

AperTO - Archivio Istituzionale Open Access dell'Università di Torino

I microbiota e la salute: dall'uomo alle piante e viceversa

This is the author's manuscript

Original Citation:

Availability:

This version is available <http://hdl.handle.net/2318/152695> since

Terms of use:

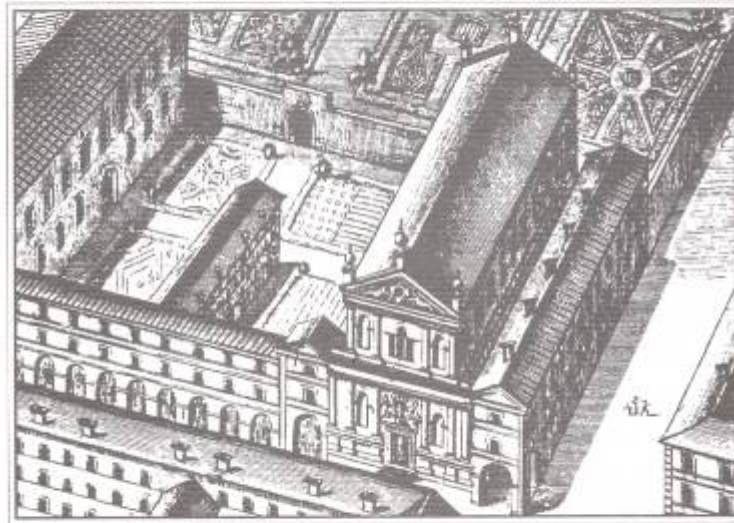
Open Access

Anyone can freely access the full text of works made available as "Open Access". Works made available under a Creative Commons license can be used according to the terms and conditions of said license. Use of all other works requires consent of the right holder (author or publisher) if not exempted from copyright protection by the applicable law.

(Article begins on next page)



Giornale *della*
Accademia *di* Medicina
di Torino



I MICROBIOTA E LA SALUTE: DALL'UOMO ALLE PIANTE E VICEVERSA

Paola Bonfante, Mara Novero

Dipartimento di Scienze della Vita e Biologia dei Sistemi - Università di Torino

Parole chiave: *Piante*
Microbiota
Salute
Funghi
Associazioni simbiotiche

Key words: *Plants*
Microbiota
Health
Fungi
Symbiotic associations

Riassunto

Un numero sempre crescente di dati sperimentali dimostra come lo stato di salute di un organismo, sia animale sia vegetale, dipenda dalle comunità microbiche associate. Oggi sappiamo che un corpo umano contiene dieci volte più cellule batteriche che umane e le centinaia di specie diverse di batteri che tappezzano la nostra pelle e le nostre cavità non sono viaggiatori clandestini, ma regolano molte delle nostre funzioni. Essi costituiscono il microbioma umano, una straordinaria sorgente di diversità individuale che controlla funzioni vitali come l'immunità, l'obesità o l'invecchiamento. Lo scopo della nota è quello di illustrare come anche le piante interagiscano con migliaia di microorganismi che vivono nella rizosfera o sulle foglie. Lo sviluppo delle nuove tecnologie basate su piattaforme che permettono un rapido ed esteso sequenziamento (Next Generation Sequencing) ha permesso di dare un nome a molti di questi microorganismi. Molti studi attuali hanno però semplificato la complessità del microbioma considerando solo gli organismi procarioti. Al contrario, i funghi sono componenti essenziali del microbioma e tra quelli benefici un ruolo ben noto è attribuito a quelli che agiscono nel biocontrollo

dei patogeni e ai saprotrofi che favoriscono il riciclo di nutrienti: tuttavia, i primi attori sono sicuramente i funghi micorrizici. Essi sono cruciali per la salute e produttività delle piante. Studiare che cosa accade nel suolo permetterà di individuare soluzioni innovative ai problemi che la scienza deve oggi risolvere per rispondere alle sfide del futuro.

Abstract

A growing body of experimental evidence shows that the health status of an organism both animal and plant depends on the microbial communities associated with it. Today we know that a human body contains ten times more bacterial than human cells, and hundreds of different bacterial species cover our skin and our cavities, not as illegal travelers, but as crucial regulators of our physiology. They are the human microbiota, an extraordinary source of individual diversity that controls vital functions such as immunity, obesity or aging. The purpose of the report is to illustrate how plants also interact with thousands of microorganisms living in the rhizosphere or on leaves. The development of new technology-based platforms that allow rapid and extensive sequencing (so-called Next Generation Sequencing) has allowed us to identify many of these microorganisms. However, the study of plant microbiota is often limited to the investigation of prokaryotic organisms. In contrast, fungi are essential components and between them a well-known role is attributed to the fungi that act in the biocontrol of pathogens, and to the saprotrophs that allow the recycling of nutrients: however, the main actors are definitely the mycorrhizal fungi. They are crucial actors in plant health and productivity. To study what happens in the soil will help identify innovative solutions to the challenges that Science has currently to face.

Le comunità dei microrganismi (microbiota) che vivono in associazione con un individuo rappresentano oggi un tema scientificamente molto caldo: basta digitare le parole microbiota/microbiome su Google, che in 0.20-0.40 secondi emergono oltre 2 milioni e mezzo di risultati. Questo mare di informazioni è basato su un numero sempre crescente di studi che dimostrano come lo stato di salute di un organismo, sia animale sia vegetale, dipenda dalle comunità microbiche stabilmente associate. A partire dal lavoro seminale di Eckburg e collaboratori del 2005 su *Science*⁽¹⁾, oggi sappiamo che un corpo umano contiene dieci volte più cellule batteriche che umane e le centinaia di specie diverse di batteri che tappezzano la nostra pelle e le nostre cavità non sono viaggiatori clandestini, ma regolano molte delle nostre funzioni. Essi costituiscono il microbiota umano, una straordinaria sorgente di diversità individuale che interviene in tutti i fenomeni vitali dall'immunità, all'invecchiamento e che coopera per innescare determinate condizioni metaboliche (ad esempio l'obesità). Ogni giorno le maggiori riviste scientifiche portano nuovi risultati che dimostrano l'impatto di questo secondo genoma sulla nostra salute. Per meglio caratterizzarlo, un progetto americano <http://americangut.org/wordpress> si pone come obiettivo quello di fornire una mappa microbica ai cittadini (più di mille individui) che hanno offerto i loro campioni, ponendo attenzione alla dieta, all'età, al genere, allo stato di salute, e all'attività fisica. Sorprendentemente il genere non sembra avere molta influenza sulla biodiversità delle comunità batteriche che sono comunque dominate dai Firmicutes, che includono *Clostridium* e *Lactobacillus*, e dai Bacteroidetes con *Bacteroides* e *Prevotella* come generi dominanti. Tuttavia, le popolazioni variano molto di più a seconda dei distretti considerati (intestino, pelle, bocca). Alcuni partecipanti hanno dato il permesso di rendere pubblici i loro dati permettendo un diretto confronto con altri: tra questi è interessante il caso di Michael Pollan per definizione onnivoro⁽²⁾ il cui microbioma sembra essere molto sensibile alle terapie antibiotiche. La cosiddetta paleodieta è un altro fattore che ha grande impatto, confermando l'idea un po' banale che noi siamo anche quello che mangiamo. Le conclusioni di questo studio sono tuttavia assai interessanti: sembra davvero che una ridotta diversità delle comunità batteriche sia associata a un certo grado di malattie, non diversamente da quanto accade negli ecosistemi.

Dai microbi coltivabili a quelli non coltivabili

Da un punto di vista tecnico gli studi di environmental microbiology parlano di "Microbiota" quando si riferiscono ad una particolare comunità di microbi che vengono identificati in un ambiente (ad esempio, tutti i batteri tassonomicamente conosciuti che sono presenti nell'intestino umano). Al contrario per "Microbioma" si intende il complesso dei geni che i microbi contengono e quindi le funzioni ad essi associate. Indipendentemente dal tipo di informazione che i due termini contengono, essi originano dall'applicazione di nuove tecniche di sequenziamento che vanno sotto il nome di Next Generation Sequencing. Queste tecniche si basano su un concetto molto importante: fino alla fine del XX secolo la microbiologia si basava fondamentalmente sui microbi che crescono nelle capule Petri e che offrono un materiale omogeneo e studiabile direttamente, permettendo di applicare il postulato di Koch. Tuttavia a partire dai pionieristici lavori di Craig Venter sulla biodiversità nascosta in una goccia del mar dei Sargassi⁽³⁾, si è imposta l'idea che i microbi presenti siano per lo più non coltivabili e quindi la loro identificazione e il loro studio devono by-passare il problema di non disporre di colture microbiche che crescono in piastra.

Decifrare le sequenze di DNA è essenziale per quasi tutti i settori della ricerca biologica. Con l'avvento del metodo Sanger, basato sull'elettroforesi capillare (CE), gli scienziati hanno acquisito la capacità di ottenere le informazioni genetiche da qualsiasi sistema biologico. Questa tecnologia è diventata ampiamente adottata nei laboratori di tutto il mondo, anche se ha limitazioni intrinseche in velocità e risoluzione, che spesso impediscono agli scienziati di ottenere le informazioni essenziali di cui hanno bisogno. Per superare questi ostacoli, si segue oggi una nuova tecnologia detta Next-Generation Sequencing (NGS), che offre un approccio fondamentalmente diverso dal sequenziamento Sanger e che ha avviato una vera rivoluzione nella scienza genomica. In cinque anni dall'introduzione della tecnologia NGS si è verificata una profonda trasformazione nel modo in cui gli scienziati estraggono informazioni genetiche dai sistemi biologici, ottenendo una visione straordinariamente ampia sul genoma, trascrittoma e epigenoma di qualsiasi specie di organismo vivente. La NGS ha catalizzato una serie di innovazioni importanti, portando ad importanti avanzamenti nei settori scientifici più ampi, dalle malattie umane all'agricoltura e alla biologia evolutiva. In linea di principio, il concetto alla base della tecnologia NGS è simile a quello della Sanger: vengono identificate sequenzialmente le basi di un frammento di DNA tramite i segnali emessi da ciascun frammento che viene ri-sintetizzato

a partire dal filamento stampo di DNA. Nella NGS il processo però non è limitato ad un solo frammento, ma è esteso a milioni di frammenti attraverso milioni di reazioni condotte parallelamente. Questo progresso consente un rapido sequenziamento di ampi tratti di coppie di basi di DNA che abbracciano interi genomi, e di produrre centinaia di gigabases di dati in una unica corsa di sequenziamento. Per illustrare come funziona questo processo, si consideri un singolo DNA genomico (gDNA) del campione. Il gDNA viene dapprima frammentato in una libreria di piccoli segmenti che sono uniformemente ed accuratamente sequenziati in milioni di reazioni parallele. I dati così ottenuti vengono quindi riassemblati utilizzando, se disponibile, un genoma di riferimento noto come impalcatura (resequencing), o in assenza di un genoma di riferimento (de novo sequencing) (per approfondimenti vedere ad esempio <http://www.youtube.com/watch?v=womKfikWlxM>).

La quantità di dati prodotta dal NGS è imponente: nel 2007, una sola corsa di sequenziamento poteva produrre un massimo di circa un GigaBase (Gb) di dati. Nel 2011 si era già raggiunto un terabase (Tb) di dati con un aumento di mille volte in quattro anni. Con tali capacità, le piattaforme di NGS permettono ai ricercatori di sequenziare più di cinque genomi umani in un'unica corsa, con dei costi molto più favorevoli rispetto a quelli di alcuni anni fa.

La natura potente e flessibile della NGS è ora alla base di molte aree di studio, diventando uno strumento indispensabile per la ricerca biologica: in questo nuovo contesto i progetti dei microbiota sono diventati una realtà accessibile a molti laboratori.

Il Plant Microbiota

Allo stesso modo degli organismi animali le piante interagiscono con migliaia di microorganismi che vivono nella rizosfera, la regione del suolo che viene influenzata dalle attività radicali, o sulle foglie, la cosiddetta fillosfera. I numeri del microbiota vegetale sono assai elevati: si sono evidenziati fino a 10^{11} cellule microbiche per grammo di radice.

Da sempre biologi vegetali e microbiologi hanno studiato l'impatto dei microorganismi sulle piante, ma anche per il mondo delle piante la chiave di volta del cambiamento è stata l'applicazione delle NGS. Nel numero di Agosto 2012, Nature ha dedicato la copertina proprio ai microorganismi che colonizzano la rizosfera delle piante, grazie a due lavori che hanno portato all'identificazione e alla caratterizzazione del microbiota di *Arabidopsis thaliana*: la pianta modello della biologia vegetale^(4,5). Nel giro di un anno

i contributi in questo settore si sono decuplicati. Una bellissima review⁽⁶⁾ riassume i punti più salienti finora ottenuti: la composizione filogenetica delle comunità associate alle piante è definita da relativamente pochi phyla di batteri, tra cui Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, e Proteobacteria. Viene suggerito un processo di selezione in due fasi in cui la microflora batterica delle radici dapprima si differenzia dal bioma presente nel terreno circostante tramite un processo mediato dalla rizodeposizione; successivamente la nicchia rizosferica alimenta specifiche comunità interagendo con il genotipo dell'ospite. In conclusione, il microbiota sia della foglia che della radice è utile alla pianta perché contiene batteri che forniscono una protezione indiretta ai patogeni.

Lo studio del microbiota ha però spesso portato a semplificare la complessità del sistema come se fosse costituito essenzialmente da organismi procarioti. Al contrario, nel caso del plant microbiota i funghi sono componenti essenziali e – tra quelli benefici – un ruolo ben noto è attribuito ai funghi che agiscono nel biocontrollo dei patogeni⁽⁷⁾, o ai saprotrofi che favoriscono il riciclo di nutrienti⁽⁸⁾ o ancora ai funghi micorrizici che sono attori di primo piano.

I funghi micorrizici sono un gruppo molto diversificato di miceti che appartengono a diversi taxa fungini e che stabiliscono delle associazioni simbiotiche definite come micorrize con le radici di quasi tutte le piante che si trovano sulla terra. La funzione ormai riconosciuta per queste simbiosi è che la pianta migliora la sua nutrizione minerale, registrando un effetto positivo sulla sua crescita, cedendo in cambio zuccheri al fungo. Grazie alla simbiosi micorrizica, la pianta risulta essere più resistente a stress biotici o abiotici, aumenta la tolleranza alla mancanza di acqua o alla presenza di inquinanti, e porta a una riduzione della sua suscettibilità ai più comuni agenti patogeni. Lo scambio equilibrato tra i due partner è ora descritto come un mercato biologico dove ognuno dei due partner ha la giusta ricompensa⁽⁹⁾.

Tra i molteplici tipi di simbiosi micorriziche, quella arbuscolare (AM) è il tipo più diffuso, dal momento che si trova in oltre l'80% delle piante terrestri e coinvolge come funghi simbiotici i Glomeromycota, un antico phylum che si è coevoluto con le piante da almeno 450 milioni di anni⁽¹⁰⁾. I funghi AM contribuiscono alla diffusione delle sostanze nutritive dal terreno alle piante, aumentando così la loro produttività e conferendo resistenza allo stress. Allo stesso tempo, come biotrofi obbligati, essi non possono crescere in coltura pura, ma dipendono dalla pianta per la loro vitalità e in particolare per i carboidrati. La loro unicità è dovuta anche ad

altre caratteristiche biologiche: il concetto di specie è mal definito in questo gruppo fungino e riflette un alto grado di variabilità genetica e funzionale; situazione che ha anche portato a difficoltà nella definizione della loro posizione filogenetica. Sulla base del genoma di *Rhizophagus irregularis*, un fungo ubiquitario che è stato il primo fungo AM sequenziato^(11,12), si può affermare che i Glomeromycota siano più vicini ai Mucormycotina, un gruppo fungino basale, che non agli Asco- e Basidiomiceti⁽¹³⁾. Una caratteristica particolare è il fatto che le spore e le ife contengono migliaia di nuclei e questo rende gli approcci genetici classici del tutto inadatti. Infine molti funghi AM contengono endobatteri nel loro citoplasma, e questo porta ad un aumento inatteso della loro complessità genetica^(14,15). D'altra parte, la disponibilità di strumenti genetici e informazioni genomiche per diverse piante ospiti, hanno messo in luce i molteplici aspetti delle interazioni pianta-fungo, tra cui il processo di colonizzazione delle radici, la comunicazione tra i simbionti e il contributo di ciascun partner al funzionamento dell'associazione⁽¹⁶⁾.

I funghi AM sono una componente importante del microbiota vegetale, in quanto sono importanti determinanti della biodiversità vegetale, della variabilità degli ecosistemi e della produttività vegetale⁽¹⁷⁾. Dati i loro potenziali effetti benefici, è essenziale comprendere i fattori che controllano l'assemblaggio, la distribuzione e le dinamiche dei funghi AM al fine di individuare i principali driver delle comunità microbiche in ecosistemi naturali e agricoli, e di monitorare e massimizzare le loro funzioni sull'ecosistema. In questo contesto due progetti attualmente in corso nei nostri laboratori (Risinnova e Mycoplant) hanno lo scopo di identificare le comunità microbiche, associate a due piante che hanno grande interesse per l'economia nazionale, il riso e il pomodoro rispettivamente, e che – nello stesso tempo – sono piante modello, grazie al sequenziamento dei loro genomi e del numero di mutanti disponibili. Attraverso l'uso delle NGS da una parte stiamo osservando come nel riso le comunità batteriche e fungine, comprensive anche dei funghi simbionti, siano molto sensibili non solo alla nicchia ecologica (suolo *vs* radice), ma anche alla procedura agronomica (P. Abbruscato, E. Lumini et al, unpublished). Nel ciclo di produzione il riso alterna fasi in asciutta a quelle in sommersione: analisi della biodiversità unite a osservazioni di sommersione simulata in microcosmi dimostrano che la sommersione fa praticamente scomparire i funghi AM dalle radici⁽¹⁸⁾, mentre essi permangono nella rizosfera circostante. Nel modello pomodoro, il disegno sperimentale prevede di capire come diversi genotipi di pomodoro (ad esempio resistenti o no a patogeni) possano influenzare il microbiota, e

al contrario come suoli con diverse caratteristiche strutturali provenienti da aree geografiche diverse contengano un diverso microbiota, e possano quindi influenzare lo stato di salute della pianta (Figura 1).

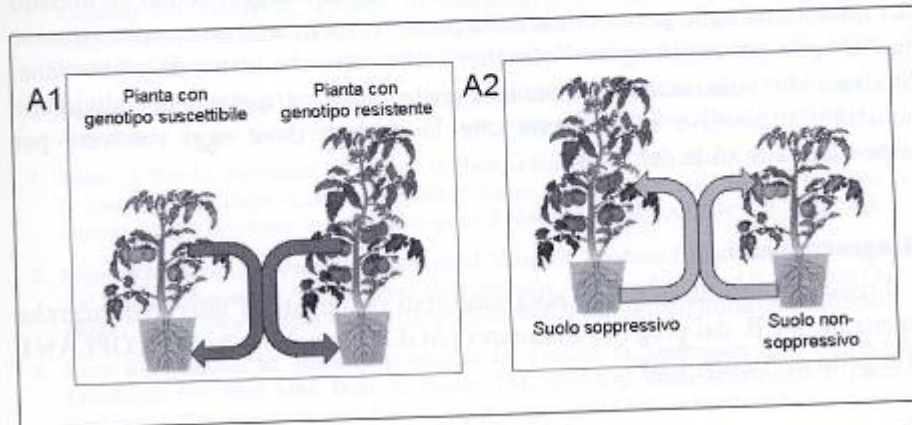


Figura 1. Lo schema illustra il piano di lavoro alla base del progetto Mycoplant. Tale progetto è stato sviluppato allo scopo di capire come diversi genotipi di pomodoro (resistenti o no a patogeni) possano influenzare il microbiota, e al contrario come suoli con diverse caratteristiche strutturali provenienti da aree geografiche diverse e soppressivi oppure no nei confronti di determinati patogeni, contengano un diverso microbiota e possano quindi influenzare lo stato di salute della pianta.

Conclusione

L'esplosione di dati che provengono dalle piattaforme NGS dandoci informazioni sulla biodiversità dei funghi sia saprotrofi che simbiotici AM, e i dati di trascrittoma e proteoma che rivelano le risposte di molte piante di interesse per l'alimentazione e la salute dell'uomo (riso, pomodoro, vite, patata) hanno aperto molte nuove domande: in che modo la pianta reagisce al fungo cambiando profondamente il suo profilo trascrizionale? Attraverso quali meccanismi risulta più difesa contro i patogeni? Ma la sfida oggi è capire se i funghi che vivono confinati nelle radici abbiano un effetto sistemico, a lunga distanza. Alcuni lavori sul pomodoro suggeriscono che vengano variate alcune proprietà nutrizionali e i nostri dati, ottenuti usando le nuove tecnologie di RNA-seq, dimostrano come il pomodoro prodotto da piante micorrizzate abbia un profilo metabolico profondamente diverso da quello prodotto da piante non micorrizzate o da quello prodotto da piante trattate con alte dosi di fertilizzanti⁽¹⁹⁾.

In conclusione, il microbiota degli animali e dell'uomo è sicuramente un determinante cruciale della salute dell'uomo; ed allo stesso modo il microbiota delle piante e in particolar modo i funghi simbiotici sono essenziali per il benessere delle piante. Le evidenze attuali che suggeriscono un impatto del microbiota sulle parti edibili delle piante evidenziano un circolo virtuoso su cui agire per raggiungere l'obiettivo: cibo sano che arriva da piante sane. Studiare che cosa accade nel suolo e nelle radici permetterà di individuare soluzioni innovative ai problemi che la scienza deve oggi risolvere per rispondere alle sfide del futuro.

Ringraziamenti

I risultati illustrati in questa nota sono stati sviluppati all'interno di ricerche finanziate a P.B. dal progetto Risinnova (AGER-Cariplo) e da MYCOPLANT (Progetto di Ateneo-CSP).

BIBLIOGRAFIA

1. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA. *Diversity of the human intestinal microbial flora*. Science. 2005; 308: 1635-1638.
2. Pollan M. *Il dilemma dell'onnivoro*. Adelphi, 2013, Milano.
3. Rusch DB, Halpern AL, Sutton G, Heidelberg KB, Williamson S, Yooseph S, Wu D, Eisen JA, Hoffman JM, Remington K, Beeson K, Tran B, Smith H, Baden-Tillson H, Stewart C, Thorpe J, Freeman J, Andrews-Pfannkoch C, Venter-JE, Li K, Kravitz S, Heidelberg JF, Utterback T, Rogers YH, Falcon LI, Souza V, Bonilla-Rosso G, Eguiarte LE, Karl DM, Sathyendranath S, Platt T, Bermingham E, Gallardo V, Tamayo-Castillo G, Ferrari MR, Strausberg RL, Nealson K, Friedman R, Frazier M, Venter JC. *The Sorcerer II Global Ocean Sampling Expedition: Northwest Atlantic Through Eastern Tropical Pacific*. In "PLoS Biol.", 2007; 13: 5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1821060/>.

4. Bulgarelli D, Rott M, Schlaeppi K, Ver Loren van Themaat E, Ahmadinejad N, Assenza F, Rauf P, Huettel B, Reinhardt R, Schmelzer E, Peplies J, Gloeckner FO, Amann R, Eickhorst T, Schulze-Lefert P. *Revealing structure and assembly cues for Arabidopsis root-inhabiting bacterial microbiota*. *Nature*. 2012; 488: 91-95.
5. Lundberg DS, Lebeis SL, Paredes SH, Yourstone S, Gehring J, Malfatti S, Tremblay J, Engelbrektsen A, Kunin V, del Rio TG, Edgar RC, Eickhorst T, Ley RE, Hugenholtz P, Tringe SG, Dangl JL. *Defining the core Arabidopsis thaliana root microbiome*. *Nature*. 2012; 488: 86-90.
6. Bulgarelli D, Schlaeppi K, Spaepen S, van Themaat EVL, Schulze-Lefert P. *Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants*. *Annu Rev Plant Biol*. 2013; 64: 807-838.
7. Lorito M, Woo SL, Fernandez IG, Colucci G, Harman GE, Pintor-Toro JA, Filippone E, Muccifora S, Lawrence CB, Zoina A, Tuzun S, Scala F. *Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens*. *P Natl Acad Sci USA*. 1998; 95: 7860-7865.
8. Orgiazzi A, Lumini E, Nilsson RH, Girlanda M, Vizzini A, Bonfante P, Bianciotto V. *Unravelling soil fungal communities from different mediterranean land-use backgrounds*. In "PloS One", 2012; 7. <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0034847>.
9. Kiers ET, Duhamel M, Beesetty Y, Mensah JA, Franken O, Verbruggen E, Fellbaum CR, Kowalchuk GA, Hart MM, Bago A, Palmer TM, West SA, Vandenkoornhuysen P, Jansa J, Buckley H. *Reciprocal rewards stabilize cooperation in the mycorrhizal symbiosis*. *Science*. 2011; 333: 880-882.
10. Bonfante P, Genre A. *Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis*. In "Nature Communications", 2010; 1. <http://www.nature.com/ncomms/journal/v1/n4/full/ncomms1046.html>.
11. Lin K, Limpens E, Zhang ZH, Ivanov S, Saunders DGO, Mu DS, Pang EL, Cao HF, Cha HH, Lin T, Zhou Q, Shang Y, Li Y, Sharma T, van Velzen R, de Ruijter N, Aanen DK, Win J, Kamoun S, Bisseling T, Geurts R, Huang SW. *Single nucleus genome sequencing reveals high similarity among nuclei of an endomycorrhizal fungus*. In "Plos Genetics", 2014; 10. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3886924/>.
12. Tisserant E, Malbreil M, Kuo A, Kohler A, Symeonidi A, Balestrini R, Charron P, Duensing N, Frey NFD, Gianinazzi-Pearson V, Gilbert LB, Handa Y, Herr JR, Hijri M, Koul R, Kawaguchi M, Krajinski F, Lammers PJ, Masclauxm FG, Murat C, Morin E, Ndikumana S, Pagni M, Petitpierre D, Requena N, Rosikiewicz P, Riley R, Saito K, Clemente HS, Shapiro H, Van Tuinen D, Becard G, Bonfante P, Paszkowski U, Shachar-Hill YY, Tuskan GA, Young PW, Sanders IR, Henrissat B, Rensing SA, Grigoriev IV, Corradi N, Roux C, Martin F. *Genome of an arbuscular mycorrhizal fungus provides insight into the oldest plant symbiosis*. *P Natl Acad Sci USA*. 2013; 110: 20117-20122.
13. Schussler A, Schwarzott D, Walker C. *A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution*. *Mycol Res*. 2001; 105: 1413-1421.
14. Bonfante P, Anca IA. *Plants, mycorrhizal fungi, and bacteria: a network of interactions*. *Annu Rev Microbiol*. 2009; 63: 363-383.
15. Desiro A, Salvioli A, Ngonkeu EL, Mondo SJ, Epis S, Faccio A, Kaech A, Pawlowska TE, Bonfante P. *Detection of a novel intracellular microbiome hosted in arbuscular mycorrhizal fungi*. *Isme J*. 2014; 8: 257-270.
16. Gutjahr C, Parniske M. *Cell and developmental biology of arbuscular mycorrhizal symbiosis*. *Annu Rev Cell Dev Bi*. 2013; 29: 593-617.

17. van der Heijden MGA, Verkade S, de Bruin SJ. *Mycorrhizal fungi reduce the negative effects of nitrogen enrichment on plant community structure in dune grassland*. *Global Change Biol.* 2008; 14: 2626-2635.
18. Vallino M, Fiorilli V, Bonfante P. *Rice flooding negatively impacts root branching and arbuscular mycorrhizal colonization, but not fungal viability*. *Plant Cell Environ.* 2014; 37 (3): 557-572.
19. Zouari I, Salvioli A, Chialva M, Novero M, Miozzi L, Tenore GC, Bagnaresi P, Bonfante P. *From root to fruit: RNA-Seq analysis shows that arbuscular mycorrhizal symbiosis may affect tomato fruit metabolism*. In "BMC Genomics", 2014; 15: 221. <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/15/221>.