



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

INTERAZIONE FRA INSETTI E
SACCHAROMYCES CEREVISIAE
INTERACTION BETWEEN INSECTS AND
SACCHAROMYCES CEREVISIAE

TIPO TESI: Compilativa

Studente:
FRANCESCA D'AMBROSIO

Relatore:
PROF.SSA PAOLA RIOLO

Correlatore:
DOTT.SSA VESNA MILANOVIC

ANNO ACCADEMICO 2021-2022

Dedico la mia tesi
a tutti coloro che sono presenti
a chi sarà presente
e a chi è stato presente
alla Famiglia
e ai nonni ANGELO e FIORENTINO che mi guardate da lassù.

SOMMARIO

ELENCO DELLE FIGURE	4
CAPITOLO 1 LIEVITI	6
1.1 STORIA E DIFFUSIONE DELLA FERMENTAZIONE E DELLA DOMESTICAZIONE DEI LIEVITI	7
1.2 METABOLISMO E CRESCITA DI <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	8
CAPITOLO 2 INTERAZIONE FRA INSETTI E LIEVITI	10
2.1 ASSOCIAZIONE E FUNZIONALITA' DELLE COMUNITA' DI LIEVITI NEGLI INSETTI	10
2.2 DIVERSITA' DELLE COMUNITA' DI LIEVITI ASSOCIATE CON GLI INSETTI.....	12
2.3 FATTORI CHE INFLUENZANO LE COMUNITA' DI LIEVITI ASSOCIATE CON GLI INSETTI.....	13
CAPITOLO 3 INFLUENZA DEI LIEVITI SULLE CARATTERISTICHE DEL CICLO BIOLOGICO E SUL SISTEMA IMMUNITARIO	15
3.1 IMPATTO SULLO SVILUPPO, SOPRAVVIVENZA E RIPRODUZIONE.....	15
3.2 IMPATTO SULLA RISPOSTA IMMUNITARIA DEGLI INSETTI, SULLA RESISTENZA ALLE INFEZIONI E PRODUZIONE DI COMPOSTI VOLATILI.....	17
CAPITOLO 4 INTERAZIONE FRA INSETTI E <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	19
4.1 ASSOCIAZIONE INSETTI E <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	19
4.2 INTERAZIONE <i>SACCHAROMYCES</i> -INSETTO.....	20
4.3 INTERAZIONE <i>SACCHAROMYCES</i> -INSETTO: BENEFICI SU <i>SACCHAROMYCES</i>	22
4.4 INTERAZIONE <i>SACCHAROMYCES</i> -INSETTO: BENEFICI SUGLI INSETTI.....	23
4.5 INTERAZIONE <i>SACCHAROMYCES</i> -INSETTO DIFFUSIONE.....	23
4.6 SPECIFICA INTERAZIONE <i>SACCHAROMYCES</i> -INSETTI.....	25

BIBLIOGRAFIA 31

ELENCO DELLE FIGURE

Figura 1-1: Coltura pura di <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7
Figura 1.2-2: Ciclo riproduttivo di <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8
Figura 2.1-3: Anatomia di un insetto.....	10
Figura 2.1-4: Densità dei batteri nell'intestino di un insetto.....	11

Capitolo 1

I LIEVITI:

Comunità microbiche all'interno degli alimenti, compresi i lieviti naturalmente, svolgono un ruolo fondamentale nell'innescare processi fermentativi, donando tipici odori e sapori ai prodotti alimentari, grazie ai composti volatili che essi producono. Quali gli esteri aromatici, ad esempio, come acetato di isoamile (banana e pera), ottonato di etile (ananas e pera), acetato di etile (fruttato), acetato di isobutile (banana), questi sono pochi e semplici esempi di aromi prodotti ma ne esistono tantissimi, donando diverse caratteristiche sensoriali ai prodotti alimentari (Di Paola *et al.*, 2020).

I lieviti sono microrganismi unicellulari che fanno parte dell'ampio regno dei funghi, "EUMICETI", un vasto gruppo di organismi eucariotici. (Unicellulari e pluricellulari), che comprendono lieviti, muffe e funghi. La maggior parte di lieviti appartiene agli Ascomiceti, ampia divisione molto variegata di funghi. Comprende i lieviti unicellulari, quali *Saccharomyces* e i funghi filamentosi e i funghi complessi.

Gli ascomiceti devono il loro nome alla produzione di aschi, cellule nelle quali due nuclei aploidi, si fondono a formare un nucleo diploide, andando in seguito incontro a meiosi. con produzione di ascospore aploidi. Oltre alla formazione delle ascospore, gli ascomiceti, si riproducono anche per via asessuata, mediante la riproduzione di gemme o conidi, che si formano alle estremità di ife specializzate dette conidiofori. I lieviti crescono in ambienti ricchi di zuccheri, come superficie di fiori e frutti. Sono aerobi facoltativi, crescono in ambienti con presenza di ossigeno, oppure in ambienti con scarsa presenza di ossigeno, mediante il metabolismo fermentativo. (Madigan M.T., ed ita Branduardi P. *et al.*, 2016)

1.1 STORIA E DIFFUSIONE DELLA FERMENTAZIONE E DELLA DOMESTICAZIONE DEI LIEVITI

Molte specie di Saccaromiceti, sono componenti essenziali della produzione umana di alimenti e bevande fermentate. *Saccharomyces cerevisiae*, meglio noto e volgarmente detto “Lievito di Birra”, è stato ed è ampiamente utilizzato per la sua capacità fermentativa per migliaia di anni. Le tracce più antiche di lieviti e cibi fermentati sono state rinvenute nella tomba di Jahu in Heman in Cina del 7.000 a.C., in Iran del 6.000 a.C., in vasi di vino nella tomba del Re Scorpione in Egitto del 3.150 a.C e in Mesopotamia in ritrovamenti risalenti 4.000 al 3.100 a.C. Questi ritrovamenti fanno intuire, che la fermentazione di frutta, cereali e miele, veniva effettuata sin dall’inizio della civiltà. In seguito, la viticoltura venne diffusa in Asia Minore e in Africa settentrionale, nei paesi Mediterranei circa nel 1.000a.C. L’arte della fermentazione è stata tramandata da generazione in generazione. La conoscenza scientifica delle reazioni biochimiche durante le fermentazioni, iniziò intorno XVIII/XIX secolo, precisamente nel 1883, grazie al micologo danese Emil Christan Hansen che creò la prima coltura pura di lievito, (Figura1) per la per la produzione della birra.



Figura 1 *Coltura pura di Saccharomyces Cerevisiae in piastra petri Fonte:” Civiltà del bere.com”*

All’interno dei laboratori Carlsberg, isolando e stabilizzando il microrganismo, riuscì a creare una standardizzazione della qualità della birra. In seguito nel 1890, Herman Müller-Thurgau, illustre pioniere svizzero della botanica applicata, progettò il processo per migliorare il controllo e la ripetibilità delle fermentazioni del vino come colture starter. Sino ad arrivare ai tempi più moderni, in cui l’ascesa dell’industria dei prodotti fermentati e l’applicazione dei metodi biotecnologici innovativi, per la selezione di ceppi di lievito, o la

produzione di ibridi adatti a diversi tipi di substrato fermentescibili, consentono un controllo del processo di fermentazione molto più definito. (Di Paola *et al.*, 2020).

1.2. METABOLISMO E CRESCITA DI *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Le cellule di *S.cerevisiae* e di altri ascomiceti unicellulari, sono cilindriche, ovoidali o sferiche, più grandi rispetto le cellule batteriche. La divisione cellulare, solitamente avviene per gemmazione, ovvero una divisione cellulare che avviene a seguito della formazione di una escrescenza (gemma), sulla cellula madre che man mano si ingrandisce e infine si separa dalla cellula parentale. Inoltre i lieviti come in *S.cerevisiae* possono effettuare anche la riproduzione sessuale, mediante unione di due cellule aploidi, originando lo zigote, in seguito avviene la meiosi, generando le ascospore ed, in fine da una cellula diploide si ha la formazione di cellule aploidi.(Figura 2). (Madigan M.T., ed ita Branduardi P. *et al.*,2016).

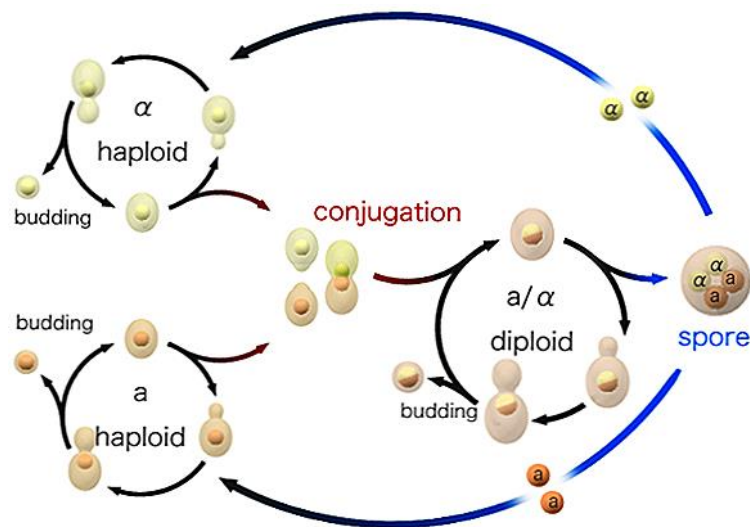


Figura 2 Ciclo di riproduzione di *Saccharomyces cerevisiae* Fonte: “*Microbiologiaitalia.it*”

I lieviti hanno la capacità di metabolizzare gli zuccheri, producendo etanolo e CO₂ attraverso la fermentazione, in condizioni di anaerobiosi. In particolare *S.cerevisiae* ha una peculiarità nel proprio metabolismo, ovvero a concentrazioni elevate di glucosio, anche in presenza

dell'ossigeno, si forma l'etanolo attraverso il processo fermentativo. Il fenomeno è chiamato, effetto Crabtree, e il principale prodotto è l'etanolo. (Di Paola *et al.*2020).

Capitolo 2

INTERAZIONE FRA INSETTI E LIEVITI

2.1 ASSOCIAZIONE E FUNZIONALITA' DELLE COMUNITA' DI LIEVITI NEGLI INSETTI

Gli insetti rappresentano una grande percentuale della biodiversità animale sulla terra. Il grande successo evolutivo di molti insetti, è strettamente legato alle associazioni di interrelazioni con i microrganismi, con un forte potenziale complementare, che se fosse carente negli insetti li limiterebbe in una nicchia ecologicamente ristretta, e con difficoltà nell'interazioni in nuovi ambienti. Le interazioni insetto-microbiota, svolgono un ruolo importante nella biologia degli insetti, influenzando lo sviluppo, la fisiologia, la nutrizione, la sopravvivenza e l'immunità. La maggior parte degli studi che sono stati effettuati, si focalizzano maggiormente su microrganismi, che stabiliscono delle relazioni principalmente parassitarie, commensali o simbiotiche con gli insetti ospiti. Colonizzando diversi tessuti come tegumento, organi riproduttivi o cellule specializzate (batteriociti), in generale la maggior parte del microbiota colonizza il tratto digestivo, diversificandosi nelle tre regioni con funzioni specifiche. (Figura3) (Malassigné et al., 2021).

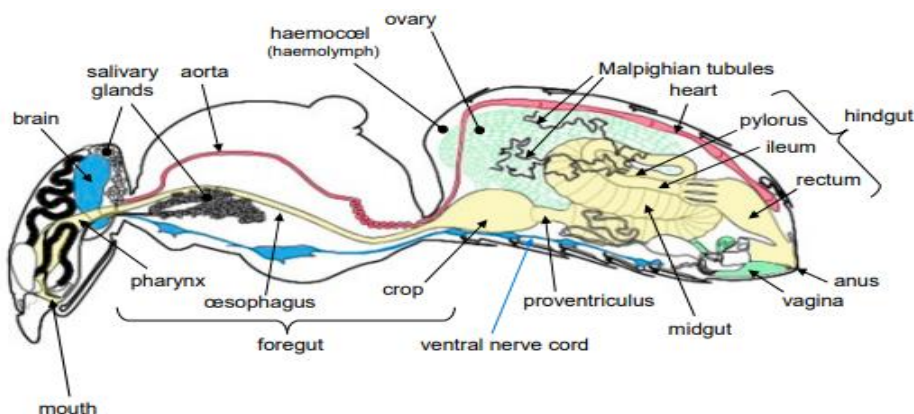


Figura 3: Anatomia interna di un insetto. Tutti gli insetti presentano una cavità interna (Emocoel) contenente un fluido circolatorio (Emolinfa), tutti gli organi dell'apparato digestivo (in giallo), riproduttivo (in

verde), circolatorio (*in rosso*), sistema respiratorio e nervoso (*in blu*).
Fonte: Mallassigné et.al.,2021.

Queste regioni variano ampiamente, in termini di morfologia e proprietà fisico-chimiche. L'intestino medio ospita una comunità microbica densa e diversificata, nei diversi ordini degli insetti è il sito principale di digestione e assorbimento. La parte anteriore è dedicata all'assunzione, conservazione, filtraggio e alla digestione parziale del cibo. La parte posteriore la densità batterica è molto più bassa rispetto ai tratti iniziali, in questo tratto intestinale l'assorbimento è completato con la formazione di feci. In diversi studi, è stato osservato che nelle diverse specie di insetti, la crescita e la quantità dei microrganismi, si differenzia da zona a zona intestinale e da insetto a insetto. (Figura 4) (Malassigné *et al.*,2021).

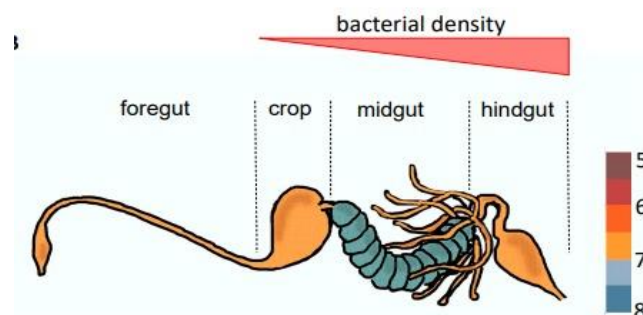


Figura 3 Variabilità della densità dei batteri all'interno nell'intestino di un insetto (Fonte: Melassigné et.al 2021)

È stato osservato, come il microbiota negli insetti offra un'ampia rete di benefici all'ospite, spaziando dall'aumento di fecondità dell'ovideposizione, alla longevità di sopravvivenza, ed un più breve sviluppo larvale. I batteri associati, influenzano anche molti altri aspetti della biologia degli insetti, come il completamento della nutrizione dell'ospite, la facilitazione nella digestione della dieta, la protezione dai patogeni e un'azione detossificante.

La natura dell'associazione fra i microbiota intestinale e l'ospite, appare essere variabile negli insetti.

Mentre Coleotteri, Curculionidi, Coleotteri Silfidi insetti sociali, come ad esempio termiti, api, e alcune specie di formiche, ospitano nell'intestino comunità microbiche che vengono trasmessi verticalmente e rappresentano interazioni microbiota-ospite di lunga data, altri insetti come i Ditteri Drosophilidi e i Ditteri Culicidi, sono principalmente colonizzati in maniera transitoria da comunità microbiche acquisite dall'ambiente. (Malassigné *et al.*, 2021). Negli Imenotteri adulti, i lieviti vengono acquisiti principalmente dal nettare dei fiori, al contempo, le larve, li acquisiscono alimentandosi di polline e miele fornitogli dagli adulti, mentre alcune specie, gli vengono trasmessi verticalmente attraverso le secrezioni anali degli adulti alle larve e questa è associata ai lieviti endosimbiotici. (Malassigné *et al.*, 2021).

2.2 DIVERSITA' DELLE COMUNITA' DI LIEVITI ASSOCIATE CON GLI INSETTI.

Con quasi un milione di specie descritte e 5,5 milioni specie stimate, gli insetti, rappresentano oltre l'80% della biodiversità animale sulla terra. Tale diversità, si riflette in un ampio spettro di tratti evolutivi acquisiti, alcuni dei quali legati alla loro modalità di alimentazione. Il successo evolutivo di molti insetti è strettamente legato alle associazioni simbiotiche, con microrganismi aventi un potenziale complementare, che normalmente è carente negli insetti e li limita quando abitano una nicchia ecologicamente impegnativa, o quando invadono nuovi ambienti. Pertanto, la comprensione della biologia degli insetti sta affrontando un cambio di paradigma, in cui questi organismi superiori non possono più essere considerati come entità isolata e dovrebbero invece essere studiati in relazione al suo microbiota, (batteri, funghi, protisti e virus), con cui interagisce e forma un metaorganismo, spesso indicato, come olibionte. (Malassigné *et al.*, 2021)

I lieviti rappresentano una parte importante delle comunità microbiche associate agli insetti, come il caso delle zanzare, i cui lieviti, rappresentano in media dal 19% al 47% delle comunità fungine a loro associate, sino all'84% in alcune popolazioni di *Aedes albopictus* (zanzara tigre).

Le comunità di lievito associate agli insetti sono principalmente composte da *Ascomycota* e *Saccharomycota*. Nei Coleotteri antofagi, le specie di *Saccharomycotina* rappresentano 95% delle comunità di lieviti intestinali. Inoltre, comunità di lieviti sono composte da un basso numero di specie dominanti, da 1 a 6 specie per individuo, che differiscono in funzione della specie. Ad esempio, da 1 a 5 specie diverse, tra *Torulaspora delbrueckii*, *Pichia membranifaciens*, *Starmerella apicola*, *Pichia kluyveri*, *Starmerella meliponinorum* e *Starmerella bombicola*, dominano le comunità di lieviti associate alle seguenti specie di: Meliponini (Imenotteri, Apoidei) *Frieseomelitta varia*, *Scaptotrigona aff.postica*, *Scaptotrigona*

polysticta, *Tetragonisca angustata angustata*, *Melipona compressipes manaosensis* e *Melipona* *scutellaris*.

Mentre le popolazioni di zanzara tigre (*Ae.albopictus*), sono in gran parte dominate da *Aureobasidium pullulans*, *Hyphopichia bur tonii* e *Candida sp*, in *Drosophila suzukii* (Dittero, Drosofilide) le specie predominanti, sono *Hanseniaspora uvarum*, *Pichiaa terricola*, *P.kluyveri* e *Metschnikowia pulcherrima*. Queste specie abbondanti di lieviti, sono anche le più diffuse nelle popolazioni di insetti, poiché sono diffuse in oltre il 90% degli individui.

Sembra che si siano stabilite delle associazioni preferenziali, fra gruppi di insetti e specie di lieviti.

Mentre i Coleotteri antofagi, (che si nutrono di fiori), sono preferenzialmente associati a lieviti, appartenenti al genere *Metschnikowia*, i Coleotteri che si nutrono della corteccia degli alberi, (esempio Scolitidi e Bostrichidi), prediligono i generi *Kuraishia*, *Ogataea* e *Cyberlindnera*.

Gli Imenotteri Apoidei e i Ditteri Drosofilidi sono preferenzialmente associati ai generi, *Starmerella* e *Hanseniaspora*, rispettivamente. Per quanto riguarda la localizzazione all'interno del corpo degli insetti, i lieviti sono principalmente presenti nel canale alimentare, (sacca melaria, sacca del sangue, etc.). Comunque, alcuni lieviti possono essere rilevati in altri organi, quali, micetangi, ovari, tubi malpighiani ed emolinfa. (Malassigné *et al.*, 2021)

2.3 FATTORI CHE INFLUENZANO LE COMUNITA' DI LIEVITI ASSOCIATE CON GLI INSETTI

Gli insetti acquisiscono gran parte delle loro comunità di lieviti, dalle loro fonti nutritive (fiori, frutti, linfa, etc.) e/o dai loro siti di riproduzione. L'ambiente, è quindi, uno dei principali fattori che influisce sulla struttura delle comunità di lieviti, associate agli insetti. Alcuni studi, che hanno analizzato la struttura delle comunità di lieviti, associate a diverse specie di Drosofile, hanno dimostrato, che la dieta ha un impatto maggiore rispetto alla stessa specie di insetto. Altri studi, hanno inoltre, evidenziato l'importanza dei fattori ambientali, sulla composizione delle comunità di lieviti, ad esempio la vegetazione visitata per alcuni Apoidei, della specie arborea e della stagione, per alcuni Coleotteri Scolitini. (Malassigné *et al.*, 2021).

I lieviti, possono mostrare un tropismo tissutale specifico, o un tropismo tissutale differenziato, quando non colonizzano uniformemente tutti gli organi del corpo degli insetti. Alcuni di loro sono localizzati in organi specifici.

Nei Coleotteri Anobidi e negli Emitteri, i lieviti si accumulano e si moltiplicano nei micetociti. Queste peculiari cellule del corpo adiposo, sono più grandi delle altre cellule presenti nel corpo degli insetti, presentano un citoplasma pieno di microrganismi simbiotici e sono spesso raggruppate in un organo chiamato micetoma. Questi microrganismi simbiotici forniscono all'insetto ospite, nutrienti essenziali, (come vitamine, aminoacidi, etc.). (Malassigné *et al.*, 2021).

Se i lieviti colonizzano preferenzialmente l'intestino, la loro densità varia a seconda della loro localizzazione. Ad esempio, in *Chrysoperla rufilabris* (Neurottero; adulti si nutrono di nettare), l'abbondanza di lieviti è maggiore nell'ingluvie e nell'intestino anteriore, rispetto all'intestino medio e all'intestino posteriore. In *A. albopictus*, i lieviti appartenenti al genere *Malassezia* sono da 3 a 55 volte più abbondanti nella sacca del sangue, che nell'intestino medio. (Malassigné *et al.*, 2021).

Mute successive, durante lo sviluppo degli insetti, portano all'eliminazione di parte del tegumento e di sostanze di scarto e al potenziamento del sistema immunitario, che ha un forte impatto sulle comunità di lieviti. Questo è il caso delle zanzare, per le quali la struttura e l'abbondanza delle comunità fungine variano durante il loro sviluppo, con una significativa riduzione della diversità fungina nei giovani adulti, poiché l'intestino medio, subisce una sterilizzazione parziale durante la metamorfosi da pupa ad adulto. (Malassigné *et al.*, 2021).

La composizione della comunità dei lieviti è influenzata anche dallo stato sociale dei loro ospiti, come è stato dimostrato per l'ape domestica (*Apis mellifera*). L'intestino delle giovani api e nutrici, presenta una bassa diversità di lieviti, ed è fortemente dominato da *Saccharomyces*, (che rappresentano dal 97% al 99% della diversità dei lieviti). Al contrario, le api bottinatrici e le regine sono colonizzate da diverse specie di lieviti e dominate rispettivamente dalle specie *Zygosaccharomyces* (87%). (Malassigné *et al.*, 2021).

Capitolo 3: INFLUENZA DEI LIEVITI SULLE CARATTERISTICHE DEL CICLO BIOLOGICO E SUL SISTEMA IMMUNITARIO

3.1 IMPATTO SULLO SVILUPPO, SOPRAVVIVENZA E RIPRODUZIONE

Qualunque sia il loro stadio di sviluppo, gli insetti, possono utilizzare lieviti simbiotici obbligati o facoltativi, per compensare diverse funzioni metaboliche. È noto, che i lieviti associati con gli insetti, facilitano l'alimentazione su substrati poco digeribili, forniscono immunità e protezione contro vari agenti patogeni e parassiti, mediano la comunicazione inter e intra-specifica, per quanto riguarda gli alimenti di cui nutrirsi, favoriscono i processi digestivi e forniscono aminoacidi essenziali, composti metabolici e nutrienti. (Malassigné *et al.*, 2021). Tali lieviti, sono essenziali, per lo sviluppo ottimale e la sopravvivenza di molti insetti, come dimostrato dal fatto che le larve di *Drosophila suzukii* allevate in un ambiente privo di lieviti non raggiungono lo stadio pupale. È stato anche dimostrato che le larve di zanzara, prive di microbiota (axeniche), mostrano ritardi nella crescita di oltre sei giorni, rispetto a quelle allevate in modo convenzionale, o non si sviluppano oltre il primo stadio, mentre il normale sviluppo, viene ripristinato quando vi vengono forniti i lieviti. (Malassigné *et al.*, 2021). I lieviti, forniscono un'integrazione alimentare essenziale, per lo sviluppo degli insetti grazie alla loro capacità di produrre aminoacidi essenziali, vitamine, proteine e steroli. Le pupe, per il loro sviluppo, necessitano di ormoni steroidei e poiché gli insetti non sono in grado di sintetizzare gli steroli, li devono assumere attraverso la dieta. Recentemente, è stato dimostrato che i lieviti *Zygosaccharomyces*, forniscono precursori steroidei essenziali per l'impupamento di *Scaptotrigona depilis* (Apoideo Meliponino). (Malassigné *et al.*, 2021).

I lieviti, sono una fonte di colesterolo per gli insetti, infatti, esso è un costituente essenziale delle membrane cellulari e un componente delle vie di trasduzione dei segnali cellulari. I lieviti costituiscono, inoltre, un'importante fonte di proteine per la mosca mediterranea della frutta (*Ceratitis capitata*, Dittero, Tefritide), aumentando la longevità delle popolazioni di

laboratorio, l'accumulo di proteine nelle larve e che il peso delle pupe. (Malassigné *et al.*, 2021).

S. cerevisiae e *Pseudozyma* sp., assunti con la dieta, sono tra i lieviti con la più alta quantità di proteine e carboidrati, utilizzati nell'accumulo delle riserve energetiche, (proteine, glicogeno, lipidi), che sono necessarie per lo sviluppo degli insetti, in particolare, in *Aedes aegypti*, per quanto riguarda il peso larvale e il raggiungimento dello stadio adulto. (Malassigné *et al.*, 2021).

Sono state osservate, inoltre, variazioni per quanto riguarda la sopravvivenza e il tempo di sviluppo, in funzione dei lieviti utilizzati come risorse nutritive. Ad esempio, le larve di *D. suzukii*, alimentate con *S. cerevisiae* si sviluppano più velocemente, rispetto a quelle allevate in presenza di *H. uvarum* o *P. terricola*. *S. cerevisiae*, conferisce alle larve di questo Dittero, un tasso di sopravvivenza migliore, rispetto ad altri lieviti. La presenza di lieviti nella dieta di *Bombus terrestris* (Imenottero, Apide), promuove anche lo sviluppo della colonia in termini di numero di pupe e operaie. (Malassigné *et al.*, 2021).

Per gli insetti che si nutrono di substrati di difficile degradazione, come il legno, i lieviti simbiotici, partecipano nel fornire elementi nutritivi e nella detossificazione dei composti di difesa, prodotti dalle piante. Diversi carboidrati strutturali delle piante ospiti, (ad esempio, cellulosa ed emicellulosa), non sono facilmente degradati dagli insetti. Alcuni di questi composti, sono parzialmente idrolizzati dagli enzimi digestivi prodotti dai lieviti simbiotici, presenti nel loro intestino. *Saccharomycopsis* sp. e *Cyberlindnera* sp., associati a *Elateroides flabellicornis* (Coleoptera: Lymexylidae), che si nutre di legno, sono in grado di assimilare il disaccaride cellobiosio. Insetti, come le cavallette (Ortotteri), si nutrono di foglie ricche di cellulosa e sintetizzano poche cellulasi. In questo caso, la cellulosa, che è un polimero di glucosio, è parzialmente idrolizzata nel loro intestino dal microbiota, e in particolare da alcuni lieviti *Basidiomycota*, che ospitano elevate attività cellulolitiche, come le specie appartenenti ai generi *Papiliotrema* e *Saitozyma*. (Malassigné *et al.*, 2021).

Da adulti, numerosi insetti fitofagi ed ematofagi, si nutrono di sostanze vegetali ricche in fruttosio, glucosio e saccarosio. Una parte di questi zuccheri viene digerita dagli enzimi salivari e direttamente assimilata dall'insetto, la maggior parte di essi, viene immagazzinata nell'ingluvie o nel diverticolo ventrale, dove sono presenti un'ampia varietà di generi di lieviti, come *Candida*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Meyerozyma*, *Metschnikowia* e *Pichia*. Gli zuccheri verranno poi trasportati nell'intestino medio, dove saranno preferibilmente utilizzati come fonte di energia dal microbiota, e in particolare dai lieviti.

Ad esempio, è stato dimostrato che i lieviti del genere *Malassezia* associati ad *A. albopictus*, sia maschi che femmine, utilizzano attivamente il fruttosio, mentre i lieviti del genere *Cyberlindnera* sono più attivi nelle femmine (che si nutrono di sangue) (Malassigné *et al.*, 2021).

Oltre al loro ruolo nutrizionale, i lieviti sono anche coinvolti nell'induzione delle funzioni di ipossia intestinale negli insetti. È stato dimostrato che *S. cerevisiae* induce ipossia nell'intestino degli insetti, che agisce da segnale per la crescita e la muta. In *A. aegypti*, inoltre, quando il microbiota è stato modificato per essere arricchito o composto esclusivamente da lieviti, è stato riscontrato che gli individui mantengono un'alta percentuale di sopravvivenza (68-100%). Risultati simili sono stati osservati anche per adulti di alcune specie di Emitteri, Omotteri, Cicadellidi (*Sogatella furcifera* e *Nilaparvata lugens*) poiché un trattamento fungicida, che riduce la densità di lieviti simbiotici nei micetociti, ha diminuito la sopravvivenza dell'insetto del 60%. I lieviti possono anche avere un impatto sulla riproduzione degli insetti. Ad esempio, l'ingestione da parte di femmine adulte di *D. suzukii* di *H. uvarum*, *Saccharomyces vini* e *Candida sp.* promuove la loro sopravvivenza e la loro fertilità (numero di uova deposte) (Malassigné *et al.*, 2021).

L'acido urico è una sostanza di scarto azotata prodotta durante il metabolismo delle purine o durante la digestione del sangue. Di solito si accumula all'interno dei tubi Malpighiani prima di essere escreto. Nelle femmine del flebotomo *Phlebotomus perniciosus*, (Diptera:Psychodidae) (ematofago) il lievito *M. guilliermondii* colonizza la parte distale dei tubi malpighiani. *M. guilliermondii*, inoltre possiede un'attività uricolitica, ed è stato ipotizzato che questo lievito potrebbe contribuire alla degradazione dell'acido urico in eccesso dopo che l'insetto ha effettuato il suo pasto di sangue. (Malassigné *et al.*, 2021).

3.2 IMPATTO SULLA RISPOSTA IMMUNITARIA DEGLI INSETTI, SULLA RESISTENZA ALLE INFEZIONI E PRODUZIONE DI COMPOSTI VOLATILI

Le specie di lieviti non naturalmente presenti nei tessuti degli insetti sono considerate agenti patogeni e il loro ingresso nel corpo degli insetti attiva il sistema immunitario. Stimolando il sistema immunitario, inoltre i lieviti possono anche prevenire la colonizzazione dell'ospite da parte di altri come agenti patogeni. (Malassigné *et al.*, 2021)

È stato osservato, che oltre alle funzioni dei lieviti all'interno dell'ospite, i lieviti influenzano il comportamento degli insetti. Gli insetti, oltre che utilizzare i segnali visivi, utilizzano la percezione olfattiva dei segnali

chimici, come di composti volatili emessi dalle piante, feromoni e anidre carbonica, per diverse funzioni, come quella di trovare un partner, fonti di cibo e siti di ovideposizione. (Malassigné *et al.*, 2021).

Queste sostanze volatili, segnali di comunicazione chimica, possono essere prodotte ed emesse dagli insetti, dai vegetali, ma anche dai microrganismi presenti sia nell'ambiente sia nel corpo degli insetti. Le sostanze volatili, prodotte dai lieviti, vengono prodotti da questi, come metaboliti secondari, avendo un ruolo fondamentale nell'attrarre gli insetti. (Malassigné *et al.*,2021).

La presenza di lieviti, nel nettare, aumenta l'attrattività della pianta nei confronti degli insetti impollinatori, grazie proprio al rilascio di composti volatili e anidride carbonica (Malassigné *et al.*, 2021).

Possono essere fortemente influenzati, dalla presenza di lieviti e dall'emissione di sostanze organiche volatili. (Malassigné *et al.*,2021)

Il comportamento riproduttivo, si basa soprattutto sulla percezione dei feromoni sessuali prodotti dall'insetto, o dal microbiota ad esso associato. Sebbene, la produzione di feromoni, da parte di microrganismi, è nota solo per poche specie di batteri, è stato dimostrato che un'alterazione della composizione del microbiota (compresi i lieviti), è associata a una diminuzione del successo riproduttivo degli insetti. (Malassigné *et al.*,2021).

Capitolo 4

INTERAZIONE FRA INSETTI E *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

4.1 CONNESSIONE INSETTI E SACCHAROMYCES CEREVISIAE

Negli ultimi anni, un numero crescente di studi, ha riportato l'esistenza di un'associazione tra il lievito *Saccharomyces cerevisiae* e gli insetti. La scoperta di questa relazione ha messo in discussione l'ipotesi che *S. cerevisiae* non sia in grado di sopravvivere in natura e che la presenza di ceppi di *S. cerevisiae* negli insetti, sia il risultato di contaminazione da ambienti antropici.

Le cellule di *S. cerevisiae* beneficiano di questa associazione, in quanto trovano nell'intestino dell'insetto un riparo, ma anche un luogo dove riprodursi attraverso l'accoppiamento, evento quest'ultimo altrimenti raramente osservato negli ambienti naturali. D'altra parte, anche gli insetti traggono vantaggio dall'ospitare *S. cerevisiae*, poiché fanno affidamento sui lieviti come nutrimento per svilupparsi correttamente, localizzare il cibo adatto e rafforzare il loro sistema immunitario. (Meriggi *et al.*, 2020)

S. cerevisiae è ampiamente utilizzato nell'industria per la vinificazione, la produzione di birra e la panetteria, come integratore alimentare o probiotico per animali e umani. La capacità di sovraccaricare altri microrganismi in substrati fermentativi e l'uso diffuso di *S. cerevisiae* nell'industria dei prodotti fermentati, fa ipotizzare che questo lievito sia stato addomesticato.

Negli ultimi decenni, questa ipotesi è stata compromessa dall'isolamento di ceppi dagli ambienti naturali e dall'osservazione dell'esistenza di ceppi geneticamente diversi da quelli utilizzati nell'industria. È stata proposta una nuova ipotesi: un modello neutro in cui *S. cerevisiae* è funzionalmente adattato a una gamma di ambienti diversi. (Meriggi *et al.*, 2020).

4.2 INTERAZIONE SACCHAROMYCES-INSETTO

Per quanto riguarda le associazioni lievito-insetto, sono state effettuati degli studi. In particolar modo sulle interazioni fra lieviti e Meloponini (Hymenoptera, Apidae), *Tetragonisca angustula*, *Melipona quadrifasciata* e *Frieseomelitta varia*. Sono stati trovati 93 isolati di lievito associati a *T. angustula*, 47 associati a *M. quadrifasciata* e 12 associati a *F. varia*. In *T. angustula* il lievito *S. meliponinorum* è stato prevalente associato agli adulti, miele, polline e propoli. I lieviti, si sviluppano a spese degli zuccheri in queste matrici alimentari, migliorandone le qualità nutrizionali. (Rosa *et al.*, 2003).

Sono stati inoltre identificati ceppi di *Candida apicola*, associati ad adulti e miele di *M. quadrifasciata*. Dalle tre specie di api, sono state isolate due specie di lieviti, in particolare: *Aureobasidium pullulan*, insieme a *Pseudozyma antarctica* e diverse specie appartenenti al genere *Cryptococcus* e *Rhodotorula*. Mediante ritrovamenti di lieviti specifici, a seconda della specie di ape e del prodotto caratteristico, è stato possibile isolare diverse specie di lieviti: *Debaryomyces hansenii* è stato isolato da *M. quadrifasciata* a partire da un campione di propoli di *T. angustula*; *Zygosaccharomyces* è stato isolato dal miele di *T. angustula* e da *M. quadrifasciata*. Il ritrovamento di *Starmerella* ha suggerito, che è strettamente associato alle api o ad habitat correlati, in quanto la presenza è ripetuta in diverse specie di api e prodotti, appurando, che questo sia il miglior microrganismo adattato alle api e ai substrati associati. (Rosa *et al.* 2003)

Per le api senza pungiglione è stato effettuato uno studio, con specie provenienti dal Brasile meridionale, in campioni di miele di 17 specie di api dei generi: *Nannotrigona*, *Melipona*, *Plebeia*, *Scaptitrigona* e *Tetragonisca*. In tutto sono state identificate 16 specie di lievito, distribuite in 9 generi. *Starmerella sp.*, è la singola specie ritrovata nel miele di *M. bicolor* e la predominante specie ritrovata, nella maggior parte del miele derivante dalle altre specie di api.

Il secondo genere più diffuso è *Zygosaccharomyces*, rappresentato da *Z. mellis*, *Z. rouxii* e *Z. siamensis*.

Un elevato numero di isolati, identificati come *Wickerhamomyces sydowiorum*, è stato trovato in campioni di miele di *Plebeia saiqui*. Questa specie di lievito non è mai stata segnalata nel miele o in altri prodotti delle api. Altre sette specie di lievito sono state rilevate, ma solo in specifici campioni di miele e, in generale, non rappresentavano più del 10% della popolazione totale di lieviti. E' stata riscontrata la presenza di *Candida patagonica*, nel miele di *M. fasciculata*, così come *Debaryomyces hansenii* è stato rilevato solo in campioni di miele di *M. seminigra* e

Wickerhamiella versatilis è stata l'unica specie ritrovata in campioni di miele di *P. nigriceps*.(Echeverrigaray et al.,2021)

E' stato inoltre riscontrato che le specie *Starmerella* e *Zygosaccharomyces* assimilano solo un numero limitato di composti zuccherini; contrariamente *C. patagonica*, *D. han senii* e *W. Sydowiorum.*, hanno migliore assimilazione dei composti zuccherini. (Echeverrigaray et.al2021).

E' stata, poi effettuata una ricerca specifica, sul pane d'api, ovvero un prodotto delle api derivante dalla lavorazione delle stesse dei granelli di polline delle stesse api, con nettare, miele e parte della loro saliva, e della specializzazione dei generi di lievito nelle diverse maturazioni del pane d'api. Sono stati ottenuti 252 isolati a partire da 161 campioni di cui 61 erano positivi alla crescita di lievito, con la rivelazione di 25 specie, tra questi era presente *Zygosaccharomyces Debaryomyces* tra gli isolati del gruppo *Debaryomyces hansenii*. Le specie di lievito più frequentemente rilevate sono state raggruppate in tre generi, *Metschnikowia*, *Starmerella*, *Zygosaccharomyces*. (Debry et al., 2020)

In diversi prodotti, quali, pellet di polline, il pane d'api fresco e stagionato, è stata riscontrata una certa variabilità per quanto riguarda: la quantità di lieviti presenti; la variabilità dei generi di lieviti.

La specie *Metschnikowia* è stata isolata principalmente da pellet di polline, ma anche da miele e pane d'api fresco, la specie *Starmerella* è prevalente nel pane d'api fresco, il pane d'api invecchiato domina la specie *Zygosaccharomyces*.(Debry et.al 2020)

Uno studio effettuato, prendendo come riferimento, le specie di insetti *Chrysoperla comanche* e *Chrysoperla carnea*, ha mostrato la presenza di 14 isolati di lievito con tre specie principali, *Metschnikowia chrysoperlae*, *Candida picachoensis*, *Candida pimense*. Nelle femmine adulte di *Chrysoperla comanche* è stato ritrovato maggiormente *M. chrysoperlae*, mentre nei maschi è stato isolato *Candida picachoensis*. *M. chrysoperlae*, con ritrovamenti, anche nelle uova.

Questa scoperta potrebbe suggerire che i lieviti siano stati trasmessi verticalmente alle generazioni successive attraverso le uova. Questi risultati fanno intuire che ci sia la possibilità una relazione ospite-simbionte in natura. (Suh et. al 2004).

4.3 INTERAZIONE SACCHAROMYCES-INSETTO: BENEFICI SU SACCHAROMYCES

Vespe sociali e calabroni (Hymenoptera, Vespidae) sono insetti onnivori che si muovono in un'ampia area di foraggiamento e visitano substrati che possono essere colonizzati da ceppi di *S. cerevisiae*. Tra i substrati visitati dalle vespe, è la buccia dell'uva, la principale fonte di ceppi di *S. cerevisiae*, presenti nell'ambiente, anche se questa specie rappresenta solo una piccola parte delle comunità microbiche presenti sull'uva (Meriggi *et al.*, 2020). *Polistes dominula* e *Vespa crabro* ospitano nel loro intestino cellule di *S. cerevisiae* tutto l'anno, fornendo così un ambiente in cui i lieviti possono risiedere e sopravvivere nel periodo stagionale con minor accesso alle fonti zuccherine. Gli insetti possono diffondere le cellule di *S. cerevisiae* tra differenti i substrati ambientali frequentati e, inoltre, gli adulti le condividono con le larve diffondendole all'interno delle loro colonie. Da sottolineare il fatto che le larve carnivore, negli insetti sociali, sono alimentate dagli adulti. Pertanto, la capacità di diffondere *S. cerevisiae* nell'ambiente, aumenta esponenzialmente con l'aumento del numero insetti, che compongono la colonia. Generalmente, l'aumento del numero degli individui, nelle colonie avviene in concomitanza con la maturazione dell'uva. (Meriggi *et al.*,2020). Nella diffusione di cellule di *S. cerevisiae* nell'ambiente sono coinvolti anche altre specie di insetti, come dimostrato ad esempio, in condizioni di laboratorio per *Drosophila* spp. e Apoidei. (Meriggi *et al.*, 2020).

L'accoppiamento (riproduzione sessuata) di *S. cerevisiae* è raro in natura, probabilmente perché le cellule di lievito selvatico, sono principalmente diploidi e quindi devono affrontare la sporulazione e la germinazione per poter accoppiarsi con altri ceppi, condizioni che si verificano raramente in natura. Al contrario, l'accoppiamento dei lieviti può avvenire all'interno dell'intestino degli insetti. Le spore di *S. cerevisiae* possono sopravvivere nel tratto intestinale della *D.melanogaster*, passando attraverso l'intestino dell'insetto, l'asco sporale si rompe e quindi l'accoppiamento tra i ceppi di lievito è facilitato. Le differenze tra le caratteristiche chimiche e fisiologiche dei diversi tratti intestinali dell'insetto, offre un ambiente che favorisce la sporulazione e la germinazione dei lieviti, e quindi l'accoppiamento. (Meriggi *et al.*,2020).

4.4 INTERAZIONE SACCHAROMYCES-INSETTI: BENEFICI SUGLI INSETTI

L'associazione *S. cerevisiae*-insetto ha effetti benefici non solo sui lieviti (che vengono diffusi nell'ambiente), ma anche sugli insetti ad essi associati. Infatti, la capacità di localizzare le fonti nutritive è fondamentale per la sopravvivenza degli insetti, sia per quanto riguarda l'alimentazione degli adulti, sia per quanto riguarda il comportamento di ovideposizione. In particolare, gli stimoli indotti dalla presenza di *S. cerevisiae* nei substrati alimentari hanno la capacità di aumentare l'attrattiva nei confronti di varie specie di insetti, che si nutrono di liquidi vegetali zuccherini, tra cui *D. melanogaster*, *Vespula germanica* e *V. vulgaris* (Meriggi *et al.*, 2020).

La caratteristica principale, che rendono questi lieviti capaci di attirare gli insetti, è la capacità di modificare le miscele di sostanze volatili emesse dalle piante, ad esempio acetato di isoamile e acetato di etile. Nel complesso, questi studi hanno evidenziato, che la presenza di cellule vive di *S. cerevisiae*, e i processi di fermentazione sono uno stimolo importante utilizzato dagli insetti per localizzare fonti alimentari ricche di sostanze zuccherine. (Meriggi *et al.*, 2020)

Si consideri che, oltre a *S. cerevisiae*, altri microrganismi presenti nei substrati zuccherini, come *Hanseniaspora* spp. e *Gluconobacter* spp., trasmessi da insetti possono indurre la produzione di sostanze volatili che attraggono gli insetti. (Meriggi *et al.*, 2020)

S. cerevisiae, è la specie di lievito che contribuisce maggiormente allo sviluppo larvale, fornendo agli insetti acido nicotinico, vitamina B, acido pantotenico, inositolo, colina, beta-alanina e acido pimelico. La presenza di *S. cerevisiae* nella dieta larvale influisce positivamente sullo sviluppo dei giovani e sul comportamento riproduttivo degli adulti. Per questo motivo gli adulti preferiscono alimenti in cui sono presenti cellule vive di lieviti rispetto ad alimenti che contengono estratti di lievito oppure sono privi di lieviti. (Meriggi *et al.*, 2020).

4.5 INTERAZIONE SACCHAROMYCES-INSETTI DIFFUSIONE

Per dimostrare la diffusione dei lieviti nei diversi ambienti è stato effettuato studio, in ambienti geograficamente distanti, e in diverse stagioni dell'anno.

Ceppi di lievito sono stati isolati da grappoli d'uva e insetti campionati in diverse località italiane.

Adulti di *Vespa crabro* e *Polistes* spp. (Hymenoptera, Vespidae) e di *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) sono state catturate e analizzate in primavera, estate e autunno.

(Stefanini *et al.*, 2012). Gli studi hanno evidenziato che all'interno dell'intestino di questi insetti, *S. cerevisiae* ha rappresentato il 4% della comunità di lieviti, ma nessun ceppo di *S. cerevisiae* è stato ritrovato nelle api mellifere. Un totale di 393 ceppi di lievito sono stati isolati dalle viscere di 61 vespe raccolte, nelle regioni della Toscana, del Lago di Garda e dell'Isola d'Elba. Per i generi *Candida spp.* *Candida apicola*. *Pichia spp.*, la frequenza di diverse specie cambia a seconda della stagione, mentre gli isolati di *C. apicola* essi, raddoppiano alla maturazione dell'uva. Il numero di ceppi di *S. cerevisiae* isolati dalla vespa ha mostrato un cambiamento minimo, contrariamente è stato il risultato del numero di *Pichia spp.*, il quale sono diminuiti di quasi la metà al momento della raccolta. (Stefanini *et al.*, 2012).

La presenza preponderante di una specie di lievito negli insetti è stata osservata per *Saccharomyces spp.*, ed è stato isolato principalmente quando le uve erano mature.

Questi risultati indicano che, la quantità di *Pichia spp.*, è maggiormente presente dopo la vendemmia, mentre la presenza di *Saccharomyces spp.* è stata confermata per il periodo di raccolta dell'uva, e la specie di *C. apicola* mostra un andamento stagionale, in modo particolare prima della maturazione delle uve, per i ceppi di *S. cerevisiae* sono presenti durante tutto l'anno, negli insetti e nell'ambiente che li circonda. (Stefanini *et al.*, 2012).

Complessivamente, le analisi genetiche eseguite mostrano che la diversità degli isolati di vespe riflette la variabilità geografica mostrata dai ceppi di *S. cerevisiae* isolati da uva, vini, pane e altre fonti ambientali nella regione mediterranea. Il processo di selezione clonale è la risultante dall'espansione selettiva di ceppi più adatti, alla biotrasformazione degli alimenti fermentati, per essere poi spostati dagli insetti ad occupare nuove nicchie ambientali.

In questa prospettiva, le vespe potrebbero svolgere un ruolo sia nel mantenimento della diversità ecologica, sia nella conservazione delle popolazioni di lieviti evolute, in ambienti stabiliti nei secoli attraverso la coltura della vite e la produzione del vino. La conservazione di tale diversità può avere una potenziale importanza industriale nel preservare la qualità dei prodotti tipici fermentati, suggerendo che qualsiasi cambiamento ambientale, influisca sulla biodiversità degli insetti e possa creare un rischio sostanziale di riduzione della biodiversità, dei lieviti e di conseguenza avere un impatto sulla qualità dei prodotti alimentari fermentati. (Stefanini *et al.* 2012)

Al fine di testare i ruoli che l'ecologia e la geografia svolge nel plasmare la specie di *S. cerevisiae*, sono stati esaminati 9 loci microsatelliti variabili in 172 ceppi di *S. cerevisiae* isolati da due fermenti spontanei di succo d'uva, terreno, fiori, apiari e corteccia in Nuova Zelanda. L'analisi mostra che, *S. cerevisiae*, in Nuova Zelanda, comprenda una popolazione di alcuni ceppi che contribuiscono ai fermenti spontanei, che si raggruppano con isolati di corteccia/terreno neozelandese, mentre altri si raggruppano con isolati di botti di rovere francese. Sembra che alcuni ceppi siano stati dispersi a livello globale, dall'uomo in botti di quercia, mentre alcuni sono localmente trasportati da insetti.

Dalla presente analisi è stato dedotto, che una discreta popolazione di *S. cerevisiae* potrebbe risiedere in Nuova Zelanda. (Goddard *et al.*,2010).

Dai 172 genotipi di *S. cerevisiae* isolati contemporaneamente da fermenti, suolo, corteccia e fiori in Nuova Zelanda, nessuno dei ceppi ha interagito significativamente con i 34 ceppi sequenziati isolati da una serie di località internazionali.

È possibile che popolazioni naturali di *S. cerevisiae* fossero presenti in Nuova Zelanda prima dell'arrivo degli esseri umani; in alternativa può essere che in passato tutti gli isolati associati alla fermentazione siano stati portati in Nuova Zelanda dall'uomo. La popolazione di *S. cerevisiae* in Nuova Zelanda è suddivisa ma esiste un flusso genico significativo tra le sottopopolazioni. (Goddard *et al.*,2010)

Tuttavia, la deduzione della completa consanguineità nelle popolazioni di suolo/corteccia/fiore della Nuova Zelanda è più strettamente allineata con le stime di una popolazione di *S. paradoxus* del Regno Unito da corteccia di quercia, che sono circa il 99% di consanguineità a suggerendo un modello alternativo per la biologia di *S. cerevisiae*.(Goddard *et al.*, 2010).

4.6 SPECIFICA INTERAZIONE SACCHAROMYCES- INSETTI

Per dimostrare maggiormente l'interazione fra insetti e i lieviti, è stato messo in discussione e studiato come possano avvenire gli accoppiamenti tra i lieviti dimostrando che l'intestino degli insetti è la camera preferenziale per l'accoppiamento dei lieviti. (Stefanini *et al.*,2016)

Da molto tempo si è sempre pensato che l'accoppiamento delle spore di *S.cerevisiae* avvenga maggiormente tra spore dello stesso ascus e che principalmente l'autofecondazione e l'outbreeding (ovvero accoppiamento tra aschi diversi) siano un evento raro.

Recenti scoperte tuttavia hanno ipotizzato che l'ibridazione interspecifica, con alti livelli di eterozigosi dei ceppi, trasmissione dei prioni di eterozigosi dei ceppi e trasmissione dei prioni, dimostra che l'outbreeding sia frequente nei lieviti. Questo evento in natura non è ancora stato dimostrato specificatamente dove avvenga, ma è stato scoperto che l'intestino delle vespe sociali (*Polistes dominula*) ospita ceppi di *S.cerevisiae* e *S.paradoxus* e che favorisca l'accoppiamento etereospecifico. Questa tipologia di accoppiamento per *S.paradoxus*, è l'unica possibilità di sopravvivere all'interno dell'intestino. (Stefanini *et al.*,2016).

Tutto rivela, un piccolo segreto dell'ecologia dei lieviti, che creano una camera ambientale dove avvengono gli incroci, con generazione e mantenimento della diversità dei ceppi degli ascomiceti.

In questo studio è stato calcolato il tasso di outbreeding (ovvero accoppiamento tra aschi diversi) di eterozigoti, in siti polimorfici di tre geni selezionati con sequenze n=34, basandosi solamente su ceppi diploidi e su di un modello modificato che tiene conto di accoppiamenti intra-ascus, oppure da incrocio.

E' stato osservato che all' interno dell'intestino delle vespe i lieviti abbiano effettuato un outbreeding, dando due ragioni di questa osservazione: una,è che le vespe preferiscano nutrirsi di lieviti accoppiati; la seconda, è che l'accoppiamento dei lieviti avvenga in modo più probabile all'interno dell'intestino degli insetti. Se fosse giusto il primo caso suggerito, si dovrebbe trovare lo stesso tasso di riproduzione per ceppi isolati dall'intestino e dall'uva,ma questo non è avvenuto. Il secondo caso suggerito è supportato da precedenti risultati che riportano una dissoluzione di ascospore di lievito all'interno dell'intestino di *D.melanogaster*. Questa scoperta non basta per dimostrare che all'interno dell'intestino degli insetti avviene una proliferazione. In quanto la dissoluzione delle spore è necessaria ma non sufficiente per far avvenire l'outbreeding, poichè le spore dissolte dovrebbero germogliare in cellule vitali e accoppiarsi con altri. (Stefanini *et al.*,2016).

Altra ipotesi è che i moscerini della frutta avrebbero potuto distribuire spore su frutti maturi, e che i lieviti potessero incontrare altri ceppi presenti, ma anche questo si è dimostrato non proprio giusto in quanto si sarebbe dovuto trovare un tasso di riproduzione più alto per i ceppi isolati dalla buccia dell'uva, rispetto a quelli isolati dall'intestino delle vespe. (Stefanini *et al.*,2016).

Per testare la crescita e la proliferazione all'interno dell'intestino degli insetti sono stati somministrati alle vespe (*Polistes dominula*) 5 diversi ceppi di *S.cerevisiae*, ciascuno

riconoscibile da un proprio profilo auxotrofico e da dei marcatori genetici. Il pool di lieviti *S.cerevisiae*, somministrato alle vespe comprendeva mutanti IME1 (induttore della meiosi), incapaci di sporulare (E324), e mutanti con delezione UME6 (espressione genica meiotica non programmata) le cui spore non sono in grado di germinare (RSY270). Questi insetti per non essere contaminanti da agenti esterni sono stati isolati individualmente in condizioni di ibernazione naturale, riproducendo un ambiente in cui possono vivere contemporaneamente diversi ceppi.

Il tempo trascorso per la prima osservazione è stata di almeno sessanta giorni e confrontate con altri insetti. (Stefanini *et al.*,2016)

Le percentuali di lievito dopo due mesi di ibernazione sono state considerevolmente importanti, dimostrando che *S.cerevisiae* può accoppiarsi all'interno dell'intestino degli insetti.

Le spore formatosi all'interno delle vespe vengono liberate dal loro ascus durante il passaggio nell'intestino posteriore e in seguito germinano in un ambiente in cui, è più probabile che si trovino delle spore individuali. È essenziale che per avere tutti gli stadi le cellule di lievito si trovino all'interno dell'intestino per un periodo sufficientemente lungo, per lo più di tutta la durata del letargo delle vespe sociali. (Stafanini *et al.*,2016)

Per analizzare nel miglior modo ciò che succede all'interno dell'intestino delle vespe sono state isolate ed analizzate le vespe sociali in natura (n=16), ed è stato osservato che erano presenti due ibridi interspecifici *S. cerevisiae* × *S. uvarum*; e *S. cerevisiae* × *S. paradoxus*. Il primo ibrido, ovvero *S. cerevisiae*-*S.uvarum* si genera maggiormente durante le fermentazioni del vino; quindi, possono essere delle vespe raccolte che potevano trovarsi in zone molte vicine a cantine o frutta in decomposizione. Per i secondi ibridi trovati, ovvero *S. cerevisiae*-*S.paradoxus*, è stato riscontrato che sono molto rari in ambienti naturali e per lo più sono stati generati in vitro. L'isolamento di un ibrido così poco comune dimostra maggiormente che le condizioni nell'intestino delle vespe sociali possono favorire l'accoppiamento dei lieviti. (Stefanini *et al.*,2016)

In seguito, è stata effettuata un'ulteriore verifica inoculando vespe del genere *Polistes dominula* con quantità uguali di 5 ceppi diversi di *S.cerevisiae* e di 2 ceppi di *S.paradoxus*, quali uno aploide e uno diploide tutti identificabili con marcatori specifici. In seguito dopo 60 giorni di ibernazione è stato osservato che più di un terzo delle vespe aveva al suo interno cellule ibridi intraspecifici, ibridi *S.cerevisiae* e *S.paradoxus* rispettivamente il 34,39% e il 36,73%.(Stefanini *et al.*,2016).Questi sono stati isolati dalla parte posteriore dell'intestino in modo da poter confermare la crescita, dopo 119 e 126 giorni l'aumento è stato considerevole

con un aumento medio del 28,40% e del 68,39%. In quest'ultime è stato osservato come i ceppi puri somministrati di *S.cerevisiae* sono scomparsi. Osservando che i ceppi ibridi sono più adatti alla crescita e alla sopravvivenza all'interno dell'intestino delle vespe, è stato teorizzato che questi ultimi potrebbero essere migliorati utilizzando ceppi auxtrofi poiché l'accoppiamento porterebbe in linea teorica un aumento di fitness. Inoltre è stato osservato che i ceppi di *S.cerevisiae* prototrofi sono scomparsi dall'intestino, ed è stato trovato solo il ceppo aploide di *S.paradoxus*, come ibrido. *S.paradoxus* ha maggior successo come ibrido interspecifico, piuttosto che come specie pura. (Stefanini *et al.*,2016).

L'intestino della vespa sociale fornisce a *S. cerevisiae*, un ambiente che favorisce l'outbreeding rappresentando un ambiente altamente selettivo per *S. paradoxus*. I ceppi di *S.paradoxus*, utilizzati, sono stati selezionati in modo da rappresentare la popolazione europea degli stessi. *S. paradoxus* proveniente dal clade europeo, che potrebbe potenzialmente portare a osservazioni di genotipo, favorito da adattamenti a un determinato ambiente.

Tuttavia, la comune origine geografica, dei ceppi di lievito e delle vespe utilizzate in questo studio è connesso con l'obiettivo di mimare i contesti ecologici in esame di studio, evidenziando che i ceppi di *S. paradoxus*, testati, sono stati in grado di sopravvivere nell'intestino dell'insetto solo come ibridi, e con *S. cerevisiae* che potrebbe essere falsata dal genotipo dei ceppi selezionati, per mancanza di rapporti sull'isolamento di ceppi puri di *S. paradoxus*. (Stefanini *et al.*,2016).

In contesti naturali potrebbe indicare un minore fitness dei ceppi puri rispetto agli ibridi interspecifici. Nondimeno, la capacità di sporulare, germinare e accoppiarsi, riportata dai ceppi di lievito qui studiati, danno origine a ibridi intra- e interspecifici, rappresentando una tappa fondamentale nel campo degli ibridi, rappresentando un fattore importante nelle conoscenze sulla storia naturale dei *Saccharomyces*, che chiarisce come la loro evoluzione dipenda dall'interazione con gli insetti, favoriti dalla formazione di nuove combinazioni genetiche. (Stefanini *et al.*,2016).

Il legame diretto tra gli insetti sociali e la biodiversità delle specie di lieviti è rilevante per l'industria umana, in quanto la diversità genetica generata nell'intestino della vespa, potrebbe favorire l'adattamento all'ambiente fermentativo in continuo mutamento, come dimostra l'evidenza, che molti dei ceppi industriali di maggior successo sono ibridi interspecifici. Pertanto, preservare il tesoro potenzialmente nascosto nell'intestino delle vespe della vigna potrebbe essere importante sia dal punto di vista ecologico che biotecnologico. (Stefanini *et al.*,2016).

Negli ultimi anni sta crescendo l'interesse per gli insetti a scopo alimentare e applicativo. L'allevamento degli insetti è un metodo sostenibile a basso impatto energetico e rappresenta una grande opportunità per applicazioni industriali su larga scala.

Gli insetti sociali potrebbero svolgere un ruolo nell'evoluzione e nella ricombinazione genetica dei lieviti, poiché sembra essere una nicchia perfetta in cui la formazione di ibridi, avviene in modo naturale e molto più efficiente, che in qualsiasi altro luogo selvaggio, senza impiegare strategie artificiali di manipolazione genetica, come recentemente mostrato realizzando ibridi sintetici da sei specie di lievito.

Le vespe potrebbero fornire alle comunità di lieviti il livello di variazione genetica necessario, per adattarsi nel tempo ad un ambiente in continua evoluzione. (Di Paola *et al.*,2020).

Dato il ritmo veloce con cui i cambiamenti climatici stanno influenzando l'ambiente artificiale, in cui vengono prodotti gli alimenti fermentati, mantenere la forza di variazione genetica guidata dalla presenza di insetti potrebbe essere molto importante per supportare l'adattabilità del lievito a questi cambiamenti. Considerando che molti lieviti utilizzati nell'industria della fermentazione sono ceppi ibridi interspecifici, si potrebbe ipotizzare che gli insetti siano stati gli allevatori del passato, avendo probabilmente fornito molto all'evoluzione della produzione della birra e del vino.

L'esigenza di diversificazione dei prodotti presenti nel settore delle bevande fermentate potrebbe guardare con grande interesse alle potenzialità dell'utilizzo delle vespe come luoghi di riproduzione per produrre lieviti di interesse biotecnologico, compresi i lieviti che producono bevande a ridotto contenuto di etanolo. (Di Paola *et al.*, 2020).

BIBLIOGRAFIA

Madigan M.T. - Matinko.J.M – Stahl. D.A.– Bender.K.S. – Buckley.D.H., *Brock. Biologia dei microrganismi. Microbiologia generale, ambientale e industriale*, Milano; Torino, Pearson Italia, 2016, 14 ed, (traduzione) Branduardi P., Brunelli E., Dalgo E., Portalupi A., Vaghi G.I, (ed.italiana a cura di) Branduardi P., Gribaudo G., Mastromei G.,Polissi A.,Vallini G.

Malassigné, S., Minard, G., Vallon, L., Martin, E., Valiente Moro, C., Luis, P. (2021). Diversity and functions of yeast communities associated with insects. *Microorganisms*, 9(8), 1552.

Buser, C. C., Jokela, J., Martin, O. Y. (2021). Scent of a killer: How could killer yeast boost its dispersal?. *Ecology and evolution*, 11(11), 5809-5814.

Cavalieri, D., Valentini, B., Stefanini, I. (2022). Going wild: ecology and genomics are crucial to understand yeast evolution. *Current Opinion in Genetics & Development*, 75, 101922.

Cui, P., Liu, L., Huang, Z., Shi, S., Kong, K., Zhang, Y. (2022). Diversity, antibacterial activity and chemical analyses of gut-associated fungi isolated from the *Crocothemis servilia*. *Frontiers in microbiology*, 13.

Detry, R., Simon-Delso, N., Bruneau, E., Daniel, H. M. (2020). Specialisation of yeast genera in different phases of bee bread maturation. *Microorganisms*, 8(11), 1789.

Di Paola, M., Meriggi, N.,Cavalieri, D. (2020). Applications of Wild Isolates of *Saccharomyces* Yeast for Industrial Fermentation: The Gut of Social Insects as Niche for Yeast Hybrids' Production. *Frontiers in Microbiology*, 11, 578425.

Echeverrigaray, S., Scariot, F. J., Foresti, L., Schwarz, L. V., Rocha, R. K. M., da Silva, Pereira Moreira, J., Delamare, A. P. L. (2021). Yeast biodiversity in honey produced by stingless bees raised in the highlands of southern Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, 347, 109200.

Engel, P., Moran, N. A. (2013). The gut microbiota of insects—diversity in structure and function. *FEMS microbiology reviews*, 37(5), 699-735.

Goddard, M. R., Anfang, N., Tang, R., Gardner, R. C., Jun, C. (2010). A distinct population of *Saccharomyces cerevisiae* in New Zealand: evidence for local dispersal by insects and human-aided global dispersal in oak barrels. *Environmental microbiology*, 12(1), 63-73.

Meriggi, N., Di Paola, M., Cavalieri, D., Stefanini, I. (2020). *Saccharomyces cerevisiae*–insects association: Impacts, biogeography, and extent. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1629.

Suh, S. O., Gibson, C. M., Blackwell, M. (2004). *Metschnikowia chrysoperlae* sp. nov., *Candida picachoensis* sp. nov. and *Candida pimensis* sp. nov., isolated from the green lacewings *Chrysoperla comanche* and *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 54(5), 1883-1890.

Rosa, C. A., Lachance, M. A., Silva, J. O., Teixeira, A. C. P., Marini, M. M., Antonini, Y., Martins, R. P. (2003). Yeast communities associated with stingless bees. *FEMS yeast research*, 4(3), 271-275.

Daniel, H. M., Rosa, C. A., Sao Thiago-Calaça, P. S., Antonini, Y., Bastos, E. M., Evrard, P., Huret, S., Fidalgo-Jiménez, A., Lachance, M. A. (2013). *Starmerella neotropicalis* fa, sp. nov., a yeast species found in bees and pollen. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(Pt_10), 3896-3903.

Stefanini, I., Dapporto, L., Legras, J. L., Calabretta, A., Di Paola, M., De Filippo, C., D. Viola, R., Capretti, P., Polsinelli, M., Turilazzi, S., Cavalieri, D., (2012). Role of social wasps in *Saccharomyces cerevisiae* ecology and evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(33), 13398-13403.

Stefanini, I., Dapporto, L., Berná, L., Polsinelli, M., Turillazzi, S., Cavalieri, D. (2016). Social wasps are a *Saccharomyces* mating nest. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(8), 2247-2251.