

Basi ultrastrutturali delle interazioni tra procarioti ed eucarioti in differenti modelli simbiotici

L. Sacchi

Dipartimento di Biologia Animale, Università di Pavia.

Abstract [Ultrastructural basis of interactions between prokaryotes and eukaryotes in different symbiotic models]. This paper reviews the Author's contribution to the knowledge of the ultrastructural basis of the prokaryote-eukaryote interactions in different models assessed by an ultrastructural approach. In agreement with the hypothesis of the origin of eukaryotic cells, which are chimeras of several prokaryotes with different morpho-functional specializations, symbiosis had major consequence for evolution of life. In Arthropods, one of the most successful lifestyles, the presence of endosymbiotic prokaryotes, plays an important role in their metabolism. In some cases, genome integration has occurred in the endosymbiotic relationships with the host, proving that intracellular symbiosis is not merely a nutritional supplement. Intracellular symbiotic bacteria are also described in nematodes. In particular, the presence of intracellular *Wolbachia* in filariae, even if its function is not yet completely known, influences positively the reproductive biology and the survival of the host, as proved by antibiotic treatment against this bacterium. The ultrastructural images reported in this review were obtained using different species of cockroaches, termites, ticks and filarial nematodes. The traditional methods of transmission (TEM), scanning (SEM) and immuno electron microscopy were used. In addition, also freeze-fracture and deep-etching techniques were employed. The cockroaches and the primitive termite *Mastotermes darwiniensis* host symbiotic bacteria in the ovary and in specialized cells (bacteriocytes) of the fat body. These bacteria have the typical cell boundary profile of Gram-negative bacteria and are enveloped in a vacuolar membrane produced by the host cell. Molecular sequence data of 16S rDNA of endosymbionts of five species of cockroaches and *M. darwiniensis* indicate that they are members of the Flavobacteria-bacteroides group and that the infection occurred in an ancestor common to cockroaches and termites probably after the end of the Paleozoic (250 Ma BP). The symbiotic bacteria are transmitted transovarially and, during embryogenesis, they are integrated into the morphogenetic processes. In particular, we were able to demonstrate that the origin of the bacteriocyte should be looked for in the cells of the haemocyte line (embryonic plasmatocytes). The eggs are infected by the bacteria emerging from the bacteriocytes of the ovaric fat body and, at the end of the vitellogenesis, they are actively phagocytized by the egg membrane. In filarial nematodes, intracellular bacteria belonging to the genus *Wolbachia* have been described: they have evolved an obligatory mutualistic association with their host. In fact, antibiotic treatments lead to the clearance of bacteria and this loss produces a negative impact on reproduction and survival of the filarial host. We evidenced, by TEM, the degenerative events occurring during the embryogenesis of *Brugia pahangi* and *Dirofilaria immitis* after tetracycline treatment. The data suggest that the *Wolbachia* play a direct role in worm metabolism. Finally, a new additional model of the prokaryote-eukaryote interaction has been described: we have recently discovered a new intracellular alpha-proteobacterium, named Iric ES1, which resides in the ovarian tissues of the tick *Ixodes ricinus*. The intriguing characteristic of this bacterium is its ability to invade and consume the ovaric mitochondria. From an evolutionary perspective, it is interesting to note that Iric ES1 enters mitochondria in a similar way to that employed by the "predatory" bacterium *Bdellovibrio bacteriovorus*.

La simbiosi, intesa nel senso più ampio del termine, è un fenomeno biologico di portata così ampia che nessun essere vivente può ritenersi escluso da esso. Inoltre, a partire da uno dei momenti più significativi della storia della vita, rappresentato dall'origine della cellula eucariotica, nessun evento biologico ha avuto un effetto sull'evoluzione paragonabile a quello esercitato dalla simbiosi. E' infatti ormai generalmente accettata l'ipotesi che la cellula eucariotica sia una sorta di chimera costituita da procarioti con differenti specializzazioni morfo-funzionali.

Un'inequivocabile serie di documentazioni ultrastrutturali, molecolari e biochimiche ha infatti fornito prove sostanziali del fatto che i mitocondri, i cloroplasti e probabilmente altri organuli cellulari sono derivati da antichi simbionti batterici.

L'affascinante storia delle interazioni tra procarioti ed eucarioti non si è naturalmente esaurita, in quanto tali modelli associativi possono essere individuati in quasi tutti i maggiori gruppi sistematici.

Tra gli artropodi, gli insetti rappresentano una delle forme di vita di maggiore successo e ciò è in parte attribuibile all'associazione con microrganismi simbionti che rivestono un ruolo importante nel loro metabolismo. Tuttavia, le interazioni simbiotiche assumono un'importanza del tutto particolare quando il procariote è presente all'interno della cellula ospite. Per questo particolare tipo di simbiosi, per cui è stato coniato il termine di "endocitobiosi", il procariote non rappresenta solo una forma di supplemento nutrizionale ma costituisce, per l'ospite, una sorta di integrazione genomica quasi fosse un organulo supplementare. Le particolari

cellule che contengono i procarioti simbiotici possono essere in tal modo considerate supercellule provviste di un'estensione del contenuto genomico che, in questo caso, comprenderebbe anche quello del procariote simbiotico che verrebbe ad essere geneticamente integrato con il DNA ospite in maniera non molto diversa rispetto a quella dei normali organuli cellulari dotati di DNA proprio (mitocondri e cloroplasti).

Endocitobiosi negli insetti

La simbiosi endocellulare è particolarmente diffusa negli insetti dove circa il 10% delle specie esaminate ospita batteri all'interno di particolari cellule e/o organi (Douglas, 1989).

Il gruppo di ricerca di Pavia si applica da anni allo studio dell'endocitobiosi utilizzando come modelli i Blattaria e gli Isoptera (scarafaggi e termiti). La presenza di simbiotici batterici in questi due gruppi di insetti era già nota agli inizi del ventesimo secolo (per una rassegna sull'argomento vedi Buchner, 1965). Tuttavia, le numerose ricerche condotte in questo settore non avevano portato a sostanziali sviluppi della conoscenza sino agli anni ottanta. La condivisione di competenze altamente specializzate nel campo degli studi ultrastrutturali e della biologia molecolare ha consentito al gruppo di ricerca di Pavia di portare importanti contributi alla conoscenza del rapporto interattivo tra il procariote simbiotico e l'organismo ospite. Le metodiche molecolari hanno permesso di amplificare e di sequenziare i 16S rDNA dei batteri simbiotici delle blatte e della termite primitiva *Mastotermes darwiniensis*. È stato in tal modo possibile attribuire tali simbiotici al gruppo flavobacteria-bacteroides risolvendo l'annoso problema della loro identificazione sistematica. Infatti, i metodi tradizionali della microbiologia non sono applicabili ai batteri simbiotici, in quanto essi non possono essere coltivati in nessun terreno sintetico (Bandi *et al.*, 1994; 1995). Gli studi ultrastrutturali, che si sono avvalsi delle metodiche della microscopia elettronica a trasmissione a scansione, nonché delle tecniche del "freeze-fracturing" e del "deep-etching", hanno per-

messo di ricostruire, per intero, il ciclo batterico nell'insetto ospite.

Il processo di integrazione tra il procariote simbiotico e la cellula ospite porta alla formazione di un'unità morfo-funzionale inscindibile, il batteriocita, presente nel corpo grasso e nell'ovario delle blatte e di *Mastotermes darwiniensis* (Sacchi *et al.*, 2000). In questa cellula i procarioti simbiotici sono contenuti all'interno di un compartimento citoplasmatico limitato da una membrana di endocitosi e formano un'entità morfo-funzionale nota con il nome di simbiosoma (Fig. 1).

L'origine embrionale del batteriocita ha da sempre richiamato l'interesse di numerosi ricercatori. Nel passato, erano state avanzate diverse ipotesi che indicavano nelle cellule dell'intestino medio i precursori del batteriocita (Buchner, 1965; Lanham, 1968). Le indagini ultrastrutturali condotte dal gruppo di Pavia hanno invece dimostrato che il batteriocita ha origine da cellule mesodermiche della linea ematica, i plasmatociti (Sacchi *et al.*, 1989). Tali cellule assumono per fagocitosi i batteri simbiotici che fuoriescono dall'endoderma che delimita l'intestino embrionale (Fig. 2).

Questo incontro dà origine ad un processo interattivo tra il procariote e la cellula ospite, che può essere così sintetizzato: 1) il plasmatocita svolge la sua funzione di cellula deputata alla difesa inglobando i batteri in un vacuolo di fagocitosi; 2) i simbiotici presenti all'interno del fagosoma inibiscono il processo di citolisi ed iniziano a dividersi; 3) il plasmatocita va incontro ad una complessa serie di modifiche morfo-funzionali che comportano la perdita della forma ameboide, l'aumento del grado di ploidia e del volume cellulare e l'assunzione della forma sferica; 4) vi è incremento numerico della popolazione batterica che, però, non procede esponenzialmente ma è sotto il controllo del batteriocita; 5) il batteriocita neoformato instaura rapporti interattivi con gli altri due morfotipi cellulari del corpo grasso (il trofocita e la cellula ad urati o urocita) (Sacchi *et al.*, 1996). L'interazione metabolica tra il procariote e la cellula ospite è documentata da una serie di immagini ultrastrutturali che mettono in evidenza la presenza di vescicole di endocitosi nella membrana vacuolare e di

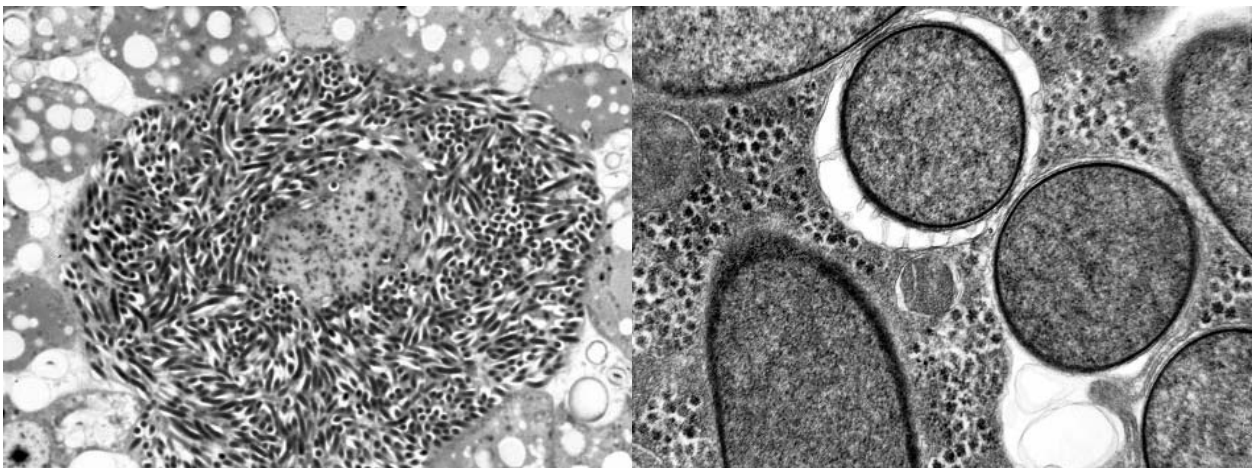


Fig.1. Batteriocita di blatta (*a sinistra*) con in evidenza l'ultrastruttura del simbiosoma (*a destra*).

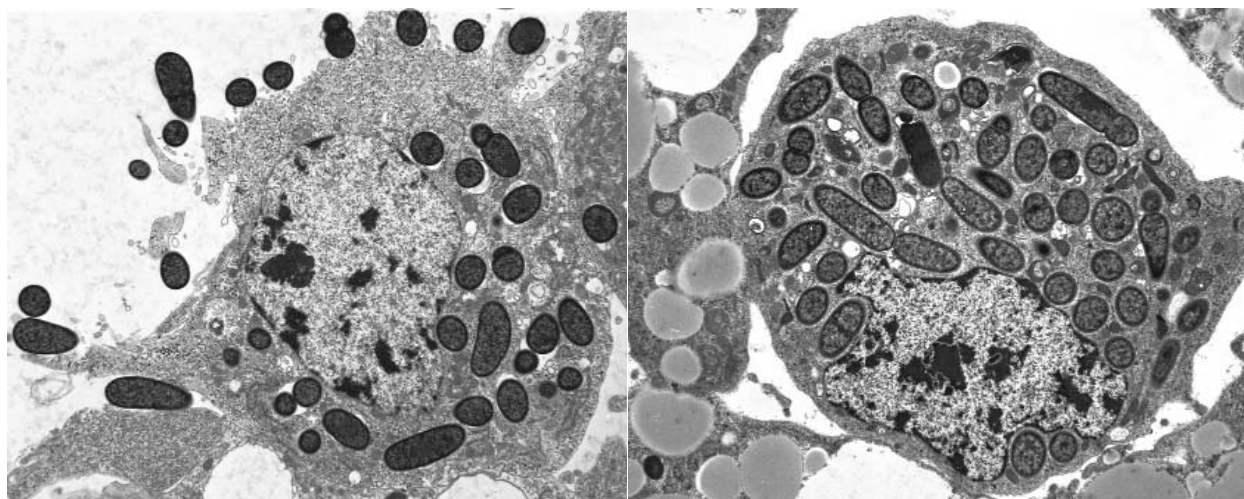


Fig. 2. Fasi progressive della formazione del batteriocita nell'embrione di blatta.

aggregazioni di IMPs (*intra membrane particles*) sulla faccia esterna della membrana vacuolare stessa (Bigliardi *et al.*, 1989; 1991). La membrana che circonda il batterio simbiote ha quindi la funzione di provvedere agli scambi con il citoplasma della cellula ospite. Inoltre, l'interscambio metabolico con le altre cellule del corpo grasso e, in particolare, con le cellule ad urati è documentato dalla presenza di canali di giunzione intercellulari (*gap junctions*) particolarmente evidenti nelle immagini ultrastrutturali ottenute con il metodo del "freeze-etching". Questo fornisce la prova che i batteri simbiotici utilizzano i cataboliti azotati accumulati negli urociti, fornendo in tal modo un supplemento nutrizionale additivo all'organismo ospite. L'equilibrio morfo-funzionale tra il simbiosoma ed il batteriocita può essere interrotto utilizzando antibiotici ad attività batteriostatica. Il blocco dell'attività metabolica del simbiote, indotto dal farmaco, fa sì che i batteri non siano più in grado di inibire il processo di citolisi all'interno del fagosoma. In tal modo nel citoplasma del batteriocita si osservano solo batteri in fase degenerativa con evidenti processi di vacuolizzazione, rimaneggiamento delle membrane e presenza di formazioni mieliniche. Probabilmente il simbiote, nel suo stato di integrità morfo-funzionale, è in grado di produrre lipopolisaccaridi e/o proteine che alterano la struttura biochimica della membrana del vacuolo di endocitosi impedendone la fusione con il lisosoma secondario. Un meccanismo simile è stato descritto per i batteri simbiotici di *Amoeba proteus* (Kim and Jeon, 1994).

Le relazioni obbligate ed il lungo processo coevolutivo che legano il simbiote all'ospite hanno richiesto la messa a punto di raffinati meccanismi di trasmissione ereditaria che in parte assomigliano a quelli che operano nel trasferimento, per via materna, dei mitocondri. Infatti, i batteri simbiotici passano alla progenie per via transovarica e sono coinvolti negli eventi ontogenetici. Anche in questo campo il gruppo di Pavia ha contribuito a chiarire le fasi essenziali del ciclo batterico e, ancora una volta, il contributo dell'analisi ultrastrutturale è

stato determinante. Gli eventi coinvolti nella trasmissione dei simbiotici sono numerosi e complessi e, in questa sede, possono essere trattati solo per sommi capi. Gli ovari embrionali delle blatte sono colonizzati da batteriociti che migrano dal corpo grasso e si portano al loro interno. Da queste cellule, gruppi di batteri vengono espulsi per esocitosi e vanno a localizzarsi nell'interfaccia tra le cellule follicolari e la cellula uovo, dove appaiono avvolti in una rete di microvilli (Fig. 3a). Alla fine della fase vitellogena, la rete microvillare scompare ed i simbiotici vengono attivamente fagocitati dalla membrana dell'uovo (Fig. 3b).

Da questo momento in poi, i batteri simbiotici sono integrati nei processi di embriogenesi e con il procedere dello sviluppo dell'embrione si possono osservare: 1) la migrazione centripeta dei batteri e la successiva formazione di un involucro sinciziale (micetoma primario) attorno alla massa batterica che si localizza al centro del tuorlo; 2) la liberazione dei simbiotici nel seno epineurale; 3) il contatto interattivo con i plasmaciti che culmina con la formazione del batteriocita.

Da ultimo, va sottolineato che la dimostrazione dell'appartenenza dei simbiotici delle blatte e di *M. darwiniensis* allo stesso gruppo flavobacteria-bacteroides e la presenza di una sostanziale identità del quadro ultrastrutturale nei due modelli, sia a livello dei batteriociti che degli ovari, hanno portato un contributo importante alla ricostruzione della storia evolutiva degli Isoptera-Blattaria. E' infatti possibile ipotizzare che i due gruppi sistematici abbiano ereditato i simbiotici da un progenitore comune vissuto nel Mesozoico. Nel corso dell'evoluzione, i simbiotici si sono conservati nei Blattaria, mentre negli Isoptera sono rimasti solo nella termite primitiva australiana *M. darwiniensis*. A ulteriore sostegno dell'esistenza del legame filogenetico che unisce i due ordini, va ricordato che la blatta lignivora semisociale *Cryptocercus punctulatus*, oltre a possedere i simbiotici endocellulari tipici delle blatte, condivide gli stessi simbiotici intestinali delle termiti (Sacchi *et al.*, 1998).

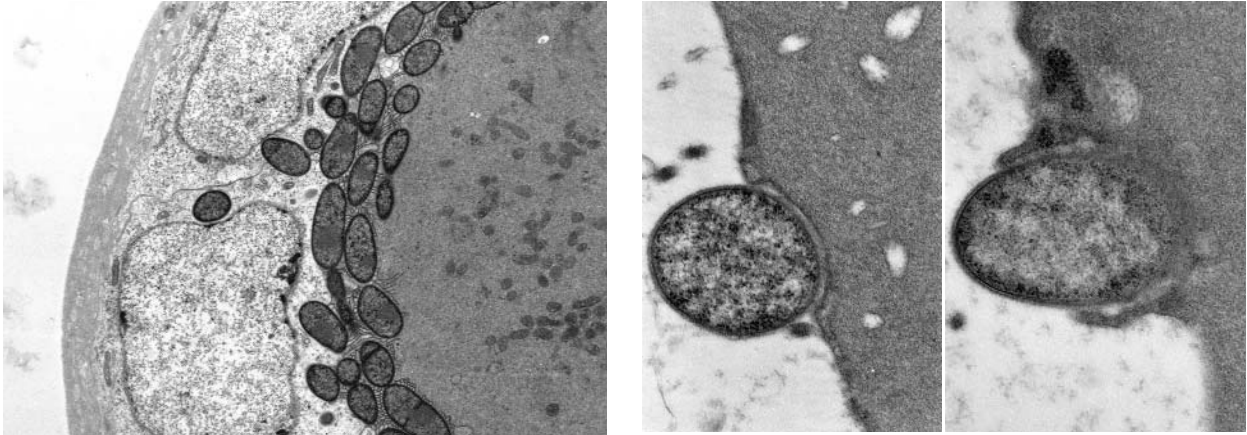


Fig. 3. (a) Oocito di blatta con i batteri simbiotici da parte della membrana dell'uovo.
(b) Fasi successive della fagocitosi dei batteri nell'interfaccia tra le cellule follicolari e l'uovo.

Endocitobiosi nelle zecche

La letteratura è ricca di dati sulla notevole varietà di microrganismi che vivono in simbiosi (*sensu lato*) con le zecche e che rivestono una notevole importanza soprattutto da un punto di vista patogeno. In questo settore è quasi sempre assai complicato fare chiarezza non solo sul tipo di rapporto intercorrente tra il procarionte simbiote e l'ospite, ma è anche poco agevole distinguere i microrganismi presenti nelle zecche per antica associazione e trasmessi per via transovarica, da quelli di recente acquisizione che vengono invece assunti e trasmessi con il pasto ematico.

A rendere il quadro più complesso ha contribuito la recente scoperta di un nuovo batterio in esemplari di *Ixodes ricinus* analizzati dal gruppo di Milano per la presenza di *Borrelia burgdorferi*. Mediante amplificazione e sequenziamento dei 16S rDNA, è stato possibile assegnare tale batterio al gruppo degli alfa-proteobatteri e ad esso è stata attribuita la denominazione IricES1 (Beninati *et al.*, in stampa). Su tale microrganismo sono state condotte osservazioni ultrastrutturali che, sorprendentemente, hanno messo in evidenza come esso viva e

si riproduca all'interno dei mitocondri presenti nell'ovario di *Ixodes ricinus* (Fig. 4) (Sacchi *et al.*, 2004).

Le particolari modalità d'infezione di tale batterio e la sua capacità di utilizzare il mitocondrio per i propri fini metabolici e riproduttivi ci consentono di individuare una notevole somiglianza con *Bdellovibrio bacteriovorus*. Come è noto, tale batterio predatore è in grado di penetrare nello spazio periplasmico (spazio compreso tra la parete cellulare e la membrana plasmatica) di procarionti Gram-negativi che vengono utilizzati come fonte alimentare e nicchia riproduttiva. IricES1 si insinua tra la membrana interna ed esterna dei mitocondri e si moltiplica all'interno dell'organulo consumandone progressivamente la matrice. Questo parallelismo può ispirarci riflessioni su dove la scienza sconfini nella fantasia e dove si possono immaginare scenari con l'antenato di IricES1 intento a nuotare nei mari primordiali, predando i batteri precursori dei mitocondri senza mai interrompere tale comportamento, a tal punto da inseguire le vittime anche all'interno della cellula. Se vogliamo invece uscire dalla fantascienza, questa singolare modalità di comportamento di IricES1 può essere considerata un'ulteriore prova dell'origine batterica dei mitocon-

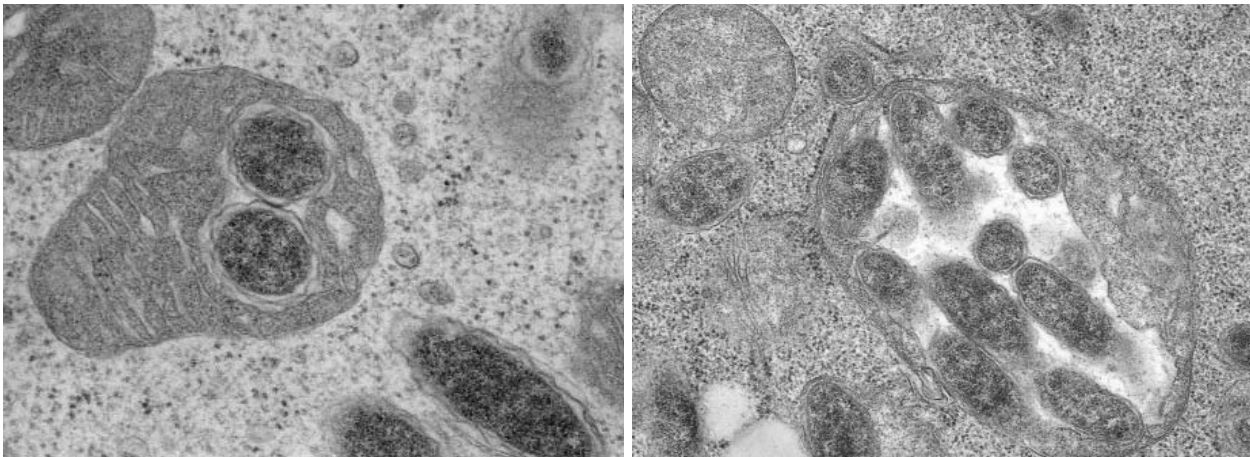


Fig. 4. Oocito di zecca: fasi iniziale (a sinistra) e terminale (a destra) dell'infezione batterica dei mitocondri.

dri. Tuttavia IricES1 appartiene al gruppo delle rickettsie ed è filogeneticamente molto lontano da *Bdellovibrio*. L'analogia del comportamento predatorio di IricES1 verso il mitocondrio e di *Bdellovibrio* verso i Gram-negativi può essere considerato come il risultato di eventi evolutivi paralleli. Per quanto concerne il significato biologico dell'interazione tra questi batteri ed i mitocondri, rimangono aperti numerosi interrogativi. Infatti, si è portati ad attribuire a IricES1 un comportamento da predatore o da parassita se si esamina solamente il suo rapporto con l'organulo parassitato, mentre sorgono difficoltà interpretative se si vuole esaminare la sua funzione nel contesto della cellula uovo dove questi eventi si verificano. È stato infatti osservato che le uova di zecca, anche se possiedono un notevole numero di mitocondri parassitati, riescono comunque a completare il processo maturativo. Inoltre, le analisi molecolari hanno dimostrato che questo batterio è presente nelle totalità delle zecche femmine esaminate. Questo fatto farebbe pensare all'esistenza di un rappor-

te (incompatibilità citoplasmatica, *male killing*, femminizzazione, partenogenesi) esiste un'ampia letteratura (O'Neill, *et al.*, 1997).

Dopo l'identificazione sistematica di *Wolbachia* in *Dirofilaria immitis*, ottenuta con le tecniche molecolari (Sironi *et al.*, 1995), questo batterio è stato individuato in numerose specie di filarie di interesse medico e veterinario. Il gruppo di Pavia si è applicato all'analisi ultrastrutturale di *Brugia pahangi*, *D. immitis* e *D. repens*, mentre l'analisi molecolare, portata avanti contemporaneamente dal gruppo di Milano, ha dimostrato che i simbionti delle filarie hanno probabilmente un'origine filogenetica diversa da quella degli artropodi (Bandi *et al.*, 1998). Nelle filarie *Wolbachia* è presente negli ovari e nelle cellule ipodermiche delle corde laterali. Questi simbionti vengono trasmessi per via transovarica e la loro presenza sembra essere essenziale all'ospite. Infatti, esperimenti condotti con l'impiego di antibiotici, hanno dimostrato che l'azione del farmaco provoca gravi disturbi sulla popolazione batterica che

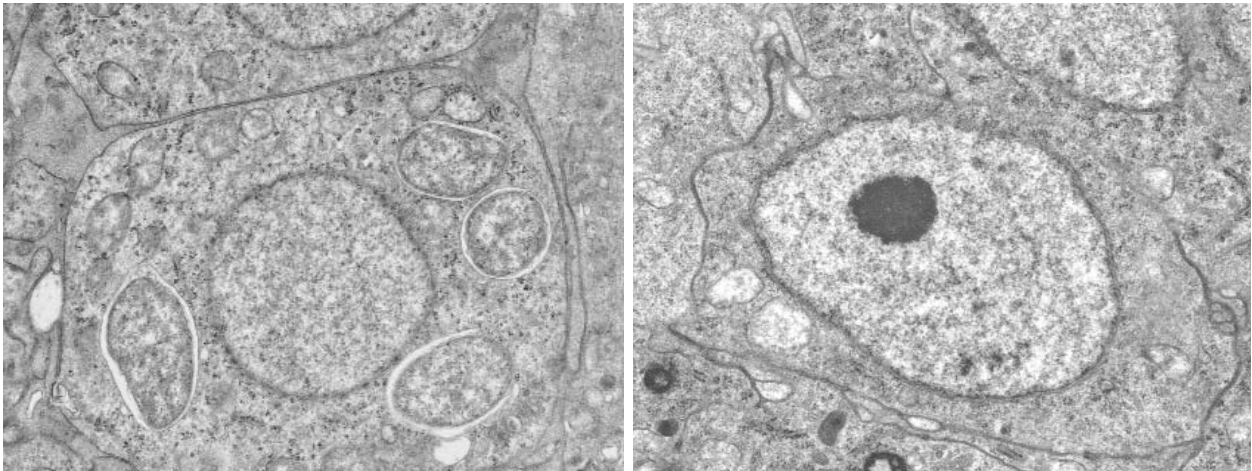


Fig. 5. Oociti di *Brugia pahangi*: si notino batteri normali (a sinistra) e degenerati dopo trattamento antibiotico (a destra).

to interattivo tra la cellula ospite ed il procariote simbiote in grado di garantire la formazione di un equilibrio bilanciato tra la popolazione dei simbionti e quella dei mitocondri. Sul significato biologico di un simile meccanismo è difficile avanzare ipotesi anche perché questo modello, appena scoperto, necessita di ulteriori e più approfonditi studi.

Wolbachia negli insetti e nelle filarie

Noti da tempo negli insetti, i batteri appartenenti al genere *Wolbachia* hanno con l'ospite un rapporto associativo diverso da quello dei veri endocitobionti obbligati. Infatti, questi procarioti non si trovano all'interno di cellule specializzate, ma si possono osservare nel citoplasma di cellule normali presenti in molti organi. Inoltre, all'interno delle cellule ospiti i simbionti non raggiungono i livelli di densità di popolazione che ritroviamo nei batteriociti. Negli insetti, *Wolbachia* viene trasmessa per via transovarica e sul suo coinvolgimento nei processi riproduttivi dell'ospite

presenta quadri degenerativi paragonabili a quelli osservati nei batteriociti e negli ovari delle blatte dopo trattamento con clorotetraciclina (Fig. 5) (Sacchi *et al.*, 2004 in stampa).

L'azione batteriostatica esercitata direttamente sul batterio simbiote provoca importanti ricadute negative in alcuni parametri vitali del filaride ospite, che si evidenziano soprattutto nel blocco dello sviluppo embrionale con conseguente arresto della microfilaremia. Inoltre, vengono compromessi anche i processi di muta larvale (Casiraghi *et al.*, 2002). Questo provverebbe, in modo indiretto, il coinvolgimento dei procarioti simbionti sullo sviluppo del filaride ospite.

Conclusioni

I diversi modelli di associazioni simbiotiche che abbiamo passato in rassegna presentano, a livello morfo-funzionale, punti in comune che prescindono dalla posizione sistematica dell'organismo ospite. Infatti, in tutte le relazioni caratterizzate da uno stretto rapporto a

livello endocellulare tra il procariote ed il simbionte si verificano le seguenti situazioni: 1) il rapporto tra i due contraenti è il risultato di un lungo processo coevolutivo, ed è inscindibile; 2) il metabolismo del procariote simbionte è sotto il controllo della cellula ospite; 3) la fitness dell'ospite è condizionata dalla presenza del simbionte; 4) i simbionti sono trasmessi per via transovarica e sono integrati nei processi di embriogenesi dell'ospite; 5) i simbionti si comportano in modo simile agli organuli cellulari provvisti di DNA.

Un ultimo ma importante argomento merita di essere sottolineato. Lo studio dei rapporti endocitobiotici ci avvicina alla comprensione di uno dei più affascinanti eventi biologici: l'integrazione funzionale ed ereditaria di due diversi patrimoni genetici (quello del procariote e quello della cellula ospite) in un'unica entità morfofunzionale. La condivisione dei patrimoni genetici di più procarioti ha consentito il verificarsi di un evento evolutivo, la nascita della cellula eucariotica, impossibile da spiegare sulla base dei tradizionali meccanismi neodarwiniani. Nel presente, la condivisione in un'unica entità cellulare di patrimoni genetici di diversa origine può costituire la premessa di nuovi e straordinari eventi evolutivi.

Riferimenti bibliografici

- Bandi C, Damiani G, Magrassi L, Grigolo A, Fani R, Sacchi L (1994). Flavobacteria as intracellular symbionts in cockroaches. *Proc R Soc Lond B* 257: 43-48.
- Bandi C, Sironi M, Damiani G, Magrassi L, Nalepa CA, Laudani U, Sacchi L (1995). The establishment of intracellular symbiosis in an ancestor of cockroaches and termites. *Proc R Soc Lond B* 259: 293-299.
- Bandi C, Anderson TJC, Genchi C, Blaxter M (1998). Phylogeny of *Wolbachia* in filarial nematodes. *Proc R Soc Lond B* 265: 2407-2413.
- Beninati T, Lo N, Sacchi L, Bandi C, Noda H, Genchi C. A novel alpha-proteobacterium invades the mitochondria of ovarian cells of the tick *Ixodes ricinus*. *Appl Environ Microbiol* (in stampa)
- Bigliardi E, Selmi MG, Baccetti B, Sacchi L, Grigolo A, Laudani U (1989). Membrane systems in endocytosis. I Specializations of the vacuolar membrane in bacteriocytes of *Blattella germanica* L. (Dictyoptera: Blattellidae). *J Ultrastruc Mol Struc Res* 102: 66-70.
- Bigliardi E, Sacchi L, Selmi MG (1991). Membrane systems in endocytosis. II. Ultrastructural features of the vacuolar membrane in bacteriocytes of *Blaberus craniifer* (Dictyoptera: Blaberidae). *Boll Zool* 8: 103-106.
- Buchner P (1965). *Endosymbiosis of Animal with Plant Microorganisms*. Interscience Publ, New York.
- Casiraghi M, McCall JW, Simoncini L, Kramer LH, Sacchi L, Genchi C, Werren JH, Bandi C (2002). Tetracycline treatment and sex-ratio distortion: a role for *Wolbachia* in the moulting of filarial nematodes? *Int J Parasitol* 32: 1457-1468.
- Douglas AE (1989). Mycetocyte symbiosis in insects. *Biol Rev* 64: 409-434.
- Kim KJ, Na YE, Jeon KW (1994). *Infection and Immunity*: 65-71.
- Lanham UN (1968). The Blochman bodies: hereditary intracellular symbionts of insects. *Biol Rev* 43: 269-286.
- O'Neill SL, Hoffmann AA, Werren JH (1997). *Influential passengers: inherited microorganisms and arthropod reproduction*, Oxford University Press.
- Sacchi L, Bigliardi E, Corona S, Bennati T, Lo N, Franceschi A (2004). A symbiont of the tick *Ixodes ricinus* invades and consumes mitochondria in a mode similar to that of the parasitic bacterium *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Tissue & Cell* 36: 43-53.
- Sacchi L, Corona S, Grigolo A, Laudani U, Gloria MG, Bigliardi E (1996). The fate of endocytobionts of *Blattella germanica* L. (Blattaria: Blattellidae) and *Periplaneta Americana* (Blattaria: Blattidae) during embryo development. *Ital J Zool* 63: 1-11.
- Sacchi L, Corona S, Kramer L, Calvi L, Casiraghi M, Franceschi A. Ultrastructural evidence of the degenerative events occurring during embryogenesis of the filarial nematode *Brugia pahangi* after tetracycline treatment. *Parassitologia* 45: in stampa.
- Sacchi L, De Piceis Polver P, Grigolo A, Bigliardi E, Selmi MG, Baccetti B, Laudani U (1989). Prokaryotic and eukaryotic membrane interactions in endocytosis. I.S.E. 4th International Colloquium on Endocytobiology and Symbiosis (Lyon, 4-8 July 1989). *Endocytobiology* 4: 389-391.
- Sacchi L, Nalepa CA, Bigliardi E, Corona S, Grigolo A, Laudani U, Bandi C (1998). Ultrastructural studies of the fat body and bacterial endosymbionts of *Cryptocercus punctulatus* Scudder (Blattaria: Cryptocercidae). *Symbiosis* 25: 251-269.
- Sacchi L, Nalepa CA, Lenz M, Bandi C, Corona S, Grigolo A, Bigliardi E (2000). Transovarial transmission of symbiotic bacteria in *Mastoteremes darwiniensis* (Isoptera: Mastotermitidae): ultrastructural aspects and phylogenetic implications. *Ann Entomol Soc Amer* 93: 1308-1313.
- Sironi M, Bandi C, Sacchi L, Di Sacco B, Damiani G, Genchi C (1995). Molecular evidence for a close relative of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* in a filarial worm. *Mol Biochem Parasitol* 74: 223-227.