoth *et al.*, 2006). Yeasts are often particularly suitable as biocontrol agents against several rot-inducing fungi (Wisniewski *et al.*, 2007) since their activity does not usually rely on the production of toxic metabolites, which could have a negative toxicological impact on environment and animals (Smilanick *et al.*, 1994; Spadaro *et al.*, 2002), rather on their ability to survive on the fruit surface and to rapidly colonize fruit wounds, competing with pathogens for space and nutrients. Other biocontrol mechanisms, such as the production of extracellular hydrolases, the induction of host-resistance response (Wisniewski *et al.*, 2007) and the capability to form a biofilm on the epicarp or within wounds (Severinatne *et al.*, 2008; Scherm *et al.*, 2003) have been proposed but most of these mechanisms remain still

unexplored at the molecular level. Such lack of information plays a significant limitation to the choice and selection of antagonists: a deeper understanding of yeasts biology and behavior, of their interactions with hosts and pathogens, is an essential prerequisite to their use as biocontrol agents. Moreover, antagonists should be thoroughly vetted prior to distribution in the environment at high concentrations since safety issues are of great importance in this scenario (Migheli, 2001).

A number of yeast species displays dimorphism, i.e., the capacity to undergo a budding or a pseudohyphal growth in response to different environmental factors such as nutrient availability, temperature and pH (Reynolds and Fink, 2001), but also in response to *quorum sensing* molecules, hormone-like signals that influence microorganism behavior, inducing physiological and morphological shift when cell density changes (Sprague and Winans, 2006). Dimorphic transition is often related to the pathogenicity of yeasts, where only one of their morphology can cause disease. As an example, *Candida albicans* (C.P. Robin) Berkhout is a commensal fungus that usually colonizes skin, oral cavity, urogenital and intestinal system of human in its yeast-like morphology, but becomes a serious opportunistic pathogen on immunocompromised hosts (D'Enfert, 2009; Wingard *et al.*, 1979) by switching into the pseudohyphal/hyphal shape, more adapted for invasion through the host epithelial tissue (Rooney and Klein, 2002). Its morphogenesis is predominantly determined by environmental conditions, and is associated with different signaling pathways regulating gene expression (Han, 2011).

Another ascomycote, *Paracoccidioides brasiliensis* (Splend.) F. P. Almeida, is able to convert itself from a non-pathogenic mold in the soil to a pathogenic yeast after infectious conidia are inhaled into the lungs of human or other mammalian immunocompromised hosts, and its infection can range from a localized lung disease to an even lethal systemic disease (Felipe *et al.*, 2005).

Even if not considered a typical dimorphic fungus, the incitant of cryptococcal meningitis *Cryptococcus neoformans* (San Felice) Vuill. can differentiate several morphologies including yeast, chlamydoconidia, pseudohyphae, and hyphae, but is usually present in the yeast form during infection in human and animal tissues (Lin and Heitman, 2006; Lin, 2009).

Correlation between yeast dimorphism and pathogenicity does not only occur in connection with human or animal health though, since it seems to be related also to plant pathology. Giobbe *et al.* (2007) demonstrated that the *Pichia fermentans* Lodder [anamorph: *Candida lambica* (Lindner & Genoud) Uden & H.R. Buckley ex S.A. Mey. & Ahearn (1983)] strain DISAABA 726 (=DBVPG 3627) able to form biofilm on liquid and solid surfaces, is a very effective biocontrol agent by reducing brown and grey rot caused by *Monilinia fruticola* (G. Winter) Honey and *Botrytis cinerea* Pers., respectively, in artificially wounded apple fruits (*Malus × domestica* "Golden Delicious" and "Renetta"). However when inoculated in artificially wounded peach fruits (*Prunus × persica*, mostly nectarine cultivar), *P. fermentans* drastically changes its behavior from a biocontrol agent to a pathogen causing complete decay of the fruit after few days even in the absence of *M. fruticola* or other pathogens. In this study, observations made with both optical and scanning-electron microscopy showed that *P. fermentans* produces yeast-like shaped cells, characterized by big sized cells and high vacuole formation, during colonization of apple tissues, while exhibiting pseudohyphal growth on peach tissues (Giobbe *et al.*, 2007). This suggested that pseudohyphal growth may play a key role in the pathogenicity of *P. fermentans* on peach fruit, but what really triggers this behaviour and how gene expression regulates it is still unexplored.

The aim of the present study was to identify genes differentially expressed during growth on apple and peach fruit that could be involved in dimorphic transition and pathogenicity, by using a cDNA (mRNA) subtraction strategy. We have then attempted two complementary suppressive subtractive hybridization approaches to obtain a wider pool of results: a Rapid Subtraction Hybridization approach (Jiang *et al.*, 2000), focusing our attention to the pseudohyphal morphology expression, and then another one using a PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit (Clontech, Palo Alto, California, USA), where also the differentially expressed genes by yeast-like morphology were analyzed.

## Material and Methods

### Culture conditions and experimental design

A single, fresh colony of *P. fermentans* DISAABA 726 (=DBVPG 3627) was inoculated into a flask containing 30 mL of 1% yeast extract, 2% bacto-peptone, 2% dextrose broth (YPD), and incubated for 24 hours at 25°C on a rotary shaker (200 r.p.m.). Cells were then recovered by centrifuging at 3000 *g* for 5 minutes, washed and re-suspended in sterile Ringer solution (H<sub>2</sub>O, 0.9% NaCl), and brought to a final concentration of 1x10<sup>9</sup> cells mL<sup>-1</sup> by direct counting with a haemocytometer. One hundred µL of this suspension were spread between two autoclaved circular sheets of cellophane membrane backing sheets (Bio-Rad, Hercules, California, USA), permeable to liquids and nutrients, which were placed between either apple or peach fruits, at the same ripening stage and sanitized in sodium hypochlorite (0.8% as chlorine), that were cut in half. The procedure has been performed for 66 of both apple and peach fruits so to recover a high quantity of yeast cells. Fruits were stored for 24 hours at 25°C at 85 ± 5% relative humidity and then the yeast grown between them was scraped off the cellophane sheets with a sterile spatula, collected in tubes and immediately frozen in liquid nitrogen.

### RNA extraction and cDNA reverse transcription

Total RNA was obtained from 0.3 g of DISAABA 726 cells grown on apple and on peach fruits by grinding them with liquid nitrogen and then performing the extraction with the Pure Link™ Micro-to-Midi Kit (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) using TRIzol® (Invitrogen). For genomic DNA removal an on-column DNase digestion with the RQ1 RNase-Free DNase (Promega, Wisconsin, USA) set was carried out according to manufacturer's instructions. cDNA reverse transcription was later performed, starting from 1 µg total RNA, using the Super SMART™ PCR cDNA synthesis kit (Clontech) according to the manufacturer's directions.

### Rapid Subtraction Hybridization

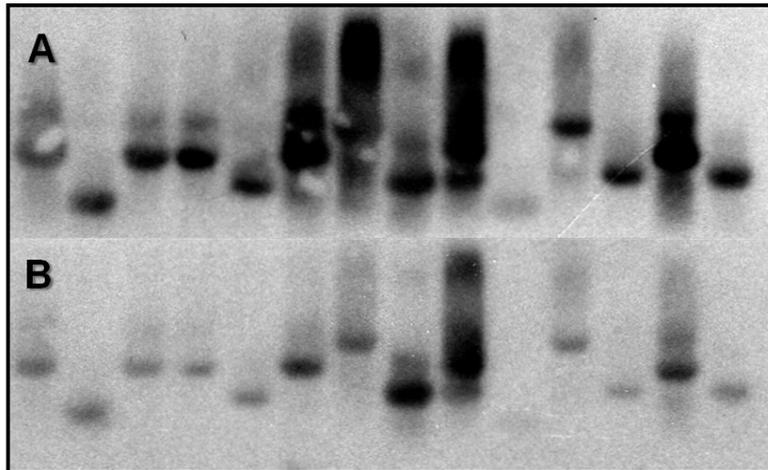
The Rapid Subtraction Hybridization (RaSH) protocol was based on the method previously reported by Scherm *et al.* (2009) with slight modifications. Briefly, cDNA of *P. fermentans* grown on apple fruit was used as driver to subtract all the genes expressed in common with tester (cDNA of *P. fermentans* grown on peach fruit) and highlight the ones expressed only, or more intensely, by the latter. cDNA of both samples was digested with a *EcoRII* restriction enzyme (New England Biolabs, Beverly, Massachusetts, USA) at 37°C for 4 hours, purified with the Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and then ligated with the adaptors XE-14, XEA-13 and XET-13, complementary to two specific primers XEA-18 and XET-18 (Table 1), by overnight incubation at 4°C. The fragments were then exponentially amplified by PCR with an Applied Biosystems 9600 thermocycler (Life Technologies, Carlsbad, California, USA) under the following conditions: TopTaq DNA Polymerase reaction buffer (Qiagen), MgCl<sub>2</sub> (2.5 mM), dNTP (0.2 mM), XEA-18 (1 mM), XET-18 (1 mM), TopTaq DNA Polymerase reaction buffer (Qiagen) and 1 µl of cDNA; the PCR-programme was set as follows: 72°C, 5 minutes; 25 cycles of 1 minute at 94°C; 1 minute at 55°C; 1 minute at 72°C, with a final extension step of 10 minutes at 72°C. PCR products were purified as previously described and then 1 µg of amplified tester fragments was digested with *XhoI* (New England Biolabs), at 37°C for 4 hours, and mixed with driver fragments in 10 µl of hybridization solution [0.5 M NaCl, 50 mM Tris pH 7.5, 0.2% SDS, 40% (vol/vol) formamide]. One hundred ng of tester were mixed with 3 µg of driver (1:30 tester:driver), and after boiling for 5 minutes the subtraction mix was incubated for 48 hours at 42°C. The hybridization mix was diluted with sterile water to 100 µl, purified and adjusted to a final volume of 30 µl. Eight µl of the mix was incubated overnight at 4°C with *XhoI*-digested pBlueScript SK (+/-) vector, dephosphorylated with Shrimp alkaline phosphatase (Fermentas, Vilnius, Lithuania) and then transformed into competent DH5α *Escherichia coli* cells by chemical transformation. White ampicillin-resistant colonies were directly PCR-amplified with *LacZ*-plasmid specific primers (RaSH-F and RaSH-R) and visualized

on 1.5% agarose gel with ethidium bromide with the Bio-Rad Laboratories Gel-Doc software to verify presence and length of the fragments. The newly amplified products were then transferred in duplicate on the same Hybond-N membrane (Amersham Biosciences, Freiburg, Germany) and each blot was hybridized with two different chemiluminescent probes (obtained from *driver* and *tester* cDNAs, respectively) to confirm their differential expression and eliminate possible false positive clones (Figure 1). Labeling and detection were conducted using DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) and blotted fragments showing a more intense detection with chemiluminescent tester probe (cDNA of *P. fermentans* grown on peach fruit), hence indicating a higher number of repeated gene copies in the *tester* cDNA, were chosen and sequenced by C.R.I.B.I. BIO Molecular Research, University Of Padova (Italy).

Sequences were then trimmed from vector residual and used to perform a BLASTx search in the NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) to identify them on the basis of the closest orthologue.

**Table 1.** Oligonucleotide sequences used for the RaSH protocol and for the semi-quantitative PCR

Name	Forward	Reverse
Adaptors		
<b>XE-14</b>	5'-CTGATCACTCGAGA-3'	/
<b>XEA-13</b>	5'-CCAGGTCTCGAG-3'	/
<b>XET-13</b>	5'-CCTGGTCTCGAG-3'	/
RaSH Primers		
<b>XEA-18</b>	5'-TGATCACTCGAGACCAGG-3'	/
<b>XET-18</b>	5'-TGATCACTCGAGACCTGG-3'	/
<b>RaSH</b>	5'-ACTCACTATAGGGCGATTG-3'	5'-GGAATTCGATATCAAGCTTATC-3'
Semi-qPCR Primers		
<b>18SrRNA</b>	5'-TACATGCGCAAAGCCCCGACT-3'	5'-TGCCCCCGACCGTCCCTATT-3'
<b>P-A21</b>	5'-CGTGATGTTCTGCACCTGCCAG-3'	5'-CTCCGTTTCCGTTCCATTCCCACC-3'
<b>P-A36</b>	5'-AACGGCAGCACCATTAAGCGACA-3'	5'-GCCCGGGCAGGTACCTTTGAA-3'
<b>P-B07</b>	5'-TGGCTTGCACGCATGGAAGGG-3'	5'-ACCAGAAAGGTCAGCCTTTGCACA-3'
<b>P-B19</b>	5'-TCACCGCTTGGTTGGCAACG-3'	5'-TGACCACGGTGCTGATGTCGTC-3'
<b>P-C55</b>	5'-CGGTGTCAGAGTTGCAGGTGTCG-3'	5'-GCTGCCTTGACACCAGATAAGGCC-3'
<b>P-C63</b>	5'-ACCAGACACCTGGTTGTCAGCC-3'	5'-TCCTGCGTTAGCTACCGTTCCC-3'
<b>P-F55</b>	5'-CCATTGTCCCCTCTGGTGCATCC-3'	5'-TTGCAAGGAACTGGCAGCGTTTG-3'
<b>P-Thi</b>	5'-TGCTGGTATGGAATTGAGT-3'	5'-CGTAGATGTTGAGAGCTT-3'
<b>P-Pyr</b>	5'-CTGACGCTTGTAGATGGA-3'	5'-AAATAGGGGAAGAGGGGA-3'
<b>M-B41</b>	5'-GGTTGGTGACGGCTCTGACAGT-3'	5'-TCAGTGTTGCCAGCCTTTCTTGC-3'
<b>M-C51</b>	5'-CCCCACGGGCTGTCTTTCGT-3'	5'-CCGCAATGCATGGGAAATCTAGCA-3'
<b>M-G43</b>	5'-GGGGAAGACATGGACAAA-3'	5'-CAAAGGTGAAAAGAGCAGG-3'



**Figure 1.** Southern blotting for confirmation of RaSH results: clones were directly amplified with specific RaSH primers and then transferred in duplicate on the same membrane. Each blot was hybridized with two different chemiluminescent probes obtained from: (A) cDNA of *P. fermentans* grown on peach and (B) cDNA of *P. fermentans* grown on apple fruit to confirm their differential expression. Fragments showing a stronger hybridization with probe A confirm their higher expression during pseudohyphal growth on peach fruit.

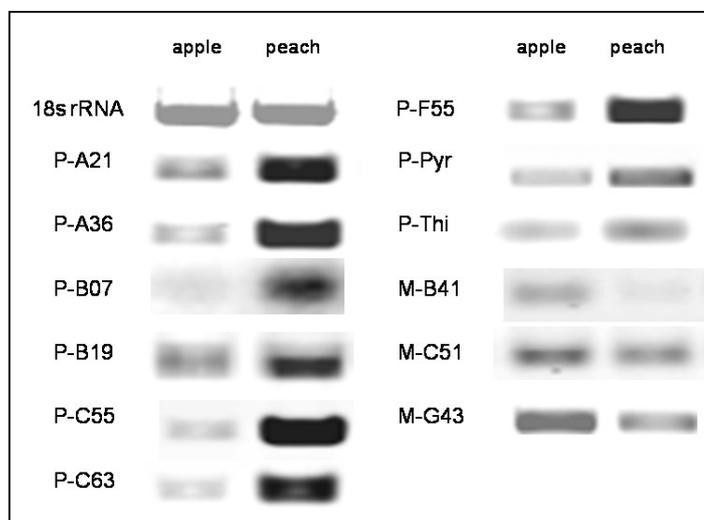
### PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit

A subtraction test was performed with the PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit (Clontech) by using yeast cells grown as previously described and following manufacturer's protocol. Two different subtractions were conducted: a forward one, where the cDNA of *P. fermentans* grown on peach fruit was the tester and the cDNA of *P. fermentans* grown on apple fruit was the driver, and *vice-versa* on the reverse one. After hybridization and two consecutive PCR, a mixture enriched for differentially expressed cDNAs was obtained. As previously reported by Bassett *et al.*, 2006, this was ligated into plasmids with the TOPO® TA Cloning® Kit (Invitrogen) and then transformed into One Shot® TOP10 competent *E. coli* (Invitrogen) by chemical transformation. White kanamycin-resistant colonies were directly PCR-amplified with M13 forward and reverse primers and the amplified fragments were loaded into 1.5% agarose gel and visualized with SYBRGold (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) in a Storm 860 fluorescence image analyzer (GE Healthcare, Piscataway, New Jersey, USA) to verify the presence and length of the fragments in each clone. All the colonies containing a fragments longer than 600 pb were chosen and, upon extraction with QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen), clones were sequenced in both directions with M13 forward and reverse primers by Macrogen Corp. (Rockville, MD, USA). All sequences were then subjected to BLASTx on NCBI.

### Semi-quantitative PCR analysis

Since PCR-based subtraction approach may result in amplification bias (Jiang *et al.*, 2000), semi-quantitative PCR has been performed to confirm differential expression of genes putatively related to dimorphism. Specific primers were designed for each fragment by using NCBI's Primer-BLAST tool and the 18S ribosomal RNA gene was chosen as reference (Table 1). PCR was carried out with an Applied Biosystems 9600 thermocycler in 60 µl reaction containing 1 x TopTaq DNA Polymerase reaction buffer (Qiagen), MgCl<sub>2</sub> (2.5 mM), dNTPs (0.2 mM each), forward and reverse primer (1 mM each), TopTaq DNA Polymerase reaction buffer (Qiagen) and 3 µl of cDNA (100 ng for both cDNA templates). The PCR-programme was set as follows: 72°C, 5 min; 30 cycles of 30 sec at 94°C, 30 sec at 59°C, and 40 sec at 72°C with a final extension step of 10 min at 72°C. After the 15<sup>th</sup> cycle an 8-µl aliquot was removed from both samples and allowed to perform a final extension of 10 min at 72°C in another thermocycler. The same operation was repeated each 3 cycles between the 18<sup>th</sup> and the 30<sup>th</sup>. The amplified

samples collected at different cycles were then loaded side by side on a 1.5% agarose gel and visualized with SYBRGold (Molecular Probes) in a Storm 860 fluorescence image analyzer (GE Healthcare) to verify their differential expression (Figure 2).



**Figure 2.** Semi-quantitative PCR confirmation: specific primers were drawn for each fragment obtained with PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit (Clontech) so to amplify them in the cDNA of both *P. fermentans* grown on apple and on peach fruit, highlighting their differential expression. Figure refers to PCR products after 25 cycles of amplification.

## Results

We have performed two complementary suppressive subtractive hybridization approaches, choosing to analyze our samples after 24 hours growth in order to look for all those genes that initially induce dimorphism, since it's possible to observe a first differentiation in shape only from the third day of growth on peach fruit (Figure 3).

With the Rapid Subtraction Hybridization approach, characterized by a mass-driven subtraction with an altered ratio of tester and driver to hybridize, and where unsubtracted cDNAs are then selected by matching their ends with the plasmid vector (Jiang *et al.*, 2000), a total of 450 clones were obtained and further analyzed by Southern hybridization. Fourteen fragments showed stronger hybridization with the tester cDNA chemiluminescent probe, suggesting that they could have been differentially expressed during pseudohyphal growth.

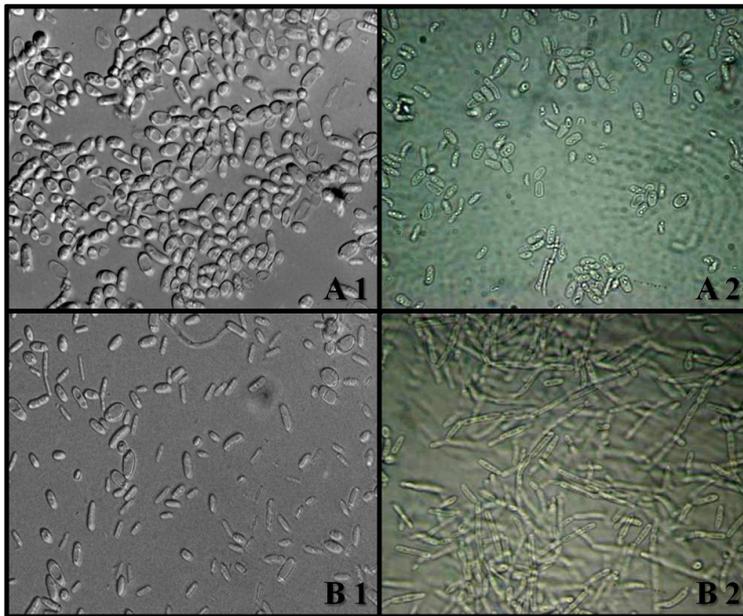
Overall, the genes differentially expressed during growth on peach could be roughly clustered in the following categories of putative functions: connections with different kind of stress response (heat shock protein 70; 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase; glutathione peroxidase; NADH dehydrogenases and succinyl-CoA synthetase), glycolysis (phosphoglycerate kinase and pyruvate kinase) and amino acid metabolism (NADP<sup>+</sup> glutamate dehydrogenases and acetolactate synthase). Upon sequencing, the heat shock protein 70 was found in two clones, while the translational protein elongation factor 2 in three clones (Table 2).

The PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit (Clontech), where the amplification of cDNAs is subsequent to hybridization and that leads to obtain longer fragments easier to identify, yielded 560 clones for the forward subtraction (cDNA of *P. fermentans* grown on peach as tester) and 420 for the reverse one (cDNA of *P. fermentans* grown on apple as tester). Among these clones, 74 and 56 fragments, respectively, which were > 600 pb in length, were chosen for sequencing and BLASTed. Twenty-three fragments (cDNA of *P. fermentans* grown on peach as tester) and five fragments (cDNA of *P. fermentans* grown on apple as tester), respectively, were then confirmed by semi-quantitative PCR (Table 2).

The function of genes selected by this approach could be referred to the ones involved in the stress response (heat shock protein; enolase; glycerol 3-phosphate dehydrogenase NAD<sup>+</sup>), amino acids metabolism (o-acetyl homoserine-o-acetylserine sulfhydrylase; peroxisomal primary copper amine oxidase; glutamate synthase), alcoholic fermentation (pyruvate decarboxilase), thiamine biosynthesis (thiamine biosynthesis enzyme and thiazole synthetase), transport (iron transport multicopper oxidase; OPT oligopeptide transporter) and in the cellular membrane biosynthesis as the C-4 methyl sterol oxidase. The presence of some of the fragments obtained with the forward subtraction was somewhat redundant, and namely: an iron transport multicopper oxidase precursor (which was found five times); an enolase and a pyruvate decarboxilase (four times); a thiazole synthase (three times); a c-4 methyl sterol oxidase and an o-acetyl homoserine-o-acetylserine sulfhydrylase (two times). Also, two of the fragments obtained with the reverse subtraction were found twice: a peroxisomal primary copper amine oxidase and a glutamate synthase.

**Table 2.** Characteristics and putative function of clones obtained from suppressive subtractive hybridization, confirmed by Southern blotting for RaSH and by semi-quantitative PCR for PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit

Clones	Predicted Function	Identity (%)	e value	frequency
<b><u>RaSH</u></b>				
<b><i>Pichia fermentans</i> on peach fruit:</b>				
PI-01	Glutathione peroxidase ( <i>Candida tenuis</i> )	64	3e-14	1
PI-02	Phosphoglycerate kinase ( <i>Candida boidinii</i> )	91	6e-29	1
PI-57	3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase ( <i>Lodderomyces elongisporus</i> )	73	3e-22	1
PI-144	Acetolactate synthase ( <i>Pichia angusta</i> )	95	3e-24	1
PII-01	Putative pyruvate kinase ( <i>Pichia angusta</i> )	74	6e-24	1
PII-06	GTPase cytoplasmic elongation factor 1 alpha ( <i>Pichia fermentans</i> )	95	2e-21	1
PII-26	Elongation factor 2 ( <i>Pichia angusta</i> )	94	2e-26	2
PII-59	Succinyl-CoA synthetase subunit ( <i>Pichia angusta</i> )	90	2e-29	1
PII-60	Heat shock protein 70 ( <i>Pichia angusta</i> )	79	2e-71	2
PII-65	NADP(+)-glutamate dehydrogenase ( <i>Pichia angusta</i> )	84	2e-31	1
PIII-02	NADH dehydrogenase ( <i>Pichia angusta</i> )	74	8e-21	1
<b><u>PCR-Select™ cDNA Subtraction</u></b>				
<b><i>Pichia fermentans</i> on peach fruit:</b>				
P-A21	C-4 methyl sterol oxidase ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	70	7e-144	2
P-A36	Heat shock protein 70-2 ( <i>Candida tenuis</i> )	91	5e-96	1
P-B07	Glycerol 3-phosphate dehydrogenase NAD+ ( <i>Candida glycerinogenes</i> )	86	6e-89	1
P-B19	o-acetyl homoserine-o-acetylserine sulfhydrylase ( <i>Pichia pastoris</i> )	65	1e-105	2
P-C55	Thiazole synthetase ( <i>Pichia angusta</i> )	66	7e-86	3
P-C63	Iron transport multicopper oxidase precursor ( <i>Pichia angusta</i> )	64	4e-91	5
P-F55	Enolase ( <i>Candida glycerinogenes</i> )	70	2e-52	4
P-Thi	Thiamine biosynthesis enzyme ( <i>Pichia angusta</i> )	83	7e-27	1
P-Pyr	Pyruvate decarboxilase ( <i>Pichia angusta</i> )	74	8e-34	4
<b><i>Pichia fermentans</i> on apple fruit:</b>				
M-B41	Peroxisomal primary copper amine oxidase ( <i>Pichia angusta</i> )	68	8e-94	2
M-C51	OPT Oligopeptide transporter ( <i>Debaryomyces hansenii</i> )	62	6e-70	1
M-G43	Glutamate synthase ( <i>Pichia angusta</i> )	87	3e-133	2



**Figure 3.** Morphological difference of *P. fermentans* DISAABA 726 grown between two autoclaved circular sheets of cellophane membrane placed between either apple (A1) or peach (B2) fruits, for 72 hours at RT. Since the morphological differences between the two shapes are perceptible from the third day of growth, becoming more and more clear from the 6<sup>th</sup> day on (A2 and B2), samples were analyzed after 24 hours of growth at RT so to look for genes involved in the first dimorphic transition induction.

## Discussion

A biofilm-forming strain of *P. fermentans* has been previously shown to be very effective in controlling brown rot on apple fruit when co-inoculated into artificial wounds with a phytopathogenic isolate of *Monilinia fructicola* (Giobbe *et al.*, 2007). When sprayed onto apple fruit surface, this strain forms a thin biofilm but fails to colonise the underlying tissues. When inoculated into wounds or when sprayed onto peach fruit surface, this yeast strain shows unexpected pathogenic traits, causing rapid decay of fruit tissues even in the absence of *M. fructicola*. Colonization of peach fruit tissue is characterized by a transition from yeast-like growth to pseudohyphal growth, suggesting that pseudohyphal growth plays a major role in governing the pathogenic behaviour of *P. fermentans*.

In the present investigation, we have performed two different subtraction approaches to gain insight on genes involved in the dimorphic transition and that could be related also to the pathogenic behaviour of *P. fermentans* on peach fruit. Overall, the potential functions of the genes reported in this study are widespread, but can be roughly related to stress response, glycolysis, amino acid biosynthesis, and alcoholic fermentation.

The higher expression of stress proteins by *P. fermentans* during growth on peach fruit indicates that the yeast undergoes stressful conditions when shifting towards pseudohyphal growth. Heat shock proteins are expressed in response to an array of stresses, including hyperthermia, exposure to oxygen radicals, heavy metals, ethanol, and amino acid analogues (De Maio, 1999). Among the upregulated genes possibly involved in *P. brasiliensis* dimorphism, Felipe *et al.* (2005) highlighted just the ones encoding for heat shock proteins suggesting that stress response is likely associated to the increasing temperature of the host required by the yeast for its cell differentiation. While an increase in temperature within the peach fruit tissues during colonization by *P. fermentans* is obviously not applicable, heat shock proteins resulted more expressed in its pseudohyphal shape as well as the enolase. An isoprotein of the latter was reported to be a heat shock protein expressed by *Saccharomyces cerevisiae* Meyen as a response to heat stress, while in *C. albicans* enolase does not increase during heat

stress but still its amino acid sequence seems quite similar to the hsp70 class proteins (Franklyn and Warmington, 1994).

Over-expression of glycerol 3-phosphate dehydrogenase NAD<sup>+</sup> could instead confirm that stimulation of glycerol biosynthesis and its accumulation under osmotic-stress growth conditions is a common mechanism for most yeasts (Hua *et al.*, 2008).

Among the over-expressed genes we have found a 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase, which is involved in the riboflavin synthesis, a vitamin usually overproduced by some yeast species in response to the oxidative stress and to iron deficiency (Boretsky *et al.*, 2007). The higher expression of NADH dehydrogenase, one of the three energy-transducing enzymes of the mitochondrial electron transport chain, suggests that an increase of respiration could also imply a higher production of reactive oxygen species (ROS), thus resulting in an oxidative stress for the yeast cells when shifting toward pseudohyphal morphology. Müller *et al.* (2008) noticed, during *in vitro* experiments, that ROS production from NADH dehydrogenase was higher during reverse electron transfer, with elevated succinate concentration (regulated by succinyl-CoA synthetase, here overexpressed), when glycerol 3-phosphate dehydrogenase NAD<sup>+</sup> and succinate dehydrogenase serve as electron donors to reduce NAD<sup>+</sup> to NADH. The oxidative stress could also explain the higher expression of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase, which protects cells from oxidative damages by reducing hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) while converting two molecules of reduced glutathione into one molecule of glutathione disulfide; in *C. albicans* that the amount of the reduced form becomes lower just during the yeast-to-mycelium transition (González-Párraga *et al.*, 2005).

Han *et al.* (2011) highlighted a likely higher glycolytic enzyme expression during hyphal growth of *C. albicans* since several glycolytic genes are regulated by signaling pathways associated with morphogenesis. Although expression of these genes is not regulated tightly and fluctuates during the yeast-to-hyphal switch (Swoboda *et al.*, 1994), some differences in their activities have been correlated with yeast dimorphism (Schwartz and Larsh, 1982). Phosphoglycerate kinase and pyruvate kinase are among these up-regulated enzymes in the pseudohyphal morphology (Enjalbert *et al.*, 2006; Yin *et al.*, 2004) but also the elongation factor 1 seems to have an important role in the upregulation of different glycolytic enzymes (Doedt *et al.*, 2004; García-Sánchez *et al.*, 2005; Sexton *et al.*, 2007) and hence in morphogenesis, since its reduced expression or deletion causes an inability to form germ tubes and true hyphae in the presence of serum (Stoldt *et al.*, 1997, Lo *et al.*, 1997). Moreover, a *C. albicans* hypha-deficient mutant *efg1Δ/Δ* presented a lack of adhesion, epithelial invasion and damage (Naglik *et al.*, 2008).

Another evidence of the importance of glycolytic enzymes during morphogenesis were shown by Shirliff *et al.* (2009), who observed that, among several of these enzymes, enolase and pyruvate kinase were downregulated when *C. albicans* was exposed to farnesol, an acyclic sesquiterpene alcohol that works as a *quorum sensing* signal able to block the hyphal differentiation of the yeast. Even the expression of oxidoreductase enzymes such as C-4 methyl sterol oxidase (Ying-Ying *et al.*, 2005), involved in the sterol biosynthetic pathway and hence in the cellular membrane composition, and of iron transport multicopper oxidase (Nett *et al.*, 2009) is lower when *C. albicans* hyphal formation is inhibited by farnesol. This could explain why in the *P. fermentans* pseudohyphal form all of these enzymes are more expressed.

It is known that morphogenesis in *S. cerevisiae* and *C. albicans* can be controlled by the production of aromatic alcohols from amino acids (Chen and Fink, 2006). The amino acid methionine also seems to induce pseudohyphal formation in *C. albicans*, since it was observed that the presence of methionine was the signal for the beginning of the filamentous controlling process (Maidan *et al.*, 2005), and this could likely happen in *P. fermentans*. The over expression of o-acetyl-homoserine sulfydrylase could be related to this pathway, since it is involved in methionine biosynthesis. It could be also worth of interest that both NAD- and NADP-dependent glutamate dehydrogenases, the biosynthetic enzymes involved in the reductive amination of α-ketoglutarate in the urea cycle (Peters and Sypherd, 1979) occupy an important role in inter-linking the carbon and

nitrogen metabolism during the biosynthesis of chitin, a main cell wall polymer (Amin *et al.*, 2004) that could be likely over-produced during the morphological switch.

It is also possible that *P. fermentans*, while growing on peach fruit undergoes fermentation processes more easily than on apple as suggested by the higher expression of pyruvate decarboxylase. This enzyme is involved in the metabolic pathway of alcoholic fermentation and its catalytic activity depends on the presence of the cofactor thiamine diphosphate (König *et al.*, 2009), a derivative from the vitamin thiamine. Synthesis of the latter requires both thiamine biosynthesis enzymes and thiazole synthetase, more expressed in the pseudohyphal form than in the yeast one. The non-coenzymatic role of thiamine derivatives could also be involved in several processes such as regulation of gene expression, stress response, and perhaps yet not identified signal transduction pathways in response to adverse environmental conditions (Tylicki and Siemieniuk, 2011).

We have no evidence for the interaction between *P. fermentans* dimorphic behavior and the fruit ripening regulator ethylene, which influences several steps of the beginning and progression of peach fruit softening (Hayama *et al.*, 2006) and is by several environmental stimuli, such as wounding and pathogen attack (Tatsuki, 2010). Noteworthy, ethylene was shown to regulate the hyphal growth of *B. cinerea* (Kępczynska, 1993) and its biosynthesis starts from the amino acid methionine, which has been highlighted, as previously noted, as one of the signals for the beginning of both *C. albicans* and *P. fermentans* dimorphic switch.

None of the sequences found are directly related to genes involved in the expression of lytic enzymes, which could have explained tissue decay on peach fruit. Noteworthy, while *C. albicans* is reported to secrete phospholipases, that could contribute to epithelial cell damage during candidiasis (Naglik *et al.*, 2003; Theiss *et al.*, 2006), their involvement in cell damages is still not rigorously tested (Zhu and Filler, 2009). It is likely that peach tissue invasion by *P. fermentans* could also depend on the mechanic pressure applied by the growing pseudohyphae against the fruit tissue, which become softer and less lignified than those of apple during storage, as a consequence of endogenous endopolygalacturonase activity during ripening (Pressey and Avants, 1973; Tatsuki, 2010). If this is the case, pathogenicity of *P. fermentans* on peach fruit would probably represent a secondary consequence of the interaction between the pseudohyphal formation and fruit ripening, culminating in a stronger intrusive growth. It is interesting to note that *C. albicans* glycerol-3-phosphate dehydrogenase deficient strains were not able to induce damage in epithelial cells, though maintaining their invasive behavior, suggesting that glycerol accumulation within the hyphae may contribute to cell damage, likely influencing turgor pressure and morphogenic plasticity (Naglik *et al.*, 2011).

It shouldn't be ruled out, however, the possibility of another cell-invasion mechanism carried out by *C. albicans*, that is the induction of epithelial cell endocytosis. This is induced by invasin-like proteins expressed on the surface of *C. albicans* hyphae that bind the epithelial cell surface proteins, inducing these cells to produce pseudopods able to tie the hyphae and to pull them inside (Zhu and Filler, 2009), occurrence that may lead to tissue-cell apoptosis. It's still not known though if and which enzymes, among those synthesized by *P. fermentans*, could work as those invasin-like proteins recognized by peach tissue, but in *C. albicans* one of these proteins is a Ssa1, a heat shock protein HSP70 family member expressed on the cell surface (Sun *et al.*, 2010).

With respect to those genes being more expressed in the budding shape of *P. fermentans*, the higher expression of the oxidoreductase enzyme glutamate synthase suggests that, just as in the pseudohyphal form, the balance between glutamate and  $\alpha$ -ketoglutaric acid in the Krebs cycle may play a key role in the control of *P. fermentans* dimorphism. The importance of nitrogen in the yeast behavior could also be highlighted by the over-expression of amine oxidase (AMO), a peroxisomal matrix protein of *Hansenula polymorpha* Morais & M.H. Maia, which is induced during growth in media containing primary amines as a sole nitrogen source (Faber *et al.*, 1993) and that is imported into the peroxisomal matrix cells have grown under nitrogen-limited conditions (Faber *et al.*, 1994).

Oligopeptide transporters of the OPT family are involved instead in nitrogen storage and mobilization, quorum sensing, differentiation, sexual induction, mating, etc.

(Gomolplitinant *et al.*, 2011). It has also been found that high-affinity *S. cerevisiae* and *S. pombe* glutathione transporters, Hgt1p and OPT1, respectively, belong to the OPT family (Dworeck *et al.* 2009; Kaur *et al.* 2009) and, as we've seen, the balance of glutathione in *P. fermentans* may be involved in its dimorphism.

Our results suggest how *P. fermentans* dimorphism is likely influenced by the commodity where it grows, but its pathogenicity on peach fruit seems to be caused by several linked events rather than by an innate pathogenic behavior. Nevertheless, this should warn over the need to foreseeing, and hence to widely testing, how the microorganisms chosen as post-harvest biocontrol agents interact with different fruit species and also how environmental stress can affect their behavior and stability. Along with proteomics, functional genomics approaches applied to this field may help to predict, determine and monitor changes in the physiological status of microorganism used in postharvest (Droby *et al.*, 2009). The final aim would be to enhance effectiveness and safety of this indispensable tool, perfectly fitting the integrated production goals, so to avoid unexpected contamination and losses during the fruit storage and processing that could result not only in wide economic leaks but also in an undesirable mistrust towards it by producers and consumers.

## References

- Amin A, Joshi M & Deshpande MV (2004) Morphology-associated expression of NADP-dependent glutamate dehydrogenases during yeast-mycelium transition of a dimorphic fungus *Benjaminiella poitrasii*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **85**: 327-334.
- Barkai-Golan R (2001) Postharvest disease initiation. *Postharvest disease of fruits and vegetables. Development and control* (Barkai-Golan R, ed.), pp. 3-21. Elsevier Science & Technology, Amsterdam, Netherland.
- Bassett CL, Wisniewski ME, Artlip TS & Norelli JL (2006) Global analysis of genes regulated by low temperature and photoperiod in peach bark. *J Am Soc Hortic Sci* **131**: 551-563.
- Boretsky YR, Protchenko OV, Prokopiv TM, Mukalov IO, Fedorovych DV & Sibirny AA (2007) Mutations and environmental factors affecting regulation of riboflavin synthesis and iron assimilation also cause oxidative stress in the yeast *Pichia guilliermondii*. *J Basic Microbiol* **47**: 371-377.
- Chen HC & Fink GR (2006) Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. *Genes Dev* **20**: 1150-1161.
- De Maio A (1999) Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams. *Shock* **11**: 1-12.
- D'Enfert C (2009) Hidden killers: persistence of opportunistic fungal pathogens in the human host. *Curr Opin Microbiol* **12**: 358-364.
- Doedt T, Krishnamurthy S, Bockmühl DP, Tebarth B, Stempel C, Russell CL, Brown AJP & Ernst JF (2004) APSES proteins regulate morphogenesis and metabolism in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* **15**: 3167-3180.
- Droby S, Wisniewski M, Macarasin D & Wilson C (2009) Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm? *Postharvest Biol Technol* **52**: 137-145.
- Dworeck T, Wolf K & Zimmermann M (2009) SpOPT1, a member of the oligopeptide family (OPT) of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, is involved in the transport of glutathione through the outer membrane of the cell. *Yeast* **26**: 67-73.
- Enjalbert B, Smith DA, Cornell MJ, Alam I, Nicholls S, Brown AJP & Quinn J (2006) Role of the Hog1 stress-activated protein kinase in the global transcriptional response to stress in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* **17**: 1018-1032.
- Faber KN, Haima P, de Hoop MJ, Harder W, Veenhuis M & Ab G (1993) Peroxisomal amine oxidase of *Hansenula polymorpha* does not require its SRL-containing C-terminal sequence for targeting. *Yeast* **9**: 331-338.
- Faber KN, Haima P, Gietl C, Harder W, Ab G & Veenhuis M (1994) The methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* contains an inducible import pathway for peroxisomal matrix proteins with an N-terminal targeting signal (PTS2 proteins). *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 12985-12989.

- Felipe MSS, Andrade RV, Arraes FBM, Nicola AM, Maranhao AQ, Torres FAG, Silva-Pereira I, Pocas-Fonseca MJ, Campos EG, Moraes LMP, Andrade PA, Tavares AHFP, Silva SS, Kyaw CM, Souza DP, PbGenome Network, Pereira M, Jesuino RSA, Andrade EV, Parente JA, Oliveira GS, Barbosa MS, Martins NF, Fachin AL, Cardoso RS, Passos GAS, Almeida NF, Walter MEMT, Soares CMA, Carvalho MJA & Brígido MM (2005) Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. *J Biol Chem* **280**: 24706-24714.
- Franklyn KM & Warmington JR (1994) The expression of *Candida albicans* enolase is not heat shock inducible. *FEMS Microbiol Lett* **118**: 219-225.
- García-Sánchez S, Mavor AL, Russell CL, Argimon S, Dennison P, Enjalbert B & Brown AJP (2005) Global roles of Ssn6 in tup1- and nrg1-dependent gene regulation in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* **16**: 2913-2925.
- Giobbe S, Marceddu S, Scherm B, Zara G, Mazzarello VL, 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.
- Gomolplitinant KM & Saier MH Jr (2011) Evolution of the Oligopeptide Transporter Family. *J Membr Biol* **240**: 89-110.
- González-Párraga P, Marin FR, Arguelles JC & Hernandez JA (2005) Correlation between the intracellular content of glutathione and the formation of germ-tubes induced by human serum in *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta-Gen Subj* **1722**: 324-330.
- Han TL, Cannon RD & Villas-Bôas SG (2011) The metabolic basis of *Candida albicans* morphogenesis and quorum sensing. *Fungal Genet Biol* **48**: 747-763.
- Hayama H, Shimada T, Fujii H, Ito A & Kashimura Y (2006) Ethylene-regulation of fruit softening and softening-related genes in peach. *J Exp Bot* **57**: 4071-4077.
- Hua Y, Liang-Hui J, Yu-Ping L & Ning J (2008) Glycerol accumulation in the dimorphic yeast *Saccharomyces fibuligera*: cloning of two glycerol 3-phosphate dehydrogenase genes, one of which is markedly induced by osmotic stress. *Yeast* **25**: 609-621.
- Janisiewicz WJ & Korsten L (2002) Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annu Rev Phytopathol* **40**: 411-441.
- Jiang H, Kang D, Alexandre D & Fisher PB (2000) RaSH. A rapid subtraction hybridization approach for identifying and cloning differentially expressed genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 12684-12689.
- Jiang ZQ, Guo YH, Li SM, Qi HY & Guo JH (2006) Evaluation of biocontrol efficiency of different *Bacillus* preparations and field application methods against *Phytophthora* blight of bell pepper. *Biol Control* **36**: 216-223.
- Kaur J, Srikanth CV & Bachhawat AK (2009) Differential roles played by the native cysteine residues of the yeast glutathione transporter, Hgt1p. *FEMS Yeast Res* **9**: 849-866.
- Kępczynska E (1993) Involvement of ethylene in the regulation of growth and development of the fungus *Botrytis cinerea* Pers. ex. Fr.. *Plant Growth Regul* **13**: 65 - 69.
- König S, Spinka M & Kutter S (2009) Allosteric activation of pyruvate decarboxylases. A never-ending story? *J Mol Catal B-Enzym* **61**: 100-110.
- Lin X & Heitman J (2006) The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annu Rev Microbiol* **60**: 69-105.
- Lin X (2009) *Cryptococcus neoformans*: morphogenesis, infection, and evolution. *Infect Genet Evol* **9**: 401-416.
- Lo HJ, Kohler JR, DiDomenico B, Loebenberg D, Cacciapuoti A & Fink GR (1997) Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* **90**: 939-949.
- 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.
- Migheli Q (2001) Genetically modified biocontrol agents: environmental impact and risk analysis. *J Plant Pathol* **83**: 47-56.

- Müller F, Liu Y, Abdul-Ghani MA, Lustgarten MS, Bhattacharya A, Jang YC & Van Remmen H (2008) High rates of superoxide production in skeletal-muscle mitochondria respiring on both complex I- and complex II-linked substrates. *Biochem J* **409**: 491-499.
- Naglik JR, Challacombe SJ & Hube B (2003) *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**: 400-428.
- Naglik JR, Moyes D, Makwana J, Kanzaria P, Tschlaki E, Weindl G, Tappuni AR, Rodgers CA, Woodman AJ, Challacombe SJ, Schaller M & Hube B (2008) Quantitative expression of the *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase gene family in human oral and vaginal candidiasis. *Microbiology* **154**: 3266-3280.
- Naglik JR, Moyes DL, Wachtler B & Hube B (2011) *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. *Microbes Infect* **13**: 963-976.
- Nett J, Lepak A, Marchillo K & Andes D (2009) Time course global gene expression analysis of an *in vivo* *Candida* biofilm. *J Infect Dis* **200**: 307-313.
- Passoth V, Fredlund E, Druvefors UA & Schnurer J (2006) Biotechnology, physiology and genetics of the yeast *Pichia anomala*. *FEMS Yeast Res* **6**: 3-13.
- Peters J & Sypherd PS (1979) Morphology- associated expression of nicotinamide adenine dinucleotide-dependent glutamate dehydrogenase in *Mucor racemosus*. *J Bacteriol* **137**: 1134-1139.
- Pressey R & Avants JK (1973) Separation and characterization of endopolygalacturonase and exopolygalacturonase from peach. *Plant Physiol* **52**: 252-256.
- Reynolds TB & Fink GR (2001) Baker's yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science* **291**: 878-881.
- Rooney PJ & Klein BS (2002) Linking fungal morphogenesis with virulence. *Cell Microbiol* **4**: 127-137.
- Schwartz DS & Larsh HW (1982) Comparative activities of glycolytic enzymes in yeast and mycelial forms of *Candida albicans*. *Mycopathologia* **78**: 93-98.
- 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, Schmoll M, Balmas V, Kubicek CP & Migheli Q (2009). Identification of potential marker genes for *Trichoderma harzianum* strains with high antagonistic potential against *Rhizoctonia solani* by a rapid subtraction hybridization approach. *Curr Genet* **55**: 81-91.
- Seneviratne G, Zavahir JS, Bandara WMMS & Weerasekara MLMAW (2008) Fungal-bacterial biofilms: their development for novel biotechnological applications. *World J Microbiol Biotechnol* **24**: 739-743.
- Sexton JA, Brown V & Johnston M (2007) Regulation of sugar transport and metabolism by the *Candida albicans* Rgt1 transcriptional repressor. *Yeast* **24**: 847-860.
- Shirliff ME, Krom BP, Meijering RAM, Peters BM, Zhu J, Scheper MA, Harris ML & Jabra-Rizk MA (2009) Farnesol-induced apoptosis in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemoter* **53**: 2392-2401.
- Smilanick JL (1994) Strategies for the isolation and testing of biocontrol agents. *Biological Control of Postharvest Diseases: Theory and Practice* (Wilson CL & Wisniewski ME, eds), pp. 25-42. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Spadaro D, Vola R, Piano S & Gullino ML (2002) 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.
- Sprague GF Jr & Winans SC (2006) Eukaryotes learn how to count: quorum sensing by yeast. *Genes Dev* **20**: 1045-1049.
- Stoldt VR, Sonneborn A, Leuker CE & Ernst JF (1997) Efg1p, 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.
- Sun JN, Solis NV, Phan QT, Bajwa JS, Kashleva H, Thompson A, Liu Y, Dongari-Bagtzoglou A, Edgerton M & Filler SG (2010) Host cell invasion and virulence mediated by *Candida albicans* Ssa1. *PLoS Pathog* **6**: e1001181.

- Swoboda RK, Bertram G, Delbrück S, Ernst JF, Gow NA, Gooday GW & Brown AJ (1994) Fluctuations in glycolytic mRNA levels during morphogenesis in *Candida albicans* reflect underlying changes in growth and are not a response to cellular dimorphism. *Mol Microbiol* **13**: 663-672.
- Tatsuki M (2010) Ethylene biosynthesis and perception in fruit. *J Jpn Soc Hortic Sci* **79**: 315-326.
- Theiss S, Ishdorj G, Brenot A, Kretschmar M, Lan CY, Nichterlein T, Hacker J, Nigam S, Agabian N & Kohler GA (2006) Inactivation of the phospholipase B gene PLB5 in wild-type *Candida albicans* reduces cell-associated phospholipase A2 activity and attenuates virulence. *Int J Med Microbiol* **296**: 405-420.
- Tylicki A & Siemieniuk. M (2011) Thiamine and its derivatives in the regulation of cell metabolism. *Postep Hig Med Dosw* **65**: 447-469.
- Wingard JR, Merz WG & Saral R (1979) *Candida tropicalis*: a major pathogen in immunocompromised patients. *Ann Intern Med* **91**: 539-543.
- Wisniewski M E, Wilson C, Droby S, Chalutz E, El-Gahouth A & Stevens C (2007) Postharvest biocontrol: new concepts and applications. In *Biological Control: A Global Perspective* (Vincent C, Goettel MS & Lazarovits G, eds), pp. 262-273. CABI, Cambridge, MA, USA.
- Yin Z, Stead D, Walker LSJ, Riba-Garcia I, McInerney T, Gaskell S, Oliver SG, Cash P & Brown AJP (2004) Proteomic response to amino acid starvation in *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Proteomics* **4**: 2425-2436.
- Ying-Ying C, Yong-Bing C, Zheng X, Kang Y, Yao L, Yi X, Zhen-Yu Z, Wan-Sheng C & Yuan-Ying J (2005) cDNA microarray analysis of differential gene expression in *Candida albicans* biofilm exposed to farnesol. *Antimicrob Agents Chemoter* **49**: 584-589.
- Zhu WG & Filler SG (2009) Interactions of *Candida albicans* with epithelial cells. *Cell Microbiol* **12**: 273-282.

## 5. Conclusioni

La conoscenza di tutti i meccanismi alla base dell'efficacia dei microrganismi antagonisti è un passo essenziale per migliorarne la loro applicazione commerciale. La comprovata efficacia antagonistica del lievito *P. angusta* contro *M. fructicola* e *B. cinerea* su mela, lo candida quale promettente modello per comprendere meglio questi meccanismi a livello molecolare. Trattandosi di un lievito ben definito dal punto di vista fisiologico, biochimico (Gellissen, 2002; Boekhout *et al.*, 2007) e genetico (Ramezani-Rad *et al.*, 2003), è già stato ampiamente utilizzato come organismo modello per studiare il metabolismo delle varie fonti di carbonio e di azoto organico utilizzate per sua la crescita (Van der Klei e Veenhuis, 2006). Inoltre diversi studi su *P. angusta* sono stati in gran parte incentrati sulla biogenesi e la proliferazione dei perossisomi (Vallini *et al.*, 2000), piccole vescicole cellulari costituite da una membrana sede di diversi enzimi coinvolti nella formazione di perossido d'idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), e sul metabolismo dell'azoto (Rossi *et al.*, 2005). I lieviti metilotrofici, come appunto *P. angusta*, sono infatti noti per produrre una grande quantità di perossisomi quando si sviluppano utilizzando metanolo o alcune fonti azotate, come metilammina, quali fonti di sviluppo. In natura, il metanolo viene rilasciato grazie alla degradazione delle pectine, ad esempio nei frutti in via di marcescenza e approfondire queste caratteristiche, sia in post-raccolta che nel pre-raccolta, potrebbe essere molto interessante, in quanto consentirebbe di studiare il disfacimento dei tessuti della frutta attaccata.

Le interazioni tra *P. angusta* e patogeni delle piante sono, al momento, ancora molto limitate ma l'utilizzo di ceppi aploidi di questa specie, ormai di largo impiego e facilmente trasformabili geneticamente, potrebbe rappresentare un utile strumento di ricerca nelle analisi genetiche atte ad indagare i rapporti fisiologici tra il lievito e gli agenti patogeni, e per capire il ruolo dei diversi metaboliti e gli enzimi coinvolti nell'attività antagonista.

A conferma di quanto detto sopra, potrebbero considerarsi un punto di partenza gli ulteriori esperimenti volti a valutare preliminarmente l'idoneità quale antagonista contro *M. fructicola*, di un ceppo mutante auxotrofico per l'amminoacido leucina, in grado di ripristinare completamente la propria efficacia

antagonista (pari a quella del ceppo tipo) solo se inoculato insieme ad una sospensione contenente  $1,2 \text{ g L}^{-1}$  di leucina esogena.

L'isolamento di altri mutanti e il loro saggio per valutarne l'attività antagonista, potrebbero porre le basi per intraprendere un'analisi sistematica di quei fattori chiave che, interagendo tra loro, sono coinvolti nella complessa rete costituita da antagonista, tessuti del frutto e agente patogeno.

Se questo lavoro di tesi mette da un lato in luce l'opportunità di utilizzare *P. angusta* come promettente modello per approfondire meglio i meccanismi antagonistici, conferma altresì la patogenicità di *P. fermentans* sul frutto di pesca: patogenicità che sembra comunque non derivare dalla produzione di enzimi litici ma, come vedremo nel dettaglio più avanti, dal concorrere di più fenomeni.

Come precedentemente riportato, un ceppo di *P. fermentans* è risultato essere molto efficace nel controllare il marciume bruno su mela quando co-inoculato, in ferite praticate artificialmente sul frutto, assieme ad un isolato del fitopatogeno *M. fructicola* (Giobbe *et al.*, 2007). Se spruzzato sulla superficie del frutto di mela, questo lievito forma un sottile biofilm ma non riesce a colonizzare i tessuti sottostanti. Quando inoculato in ferite o semplicemente spruzzato sulla superficie del frutto di pesca, lo stesso ceppo manifesta invece un comportamento inaspettato, provocando un rapido decadimento dei tessuti del frutto anche in assenza di *M. fructicola*. La colonizzazione del tessuto della pesca è inoltre caratterizzata da una marcata transizione da una crescita vegetativa tipicamente lieviforme ad uno sviluppo pseudoifale, lasciando intuire che quest'ultimo possa giocare un ruolo importante nel governare il comportamento patogeno di *P. fermentans*.

Nel lavoro qui presentato, sono stati utilizzati due diversi approcci sottrattivi per ottenere informazioni sui geni coinvolti nella transizione dimorfica e nel loro possibile coinvolgimento nella patogenicità di *P. fermentans* su pesca. Nel complesso, le potenziali funzioni dei geni individuati grazie a questo studio sono diverse, ma possono essere ricondotte, più o meno, alla risposta allo stress, alla glicolisi, alla biosintesi di aminoacidi, e alla fermentazione alcolica.

La più alta espressione di proteine da stress durante la crescita di *P. fermentans* su pesca potrebbe indicare che il lievito vada incontro a condizioni di stress nel

momento in cui inizia a svilupparsi in modo pseudoifale. Le *heat shock proteins* (*HSP*) sono espresse in risposta a una serie di sollecitazioni, tra cui l'ipertermia, l'esposizione ai radicali dell'ossigeno, ai metalli pesanti, all'etanolo e agli analoghi degli amminoacidi (De Maio, 1999). Tra i geni coinvolti nel dimorfismo di *P. brasiliensis* (Felipe *et al.*, 2005) ci sono proprio quelli che codificano *HSP*, e ciò suggerisce che la risposta allo stress potrebbe essere associata all'aumento di temperatura dell'ospite, richiesto dal lievito per la sua differenziazione cellulare. Se però l'aumento della temperatura all'interno dei tessuti di pesca, durante la colonizzazione di *P. fermentans*, è improbabile, le *HSP* risultano più espresse dalla sua forma pseudoifale, così come l'enolasi. Un'isoproteina di quest'ultima è risultata essere una *HSP* espressa da *S. cerevisiae*, come risposta allo stress termico, mentre in *C. albicans* l'enolasi non aumenta durante lo stress termico, ma la sua sequenza aminoacidica risulta comunque simile, di nove sequenze aminoacidiche, a quella delle *HSP* di classe 70 (Franklyn e Warmington, 1994). La sovra-espressione del gene codificante una glicerolo-3-fosfato deidrogenasi (NAD<sup>+</sup>) potrebbe invece confermare che l'attivazione della sintesi di glicerolo e il suo accumulo è un meccanismo comune per la maggior parte dei lieviti che si sviluppano sotto condizioni di stress osmotico (Hua *et al.*, 2008).

Tra i risultati ottenuti c'è anche una *3,4-diidrossi-2-butanone 4-fosfato sintetasi* coinvolta nella sintesi della vitamina riboflavina, di solito prodotta in elevata quantità da alcune specie di lievito in risposta allo stress ossidativo e alla carenza di ferro (Boretsky *et al.*, 2007).

La più alta espressione di NADH deidrogenasi, il Complesso I della catena di trasporto degli elettroni nei mitocondri, suggerisce che un aumento della respirazione potrebbe anche comportare una maggiore produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), con il risultato di uno stress ossidativo per le cellule di lievito che si avviano verso uno sviluppo pseudoifale. Müller *et al.* (2008) hanno osservato in esperimenti *in vitro* che la produzione di ROS, grazie a NADH deidrogenasi, era più alta durante il trasferimento inverso di elettroni, con elevata concentrazione di succinato (regolata da succinil-CoA sintetasi, risultato sovra-espresso nella sottrazione), quando la glicerolo 3-fosfato deidrogenasi (NAD<sup>+</sup>) e la succinato deidrogenasi fungono da donatori di elettroni per ridurre NAD<sup>+</sup> in

NADH. Lo stress ossidativo potrebbe anche spiegare l'espressione più alta della glutatione perossidasi, un enzima antiossidante che protegge le cellule dai danni ossidativi, riducendo il perossido di idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), grazie alla conversione di due molecole di glutatione ridotto in una molecola di glutatione disolfuro. E' stato, inoltre, osservato che, in *C. albicans*, la quantità della forma ridotta di glutatione diminuisce durante la transizione dalla forma lieviforme a quella miceliare (González-Párraga *et al.*, 2005).

Han *et al.* (2011) hanno, invece, evidenziato una più alta espressione degli enzimi glicolitici durante la crescita ifale di *C. albicans* in quanto diversi geni glicolitici sono regolati da *pathway* associati alla morfogenesi. Sebbene l'espressione di questi geni non sia strettamente regolamentata e oscilla durante la conversione lieviforme-pseudoifale (Swoboda *et al.*, 1994), alcune differenze nella loro attività sono state associate al dimorfismo del lievito (Schwartz e Larsh, 1982). La fosfoglicerato chinasi e la piruvato chinasi sono riportati appunto tra questi enzimi maggiormente espressi dalla morfologia pseudoifale (Enjalbert *et al.*, 2006; Yin *et al.*, 2004) ma anche l'*elongation factor 1 a* sembra avere un ruolo importante nell'espressione differenziale di diversi enzimi glicolitici (Doedt *et al.*, 2004; García-Sánchez *et al.*, 2005; Sexton *et al.*, 2007) e quindi nella morfogenesi, in quanto la sua ridotta espressione o inattivazione provoca l'incapacità di formare tubi germinativi e ife in presenza di siero (Stoldt *et al.*, 1997; Lo *et al.*, 1997). Inoltre, mutanti di *C. albicans* deficienti *efg1Δ/Δ* manifestano incapacità di adesione, invasione e quindi di causare danni alle cellule epiteliali dell'ospite (Naglik *et al.*, 2008).

Ulteriori prove dell'importanza degli enzimi glicolitici durante la morfogenesi sono state apportate da Shirliff *et al.* (2009), i quali hanno dimostrato come l'espressione di enolasi e di piruvato chinasi, venga inibita quando *C. albicans* è esposta al farnesolo, un alcool aciclico sesquiterpene che funziona come una molecola segnale *quorum sensing*, in grado di bloccare la differenziazione ifale del lievito. Anche l'espressione di enzimi ossidoreduttasici come C-4 metilsterolo ossidasi (Ying-Ying *et al.*, 2004), coinvolta nella via biosintetica degli steroli e, quindi, nella composizione della membrana cellulare, e della *iron transport multicopper oxidase* (Nett *et al.*, 2009) diminuisce quando la formazione ifale di

*C. albicans* è inibita dal farnesolo; tali considerazioni potrebbero spiegare come mai nella forma pseudoifale di *P. fermentans* tutti questi enzimi risultino più espressi che in quella lievitifforme.

E' noto però che la morfogenesi in *S. cerevisiae* e *C. albicans* sia controllata anche dalla produzione di alcoli aromatici derivati da aminoacidi (Chen e Fink, 2006) e che proprio in *C. albicans* la presenza dell'amminoacido metionina sia il segnale di inizio del processo di filamentazione (Maidan *et al.*, 2005). L'espressione più alta di una *o-acetyl-homoserine-o-acetylserine sulfhydrylase* nella forma filamentosa di *P. fermentans* potrebbe essere quindi correlata dal momento che è un enzima coinvolto proprio nella biosintesi della metionina. E' interessante notare anche che sia NAD e NADP glutammato deidrogenasi, enzimi coinvolti nell'amminazione riduttiva di  $\alpha$ -chetoglutarato nel ciclo dell'urea (Peters e Sypherd, 1979) occupano un ruolo importante nel collegamento tra il metabolismo di carbonio e di azoto durante la biosintesi di chitina, uno dei polimeri principali della parete cellulare (Amin *et al.*, 2004), la cui sovrapproduzione potrebbe essere verosimile durante la transizione morfologica.

E' anche possibile che *P. fermentans*, durante il suo sviluppo su pesca, vada incontro a processi di fermentazione più facilmente che su mela, così come la più alta espressione di piruvato decarbossilasi sembra suggerire. Questo enzima è infatti coinvolto nella via metabolica della fermentazione alcolica e la sua attività catalitica dipende dalla presenza del cofattore tiamina difosfato (König *et al.*, 2009), un derivato della vitamina tiamina. La sintesi di questi ultimi richiede sia enzimi specifici che la tiazolo sintetasi, entrambi più espressi nella forma pseudoifale che in quella lievitifforme. Derivati della tiamina, con ruolo non coenzimatico, potrebbero anche essere coinvolti in numerosi processi come la regolazione dell'espressione genica, la risposta allo stress e, forse, *pathway* non ancora identificati, in risposta a condizioni ambientali avverse (Tylicki e Siemieniuk, 2011).

Non si hanno informazioni circa l'interazione tra *P. fermentans* e il regolatore della maturazione della frutta, l'etilene, che influenza diverse fasi dell'inizio di rammollimento, e della sua progressione, sul frutto di pesca (Hiroko *et al.*, 2006), la cui produzione è anche indotta in risposta a diversi stimoli ambientali, quali

l'attacco di patogeni e le ferite dei tessuti (Tatsuki, 2010). E' interessante notare anche che l'etilene ha dimostrato di aver un ruolo nel regolare la crescita ifale di *B. cinerea* (Kępczynska, 1993) e che la sua biosintesi inizia proprio dall'amminoacido metionina che, come è stato messo prima in evidenza, è uno dei segnali principali per l'induzione del dimorfismo sia in *C. albicans* e potrebbe esserlo anche per *P. fermentans*.

Sorprendentemente, nessuna delle sequenze trovate è direttamente correlata a geni coinvolti nell'espressione di enzimi litici, che avrebbero potuto spiegare facilmente il deterioramento dei tessuti di pesca. E' interessante notare, però, che, sebbene la secrezione di fosfolipasi da parte di *C. albicans*, che potrebbero contribuire ai danni delle cellule epiteliali durante la candidosi, sia confermata (Naglik *et al.*, 2003; Theiss *et al.*, 2006), il loro coinvolgimento nei danni cellulari non è stato ancora rigorosamente dimostrato (Zhu e Filler, 2009). È probabile che l'invasione dei tessuti di pesca da parte di *P. fermentans* possa anche dipendere dalla crescente pressione meccanica esercitata dalla pseudoife contro il tessuto del frutto che, durante la conservazione, diventa via via più morbido e meno lignificato rispetto a quello di mela, come conseguenza dell'attività endogena delle endo-poligalatturonasi durante la maturazione (Tatsuki, 2010). Se ciò fosse vero, la patogenicità di *P. fermentans* su pesca potrebbe essere inquadrata come una conseguenza secondaria dell'interazione che si viene a creare tra lo sviluppo pseudoifale del lievito e l'aumento di maturazione del frutto, culminante in una crescita più intrusiva. E' interessante notare inoltre che due ceppi di *C. albicans* incapaci di sintetizzare la *glicerolo-3-fosfato deidrogenasi* non siano stati in grado di indurre danni alle cellule epiteliali, pur mantenendo il loro comportamento invasivo, il che suggerisce che l'accumulo di glicerolo all'interno delle ife contribuisca in qualche modo al danno cellulare, influenzando probabilmente la pressione di turgore e la morfogenesi delle ife (Naglik *et al.*, 2011).

Non dovrebbe essere tralasciata, tuttavia, la possibilità di un altro meccanismo di invasione cellulare messo in atto da *C. albicans*, ovvero l'induzione di endocitosi delle cellule epiteliali. Questa è indotta da cosiddette *invasin protein* espresse sulla superficie ifale di *C. albicans* e che si legano a proteine di superficie delle cellule epiteliali, inducendo queste ultime a produrre pseudopodi in grado di

legarsi attorno alle ife per poi inglobarle all'interno della cellula (Zhu e Filler, 2009); evento che può portare all'apoptosi delle cellule del tessuto epiteliale. Non è ancora noto però se e quali enzimi, tra quelli sintetizzati da *P. fermentans*, potrebbero svolgere la funzione di *invasin protein* riconosciute dal tessuto di pesca, ma in *C. albicans* una di queste è risultata essere una Ssa1, ovvero una HSP membro della famiglia HSP70 ed espressa sulla superficie cellulare (Sun *et al.*, 2010).

Per quanto riguarda i geni più espressi nella morfologia lievitifforme di *P. fermentans* su mela, la più alta espressione dell'enzima ossidoriduttasi glutammato sintasi potrebbe indicare che, proprio come nella forma pseudoifale, l'equilibrio tra il glutammato e l'acido  $\alpha$ -chetoglutarico nel ciclo di Krebs svolge un ruolo chiave nel regolare il dimorfismo *P. fermentans*.

L'importanza dell'azoto nel comportamento del lievito potrebbe anche essere evidenziata dalla sovra-espressione di ammina ossidasi (contenente rame), un enzima della matrice perossisomiale di *H. polymorpha*, che è indotta durante la crescita del lievito in un mezzo contenente ammine primarie come unica fonte di azoto (Faber *et al.*, 1993) e che viene importata nella matrice perossisomiale quando le cellule crescono sotto condizioni limitanti di azoto (Faber *et al.*, 1994).

Gli oligopeptidi trasportatori appartenenti alla famiglia OPT sono coinvolti invece nel deposito di azoto e nella sua mobilitazione, nella differenziazione, nell'induzione sessuale, nell'accoppiamento, fungono da molecole quorum sensing, ecc. (Gomolplitinant *et al.*, 2011). E' stato anche osservato che i trasportatori di glutatione ad alta affinità di *S. cerevisiae* e *S. pombe*, Hgt1p e OPT1, rispettivamente, appartengono alla famiglia degli OPT (Dworeck *et al.*, 2009; Kaur *et al.*, 2009) e, come abbiamo visto, l'equilibrio di glutatione in *P. fermentans* parrebbe essere coinvolto nel suo dimorfismo.

I risultati qui esposti indicano come il dimorfismo di *P. fermentans* sia molto probabilmente influenzato dal substrato in cui cresce, nel caso specifico i frutti di pesca e mela, ma la sua patogenicità su pesca sembra più il risultato di diversi eventi collegati tra loro che non un innato comportamento patogeno. Tuttavia questo dovrebbe comunque mettere in guardia circa la necessità di immaginare, e poi ampiamente saggiare, come i microrganismi scelti quali agenti antagonisti nel

post-raccolta possano interagire con le diverse specie di frutta e anche come gli stress ambientali possano influenzare il loro comportamento e la loro stabilità. Sta diventando quindi cruciale la necessità di meglio sviluppare le ricerche sulla proteomica e sulla genomica funzionale da applicare a questo campo, in modo da prevedere, determinare e monitorare i cambiamenti nello stato fisiologico dei microrganismi utilizzati in post-raccolta (Droby *et al.*, 2009). Lo scopo è ovviamente quello di migliorare l'efficacia e la sicurezza di questo indispensabile strumento, che si adatta perfettamente agli obiettivi della produzione integrata, in modo da evitare inaspettate contaminazioni e perdite durante lo stoccaggio e la lavorazione della frutta, che si risolverebbero non soltanto in ampie perdite economiche ma anche in una indesiderata sfiducia nei suoi confronti sia da parte dei produttori che dei consumatori.

## 6. Bibliografia

- Agrios G.N.** (2005). *Plant Pathology* (5<sup>th</sup> edition). Elsevier-Academic Press, San Diego, CA.
- Amano H.**, Haseeb M. (2001). Recently-proposed methods and concepts of testing the effects of pesticides on the beneficial mite and insect species: study limitations and implications in IPM. *Applied Entomology and Zoology*, 36: 1-11.
- Amin A.**, Joshi M., Deshpande M.V. (2004). Morphology-associated expression of NADP-dependent glutamate dehydrogenases during yeast-mycelium transition of a dimorphic fungus *Benjaminiella poitrasii*. *Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 85: 327-334.
- Andersen R.A.**, Hamilton-Kemp T.R., Hildebrand D.F., McCracken C. T., Collins R.W., Fleming P.D. (1994). Structure-antifungal activity relationship among volatile C6 and C9 aliphatic aldehydes, ketones and alcohols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42: 1563-1568.
- Arras G.**, Scherm B., Migheli Q. (2002). Improving biocontrol activity of *Pichia guillermondii* against post-harvest decay of oranges in commercial packing-houses by reduced concentration of fungicides. *Biocontrol Science and Technology*, 12: 547-553.
- Arras G.**, Maltoni S. (2004). Postharvest biological and integrated control of fungal pathogens on fruit. In: *Crop management and postharvest handling of horticultural crops: disease and disorder of fruit and vegetables* (Dris R., Niskanen R., Jain S.M., eds.), pp. 115-185. Science Publishers Inc, Enfield, USA.
- Arthur H.**, Watson K. (1976). Thermal adaptation in yeast: growth temperatures, membrane lipid, and cytochrome composition of psychrophilic, mesophilic, and thermophilic yeasts. *Journal of Bacteriology*, 128: 56-68.
- Baker K.F.**, Cook R.J. (1974). *Biological control of plant pathogens*. W. H. Freeman and Company, San Francisco, CA.
- Barkai-Golan R.** (2001). Postharvest disease initiation. In *Postharvest disease of*

*fruits and vegetables. Development and control* (Barkai-Golan R., ed.), pp. 3-21. Elsevier Science & Technology, Amsterdam, The Netherlands.

- Blachinsky D.**, Antonov J., Bercovitz A., Elad B., Feldman K., Husid A., Lazare M., Marcov N., Shamai I., Keren-Zur M., Droby S. (2007). Commercial applications of “Shemer” for the control of pre- and postharvest diseases. *IOBCWPRS Bulletin*, 30: 75-78.
- Blakeman J.P.**, Fokkema N.J. (1982). Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. *Annual Review of Phytopathology*, 201: 439-448.
- Blanco J.L.**, Garcia M.E. (2008). Immune response to fungal infections. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 125: 47-70.
- Boekhout T.**, Veenhuis M., Gellissen G. (2007). *Hansenula polymorpha* - progress in fundamental and applied research. *FEMS Yeast Research*, 7: 1081.
- Bolwell P.G.**, Bindschedler L.V., Blee K.A., Butt V.S., Davies D.R., Gardner S.L., Gerrish C., Minibayeva, F. (2002). The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three component system. *Journal of Experimental Botany*, 53: 1367-1376.
- Bolwell P.G.**, Blee K.A., Butt S.V., Davies D.R., Gardner S.L., Gerrish C., Minibayeva F., Rowntree E.G., Wojtaszek P. (1999). Recent advances in understanding the origin of the apoplastic oxidative burst in plant cells. *Free Radical Research*, 31: 137-145.
- Bolwell P.G.**, Wojtaszek P. (1997). Mechanism for the generation of reactive oxygen species in plant defense - A broad perspective. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 51: 347-366.
- Boretsky Y.R.**, Protchenko O.V., Prokopiv T.M., Mukalov I.O., Fedorovych D.V., Sibirny A.A. (2007). Mutations and environmental factors affecting regulation of riboflavin synthesis and iron assimilation also cause oxidative stress in the yeast *Pichia guilliermondii*. *Journal of Basic Microbiology*, 47: 371-377.
- Botha A.** (2011). The importance and ecology of yeasts in soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 43: 1-8.
- Bruce A.**, Austin W. J., King B. (1984). Control of growth of *Lentinus lepideus* by volatiles from *Trichoderma*. *Transactions of the British Mycological Society*,

82: 423-428.

- Calvo J.**, Calvente V., Orellano M.E., Benuzzi D., Detosetti M.I.S. (2003). Improvement in the biocontrol of post-harvest diseases apple with the use of yeast mixtures. *Biocontrol*, 48: 579-593.
- Canamas T.P.**, Viñas I., Torres R., Usall J., Solsona C., Teixidó N. (2011). Field applications of improved formulations of *Candida sake* CPA-1 for control of *Botrytis cinerea* in grapes. *Biological Control*, 56: 150-158.
- Ceccato-Antonini S.R.**, Sudbery P.E. (2004). Filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae* *Brazilian Journal of Microbiology*, 35: 173-181.
- Chalutz E.**, Wilson C.L. (1990). Postharvest biocontrol of green and blue mold and sour rot of citrus-fruit by *Debariomyces hansenii*. *Plant Disease*, 74: 134-137.
- Chand-Goyal T.**, Spotts R.A. (1996). Postharvest biological control of blue mold of apple and brown rot of sweet cherry by natural saprophytic yeasts alone or in combination with low doses of fungicides. *Biological Control*, 6: 253-259.
- Chaucheyras-Durand F.**, Walker N.D., Bachc A. (2008). Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: Past, present and future. *Animal Feed Science and Technology*, 145: 5-26.
- Chen H.C.**, Fink G.R. (2006). Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. *Genes and Development*, 20: 1150-1161.
- Cook R.J.**, Bruckart W.L., Coulson J.R., Goettel M.S., Humber R.A., Lumsden R.D., Maddox J.V., McManus M.L., Moore L., Meyer S.F., Quimby P.C., Stack J.P., Vaughn J.L. (1996). Safety of microorganisms intended for pest and plant disease control: a framework for scientific evaluation. *Biological Control*, 7: 333-351.
- Daffonchio D.**, Casella S. (2008). I microrganismi nella lotta biologica. In *Microbiologia agroalimentare* (Biavati B. e Sorlini C. eds), pp 392-395. Casa Editrice Ambrosiana, Milano.
- Deacon J.W.** (1983). Microbial control of plant pests and diseases. *American Society for Microbiology*, Washington DC, USA.
- De Maio A.** (1999). Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams. *Shock*, 11: 1-12.

- d'Enfert C.** (2009). Hidden killers: persistence of opportunistic fungal pathogens in the human host. *Current Opinion in Microbiology*, 12: 358-364.
- d'Enfert C.** (2006). Biofilms and their role in the resistance of pathogenic *Candida* to antifungal agents. *Current Drug Targets*, 7: 465-470
- Doedt T., Krishnamurthy S., Bockmühl D.P., Tebarth B., Stempel C., Russell C.L., Brown A.J.P., Ernst J.F.** (2004). APSES proteins regulate morphogenesis and metabolism in *Candida albicans*. *Molecular Biology of the Cell*, 15: 3167-3180.
- Droby S., Wisniewski M.E., Cohen L., Weiss B., Touitou D., Eilam Y., Chalutz E.,** (1997). Influence of CaCl<sub>2</sub> on *Penicillium digitatum*, grapefruit tissue and biocontrol activity of *Pichia guilliermondii*. *Phytopathology* 87: 310-315.
- Droby S., Wisniewski M.E., El-Ghaouth A., Wilson C.L.** (2002). Influence of food additives on the control of postharvest rots of apple and peach and efficacy of the yeast-based biocontrol product Aspire. *Postharvest Biology and Technology*, 27: 127-135.
- Droby S., Wisniewski M., Macarasin D., Wilson C.** (2009). Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm? *Postharvest Biology and Technology*, 52: 137-145.
- Dworeck T., Wolf K., Zimmermann M.** (2009). SpOPT1, a member of the oligopeptide family (OPT) of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, is involved in the transport of glutathione through the outer membrane of the cell. *Yeast*, 26: 67-73.
- Enjalbert B., Smith D. A., Cornell M.J., Alam I., Nicholls S., Brown A.J.P., Quinn J.** (2006). Role of the Hog1 stress-activated protein kinase in the global transcriptional response to stress in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Molecular Biology of the Cell*, 17: 1018-1032.
- Faber K.N., Haima P., de Hoop M.J., Harder W., Veenhuis M., Ab G.** (1993). Peroxisomal amine oxidase of *Hansenula polymorpha* does not require its SRL-containing C-terminal sequence for targeting. *Yeast*, 9: 331-338.
- Faber K. N., Haima P., Gietl C., Harder W., Ab G., Veenhuis M.** (1994). The methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* contains an inducible import pathway for peroxisomal matrix proteins with an N-terminal targeting signal

(PTS2 proteins). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91: 12985-12989.

- Felipe M.S.S.**, Andrade R.V., Arraes F.B.M, Nicola A.M., Maranhao A.Q., Torres F.A.G., Silva-Pereira I., Pocas-Fonseca M.J., Campos E.G, Moraes L.M.P., Andrade P.A., Tavares A.H.F.P., Silva S.S., Kyaw C.M., Souza D.P., PbGenome Network, Pereira M., Jesuino R.S.A, Andrade E.V., Parente J.A., Oliveira G.S., Barbosa M.S., Martins N.F., Fachin A.L., Cardoso R.S., Passos G.A.S., Almeida N.F., Walter M.E.M.T., Soares C.M.A., Carvalho M.J.A., Brigido M.M. (2005). Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 280: 24706-24714.
- Franklyn K.M.**, Warmington J.R. (1994). The expression of *Candida albicans* enolase is not heat shock inducible. *FEMS Microbiology Letters*, 118: 219-225.
- Fukui M.**, Teske A., Aßmus B., Muyzer G., Widdel F. (1999). Physiology, phylogenetic relationships, and ecology of filamentous sulfate-reducing bacteria (genus *Desulfonema*). *Archives of Microbiology*, 172: 193-203.
- García-Sánchez S.**, Mavor A.L., Russell C.L., Argimon S., Dennison P., Enjalbert B., Brown A.J.P. (2005). Global roles of Ssn6 in tup1- and nrg1-dependent gene regulation in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Molecular Biology of the Cell*, 16: 2913-2925.
- Gellissen G.** (2002). *Hansenula polymorpha*: biology and applications. Wiley-VCH, Weinham.
- Ghisalberti E.L.**, Sivasithampam K. (1991). Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp.. *Soil Biology & Biochemistry*, 23: 1011-1020.
- Gibson C.M.**, Hunter M.S. (2010). Extraordinarily widespread and fantastically complex: comparative biology of endosymbiotic bacterial and fungal mutualists of insects. *Ecology Letters*, 13: 223-234.
- Giobbe S.**, Marceddu S., Scherm B., Zara G., Mazzarello V. L., 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 Research*, 7: 1389-1398.

- Goffeau A.**, Barrell B.G., Bussey H., Davis R. W., Dujon B., Feldmann H., Galibert F., Hoheisel J.D., Jacq C., Johnston M., Louis E. J., Mewes H.W., Murakami Y., Philippsen P., Tettelin H., Oliver S.G. (1996). Life with 6000 genes. *Science*, 274:563–567
- Gomolplitinant K.M.**, Saier M.H. Jr. (2011). Evolution of the Oligopeptide Transporter Family. *Journal of Membrane Biology*, 240: 89-110.
- González-Párraga P.**, Marin F.R., Arguelles J. C., Hernandez J.A. (2005). Correlation between the intracellular content of glutathione and the formation of germ-tubes induced by human serum in *Candida albicans*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1722: 324-330.
- Gueldner R.C.**, Reilly C.C., Pusey P.L., Costello C.E., Arrendale R. F., Cox R.H., Himmelsbach D.S., Gene Crumley F., Cutler H.G. (1988). Isolation and identification of iturins as antifungal peptides in biological control of peach brown rot with *Bacillus subtilis*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36: 366-370.
- Guetsky R.**, Shtienberg D., Elad Y., Dinoor A. (2001). Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control, *Phytopathology*, 91: 621-627.
- Gullino M.L.** (2005). Environmental impact and risk analysis of bacterial and fungal biocontrol agents - Guest editorial. *Phytoparasitica*, 33: 3-6.
- Hamilton-Kemp T.R.**, McCracken J.R., Loughrin R.A., Andersen R.A., Hildebrand D.F. (1992). Effects of some natural volatile compounds on the pathogenic fungi *Alternaria alternata* and *Botrytis cinerea*. *Journal of Chemical Ecology*, 18: 1083-1091.
- Han T.L.**, Cannon R.D., Villas-Bôas S.G. (2011). The metabolic basis of *Candida albicans* morphogenesis and quorum sensing. *Fungal Genetics and Biology*, 48: 747-763.
- He D.**, Zheng X.D., Yin Y.M., Sun P., Zhang H.Y. (2003). Yeast application for controlling apple postharvest diseases associated with *Penicillium expansum*. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 44: 211-216.
- Hua Y.**, Liang-Hui J., Yu-Ping L., Ning J. (2008). Glycerol accumulation in the dimorphic yeast *Saccharomycopsis fibuligera*: cloning of two glycerol 3-

phosphate dehydrogenase genes, one of which is markedly induced by osmotic stress. *Yeast*, 25: 609-621.

- Janisiewicz W.J.**, Tworowski T.J., Sharer C. (2000). Characterizing the Mechanism of Biological Control of Postharvest Diseases on Fruits with a Simple Method to Study Competition for Nutrients. *Phytopathology*, 90: 1196-1200.
- Janisiewicz W.J.**, Korsten L. (2002). Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annual Review of Phytopathology*, 40: 411-441.
- Janisiewicz W.J.**, Usall J., Bors B. (1992). Nutritional enhancement of biocontrol of blue mold on apples. *Phytopathology*, 82: 1364-1370.
- Janisiewicz W.J.**, Roitman J. (1988). Biological control of blue mold and gray mold on apple and pear with *Pseudomonas cepacia*. *Phytopathology*, 78: 1697-1700.
- Jiang Z.Q.**, Guo Y.H., Li S.M., Qi H.Y., Guo J.H. (2006). Evaluation of biocontrol efficiency of different *Bacillus* preparations and field application methods against *Phytophthora* blight of bell pepper. *Biological Control*, 36: 216-223.
- Karabulut O.A.**, Lurie S., Droby S. (2001). Evaluation of the use of sodium bicarbonate, potassium sorbate and yeast antagonists for decreasing postharvest decay of sweet cherries. *Postharvest Biology and Technology*, 23: 233-236.
- Kaur J.**, Srikanth C.V., Bachhawat A.K. (2009). Differential roles played by the native cysteine residues of the yeast glutathione transporter, Hgt1p. *FEMS Yeast Research*, 9: 849-866.
- Kępczyńska E.** (1993). Involvement of ethylene in the regulation of growth and development of the fungus *Botrytis cinerea* Pers. ex. Fr.. *Plant Growth Regulation*, 13: 65-69.
- König S.**, Spinka M., Kutter S. (2009). Allosteric activation of pyruvate decarboxylases. A never-ending story? *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 61: 100-110.
- Kurtzman C.P.**, Droby S. (2001). *Metschnikowia fructicola*, a new ascosporic yeast effective for biocontrol of postharvest fruit rots. *Systematic and Applied Microbiology*, 24: 395-399.

- Kurtzman C.P.**, Fell J.W. (2005). Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. In *The Yeast Handbook* (Gábor P., de la Rosa C.L., eds.), pp. 11-30. Springer, Berlin, Germany.
- Kurtzman C.P.**, Piškur J. (2006). Taxonomy and phylogenetic diversity among the yeasts. In *Comparative Genomics: Using Fungi as Models* (Sunnerhagen P., Piskur J., eds.), pp. 29-46. Springer, Berlin, Germany.
- Kutty S.N.**, Philip R. (2008). Marine yeasts - a review. *Yeast*, 25: 465-483.
- Landry C.R.**, Townsend J.P., Hartl D.L., Cavalieri D. (2006). Ecological and evolutionary genomics of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Ecology*, 15: 575-591.
- Lin X.**, Heitman J. (2006). The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annual Review of Microbiology*, 60: 69-105.
- Lin X.** (2009). *Cryptococcus neoformans*: morphogenesis, infection, and evolution. *Infection, Genetic and Evolution*, 9: 401-416.
- Lo H.J.**, Kohler J.R., DiDomenico B., Loebenberg D., Cacciapuoti A., Fink G.R. (1997). Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell*, 90: 939-949.
- Macarisin D.**, Droby S., Bauchan G., Wisniewski M. (2010). Superoxide anion and hydrogen peroxide in the yeast antagonist–fruit interaction: A new role for reactive oxygen species in postharvest biocontrol? *Postharvest Biology and Technology*, 58: 194-202.
- Maidan M.M.**, Thevelein J.M., 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. *Biochemical Society Transactions*, 33: 291-293.
- Mari M.**, Neri F., Bertolini P. (2007). Novel approaches to prevent and control postharvest diseases of fruits. *Stewart Postharvest Review*, 3: 1-7.
- Masih E.I.**, Paul B. (2002). Secretion of beta-1,3-glucanases by the yeast *Pichia membranifaciens* and its possible role in the biocontrol of *Botrytis cinerea* causing grey mold disease of the grapevine. *Current Microbiology*, 44: 391-395.
- Matta A.** (1996). Fondamenti di patologia vegetale. Pàtron Editore, Bologna.
- Migheli Q.**, Gullino M.L. (1990). La lotta biologica contro funghi fitopatogeni

- III: *Trichoderma* e *Gliocladium* come mezzi biologici di lotta. *Informatore fitopatologico*, 40: 9-18.
- Migheli Q.** (2001). Genetically modified biocontrol agents: environmental impact and risk analysis. *Journal of Plant Pathology*, 83: 47-56.
- Mowe G.** (1984). Mechanistic aspects of the microbial invasion of wood. Ph.D. thesis. *Dundee College of Technology, Dundee, UK*.
- Muller F.**, Liu Y., Abdul-Ghani M.A., Lustgarten M.S., Bhattacharya A., Jang Y.C., Van Remmen H. (2008). High rates of superoxide production in skeletal-muscle mitochondria respiring on both complex I- and complex II-linked substrates. *Biochemical Journal*, 409: 491-499.
- Nadal M.**, García-Pedrajas M.D., Gold S.E. (2008). Dimorphism in fungal plant pathogens. *FEMS Microbiology Letters*, 284: 127-134.
- Naglik J.R.**, Challacombe S.J., Hube B. (2003). *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67: 400-428.
- Naglik J.R.**, Moyes D., Makwana J., Kanzaria P., Tsihlaki E., Weindl G., Tappuni A.R., Rodgers C.A., Woodman A.J., Challacombe S.J., Schaller M., Hube B. (2008). Quantitative expression of the *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase gene family in human oral and vaginal candidiasis. *Microbiology*, 154: 3266-3280.
- Naglik J.R.**, Moyes D.L., Wachtler B., Hube B. (2011). *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. *Microbes and Infection*, 13: 963-976.
- Nett J.**, Andes D. (2006). *Candida albicans* biofilm development, modeling a host-pathogen interaction. *Current Opinion in Microbiology*, 9: 340-345
- Nett J.**, Lepak A., Marchillo K., Andes D. (2009). Time course global gene expression analysis of an *in vivo* *Candida* biofilm. *Journal of Infectious Diseases*, 200: 307-313.
- Nuñez C.**, Usall J., Teixidó N., Fons E., Viñas I. (2002). Postharvest biological control by *Pantoea agglomerans*(CPA-2) on Golden Delicious apples. *Journal of Applied Microbiology*, 92: 247-255.
- Olivain C.**, Alabouvette C., Steinberg C. (2004). Production of a mixed inoculum

- of *Fusarium oxysporum* Fo47 and *Pseudomonas fluorescens* C7 to control *Fusarium* disease. *Biocontrol Science and Technology*, 14: 227-238.
- Ortu G.**, Demontis M.A., 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*. *Journal of Plant Pathology*, 87: 300 (abstract).
- Österlund T.**, Nookaew I., Nielsen J. (2011). Fifteen years of large scale metabolic modeling of yeast: Developments and impacts. *Biotechnology Advances*, doi:10.1016/j.biotechadv.2011.07.021.
- Passoth V.**, Fredlund E., Druvefors U.A., Schnurer, J. (2006). Biotechnology, physiology and genetics of the yeast *Pichia anomala*. *FEMS Yeast Research*, 6: 3-13.
- Peters J.**, Sypherd P.S. (1979). Morphology- associated expression of nicotinamide adenine dinucleotide-dependent glutamate dehydrogenase in *Mucor racemosus*. *Journal of Bacteriology*, 137: 1134-1139.
- Piper P.**, Ortiz Calderon C., Hatzixanthis K., Mollapour M. (2001). Weak acid adaptation: the stress response that confers yeasts with resistance to organic acid food preservatives. *Microbiology*, 147: 2635-2642.
- Quin G.Z.**, Iian S.P., Liu H.B., Xu Y. (2003). Biocontrol efficacy of three antagonistic yeast against *Penicillium expansum* in harvested apple fruits. *Acta Botanica Sinica*, 45: 417-421.
- Ramezani-Rad M.**, Hollenberg C.P., Lauber J., Wedler H., Griess E., Wagner C., Albermann K., Hani J., Piontek M., Dahlems U., Gellissen G. (2003). The *Hansenula polymorpha* (strain CBS 4732) genome sequencing and analysis. *FEMS Yeast Research*, 4: 207-215.
- Restuccia C.**, Giusino F., Licciardello F., Randazzo C., Caggia C., Muratore G. (2006). Biological control of peach fungal pathogens by commercial products and indigenous yeasts. *Journal of Food Protection*, 69: 2465-2470.
- Reynolds T.B.**, Fink G.R. (2001). Baker's yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science*, 291: 878-881.

- Rooney P.J.**, Klein B.S. (2002). Linking fungal morphogenesis with virulence. *Cellular Microbiology*, 4: 127-137.
- Rossi B.**, Manasse S., Serrani F., Berardi E. (2005). *Hansenula polymorpha* NMR2 and NMR4, two new loci involved in the nitrogen metabolite repression. *FEMS Yeast Research*, 5: 1009-1017.
- Sánchez-Martínez C.**, Pérez-Martín J. (2001). Dimorphism in fungal pathogens: *Candida albicans* and *Ustilago maydis* - similar inputs, different outputs. *Current Opinion in Microbiology*, 4: 214-221.
- Schwartz D.S.**, Larsh H.W. (1982). Comparative activities of glycolytic enzymes in yeast and mycelial forms of *Candida albicans*. *Mycopathologia*, 78: 93-98.
- Scherm B.**, Ortu G, Muzzu A, Budroni M, Arras G, Migheli Q. (2003). Biocontrol activity of antagonistic yeasts against *Penicillium expansum* on apple. *Journal of Plant Pathology*, 85: 205-213.
- Schirmbock M.**, Lorito M., Wang Y.L., Hayes C.K., Arisan-Atac I., Scala F., Harman G.E., Kubicek C.P. (1994). Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 4364-4370.
- Seneviratne G.**, Zavahir J.S., Bandara W.M.M.S., Weerasekara M.L.M.A.W. (2008). Fungal-bacterial biofilms: their development for novel biotechnological applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24: 739-743.
- Sexton J.A.**, Brown V., Johnston M. (2007). Regulation of sugar transport and metabolism by the *Candida albicans* Rgt1 transcriptional repressor. *Yeast*, 24: 847-860.
- Shirtliff M.E.**, Krom B.P., Meijering R.A.M., Peters B.M., Zhu J., Scheper M.A., Harris M.L., Jabra-Rizk M.A. (2009). Farnesol-induced apoptosis in *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53: 2392-2401.
- Smilanick J.L.** (1994). Strategies for the isolation and testing of biocontrol agents. *Biological Control of Postharvest Diseases: Theory and Practice* (Wilson CL & Wisniewski ME, eds), pp. 25-42. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.

- Spadaro D.**, Vola R., Piano S., Gullino M.L. (2002). Mechanisms of action and efficacy of four isolates of the yeast *Metschnikowia pulcherrima* active against postharvest pathogens on apples. *Postharvest Biology & Technology*, 24: 123-134.
- Spadaro D.**, Gullino M.L. (2004). State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit disease. *International Journal of Food Microbiology*, 91: 185-194.
- Sprague G.F. Jr.**, Winans S.C. (2006). Eukaryotes learn how to count: quorum sensing by yeast. *Genes & Development*, 20: 1045-1049.
- Stevenson R.L.** (1886). The strange case of Dr. Jekyll and Mr. Hide. Broadview Press Ltd; 2nd edition (July 15, 2005).
- Stockwell V.O.**, Stack J.P. (2007). Using *Pseudomonas* spp. for integrated biological control. *Phytopathology*, 97: 244-249.
- Stoldt V.R.**, Sonneborn A., Leuker C.E., Ernst J.F. (1997). Efg1p, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen *Candida albicans*, is a member of a conserved class of bHLHproteins regulating morphogenetic processes in fungi. *The EMBO Journal*, 16:1982-1991.
- Sudbery P.**, Gow N., Berman J. (2004). The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology*, 12: 317-324.
- Sun J.N.**, Solis N.V., Phan Q.T., Bajwa J.S., Kashleva H., Thompson A., Liu Y., Dongari-Bagtzoglou A., M. Edgerton M., Filler S.G. (2010). Host cell invasion and virulence mediated by *Candida albicans* Ssa1. *PLoS Pathogens*, 6: e1001181.
- Swalding I.R.**, Jeffries P. (1998). Antagonistic properties of two bacterial biocontrol agents of grey mould disease. *Biocontrol Science and Technology*, 8: 439-448.
- Swoboda R.K.**, Bertram G., Delbrück S., Ernst J.F., Gow N.A., Gooday G.W., Brown A.J. (1994). Fluctuations in glycolytic mRNA levels during morphogenesis in *Candida albicans* reflect underlying changes in growth and are not a response to cellular dimorphism. *Molecular Microbiology*, 13: 663-672.
- Tatsuki M.** (2010). Ethylene biosynthesis and perception in fruit. *Journal of the*

- Japanese Society for Horticultural Science*, 79: 315-326.
- Theiss S.**, Ishdorj G., Brenot A., Kretschmar M., Lan C.Y., Nichterlein T., Hacker J., Nigam S., Agabian N., Kohler G.A. (2006). Inactivation of the phospholipase B gene PLB5 in wild-type *Candida albicans* reduces cell-associated phospholipase A2 activity and attenuates virulence. *International Journal of Medical Microbiology*, 296: 405-420.
- Tian S.**, Qin G., Xu Y. (2004). Survival of antagonistic yeasts under field conditions and their biocontrol ability against postharvest diseases of sweet cherry. *Postharvest Biology and Technology*, 33: 327-331.
- Tibayrenca P.**, Preziosi-Belloya L., Rogerb J.M., Ghommidha C. (2010). Assessing yeast viability from cell size measurements? *Journal of Biotechnology*, 149: 74–80.
- Torres R.**, Teixidó N., Usall J., Abadias M., Viñas I. (2005). Postharvest control of *Penicillium expansum* on pome fruits by the bacterium *Pantoea amanatis* (CPA-3). *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 80: 75-81.
- Tylicki A.**, Siemieniuk M. (2011). Thiamine and its derivatives in the regulation of cell metabolism. *Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej*, 65: 447-469.
- Vallini V.**, Berardi E., Strabbioli R. (2000). Mutation affecting the expression of the MOX gene encoding the peroxisomal methanol oxidase in *Hansenula polymorpha*. *Current Genetics*, 38: 163-170.
- van Elsas J.D.**, Migheli Q. (1999). Evaluation of risks related to the release of biocontrol agents active against plant pathogens. In: *Integrated pest and disease management in greenhouse crops* (Albajes R., Gullino M.L., van Lenteren J.C., Elad Y. eds.), pp. 377-393. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Ven der Klei I.J.**, Veenhuis M. (2006). Yeast and filamentous fungi as model organism in microbody research. *Biochimica et Biophysica Acta, Molecular Cell Research*, 1763: 1364-1373.
- Yan H.**, Jia L.H., Lin Y.P., Jiang N. (2008). Glycerol accumulation in the dimorphic yeast *Saccharomycopsis fibuligera*: cloning of two glycerol 3-phosphate dehydrogenase genes, one of which is markedly induced by osmotic stress. *Yeast*, 25: 609–621.

- Yao H.J.**, Tian S.P. (2005). Effects of a biocontrol agent and methyl jasmonate on postharvest diseases of peach fruit and the possible mechanism involved. *Journal of Applied Microbiology*, 98: 941-950.
- Yin Z.**, Stead D., Walker L.S.J. Riba-Garcia I., McInerney T., Gaskell S., Oliver S.G., Cash P., Brown A.J.P. (2004), Proteomic response to amino acid starvation in *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Proteomics*, 4: 2425-2436.
- Wheatley R.E.**, Ritz K., Griffiths B.S. (1997). Application of an augmented nitrification assay to elucidate the effects of a spring barley crop and manures on temporal variations in rates. *Biology and Fertility of Soils*, 24: 378-383.
- Wilson C.L.**, Pusey P.L. (1985). Potential for biological control of postharvest plant diseases. *Plant Disease*, 69: 375-378.
- Wilson C.L.**, Wisniewski M.E. (1989). Biological control of postharvest diseases of fruit and vegetables: an emerging technology. *Annual Review of Phytopathology*, 27: 425-441.
- Wilson C.L.**, El-Ghaouth A., Chalutz E., Droby S., Stevens C., Lu J.Y., Khan V., Arul J. (1994). Potential of induced resistance to control postharvest diseases of fruits and vegetables. *Plant Disease*, 78: 837-844.
- Wingard J.R.**, Merz W.G., Saral R. (1979). *Candida tropicalis*: a major pathogen in immunocompromised patients. *Annals of Internal Medicine*, 91: 539-543.
- Wisniewski M.**, Biles C., Droby S., McLaughlin R., Wilson C., Chalutz E. (1991). Mode of action of the postharvest biocontrol yeast, *Pichia guilliermondi*. I. Characterization of the attachment to *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 39: 245-258.
- Wisniewski M.E.**, Wilson C., Droby S., Chalutz E., El-Ghaouth A., Stevens C. (2007). Postharvest biocontrol: new concepts and applications. In: *Biological Control: A Global Perspective* (Vincent C., Goettel M.S. & Lazarovits G., eds), pp. 262-273. CABI, Cambridge, MA, USA.
- Ying-Ying C.**, Yong-Bing C., Zheng X., Kang Y., Yao L., Yi X., Zhen-Yu Z., Wan-Sheng C., Yuan-Ying J. (2005). cDNA microarray analysis of differential gene expression in *Candida albicans* biofilm exposed to farnesol. *American*

*Society of Microbiology – Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49: 584-589.

**Zaragoza O.**, Gancedo J.M. (2000). Pseudohyphal growth is induced in *Saccharomyces cerevisiae* by a combination of stress and cAMP signaling. *Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 78: 187-194.

**Zheng X.D.**, Zhang H.Y., Sun, P. (2005). Biological control of postharvest green mold decay of oranges by *Rhodotorula glutinis*. *European Food Research and Technology*, 220: 353-357.

**Zhu W.G.**, Filler S.G. (2009). Interactions of *Candida albicans* with epithelial cells. *Cellular Microbiology*, 12: 273-282.

## ***Ringraziamenti***

*A conclusione di questo percorso voglio ringraziare con riconoscenza il Professor Quirico Migheli e la Professoressa Marilena Budroni per avermi guidato con competenza, disponibilità e pazienza; la Dottoressa Barbara Scherm per i suoi preziosi insegnamenti e consigli; la Professoressa Ilaria Mannazzu, il Dottor Virgilio Balams e la Dottoressa Angela Marcello per la loro continua disponibilità; Franceca Spanu e Maria Lina Sanna per aver condiviso assieme gioie e difficoltà di questi ultimi tre anni.*

*Un pensiero di riconoscenza anche a Michael Wisniewski e a tutto il gruppo dell'USDA/AFRS di Kearneysville, WV, USA e a quello del centro di ricerca sul post-raccolta dell'IRTA di Lleida, Catalogna, Spagna.*