



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

DIPARTIMENTO delle SCIENZE AGRARIE e FORESTALI

Dottorato in gestione fitosanitaria eco-compatibile in ambienti agro- forestali e urbani

CARATTERIZZAZIONE METAGENOMICA di MICRORGANISMI E ORGANISMI DEL TERRENO PER UN LORO UTILIZZO COME AGENTI di LOTTA BIOLOGICA CONTRO NEMATODI FITOPARASSITI

AGR/11 - AGR/12

DOTTORANDA
D.ssa MARIANTONIETTA COLAGIERO

TUTOR
Prof. LEONARDO SCHENA

COORDINATORE DEL DOTTORATO
Prof. STEFANO COLAZZA

Co-TUTOR
Dot. AURELIO CIANCIO

XXIV Ciclo - 2012-2013

DOTTORATO



INDICE

<i>Introduzione</i>	1
---------------------------	---

CAPITOLO I - Contenuti generali

1.1 <i>Generalità sui nematodi fitoparassiti</i>	5
1.2 <i>Lotta biologica contro i nematodi</i>	7
1.3 <i>Obiettivo</i>	11

CAPITOLO II - Analisi della biodiversità microbica nella rizosfera ed effetti indotti da trattamenti nematocidi

2.1 <i>Contenuti generali: Metagenomica</i>	12
2.2 <i>Contenuti generali: analisi bioinformatica</i>	19
2.3 <i>Prova Sperimentale</i>	21
2.4 <i>Materiali e metodi</i>	23
2.5 <i>Risultati e discussione</i>	29

CAPITOLO III - Analisi delle specie batteriche presenti in associazione a nematodi galligeni

3.1 <i>Prova Sperimentale</i>	46
3.2 <i>Materiali e metodi</i>	46
3.3 <i>Risultati e discussione</i>	50

CAPITOLO IV Conclusioni

<i>Conclusioni</i>	64
<i>Bibliografia</i>	67

Introduzione

Introduzione

L'agricoltura biologica, caratterizzata dall'esclusivo utilizzo di fattori di produzione di origine naturale o, se di sintesi, solo se già presenti nell'ambiente, si è sviluppata in Italia con notevole ritardo rispetto agli altri paesi europei. Tuttavia, al suo apprezzabile ma "disordinato" sviluppo negli anni '80 ha fatto seguito, nell'ultimo ventennio, una forte impennata delle superfici. Questa crescita deriva dall'adozione di opportuni riferimenti normativi e riflette una maggiore sensibilizzazione dell'opinione pubblica in materia di qualità e sicurezza degli alimenti e di salvaguardia ambientale.

L'applicazione corretta del metodo dell'agricoltura biologica offre numerosi vantaggi non solo a produttori e consumatori ma anche all'ambiente, in quanto rappresenta di per sé un importante strumento di conservazione della biodiversità. Il principio di base dell'agricoltura biologica consiste infatti nel ricercare le risposte ai problemi della coltivazione delle piante prioritariamente all'interno dell'agroecosistema, piuttosto che ricorrere ad input esterni, che possono essere considerati solo se necessari a ristabilire un corretto equilibrio fra le diverse componenti del ciclo culturale.

Uno dei problemi maggiormente sentiti nel settore biologico è costituito dalla scarsità di mezzi di gestione delle avversità e, in particolare, di prodotti fitosanitari. L'adozione e l'espansione del criterio di coltivazione secondo il metodo biologico anche in agricoltura di tipo convenzionale o in fase di conversione presuppongono, per la difesa delle colture, lo sviluppo di nuovi prodotti e protocolli basati su tecnologie quali l'uso di agenti di controllo biologico, come possibile alternativa all'uso di pesticidi. Occorre, infatti, favorire le condizioni più adatte alla riproduzione e

diffusione dei nemici naturali dei parassiti come possibili alternative all'uso di prodotti di sintesi, ormai al bando in Europa, e peraltro inutilizzabili in un regime biologico.

Per quanto riguarda i parassiti tellurici, la microflora della rizosfera riveste un ruolo principale sia nella difesa che nello sviluppo e crescita delle piante. Infatti, nonostante il gran numero di agenti di controllo biologico identificati ed esaminati negli ultimi decenni e gli sforzi volti a sviluppare protocolli applicativi in pieno campo, le pratiche di controllo biologico richiedono ancora un notevole investimento di studio e ricerca (Kerry, 2000). Data la sua ricchezza in specie microbiche, il terreno sostiene complesse reti trofiche che includono diversi gruppi di nematodi (Ferris *et al.*, 2001; Sleator *et al.*, 2008). Tuttavia, gli effetti di questa complessità sono spesso poco studiati nel loro insieme, dal momento che un numero molto elevato di variabili sono attive nel sistema. Di conseguenza, molti studi sperimentali sono spesso semplificati, concentrando l'attenzione su poche specie microbiche e sui loro ospiti, osservati in condizioni semi-controllate per acquisire conoscenze sulle relazioni esistenti (Gowen e Tzortzakakis, 1994; Sharon *et al.*, 2001; Polesani *et al.*, 2008). In condizioni di pieno campo, spesso diverse dalle condizioni sperimentali di laboratorio o di serra, i microrganismi del terreno interagiscono con le radici, che a loro volta influenzano le reti alimentari sia attraverso il flusso di energia fotosintetica e le pratiche colturali (incluso le rotazioni, le varietà presenti o le diverse tecnologie di gestione della fertilità applicate localmente), sia attraverso gli effetti diretti sulle componenti microbiche del rizopiano, sulla loro biodiversità e attività (Raaijmakers *et al.*, 2009).

Per quanto riguarda alcuni parassiti d'importanza agronomica, tra cui i nematodi galligeni (*Meloidogyne* spp.), le conoscenze di base

sulla biologia, comportamento e biochimica sono da considerarsi a tutt'oggi avanzate, anche grazie al sequenziamento del genoma di alcune specie (Abad *et al.*, 2008). La disponibilità di dati sugli effetti dei microrganismi presenti nella rizosfera e associati a tali nematodi sono invece ancora di ridotta entità e in parte di difficile reperimento.

I nematodi galligeni sono spesso causa d'ingenti perdite di produzione, in particolare in agroecosistemi intensivi come le produzioni ortive mediterranee (Sasser, 1980; 1989). Essi danneggiano le piante sia direttamente, attraverso le alterazioni istologiche indotte nelle radici e l'assimilazione di nutrienti, che indirettamente, alterando la funzionalità radicale e facilitando l'insediamento di altri microrganismi patogeni. Il controllo biologico dei nematodi fitoparassiti e, in generale, delle specie galligene di maggior impatto agrario, ha visto negli ultimi anni un accresciuto interesse grazie agli studi su alcuni agenti di biocontrollo con diverso grado di specificità (Chen *et al.*, 1996; Kerry, 2000; Viaene e Abawi, 2000; Talavera *et al.*, 2002; Jaffee, 2003; Bokhari, 2009).

Sulla base di questa prospettiva, l'obiettivo di questo lavoro è stato quello di valutare ed identificare, attraverso un approccio il più ampio possibile, il grado di biodiversità e le interazioni esistenti in un sistema rappresentato da *Meloidogyne incognita*, pianta ospite e batteri presenti nel terreno. In particolare, sono stati studiati i cambiamenti indotti sulla microflora batterica di un terreno proveniente da un'azienda biologica, conseguenti all'introduzione di nematodi e ad un trattamento chimico, con il fine ultimo di mettere a disposizione un insieme di informazioni e conoscenze suscettibili di sviluppo applicativo e/o industriale per la lotta biologica.

La biodiversità del suolo riveste un ruolo ecologico fondamentale garantendo la conservazione della capacità di autoregolazione degli

ecosistemi. Di conseguenza, conoscere la struttura delle diverse componenti microbiche e le interazioni fra gli organismi che costituiscono l'ecosistema tellurico ci permette di acquisire conoscenze utili per mettere in atto una corretta gestione dell'ambiente radicale.

Fino a pochi anni fa, gli studi sulla biodiversità delle specie batteriche presenti in un determinato ambiente e sul loro metabolismo erano basati sulla presunzione che esse potessero essere quasi tutte isolate e coltivate su substrati artificiali. Anche se queste tecniche tradizionali hanno permesso (e permettono tuttora) uno studio molto dettagliato della specie isolata, è noto da tempo che la visualizzazione di un campione ambientale mediante tecniche di colorazione e microscopia rivela che la quantità di batteri presenti è di alcuni ordini di grandezza superiore rispetto a quella misurata con tecniche tradizionali di coltura in laboratorio. Questo significa che solo una ridotta frazione degli organismi presenti in un ecosistema può essere studiata mediante le tecniche tradizionali (Pace *et al.*, 1986). Il suolo, infatti, nasconde un numero straordinario di forme di vita, una complessa rete di interazioni che coinvolge un'enorme quantità di biomassa vivente (Bloem e Breure, 2003; Nannipieri *et al.*, 2003). Pochi grammi di terreno possono contenere miliardi di batteri, chilometri di ife fungine, decine di migliaia di protozoi, migliaia di nematodi, alcune centinaia di insetti, aracnidi, vermi e metri di radici (Metting, 1993).

L'avvento della biologia molecolare ha portato ad un cambiamento significativo nell'approccio utilizzato per lo studio della struttura e dinamica di una comunità di organismi, consentendo una valutazione diretta della diversità dei gruppi e fornendo una serie di dati rilevanti per misurare e modellare i processi biologici. L'approccio metagenomico si basa sull'analisi del DNA microbico estratto

direttamente da campioni ambientali, permettendo la determinazione e comprensione di complessi sistemi microbici. Gli studi di metagenomica hanno rivelato che la maggior parte delle specie microbiche esistenti sul pianeta e i loro comportamenti rappresentano una vasta area d'indagine ancora poco esplorata (Vogel *et al.*, 2009). L'analisi metagenomica, che non necessita dell'isolamento in coltura di singoli isolati microbici, rende più semplice recuperare l'informazione da una o più sequenze genomiche di specie difficili da isolare, permettendo l'identificazione, fra l'altro, di endosimbionti o di diversi antagonisti non coltivabili, il cui ruolo nelle pratiche agricole odierne è ancora largamente sottovalutato.

Oltre agli aspetti ecologici, l'utilizzo dei prodotti che possono derivare da tali conoscenze è da considerarsi come un fattore di sviluppo anche economico, ma il loro sfruttamento dipende anche dai costi di produzione contenuti, dall'efficacia d'uso e dall'innocuità nei confronti dell'uomo e dell'ambiente. Una possibile identificazione di antagonisti con spiccate capacità di biocontrollo comporta sicuramente dei vantaggi non solo economici, ma anche ambientali, grazie alla riduzione dell'impatto dei trattamenti nematocidi, garantendo maggiore sicurezza per gli operatori e per i consumatori e raggiungendo gli obiettivi principali della conduzione biologica. La catalogazione ed analisi dei genomi microbici di un terreno è pertanto la base scientificamente più avanzata per poterne oggi studiare le funzioni nel terreno e sfruttarne le potenzialità applicative.

La conoscenza di queste interazioni può avere ricadute importanti nello sviluppo di modelli di agricoltura sostenibile e nella messa a punto di strategie di lotta biologica. Altre potenzialità includono la biofertilizzazione, il biorisanamento e, in generale, la valorizzazione delle produzioni ottenibili.

CAPITOLO I

Contenuti generali

1.1 Genealogia sui nematodi fitoparassiti

I nematodi fitoparassiti sono presenti in tutte le regioni agricole del mondo e provocano danni rilevanti su numerose colture. Fra i più importanti nematodi d'importanza economica si possono considerare i generi *Meloidogyne* e *Globodera*.

Il genere *Meloidogyne* (root-knot nematodes o nematodi galligeni), è ampiamente polifago. Le specie appartenenti a questo gruppo sono endoparassite obbligate e sono state rinvenute su più di 3000 specie vegetali. Tra le più comuni, *Meloidogyne incognita* rappresenta un serio problema fitosanitario specialmente per le colture ortive, su cui provoca considerevoli perdite di produzione e severi danni economici (Eisenback *et al.*, 1981). I nematodi del genere *Meloidogyne* provocano delle gravi alterazioni istologiche sulla radice, visibili ad occhio nudo come galle. L'attacco causa una riduzione del volume e dell'efficienza del sistema radicale, un minore assorbimento e trasporto di acqua e nutrienti e, conseguentemente, una crescita ridotta della parte aerea della pianta, con perdita di produzione anche considerevoli.

Il ciclo biologico di *M. incognita* inizia con la deposizione delle uova. La femmina può produrre uova fertili dopo l'accoppiamento con il maschio o, in mancanza di questo, per partenogenesi o produzione autonoma di spermatozoi. Ciascuna femmina depone fino ad oltre 500 uova, avvolte da una matrice gelatinosa protettiva che essa stessa produce (Fig. 1). Lo sviluppo del nematode avviene attraverso quattro stadi larvali, separati l'uno dall'altro da altrettante mute. La larva di primo stadio si sviluppa all'interno dell'uovo e, dopo la prima muta, passa a larva di secondo stadio (J2). Quest'ultima fuoriesce dall'uovo e migra nel terreno, dove si muove alla ricerca di una radice. La J2 rappresenta l'unico stadio mobile dell'intero ciclo biologico del

nematode. Quando incontra la radice suscettibile, essa penetra al suo interno (Fig. 1.1a) e, dopo altre due mute, diviene adulta sedentaria (Fig. 1.1b-c).

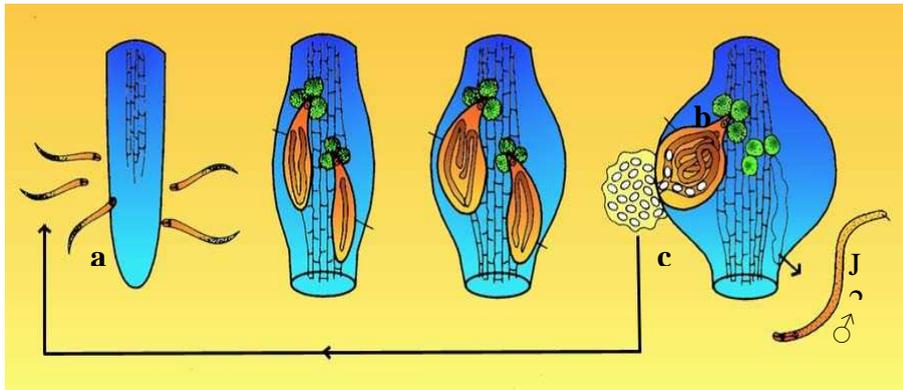


Fig. 1.1 Ciclo biologico di *Meloidogyne incognita*. L'intero ciclo dura circa 25 giorni a 27 - 28 °C.

Le J2 vengono attratte dalle radici, penetrando di solito nelle vicinanze dell'apice radicale. Una volta all'interno del tessuto radicale le larve migrano verso le cellule non differenziate dell'endoderme. Questa migrazione attiva avviene a livello intercellulare, per concludersi in prossimità del tessuto vascolare, dove i parassiti finalmente stabiliscono il sito d'alimentazione (Fig. 1.2A). Quest'ultimo è generalmente costituito da 3-10 cellule, che si trasformano rapidamente in cellule giganti e multinucleate mediante endomitosi, senza divisione cellulare. In questa fase si osservano fenomeni d'ipertrofia. Gli eventi che danno origine a queste cellule specializzate sono determinati dalle secrezioni iniettate dal nematode quando penetra le cellule vegetali con lo stiletto (Hussey, 1998; Jones, 1981; Dubreuil, 2007). Allo stesso tempo, mentre le cellule giganti si differenziano, le cellule vicine del periciclo iniziano a suddividersi, originando un tessuto iperplastico che costituisce la tipica galla, principale sintomo dell'infestazione da nematodi galligeni (Fig. 1.2B).

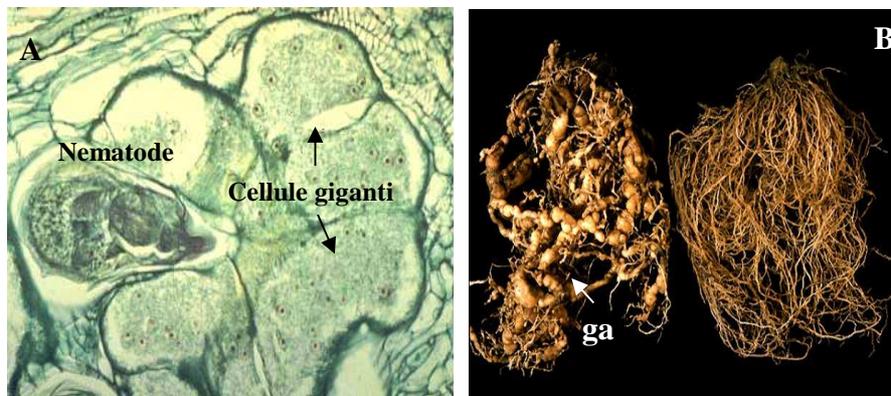


Fig. 1.2 Alterazioni prodotte da *Meloidogyne incognita* in radici di pomodoro. Sezione trasversale della radice, che mostra le cellule giganti che circondano il nematode (A). Radici parassitate con le caratteristiche galle (B, sinistra) e radice sana (B, destra).

1.2 Lotta biologica contro i nematodi

I nematodi fitoparassiti coesistono nel suolo con numerosi antagonisti naturali presenti in tutti i terreni. Essi sono caratterizzati da un diverso grado di specializzazione e includono funghi, oomiceti, batteri, nematodi ed altri invertebrati predatori (Mankau, 1980; Sayre e Starr, 1988; Stirling, 1991; Ciancio, 2008; Ciancio *et al.*, 2009). Numerose sono le specie utili che, se impiegate correttamente, possono risultare efficaci.

L'ambiente tellurico presenta una grande biodiversità microbiologica, stimata sulla base di analisi convenzionali nell'ordine di circa 10^3 specie per g di terreno (Torsvik *et al.*, 1990), ma le nuove indagini molecolari suggeriscono una diversità genetica ancora superiore. Questi microrganismi sono presenti in tutti i terreni e svolgono funzioni fondamentali come la decomposizione ed il riciclo dei nutrienti. Tuttavia, nei terreni non coltivati è spesso possibile

osservare una maggior diversità. Infatti, l'uso indiscriminato di agrofarmaci di sintesi ed in particolare di fumiganti spesso comporta, nei terreni agricoli convenzionali, una riduzione significativa di tutte le specie, incluso quelle utili, sia dal punto di vista della densità che della biodiversità. Diversi antagonisti vengono spesso osservati in natura nello stesso microcosmo e la loro azione può essere esercitata contro uno o più organismi (Ciancio, 2005). Tuttavia, nonostante la moltitudine di nemici naturali, i nematodi fitoparassiti persistono nel terreno, dove risultano spesso in grado di causare danni consistenti alle colture attaccate (Mankau, 1980), in particolare in regime di monocoltura intensiva. Le interazioni nella rizosfera sono caratterizzate da un alto grado di organizzazione complessa che determina anche la stabilità dell'intero microcosmo.

Tra gli antagonisti dei nematodi rientrano principalmente i batteri e i funghi. Molti autori hanno riportato l'importanza dei batteri come agenti di controllo biologico dei nematodi; ad esempio i batteri del genere *Pasteuria* sono antagonisti specifici. Si tratta di alcune specie di Gram-positivi afferenti alle Bacillaceae, specializzate e caratterizzate da endospore infettive e durevoli, dal tipico aspetto a ventosa (Sayre e Starr, 1988; Stirling, 1991; Sturhan *et al.*, 1994). Altri batteri appartenenti al genere *Bacillus* sono stati descritti come possibili strumenti di lotta contro diverse specie di nematodi fitoparassiti (Wei *et al.*, 2003). Altri batteri Gram-negativi sono stati recentemente individuati e mostrano un ciclo parassitario simile a quello di *Pasteuria* spp. Essi sono in grado di aderire alle larve di *Meloidogyne* spp. e di germinare al loro interno dando origine a una fase infettiva che si conclude con la morte dell'ospite.

Questo gruppo di batteri, non coltivabili, è attualmente allo studio. Inoltre, applicazioni di tipo metagenomico hanno mostrato l'esistenza

di una grande biodiversità di specie batteriche associate a nematodi d'importanza agraria, suggerendo che quanto oggi è noto rappresenti solo una frazione delle specie esistenti (Nour *et al.*, 2003). I batteri sono gli organismi più numerosi del suolo, infatti come riportato da Paul e Clark (1996) un grammo di suolo può contenere fino a miliardi di batteri. Gran parte dei batteri del suolo vive nei micropori formati dagli aggregati di particelle di terreno che garantiscono condizioni più favorevoli alla crescita microbica (Ranjard e Richaume, 2001). Essi tendono a vivere in “hotspots” che si distribuiscono in modo casuale, con frequenza crescente man mano che si procede in profondità (Nunan *et al.*, 2002) (Fig. 1.3). Normalmente sono attaccati alle superfici degli aggregati: più piccoli essi sono, maggiore è la diversità microbica e viceversa. Inoltre, le dimensioni delle particelle hanno un impatto sulla diversità e struttura delle comunità microbiche maggiore, rispetto a quanto non facciano pH e sostanza organica (Sessitsch *et al.*, 2001).

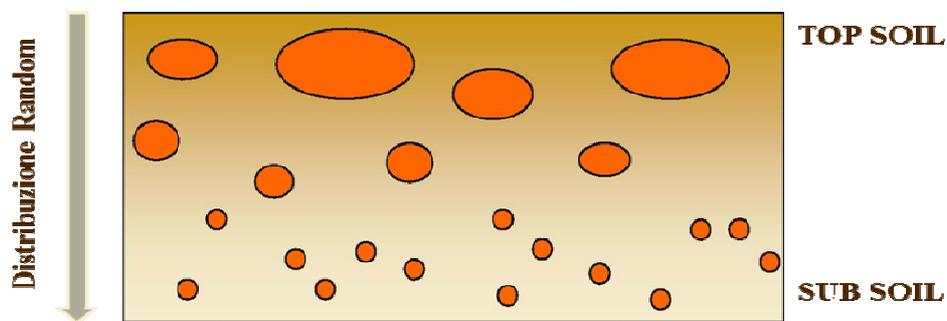


Fig. 1.3 Rappresentazione della distribuzione dei batteri nel suolo.

Nel presente lavoro l'approccio sperimentale per lo studio degli antagonisti dei nematodi è stato basato su osservazioni ed analisi molecolari e microbiologiche, ripetute nel tempo, di diversi campioni, rappresentati da materiale vegetale (radici con o senza infestazioni di *Meloidogyne*) e terreno prelevato nella rizosfera. In particolare, lo

studio si è sviluppato su due direttrici: 1) l'analisi della biodiversità e degli effetti indotti su di essa da trattamenti nematocidi, analizzando la microflora batterica di un terreno proveniente da un'azienda biologica e 2) l'analisi delle specie di batteri presenti in associazione a nematodi galligeni.

Nel primo studio è stato utilizzato un approccio di tipo metagenomico, basato sul *Next Generation Sequencing* (NGS) per lo studio del metagenoma batterico presente. L'RNA totale presente nel terreno è stato amplificato utilizzando primer universali per il gene 16S dei batteri e sequenziato mediante NGS dopo opportuni trattamenti. Sono stati utilizzati campioni provenienti da un esperimento fattoriale (terreno inoculato o non inoculato con *M. incognita* e trattato o non trattato con un nematocida granulare), in due tempi diversi.

Nel secondo caso sono state utilizzate tecniche tradizionali per l'isolamento di batteri da nematodi e per la successiva caratterizzazione sperimentale in serra. Sono stati considerati terreni infestati da nematodi galligeni (*Meloidogyne* spp.) presenti su colture ortive mediterranee presenti in Puglia, sia a conduzione biologica che convenzionale. In particolare, sono stati isolati e analizzati diversi batteri G+ e G- ottenuti da uova, larve o masse d'uova di tre popolazioni di *Meloidogyne* spp., ottenute da radici di piante di pomodoro.

1.3 Obiettivo

L'impossibilità di allevare *in vitro* molte specie microbiche e la mancanza di metodi di identificazione dotati di un'adeguata specificità e sensibilità limitano la comprensione di ecosistemi complessi come il terreno e la rizosfera. Per questa ragione, le specie di microrganismi attualmente note alla comunità scientifica poiché descritte dopo essere state isolate e coltivate in laboratorio non riflettono l'effettiva diversità presente, rendendo il terreno uno degli habitat terrestri più difficili da analizzare. Attraverso l'uso di moderne tecniche metagenomiche per lo studio di comunità microbiche direttamente nel loro ambiente naturale, questo lavoro si prefiggeva di:

1. arricchire le conoscenze sul livello di biodiversità riscontrabile in agroecosistemi con diverso tipo di conduzione (biologica o convenzionale),
2. ampliare le conoscenze in termini di specie, in riferimento alla rizosfera di colture ortive in ambienti mediterranei,
3. produrre dati (sequenze) informativi sulla variabilità genomica per alcuni gruppi di specie di maggior interesse,
4. identificare microrganismi (batteri) associati a nematodi galligeni da cui possano emergere nuovi possibili risultati applicativi.

Capitolo II

*Analisi della biodiversità microbica nella rizosfera ed
effetti indotti da trattamenti nematocidi*

2.1 Contenuti generali: metagenomica

La metagenomica cerca di capire la biologia a livello aggregato, e trascende il singolo organismo per concentrarsi su uno o più geni della comunità al fine di analizzarne il grado di biodiversità o i meccanismi attraverso i quali essi possano influenzare le rispettive attività sulla base delle funzioni collettive. Inoltre, essa riconosce anche la necessità di sviluppare metodi computazionali in grado di facilitare la comprensione della composizione microbica e delle attività di comunità così complesse.

Il sequenziamento del DNA è uno strumento essenziale per la ricerca biologica. L'approccio al sequenziamento, basato sul tradizionale metodo Sanger, unica metodica disponibile fino a qualche anno fa, ha subito un'improvvisa accelerazione negli ultimi anni con lo sviluppo di metodologie di nuova generazione (NGS) le quali, implementando un sistema dotato di maggiore processività per la lettura delle sequenze in parallelo, sono in grado di sequenziare fino a 600 miliardi di basi (gigabasi o GB) con un ciclo di sequenziamento che dura una decina di giorni (contro circa 1.000.000 basi/giorno del metodo Sanger).

Nel 1997 Balasubramanian e Klenerman idearono un approccio per il sequenziamento di singole molecole di DNA legate a microsferi. L'anno successivo fondarono l'impresa Solexa, ma l'obiettivo di sequenziare singole molecole di DNA non fu raggiunto, portando invece allo sviluppo di una metodica basata sull'amplificazione clonale del DNA. A partire dal 2006, la prima piattaforma per il sequenziamento di frammenti corti ("short reads") di DNA (Solexa Genome Analyzer) è stata introdotta sul mercato e, in seguito, acquisita da Illumina (<http://www.illumina.com>).

Parallelamente a questo straordinario sviluppo in termini di produttività vi è stata una drastica riduzione in termini di costi che ha portato il sequenziamento di un Mbase a circa 1 dollaro americano (USD) contro i ~10.000 USD necessari per ottenere lo stesso risultato nel 2000. Conseguentemente, il sequenziamento di grandi genomi è diventato accessibile, determinando una vera e propria rivoluzione nel settore. In particolare, la gestione e l'analisi dei dati hanno determinato la nascita e lo sviluppo della bioinformatica, una disciplina che integra competenze informatiche, statistiche e analitiche nell'ambito della biologia. I sequenziatori di nuova generazione (Illumina, ABI SOLiD e Roche 454) sono diventati gli strumenti d'elezione per analisi approfondite nel campo della biologia e della medicina, e consentono in maniera nuova e più globale una serie di applicazioni, tra cui il sequenziamento dei genomi di interesse comunità microbiche.

La metagenomica è pertanto basata su di una tecnologia che permette di analizzare contemporaneamente uno o più geni di tutti i microrganismi (metagenoma) presenti in un determinato ambiente. Si tratta di un'analisi che si applica a campioni prelevati direttamente dall'ambiente naturale (Turnbaugh *et al.*, 2009). L'impatto di queste nuove metodiche di analisi in studi di biodiversità microbica ha permesso l'accesso ad informazioni enormemente maggiori di quelle ottenibili in precedenza. Rientrano negli studi di tipo metagenomici anche gli approcci NGS basati sul sequenziamento di regioni variabili di RNA ribosomale 16S (rRNA 16S), per studi tassonomici volti ad identificare i generi di batteri presenti in una comunità microbica e la loro abbondanza relativa. Esempi di studi di metagenomica includono analisi di popolazioni microbiche presenti nell'oceano (Huber *et al.*, 2007, Sogin *et al.*, 2006) o nel suolo (Urich *et al.*, 2008), la

caratterizzazione comparativa della microflora presente nella cavità orale umana (Keijser, 2008) o nell'intestino (Turnbaugh *et al.*, 2008).

La caratterizzazione tassonomica e genetica del microbioma del terreno, in funzione di diversi fattori di ordine fitopatologico, rappresenta l'obiettivo primario degli studi di metagenomica svolti durante questo corso di dottorato.

Il gene batterico che codifica per il 16S rappresenta il marker filogenetico generalmente utilizzato negli studi molecolari di biodiversità. La sua struttura di circa 1500 nucleotidi (Fig. 2.1), caratterizzata da sequenze altamente conservate in tutti gli organismi e da sequenze ipervariabili, uniche per gli organismi di una stessa specie, lo rende idoneo per valutare la diversità genetica all'interno di comunità microbiche e per stabilire le relazioni filogenetiche tra i diversi organismi. Le sequenze conservate hanno permesso l'individuazione di primers universali che sono utilizzati nelle reazioni di amplificazione del DNA (Backer *et al.*, 2003). L'amplificazione mediante Polymerase Chain Reaction (PCR) del 16S, o di sue porzioni, il sequenziamento di tutti gli ampliconi ed il loro confronto con le sequenze di microrganismi già classificati e presenti in apposite banche dati, permette la caratterizzazione delle comunità microbiche oggetto di studio.

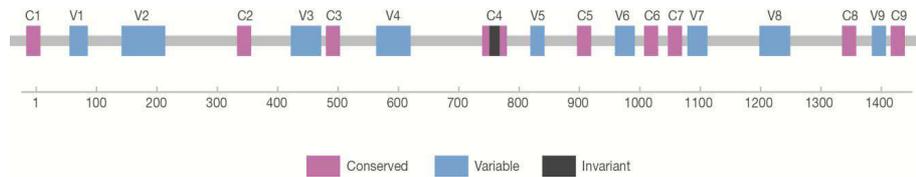


Fig. 2.1 Rappresentazione schematica del gene batterico che codifica per l'rRNA ribosomale (rRNA 16S). Le regioni variabili sono evidenziate in blu, mentre quelle conservate sono evidenziate in rosa. La regione di colore nero è invariata in tutti i batteri.

In questa ricerca il sequenziamento è stato eseguito mediante piattaforma MiSeq System Illumina (www.illumina.com/miseq), che prevede il sequenziamento di entrambe le estremità della regione V4 del 16S (Caporaso *et al.*, 2011). La sequenza ipervariabile di tale regione è sufficiente per la classificazione tassonomica della specie (Liu *et al.*, 2007; 2008; Claesson *et al.* 2010). In tutti i batteri la regione V4 del 16S è costituita da 254 nucleotidi e si discosta solo di poche paia di basi da questa lunghezza. Secondo il protocollo Illumina la regione V4 viene amplificata usando il forward primer 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') ed il reverse primer 806R (5'-GGACTACVSGGGTATCTAAT-3') a cui sono ancorati degli adattatori unici per ogni campione. Il modello di amplificazione è rappresentato nella Fig. 2.2.

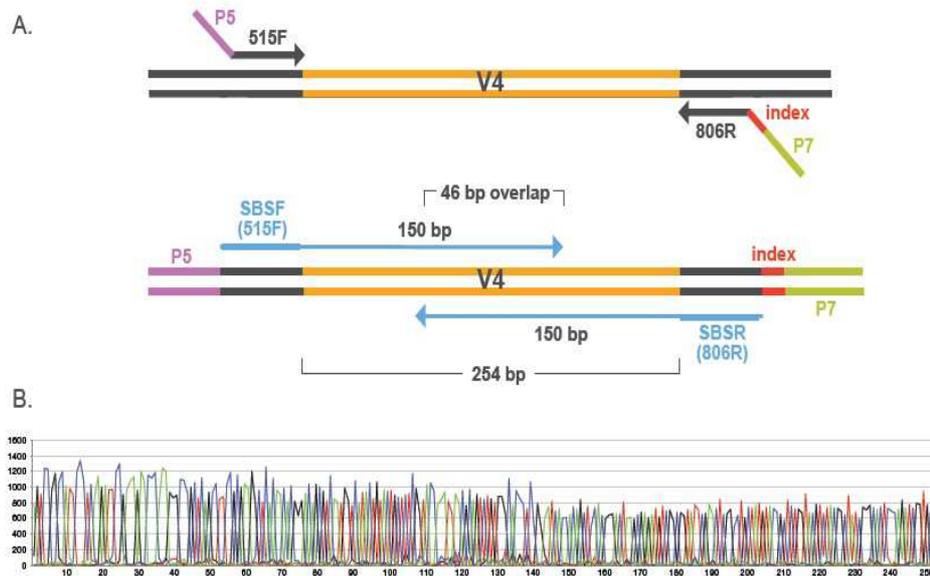


Fig. 2.2 Rappresentazione schematica della regione V4 del 16S ribosomiale batterico. A) Schema di amplificazione. B) Esempio di frammento sequenziato.

Il MySeq System Illumina, come tutte le tecnologie NGS, utilizza una cella a flusso consistente in una “slide” otticamente trasparente costituita, sulla superficie, da 8 compartimenti a cui sono legati degli oligonucleotidi di ancoraggio. Il DNA da sottoporre a sequenziamento, derivante da ciascun campione, viene modificato per l'aggiunta di oligonucleotidi adattatori, i quali sono complementari agli oligonucleotidi ancorati alla cella di flusso. In condizioni di diluizione limite, il DNA a singolo filamento legato agli adattatori è aggiunto alla cella a flusso e immobilizzato mediante ibridazione agli oligonucleotidi di ancoraggio. I frammenti di DNA sono amplificati nella cella a flusso mediante una amplificazione “a ponte” (“bridge amplification”), che si basa sulla cattura dei filamenti di DNA ripiegati ad arco che si ibridano a un oligonucleotide di ancoraggio adiacente. Cicli multipli di amplificazione convertono la singola molecola di DNA stampo in un

“cluster” o fascio di frammenti, amplificati clonalmente, ciascuno composto approssimativamente da 100-200 milioni di ampliconi clonali separati. Il sequenziamento dei filamenti avviene mediante l’ibridazione di un “primer” complementare alla sequenza dell’oligonucleotide adattatore. Successivamente, si ha l’aggiunta di una DNA polimerasi e di una miscela di 4 nucleotidi terminatori “reversibili” marcati con fluorofori differenti. I nucleotidi terminatori sono incorporati in base alla complementarità della sequenza di ciascun filamento, all’interno di ogni fascio clonale. Dopo l’incorporazione del nucleotide appropriato, gli altri reagenti in eccesso vengono rimossi con un lavaggio e la fluorescenza relativa ad ogni “cluster” viene rilevata e registrata. Mediante successivi passaggi, il gruppo di blocco dei nucleotidi terminatori “reversibili” viene rimosso e la marcatura fluorescente viene allontanata tramite un lavaggio, consentendo di effettuare il ciclo successivo di sequenziamento.

Illumina e altre tecnologie NGS hanno elaborato strategie per sequenziare entrambe le estremità delle molecole di DNA stampo. Tale possibilità fornisce informazioni che facilitano l’allineamento e l’assemblaggio specialmente di “short reads” (Korbel *et al.*, 2007; Campbell *et al.*, 2008). Con la piattaforma Illumina l’accuratezza nell’identificazione delle basi (“base calling”) diminuisce con l’aumentare della lunghezza del “read” (Dohm *et al.*, 2008). Questo fenomeno è dovuto principalmente all’aumento di segnali d’interferenza (“dephasing noise”), costituendo un problema tecnico per il processo di sequenziamento. Durante un dato ciclo di sequenziamento, i nucleotidi possono essere incorporati in eccesso o in difetto o la rimozione del blocco può fallire. Con i cicli successivi, questi segnali di errore si accumulano producendo una popolazione eterogenea di filamenti di varia lunghezza all’interno di un “cluster”.

Questa eterogeneità riduce la specificità del segnale e la precisione nel “base calling” oltre una certa lunghezza del fascio. Di seguito è riportata una schematizzazione di sequenziamento NGS secondo la tecnologia Illumina (Fig. 2.3).

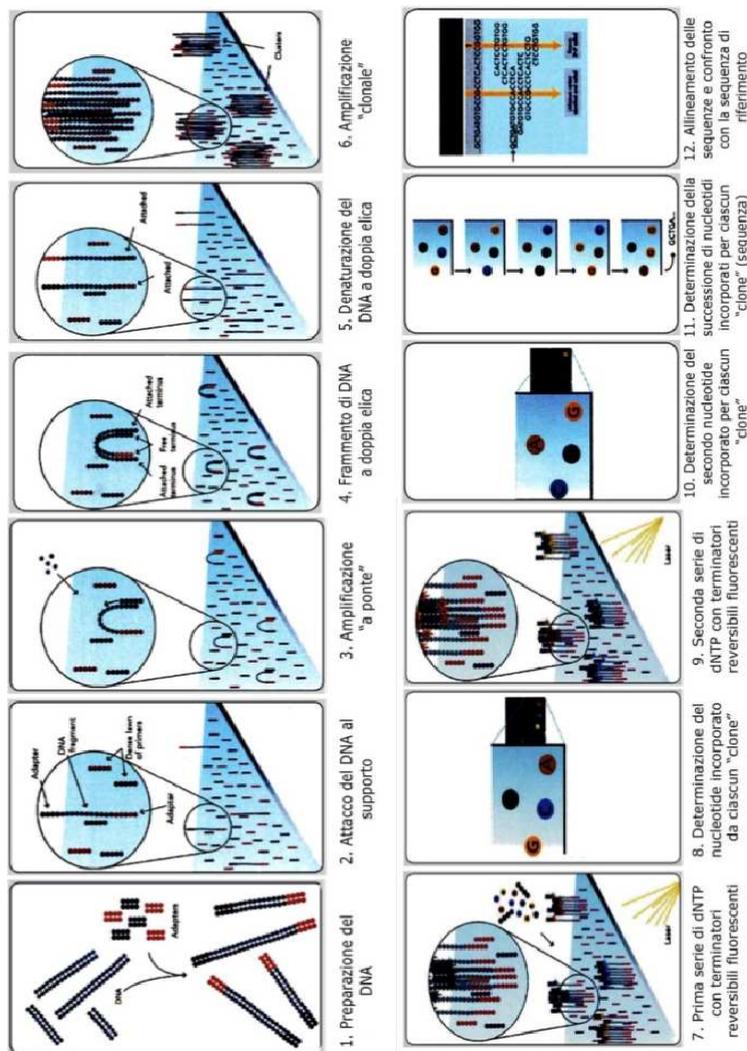


Fig. 2.3 Rappresentazione schematica del sequenziamento mediante piattaforma Illumina.

Nonostante le potenzialità, la tecnica è molto recente e non se ne conoscono ancora limiti e problematiche. Infatti, oltre al rischio che qualche campione venga contaminato, e non sempre è facile rilevarlo, è difficile capire come utilizzare tutti i dati provenienti da un esperimento di questo tipo: il sequenziamento (denominato “*shot-gun*”) produce infatti un numero elevato di sequenze che devono essere riassemblate. Anche quando si riesce a ricostruire il genoma completo di alcuni organismi sconosciuti, non è immediato capire come questo venga trascritto e regolato e se contenga geni di particolare interesse, almeno per quello che è lo stato attuale delle conoscenze. Il problema di sapere come utilizzare grandi quantità di dati è il punto principale di tutta la bioinformatica: anche se entro pochi anni sarà possibile sequenziare il genoma di un individuo in poche ore, le banche dati si riempiranno di dati in maniera esponenziale, per cui sarà necessario elaborare strumenti di analisi complessi, ma allo stesso tempo sufficientemente flessibili e veloci, per sfruttarne al massimo le potenzialità.

2.2 Contenuti generali: analisi bioinformatica

L’era genomica ha assistito ad una crescita esponenziale delle informazioni biologiche rese disponibili dai progressi nel campo della biologia molecolare. In particolare, il sequenziamento del genoma ha dato un forte impulso a quel settore della bioinformatica che si occupa dello studio del DNA e delle proteine. La grande sfida che la comunità scientifica sta ora affrontando consiste nel cercare di analizzare l’enorme quantità di dati prodotta in laboratorio. La bioinformatica è infatti una nuova disciplina che si occupa dello sviluppo e

dell'integrazione delle applicazioni della scienza dell'informazione al servizio della ricerca in campo biotecnologico. Per fare ciò utilizza strumenti informatici per analizzare i dati biologici che descrivono sequenze di geni, composizione e struttura delle proteine, processi biochimici nelle cellule, etc.

Diversi software applicativi, anche *open source*, sono stati elaborati e messi a disposizione in internet. Essi possono essere utilizzati per l'analisi dei dati di sequenziamento derivati dalle tecnologie NGS. In questo studio sono stati utilizzati due software differenti con lo scopo di analizzare i dati ottenuti dal sequenziamento.

Il primo passo nell'analisi ha riguardato la formazione dei "contigs" dai single reads della regione V4 del 16S batterico. A tal fine è stato utilizzato il software PandaSeq Assembler (<https://github.com/neufeld/pandaseq>) seguendo le indicazioni di Masella *et al.* (2012). Poiché la piattaforma Illumina può generare sequenze di ampliconi in un formato paired-end, l'assemblaggio richiede una coincidenza perfetta in corrispondenza della regione di sovrapposizione dei due reads opposti, per produrre un elevato numero di sequenze corrette (Bartram *et al.*, 2011). PandaSeq ha utilizzato come input i dati Illumina in formato FASTA, sovrapponendo i reads per la ricostruzione dell'intera sequenza assemblata (contig). Il montaggio è estremamente veloce e milioni di sequenze paired-end sono state rapidamente assemblate.

Alla formazione dei contigs è stato necessario affiancare un software in grado di elaborare, mediante una serie di moduli, le sequenze assemblate per l'analisi definitiva che avrà come risultato l'identificazione tassonomica, il grado di biodiversità delle specie presenti e la loro distribuzione nei diversi campioni e trattamenti. Per l'analisi di questi dati è stato utilizzato QIIME (<http://qiime.org>).

QIIME è un acronimo per Quantitative Insights Into Microbial Ecology. Si tratta di un pacchetto di software *open source* per il confronto e l'analisi delle comunità microbiche, che può utilizzare dati di sequenziamento generati su una varietà di piattaforme NGS. QIIME guida dall'inizio l'analisi fino all'assegnazione tassonomica e la costruzione di alberi filogenetici delle sequenze rappresentative delle OTU (Operational Taxonomic Units) presenti nel campione (Caporaso *et al.*, 2010). Il software è stato applicato a studi basati su miliardi di sequenze da migliaia di campioni e permette di studiare e valutare sia la diversità alpha che beta. Questi termini sono stati proposti da Whittaker (1960) per indicare la diversità in numero di specie all'interno di un determinato campione (alpha), ovvero la diversità osservata tra i diversi campioni da confrontare (beta).

2.3 Prova sperimentale

Le attività per la caratterizzazione metagenomica dei batteri del terreno in relazione all'infestazione da nematodi galligeni hanno costituito la base dello studio realizzato. A tal fine è stata impostata una prova sperimentale finalizzata anche alla definizione degli effetti indotti dalla presenza di nematodi e dai relativi trattamenti chimici sulla composizione microbica del suolo.

Per allestire la prova è stato necessario campionare diverse aziende agricole presenti in Puglia, per ottenere una quantità di terreno non trattato chimicamente, utile per l'allestimento della sperimentazione in serra. La selezione ha riguardato un'area di circa 20 ettari in provincia di Brindisi, tra i comuni di Mesagne, Torchiarolo e San Pietro Vernotico, coltivata rispettando la tipicità e le tradizioni del territorio e

applicando i principi dell'agricoltura biologica. Sono stati prelevati 30 campioni di terreno controllati per l'assenza di nematodi attraverso analisi nematologiche, miscelati e posti in serra in vasi da 20 cm di diametro, in cui sono state trapiantate piantine di pomodoro cv Tondino.

La prova consiste nelle seguenti tesi:

A) terreno proveniente da un'azienda biologica, non trattato e privo di nematodi del genere *Meloidogyne* (usato come controllo);

B) lo stesso terreno (A) inoculato con nematodi utilizzando la popolazione L4 di *M. incognita*, derivante da una singola massa di uova, originaria di Leverano (LE);

C) lo stesso terreno (A) inoculato con nematodi e trattato con un nematocida granulare, *Nemacur 240 cs*, a base di fenamifos; Il prodotto (registrazione N°11788 del 21 luglio 2004, Ministero della Salute) è utilizzabile per l'impiego in pieno campo e in serra per la difesa di pomodoro, peperone, melanzana, melone, cocomero, zucchino, cetriolo e tabacco. Esso contiene $240 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ di principio attivo in formulazione micro-incapsulata. Per le colture ortive la dose d'impiego è pari a 4.2 litri per 1000 mq.

D) lo stesso terreno (A) senza inoculo di *M. incognita* e trattato con fenamifos.

Ciascuna delle tesi citate ha previsto tre repliche biologiche. La prova è stata allestita in serra in condizioni controllate (26°C e umidità relativa del 40-60%), con due tempi di prelievo dei campioni ($t_1 = 90$ e $t_2 = 180$ giorni) oltre al controllo iniziale (t_0).

2.4 Materiali e metodi

Le J2 della popolazione di *M. incognita* L4 utilizzate per la prova sono state ottenute da piante di pomodoro cv Tondino allevate in terreno sterile e infestate artificialmente. Le radici con le galle sono state poste in beute e aerate con pompa peristaltica, per consentire la schiusura di un numero elevato di uova ed ottenere i nematodi necessari per l'inoculo delle piante delle tesi B e C.

Il conteggio delle J2 è stato effettuato dopo una settimana d'incubazione a 26°C risultando in media di 200 individui · ml⁻¹. Le larve sono state lavate e sterilizzate superficialmente mediante un passaggio in ipoclorito allo 0.5% per 5 minuti e in una soluzione di antibiotici (0.1% streptomina, 0.1% ampicillina, 0.1% cloramfenicolo) per 10 minuti, e quindi lavate in acqua sterile per altri 10 minuti.

Prima di procedere all'inoculo delle piantine, il terreno di ciascun vaso è stato smosso ed è stato effettuato il primo prelievo (t₀). Sono stati prelevati 12 g di terreno da ciascun vaso, congelati in azoto liquido e conservati a -80°C per essere utilizzati nell'estrazione degli acidi nucleici. Si è proceduto quindi al trapianto di giovani piantine di pomodoro cv Tondino. L'inoculazione (tesi B e C) è stata effettuata aggiungendo 5000 nematodi per vaso mediante una pipetta, in 3 punti del terreno intorno alla radice, ad una profondità di circa 10 cm.

Ad un mese dall'inoculazione le piante presentavano radici con galle a conferma dell'avvenuta infestazione. A questo punto le piantine delle tesi C e D sono state sottoposte a due trattamenti chimici ripetuti a distanza di un mese facendo uso di fenamifos. La dose utilizzata per ciascun vaso è stata di 0.13 ml di *Nemacur*, con un contenuto di principio attivo di 0.03 ml.

Ad un mese dall'ultimo trattamento si è proceduto, per ciascuna tesi e ripetizione, al prelievo del secondo campione (t_1) seguendo le indicazioni già descritte per il precedente prelievo. Sono stati inoltre rilevati dati riguardanti l'indice di galle, la lunghezza della pianta, il peso della radice, la densità di uova \cdot g radice⁻¹ ed il numero di J2 \cdot g terreno⁻¹. La prova è proseguita trapiantando in ciascun vaso nuove piantine di pomodoro cv Tondino alla terza foglia ed effettuando, dopo tre mesi, il terzo ed ultimo prelievo (t_2). Di seguito è riportato lo schema sperimentale (Fig. 2.4).

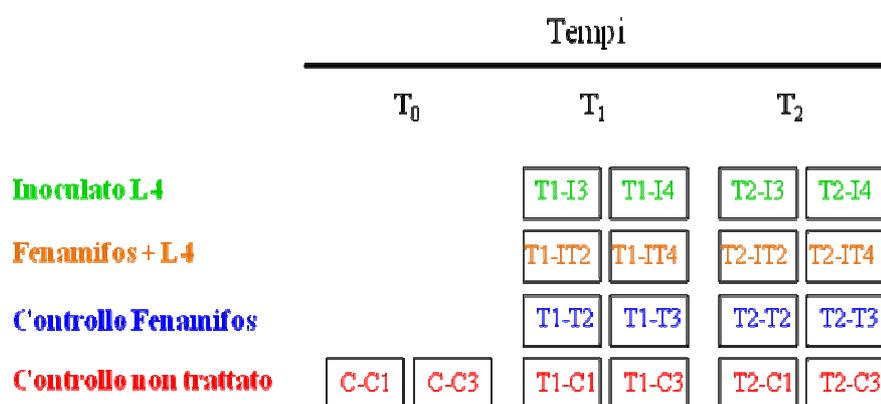


Fig. 2.4 Disegno sperimentale con l'indicazione dei campioni. Trattamenti: C-C1 e C-C3 Controllo non trattato; I3-I4 Inoculato L4; IT2-IT4 inoculato e trattato con fenamifos; T2-T3 trattato con fenamifos.

L'estrazione degli acidi nucleici per il sequenziamento metagenomico è stata effettuata mediante un kit di estrazione (*Power soil total RNA isolation kit*, MoBio, www.mobio.com), su due repliche biologiche per ciascuna tesi. Il kit (Fig. 2.5) è stato progettato per l'utilizzo con tutti i tipi di terreno comune, ma in particolare per i campioni caratterizzati da un alto contenuto di acidi umici.



Fig. 2.5 Il *Power soil total RNA isolation kit* utilizzato per l'estrazione degli acidi nucleici da terreno.

Saggi preliminari hanno mostrato che partendo da 2 g di terreno è possibile ottenere una sufficiente quantità di RNA totale, che viene catturato da una matrice in una colonna per essere successivamente lavato ed eluito. La determinazione della concentrazione di RNA è stata effettuata con lettura con spettrometro Nanodrop™ a 260 nm. Il materiale estratto è stato sottoposto a retrotrascrizione seguendo le indicazioni del protocollo di sequenziamento dettato da Illumina, mediante SuperScript III. Per ciascun campione è stata preparata una reazione di retrotrascrizione, contenente gli RNA, i dNTPs, H₂O e il primer. Il mix, preparato per ciascun campione, è stato inoculato a 65 °C per 5 min allo scopo di denaturare tutte le strutture secondarie dell'RNA e subito posto in ghiaccio per 1 min. Sono stati quindi aggiunti l'enzima con il suo buffer specifico, il DTT (ditiotreitolo) che ottimizza l'azione della trascrittasi inversa, ed un inibitore delle RNAasi (Invitrogen). La reazione è stata condotta per 10 min a 50°C e successivamente a 85°C per 5 min, per inattivare l'enzima, e quindi

trasferita in ghiaccio. Ad ogni campione è stato aggiunto 1 μ l di enzima Rnase H con incubazione a 37°C per 20 min.

Il materiale ottenuto è stato purificato utilizzando il kit di purificazione per prodotto PCR QIAquick PCR Purification Kit. L'integrità del materiale genetico è stata analizzata mediante elettroforesi su gel di agarosio 1.5% (Fig. 2.6). Il cDNA purificato dalla reazione di retrotrascrizione è stato dosato con Nanodrop e quindi inviato a IGA-Tecnology (Udine) per il sequenziamento, secondo lo schema riportato precedentemente.

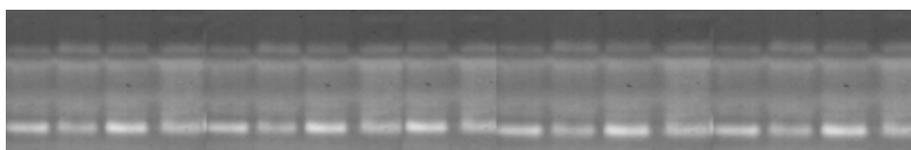


Fig. 2.6 Gel di agarosio (1.5%) del cDNA ottenuto.

Dal sequenziamento sono stati prodotti 36 file di sequenze *single reads*, 2 (un *forward* e un *reverse*) per ciascuno dei 18 campioni, i quali sono stati processati in diverse fasi dell'analisi bionformatica. Il primo passo ha riguardato l'assemblaggio delle sequenze per la formazione dei contig. A tale fine è stato utilizzato PandaSeq che ha permesso di formare delle sequenze qualitativamente valide tenendo conto di alcuni parametri, quali: eliminazione delle sequenze contenenti dei nucleotidi non ben identificati (N), la lunghezza della regione di overlapping ($o = 25$), la lunghezza minima (l) e massima (L) dei contigs. Per ciascun campione è stato ottenuto un unico file di sequenze assemblate che sono state inserite tutte in un unico file formato FASTA. Quest'ultimo ha costituito il primo input con cui si è iniziato il processamento mediante QIIME, nella versione "Virtual box" per PC, un emulatore di Linux in ambiente Windows (Fig. 2.7).

Per avviare l'analisi è stato innanzitutto necessario etichettare tutte le sequenze con l'aggiunta di alcune informazioni riguardanti i diversi campioni, utilizzando uno script di Qiime (*add_qiime_labels.py*) sviluppato per questo scopo e che richiede un file di testo denominato "mapping file" (in formato .txt, TAB delimited) in cui sono riportati i dati da tenere in conto per le analisi (Fig. 2.8). Nel mapping file sono descritti il *SampleID*, le informazioni su *BarcodeSequence* e sul *LinkerPrimerSequence* (che in questo caso non sono presenti in quanto l'analisi preliminare del servizio di sequenziamento provvede ad eliminare tali frammenti). Infine sono presenti anche le informazioni sull'*InputFileName* e una colonna di descrizione (*Description*) dei campioni.

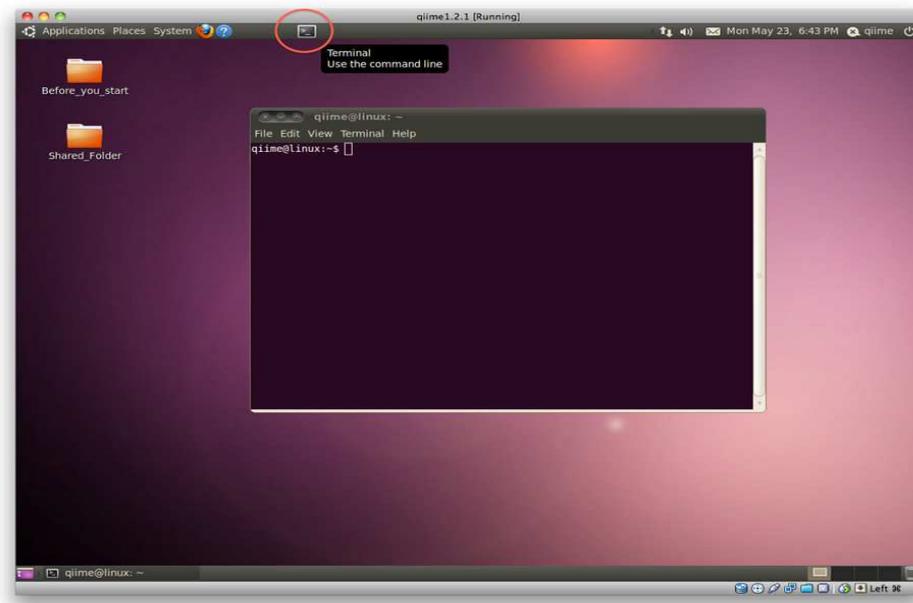


Fig. 2.7 Un'immagine desktop di Qiime Virtual Box.

2.5 Risultati e discussione

Dai 18 campioni analizzati sono stati ottenuti 36 file di sequenziamento per un totale di 13 330 298 *single reads*, ovvero 6 665 149 sequenze qualitativamente valide, con una lunghezza media di 93 paia di basi e con un contenuto medio di basi CG del 56%. Mediante PandaSeq sono state ottenute 284 872 sequenze che sono state sottoposte all'analisi utilizzando QIIME.

Inizialmente il file contenente le sequenze è stato analizzato per determinare l'assegnazione tassonomica a ciascuna di esse. Dall'analisi sono state ottenute 4878 OTU diversamente rappresentate nei vari campioni, visualizzate in una mappa termica interattiva in cui il colore indica la percentuale di OTU presenti. E' stato notato che non tutte le sequenze hanno permesso un'identificazione di pari livello tassonomico per tutti i batteri presenti. Infatti come si può osservare dalla figura (Fig. 2.10), il livello tassonomico varia a seconda dell'informazione ricavata da ciascuna sequenza. Più sequenze possono appartenere allo stesso livello tassonomico, anche se la differenza nella sequenza nucleotidica è tale da descriverli come appartenenti a OTU differenti. Molto probabilmente ciò trova spiegazione nella mancanza d'informazioni relative ai livelli tassonomici inferiori (ad esempio a livello di specie). In totale, considerando tutti i campioni, sono stati rinvenuti 578 generi afferenti a 359 famiglie e 197 ordini con 91 classi e 29 phyla (Tab. 1), distribuiti in maniera differente nei diversi campioni e trattamenti (Tab. 2).

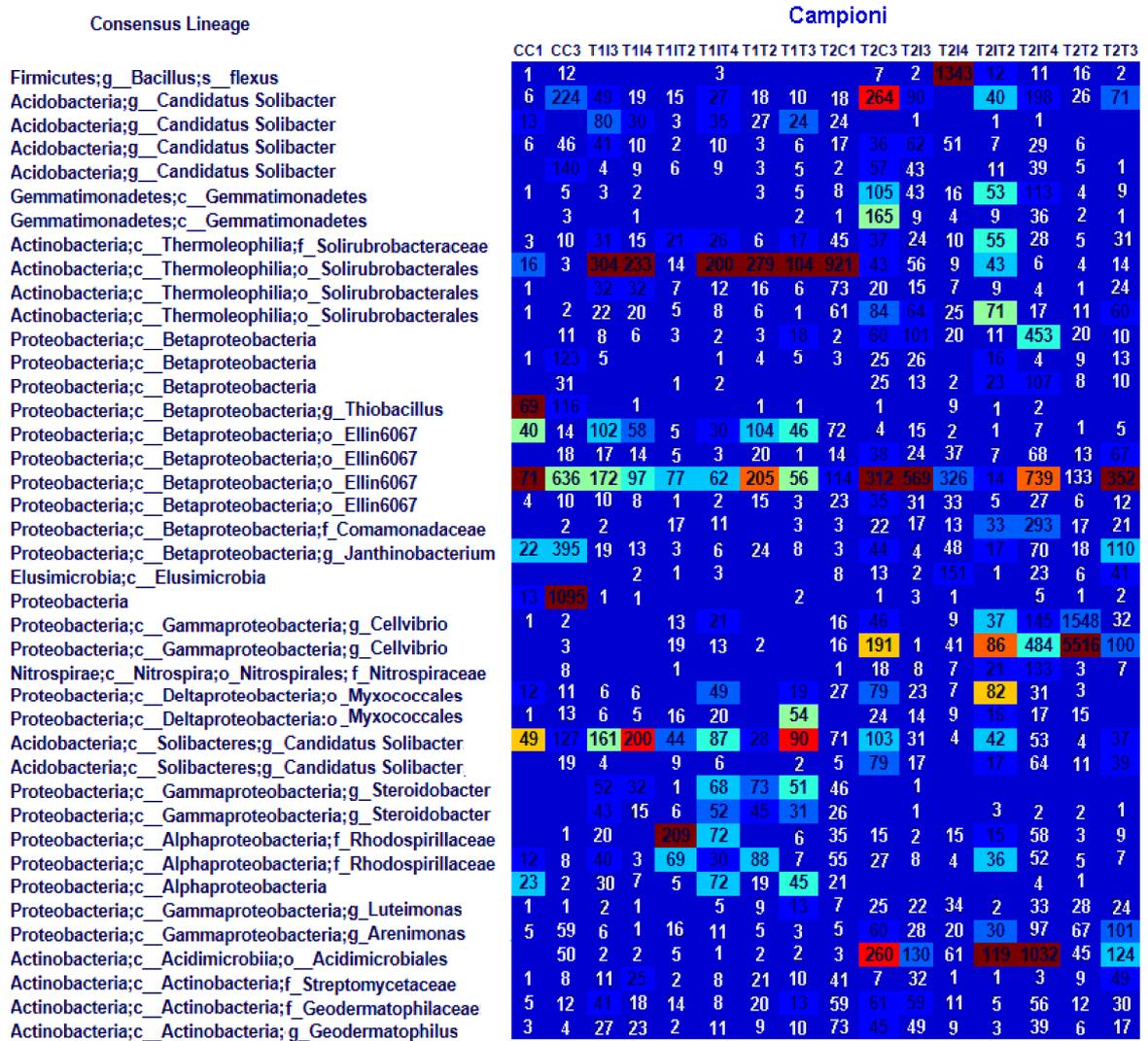


Fig. 2.10 Abbondanza relativa di OTU in ciascun campione. Per ogni colonna, il colore varia dal blu (valore minimo) al rosso intenso (valore massimo), in base al numero di OTU.

Tabella 1: Numerosità dei livelli tassonomici nello studio della biodiversità.

Regno	Phyla	Classi	Ordine	Famiglie	Generi
Unclassified					
Archea	Other				
	<i>Crenarchaeota</i>	2	3	3	4
	<i>Euryarchaeota</i>	2	3	4	4
Bacteria	Other				
	<i>Acidobacteria</i>	12	16	20	21
	<i>Actinobacteria</i>	7	13	57	112
	<i>Armatimonadetes</i>	4	5	9	11
	<i>Bacteroidetes</i>	4	5	18	38
	<i>Chlamydiae</i>	1	1	2	2
	<i>Chlorobi</i>	3	3	3	3
	<i>Chloroflexi</i>	10	26	37	39
	<i>Cyanobacteria</i>	4	4	4	4
	<i>Elusimicrobia</i>	2	6	6	6
	<i>Fibrobacteres</i>	1	2	2	2
	<i>Firmicutes</i>	3	8	21	36
	<i>Fusobacteria</i>	1	1	1	1
	<i>GN02</i>	2	2	2	2
	<i>Gemmatimonadetes</i>	7	13	16	16
	<i>NKB19</i>	2	2	2	2
	<i>Nitrospirae</i>	1	1	3	6
	<i>Planctomycetes</i>	9	15	20	26
	<i>Proteobacteria</i>	7	53	112	223
	<i>TM6</i>	2	2	2	2
	<i>TM7</i>	2	2	2	2
	<i>Thermi</i>	1	2	2	3
	<i>Verrucomicrobia</i>	4	5	10	12
<i>WYO</i>	1	1	1	1	

Tabella 2 Distribuzione dei Phyla identificati, per trattamento e replicazione.

Tempi di campionamento	t ₀		t ₁		t ₂																			
	CC1	CC3	T1C1	T1C3	T2C1	T2C3	T1T2	T1T3	T2T2	T2T3	T1B3	T1B4	T2B3	T2B4	T1B2	T1B4	T2B2	T2B4	T1B2	T1B4	T2B2	T2B4		
Taxonomy	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%		
Unclassified_Other	0.1	0.5	0.1	0.1	0.1	0.9%	0.1	0.1	0.3	0.6	0.1	0.1	0.3%	0.4	0.2	0.1	0.5	0.4	0.2	0.1	0.5	0.4		
k_Archaea_Other	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
k_Archaea_p_Crenarchaeota	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
k_Archaea_p_Euryarchaeota	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
k_Bacteria_Other	13.4	15.8	16.7	8.6	18.5	28.2	18.4	15.9	8.3	22.1	19.0	18.3	20.0	19.4	23.8	19.4	22.8	24.6	23.8	19.4	22.8	24.6		
k_Bacteria_p_Acidobacteria	3.8	7.5	3.7	1.4	4.3	6.8	4.9	5.1	0.9	2.3	9.0	8.6	5.8	2.0	6.3	5.5	3.5	4.1	6.3	5.5	3.5	4.1		
k_Bacteria_p_Actinobacteria	3.9	9.1	40.3	22.8	37.7	12.7	27.6	9.9	4.6	25.3	25.8	27.3	24.3	10.1	10.1	8.3	15.1	12.8	10.1	8.3	15.1	12.8		
k_Bacteria_p_Armatimonadetes	0.0	0.1	0.1	0.0	0.1	0.1	0.0	0.1	0.0	3.8	0.2	0.0	0.1	0.1	0.4	1.0	0.1	0.1	0.4	1.0	0.1	0.1		
k_Bacteria_p_Bacteroidetes	0.1	0.2	0.7	0.9	0.4	1.2	0.7	0.3	1.9	0.5	0.7	0.3	0.7	1.1	1.2	1.2	1.3	0.6	1.2	1.2	1.3	0.6		
k_Bacteria_p_Chlamydiae	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
k_Bacteria_p_Chlorobi	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.1	0.0	0.0	0.1	0.1	0.0	0.0		
k_Bacteria_p_Chloroflexi	0.1	0.2	0.6	0.2	0.4	1.4	0.5	0.2	0.2	0.6	0.4	0.5	0.5	0.5	0.2	0.3	0.6	0.2	0.2	0.3	0.6	0.2		
k_Bacteria_p_Cyanobacteria	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
k_Bacteria_p_Ehlsimicrobia	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.2	0.1	0.0	0.1	0.6	0.2	0.1	0.1	1.6	0.0	0.1	0.2	0.1	0.0	0.1	0.2	0.1		
k_Bacteria_p_Fibrobacteres	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
k_Bacteria_p_Firmicutes	0.2	0.7	0.6	0.6	0.3	0.5	1.0	0.7	1.0	1.1	1.0	0.9	1.0	24.7	0.6	0.7	1.2	0.4	0.6	0.7	1.2	0.4		
k_Bacteria_p_Fusobacteria	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
k_Bacteria_p_GN02	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
k_Bacteria_p_Gemmatimonadetes	2.3	1.4	9.6	2.9	11.0	15.5	8.3	5.8	2.2	9.6	10.3	11.2	14.8	11.2	1.8	3.4	8.5	5.9	1.8	3.4	8.5	5.9		
k_Bacteria_p_NKB19	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
k_Bacteria_p_Nitrospirae	0.2	0.7	0.6	0.9	1.0	1.2	0.9	0.8	0.5	0.6	1.0	1.1	2.0	2.0	1.1	0.3	1.6	2.7	1.1	0.3	1.6	2.7		
k_Bacteria_p_Plactomycetes	0.1	0.0	0.2	0.1	0.1	0.3	0.2	0.1	0.0	0.1	0.1	0.1	0.2	0.0	0.1	0.4	0.2	0.1	0.1	0.4	0.2	0.1		
k_Bacteria_p_Proteobacteria	75.5	63.2	26.5	60.9	25.8	30.7	36.5	60.7	79.8	32.6	31.4	30.7	30.0	26.3	53.8	59.0	44.1	47.7	53.8	59.0	44.1	47.7		
k_Bacteria_p_TM6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
k_Bacteria_p_TM7	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
k_Bacteria_p_Thermi	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
k_Bacteria_p_Verrucomicrobia	0.3	0.4	0.1	0.5	0.2	0.1	0.6	0.2	0.1	0.1	0.3	0.3	0.3	0.4	0.4	0.3	0.1	0.1	0.4	0.3	0.1	0.1		
k_Bacteria_p_WYO	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
Trattamento e replicazione	Control						Fenamifos						L4						Fenamifos + L4					

La diversità microbica è stata esplorata valutando l'alpha e la beta diversity. QIIME ha permesso di analizzare l'alpha diversity utilizzando diverse metriche: *Chao-1*, che fornisce un parametro indicativo della ricchezza di specie; *Observed-Species* che descrive l'unicità delle OTUs presenti in ogni campione; il *PD-Whole tree* che calcola la distanza evolutiva, utilizzando un albero filogenetico. I grafici (Fig. 2.11) hanno evidenziato che il numero di specie all'interno di ciascun campione analizzato varia significativamente in funzione dei trattamenti. Analizzando singolarmente i diversi trattamenti, è stato osservato che il controllo ha presentato un minor numero di specie identificate, rispetto agli altri trattamenti. Le differenze osservate potrebbero essere spiegate dal fatto che molte specie presenti nel terreno possono sopravvivere in uno stato di spora durevole (Nicholson, 2002). In diverse condizioni ambientali, le spore di questi batteri possono passare allo stato vegetativo e quindi essere rilevate mediante le molecole di RNA. L'inoculo dei nematodi nel terreno inoculato e inoculato + trattamento con fenamifos, ha comportato inoltre la possibile introduzione di altri batteri (Ladygina *et al.*, 2009), appartenenti a diversi taxa ed associati a nematodi, determinati mediante l'analisi molecolare eseguita. Tutti i nematodi condividono il loro ambiente con specifici gruppi di batteri (Poinar *et al.*, 1986), ed è probabile che le interazioni tra batteri e nematodi possano avere conseguenze importanti nel determinarne la composizione microbica di un determinato ambiente. È stato dimostrato che i nematodi sono in grado di influenzare la struttura delle comunità batteriche (De Mesel *et al.*, 2004) e i batteri a loro volta producono una varietà di composti come ad esempio antibiotici, nutrienti, coenzimi e molecole segnale (Pierson *et al.*, 2007) che inducono cambiamenti effettivi della microflora.

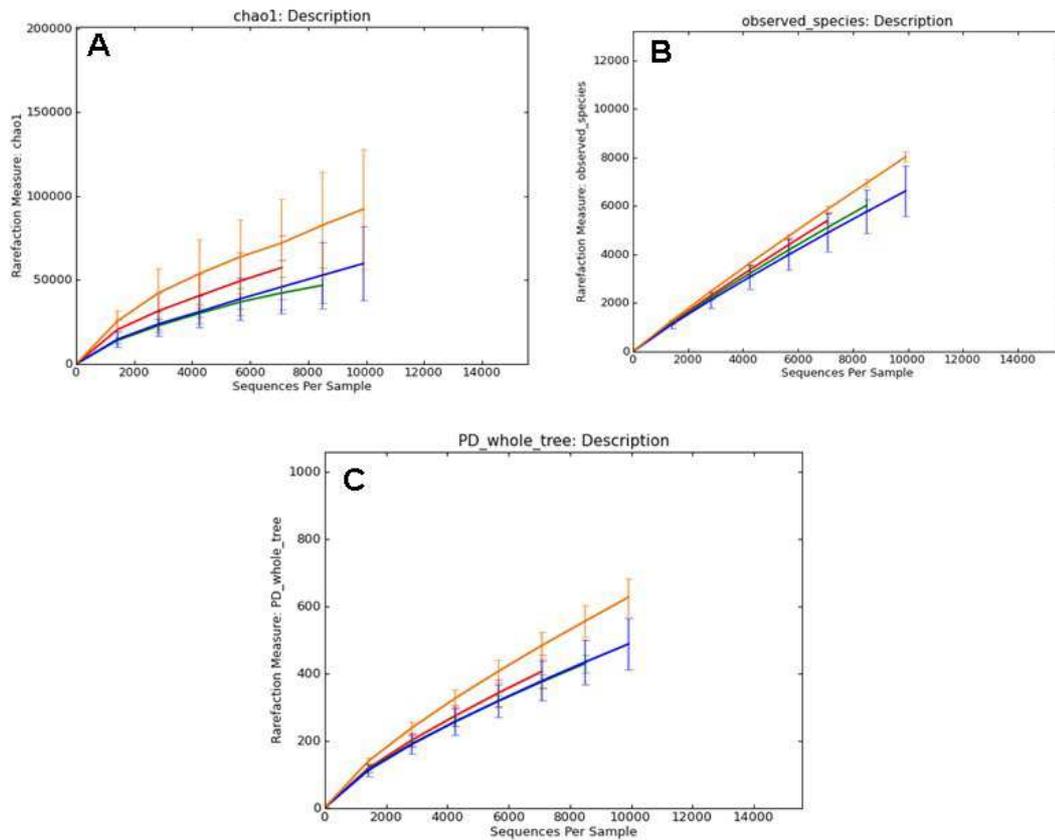


Fig. 2.11 Misura della diversità alpha nei trattamenti utilizzando le metriche chao-1(A), observed species (B) e PD whole tree (C). Trattamenti: verde = Inoculato L4; rosso = Controllo non trattato; arancio = inoculato e trattato con fenamifos; blu = solo fenamifos.

I risultati dello studio di beta diversità hanno mostrato differenze tra i trattamenti. In particolare, si è visto che i campioni inoculati con L4 e i campioni trattati e inoculati descrivono due gruppi ben definiti e distanti tra loro (Fig. 2.12). Questo comportamento non è stato osservato per i campioni appartenenti al controllo e al trattato, che si presentano maggiormente dispersi. Tale comportamento suggerisce che la presenza di J2 e uova di *M. incognita* abbia influenzato in maniera sostanziale la beta diversità, determinando l'abbondanza di determinati

gruppi che risulterebbero associati ai nematodi per i quali è nota la possibilità di trasportare batteri aderenti alla cuticola (Standing *et al.*, 2006). Nonostante i nematodi, utilizzati in questa prova, siano stati sottoposti a lavaggi superficiali prima dell'inoculo, non si può escludere che siano stati rilevati batteri presenti sulla superficie degli stessi, o specie di simbionti presenti nella cavità orale e/o intestino.

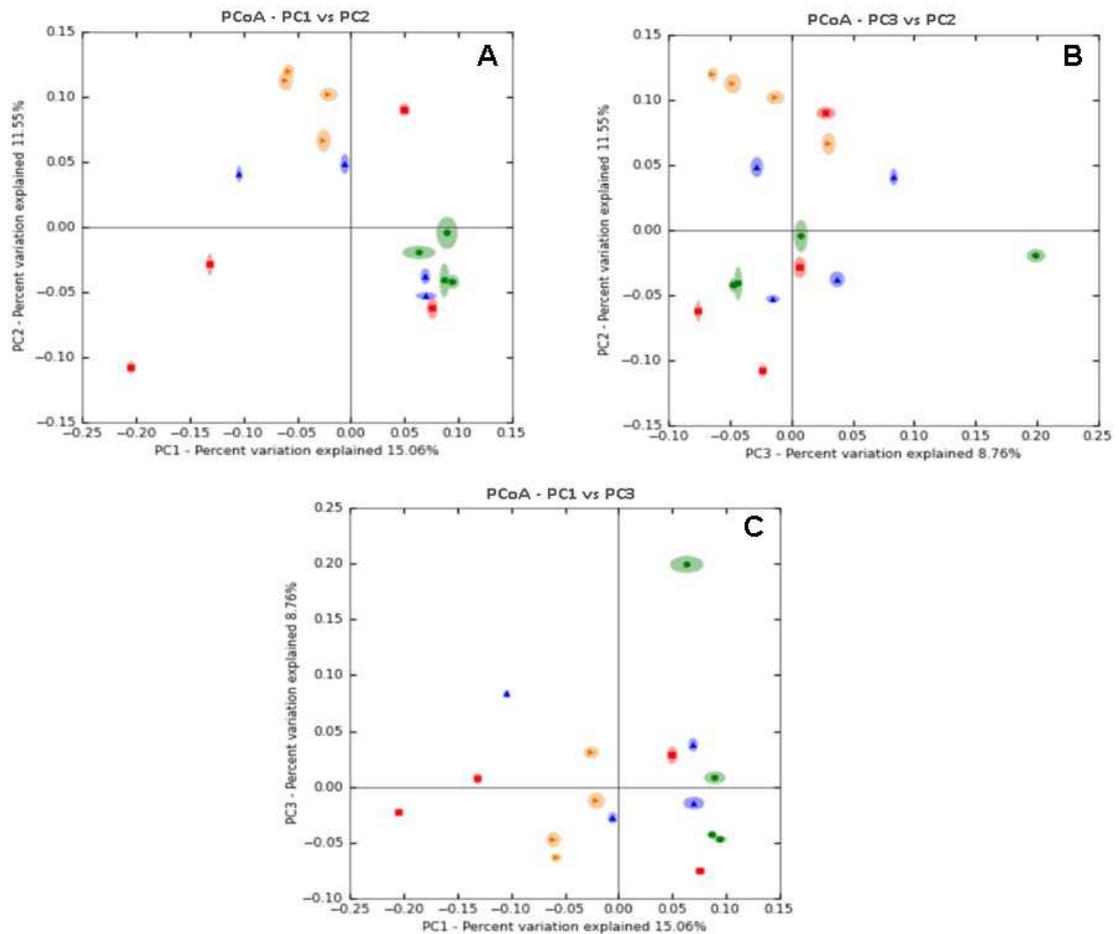


Fig. 2.12 Descrizione della diversità beta tra i diversi campioni indicati in colore per trattamento (verde = inoculato con *M. incognita* L4; rosso = controllo non trattato; arancio = inoculato e trattato con fenamifos; blu = solo fenamifos) ordinati e rappresentati sui piani della *Principal Coordinates Analysis* dati dalle componenti 1-2 (A), 2-3 (B) e 1-3 (C). Per maggiori dettagli http://www.sequentix.de/gelquest/help/principal_coordinates_analysis.htm .

Dall'analisi tassonomica basata sulle OTU identificate a diversi livelli, risulta che i taxa maggiormente rappresentati sono costituiti dagli α -, β - e δ -*Proteobacteria*. Numerosa è anche risultata la componente rappresentata da *Actinobacteria* e *Gemmatimonadetes*. Gli ordini più frequenti sono risultati: *Rickettsiales*, *Rhizobiales*, *Sphingomonadales*, *Burkholderiales* e *Nitrosomonadales* (Fig. 2.13).

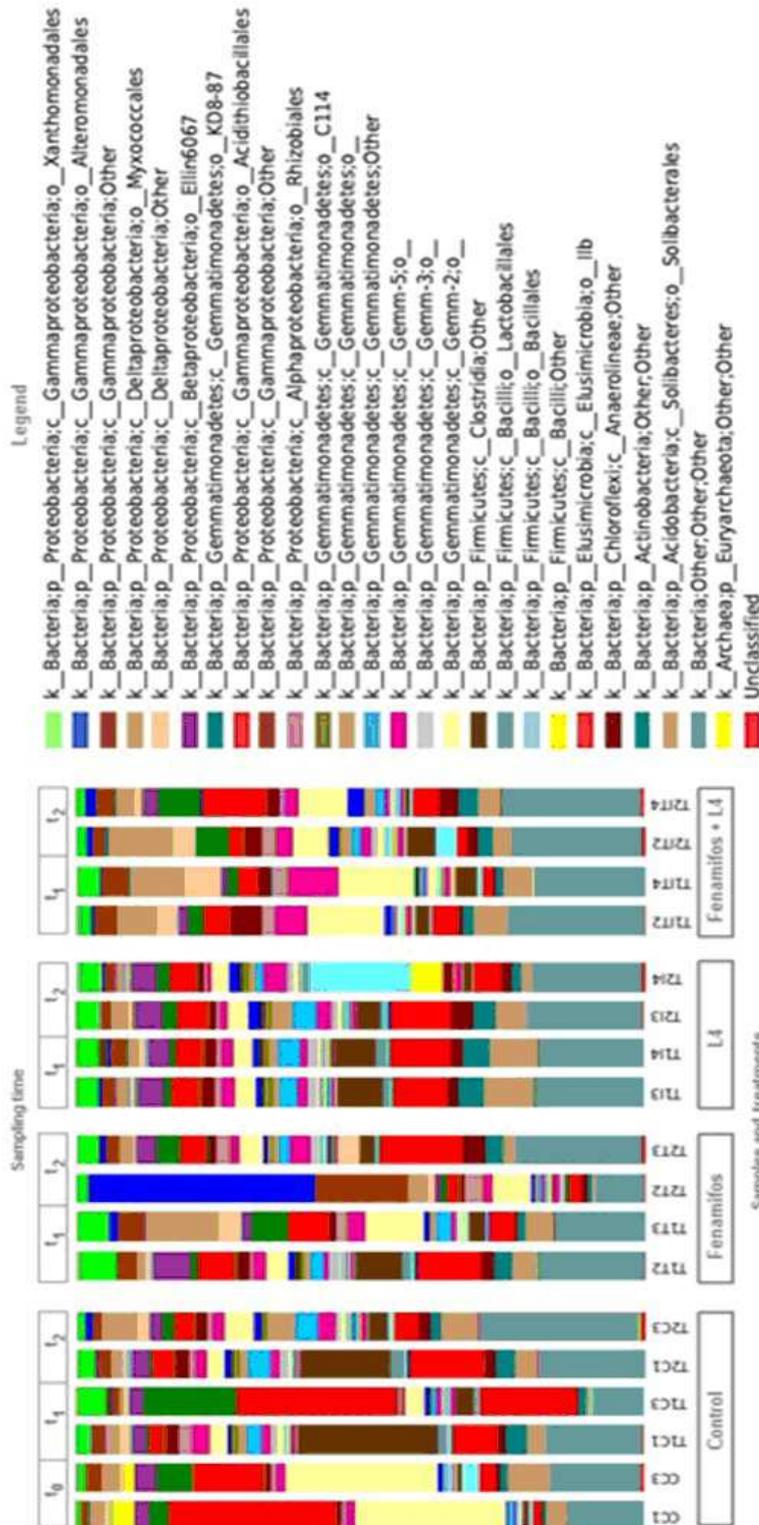


Fig. 2.13 Ripartizione (%) dei principali ordini identificati per trattamento e repliche

A livello di genere sono state riscontrate differenze nella presenza di OTU fra i campioni inoculati con *M. incognita* ed il controllo non inoculato, confermando che un certo numero di taxa batterici è associato ai nematodi e che la presenza di radici infestate influenza la composizione delle popolazioni batteriche.

La presenza di alcuni generi batterici, fra cui *Bacillus*, è stata riportata in associazione con nematodi. E' stato dimostrato che alcuni ceppi di *B. thuringensis*, "largamente utilizzati come controllo biologico di insetti", hanno anche capacità nematocida contro nematodi di vita libera e fitoparassiti (Wei *et al.*, 2003). Anche alcuni ceppi di *Pasteuria* (syn. *Bacillus*) *penetrans* hanno dimostrato efficacia nel ridurre la densità di *M. incognita*, non solo in condizioni controllate in serra, ma anche in applicazioni di pieno campo (Mankau, 1975; Sayre e Starr, 1988; Stirling, 1991; Ciancio, 2008; Ciancio *et al.*, 2009). Alla luce di queste osservazione la componente rappresentata dai bacilli nel trattamento L4 suggerisce la necessità di ulteriori indagini a livello di specie per l'identificazione di potenziali nuovi agenti di biocontrollo.

Per quanto riguarda la presenza di OTU in funzione dei trattamenti e tempi, il trattamento con L4 ha mostrato al tempo t_1 un maggior numero di generi rispetto agli altri trattamenti. Questo valore si è ridotto a t_2 rispetto agli altri trattamenti quali fenamifos+L4 e fenamifos che presentano una maggiore frequenza di generi (Fig. 2.14).

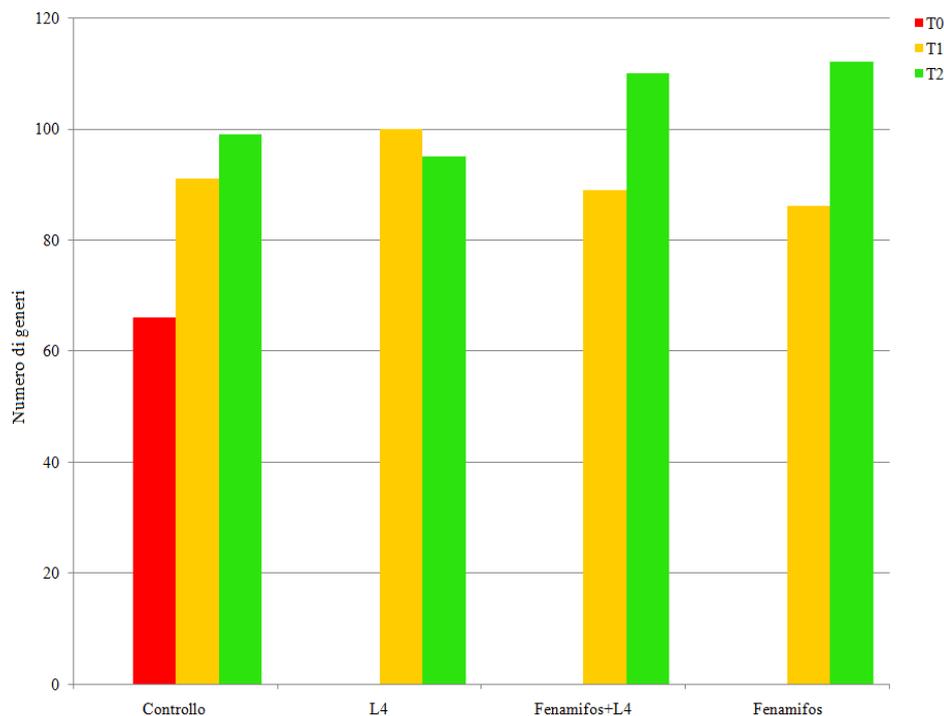


Fig. 2.14 Numero di generi per trattamento e tempo di campionamento.

In particolare, considerando i generi presenti con una frequenza pari e/o superiore all'1% del totale, solo 5 generi risultano essere comuni a tutti i trattamenti nei tre tempi del saggio, anche se con percentuali variabili in ciascun campione: *Candidatus Solibacter*, *Streptomyces*, *Rubrobacter*, *Nitrospira*, *Steroidobacter*. La restante parte dei generi è presente unicamente in un campione e/o in più trattamenti. Ad esempio il genere indicato dal codice A4, appartenente alla famiglia *Flammeovirgaceae*, raggiunge valori quasi del 2% a t_1 solo nel trattamento con fenamifos+L4; *Thiobacillus* è presente nel controllo a t_0 con percentuale del 22 % e si riduce al di sotto dell'1% in tutti i trattamenti. Anche *Janthinobacterium* presenta una riduzione con valori al di sotto dell'1% per quasi tutti i trattamenti. I batteri appartenenti al genere *Cellvibrio* hanno mostrato un incremento a t_1 ,

probabilmente dovuto al trattamento chimico con fenamifos, che raggiunge il 28% a t_2 . Al contrario, per il genere *Steroidobacter* si osserva la maggiore frequenza a t_1 ; il genere *Nocardioides*, presente in tutti i trattamenti ad eccezione del controllo a t_0 , mostra infine un incremento notevole nel trattamento con fenamifos a t_2 (Fig. 2.15).

Riguardo la crescita delle piante, al tempo t_1 il trattamento con solo fenamifos ha indotto un incremento dell'altezza rispetto al controllo e agli altri trattamenti (L4, ed L4 trattato). In quest'ultimo caso la mancata efficacia osservabile è dovuta alla somministrazione del prodotto alla fine del primo ciclo d'infestazione da parte di *M. incognita*, effettuato in modo da assicurare la presenza del nematode. La migliore crescita nel trattamento solo con fenamifos appare invece legata ad una maggior protezione da altri parassiti presenti nella serra. Al tempo t_2 l'incremento di altezza si è reso visibile solo per i trattamenti che hanno previsto l'inoculo di L4 (Fig. 2.16).

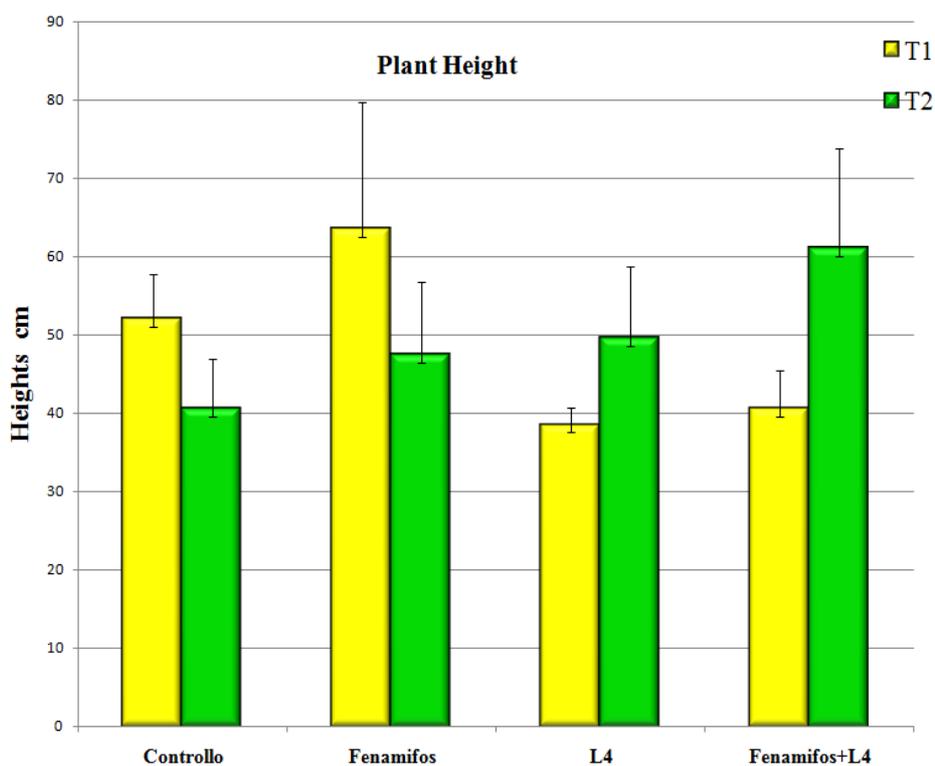


Fig. 2.16 Effetto dei trattamenti sull'altezza delle piante di pomodoro cv Tondino, (media \pm SD, 2 repliche).

Per quanto riguarda le radici, la presenza del nematocida sistemico è risultata efficace, inducendo un incremento del peso in entrambi i tempi, ed una maggior protezione anche rispetto al controllo non trattato.

Il maggior peso in presenza di nematodi è da ricondurre alla presenza di galle con alterazioni istologiche (Fig. 2.17).

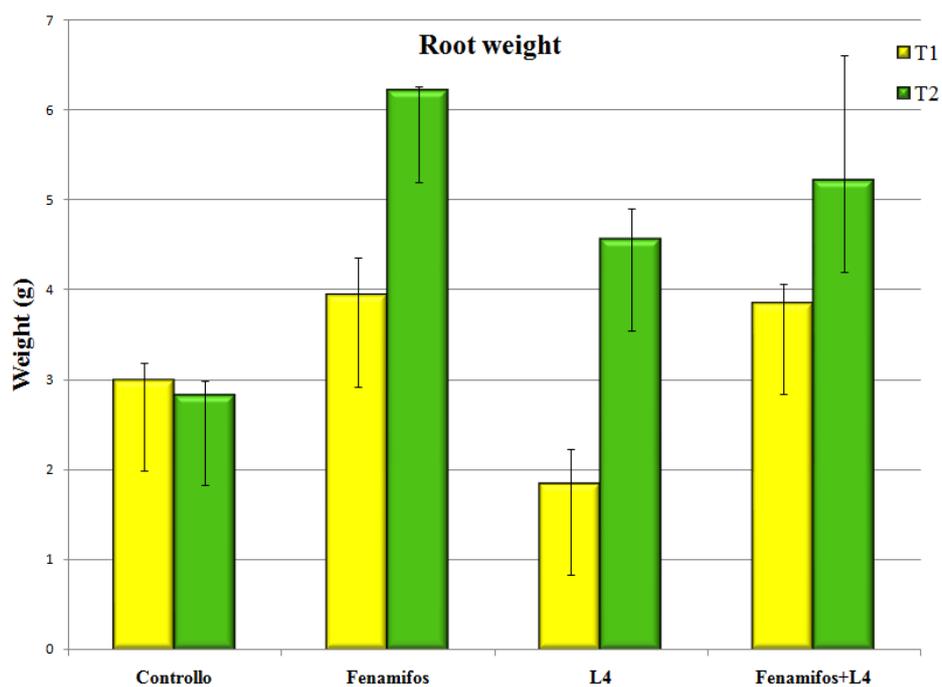


Fig. 2.17 Effetto dei trattamenti sul peso delle radici di pomodoro cv Tondino, (media \pm SD, 2 repliche).

A t_1 il trattamento con fenamifos non ha avuto effetto, per via dell'epoca di somministrazione, sul numero di uova per g di radice. Un effetto significativo, rispetto al trattamento inoculato con L4, è invece risultato osservabile a t_2 (Fig. 2.18).

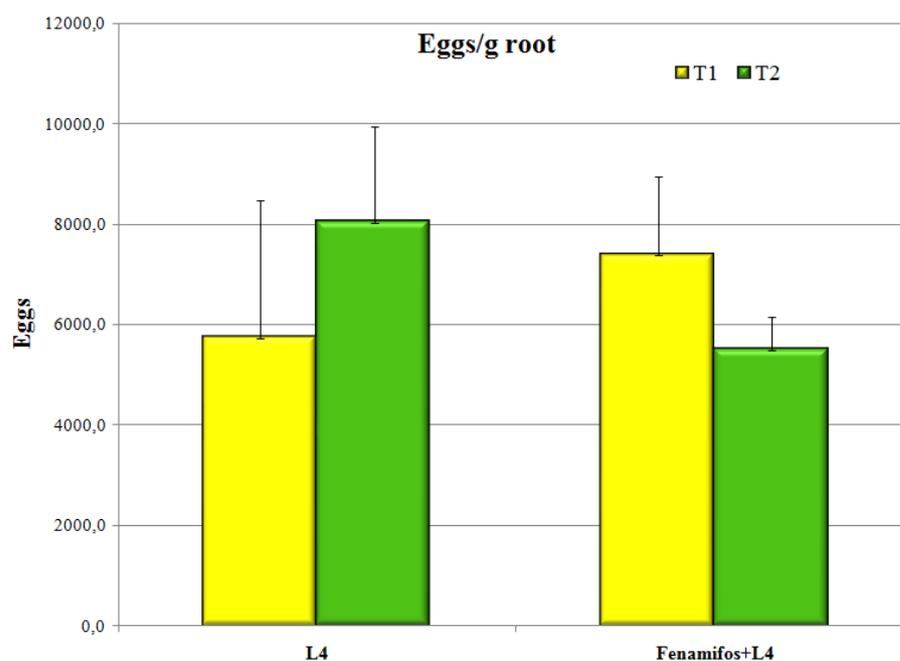


Fig. 2.18 Densità delle uova per g di radice su pomodoro cv Tondino, per i diversi trattamenti (media \pm SD, 2 repliche).

Nonostante la diversa densità di uova l'indice di galle (RGI) non è variato significativamente fra i due trattamenti (Fig. 2.19).

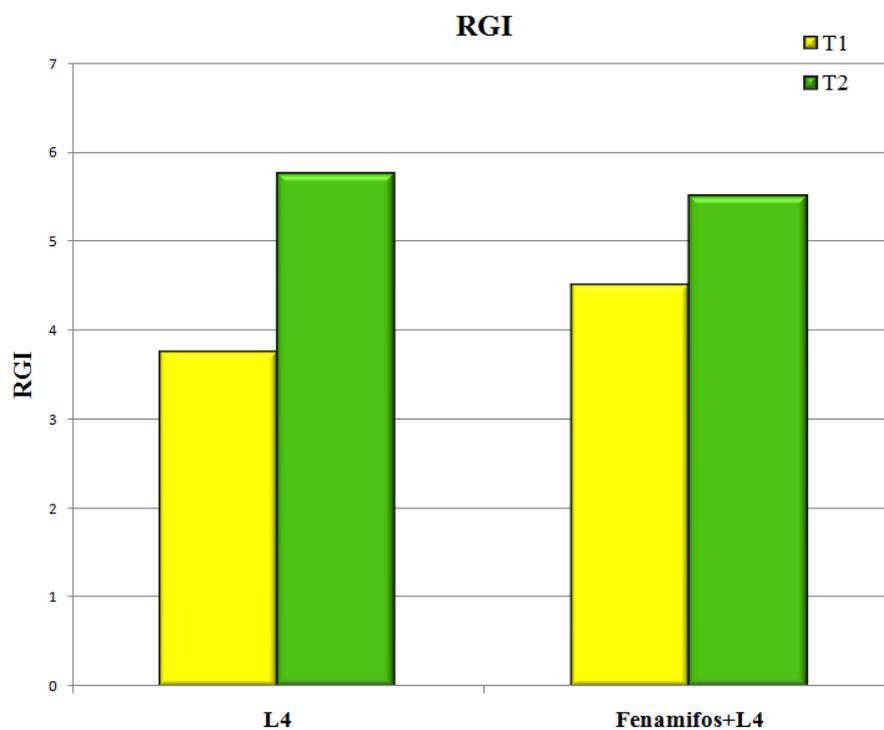


Fig. 2.17 Valori dell'indice di galle (RGI) osservati sulle radici di pomodoro inoculate, per diversi isolati.

Capitolo III

Analisi delle specie batteriche presenti in associazione a

nematodi galligeni

3.1 Prova sperimentale

Obiettivo della presente attività di ricerca è stato isolare, identificare e caratterizzare batteri presenti su masse d'uova e larve di secondo stadio (J2) da radici di piante infestate da nematodi, al fine di selezionarne isolati potenzialmente efficaci come agenti di controllo biologico.

La prova è stata condotta utilizzando batteri isolati da J2 e masse d'uova di *M. incognita*, provenienti da tre diverse aziende ortive pugliesi, naturalmente infestate dal parassita. I batteri, sono stati isolati su agar nutritivo (AN: 20 g agar, 5 g peptone, 3 g estratto di lievito, 1 l di acqua) mediante insemminazione di acqua di lavaggio di masse d'uova o J2 e successivamente utilizzati in prove sperimentali in serra per valutarne l'efficacia contro *M. incognita*. I campioni di terreno sono stati prelevati dal territorio di Gallipoli, Leverano (LE) o Terlizzi (BA) e mantenuti in serra in vasi da 20 cm di diametro con piantine di pomodoro cv Tondino.

3.2 Materiali e metodi

Sono stati saggiati diversi isolati di batteri G+ e G- provenienti da uova o J2 ottenute da radici di piante di pomodoro attaccate da *M. incognita* e prelevate in tre differenti località pugliesi (Gallipoli, Terlizzi, Leverano). Per l'isolamento, alcune masse d'uova sono state immerse in acqua sterile (100 µl) in Eppendorf da 2 ml e leggermente agitate. Con l'aiuto di un'ansa sterile ad anello sono state prelevate alcune cellule batteriche presenti nell'acqua di lavaggio e trasferite su AN strisciando l'ansa su metà piastra. Questa operazione è stata ripetuta altre due volte sterilizzando l'ansa, ruotando la piastra e riprendendo dal punto interrotto, in modo da ottenere tre percorsi in tre

diverse direzioni. Dopo un'incubazione di 48 ore a 26°C sono state isolate singole colonie in base alla forma e al colore.

Inoltre, alcune masse di uova sono state trasferite direttamente su piastre contenenti AN ed incubate a 26°C. Dopo 24 ore le masse sono state osservate al microscopio e con la punta di un'ansa o ago sterile sono state prelevate altre cellule batteriche, da colonie cresciute intorno alle uova o J2 emerse nel frattempo. I batteri presenti sono stati dispersi in 1 ml di acqua sterile in un tubo Eppendorf e quindi piastrati come descritto in precedenza al fine di ottenere colonie da singole cellule. Ogni isolato è stato messo a crescere in 1 ml di brodo liquido (LB: 10 g · l⁻¹ NaCl, 10 g · l⁻¹ peptone, 5 g · l⁻¹ estratto di lievito) a 26°C in agitazione (150 rpm). Trascorse 24 ore, 500 µl di coltura cellulare sono stati utilizzati per l'estrazione del DNA dalle cellule batteriche, mentre la parte restante è miscelata con glicerolo (concentrazione finale 20%) e conservata a -20°C.

Gli acidi nucleici totali sono stati estratti seguendo la procedura descritta da Sambrook e Russel (2001). Il DNA ottenuto è stato risospeso in 50 µl di acqua distillata e amplificato mediante PCR con i primers 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'), specifici per la regione 16S dei batteri. La reazione di amplificazione è stata allestita in 25 µl contenenti 1 µl di DNA target, 2.5 µl PCR buffer 10× (Sigma Aldrich), 0.2 mM di ciascun dNTP, 0.5 µM di ciascun primer e 1 U di *Taq* DNA Polimerasi (SigmaAldrich).

Il programma di amplificazione condotto è stato il seguente: 4 min di denaturazione a 95°C; 35 cicli di 95°C per 30 sec, 49°C per 30 sec e 72°C per 30 sec; e da un ciclo finale di 72°C per 7 min.

Il prodotto PCR è stato visualizzato su gel di agarosio 1.5%, purificato utilizzando il kit di purificazione per prodotto PCR QIAquick PCR Purification Kit e quindi inviato per il sequenziamento alla ditta Macrogen (NL). Sulla base delle sequenze del DNA, 8 isolati, identificati con le sigle E 4.2, E 4.4, E 4.6, E 4.9, E 3.7, E 3.9 (*Bacillus* spp.), E 1.16 ed E 2.4 (*Pseudomonas* spp.), sono stati saggiati contro *M. incognita* L4. Per ciascun isolato è stata preparata una sospensione di cellule con concentrazione compresa tra 10^6 e 10^7 cellule per ml^{-1} di brodo liquido.

Per determinare il numero di cellule vitali le sospensioni cellulari sono state serialmente diluite ed insemiante in caspule Petri contenenti AN. Le caspule sono state incubate a 26°C per 48 ore e successivamente analizzate per valutare in numero di colonie. Le piastre analizzate contenevano un n. di colonie comprese tra 25 e 250, mentre quelle con concentrazioni maggiori (meno diluite) sono state scartate per evitare di sottostimare il numero di cellule vive.

L' allestimento della prova in serra è stato realizzato seguendo lo schema descritto in Fig. 3.1 e precisamente:

- C) Piantine di pomodoro cv Tondino in terreno sterile (controllo).
- E) Pomodoro in terreno privo di nematodi e trattato con sospensione batterica.
- L4) Pomodoro in terreno inoculato con nematodi (popolazione L4 di *M. incognita*);
- L4+E) Pomodoro in terreno inoculato con nematodi e trattato con sospensione batterica;

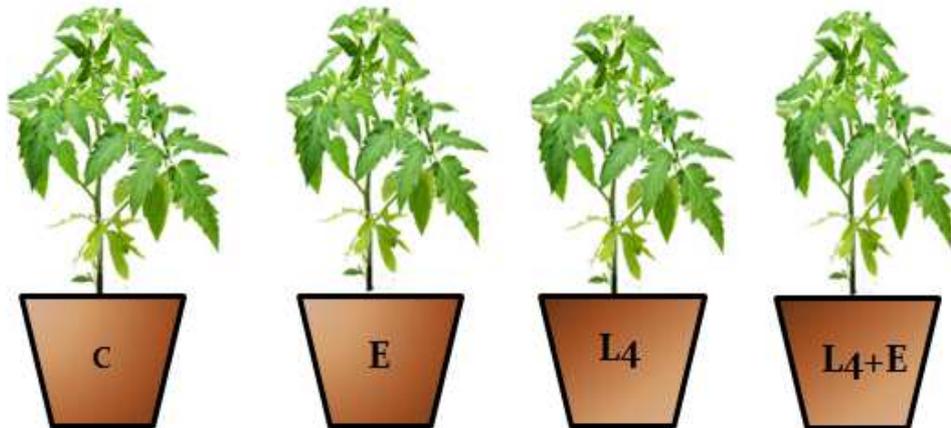


Fig. 3.1 Schema sperimentale: **C** = controllo; **E** = Isolati batterici: E4.2; E4.4, E4.6, E4.9, E3.7, E3.9 *Bacillus* spp. E1.16, E2.4 *Pseudomonas* spp. **L4** = *Meloidogyne incognita*; **L4+E** = *Meloidogyne* + ciascun isolato batterico.

Ciascuna delle tesi ha previsto tre repliche biologiche, allestite in serra in condizioni controllate (temperatura 26°C e umidità 40-60%).

Al fine di valutare preliminarmente un'eventuale fitotossicità dei batteri le radici delle piantine di pomodoro sono state immerse in sospensione batterica (tesi E e L4+E) o in acqua (tesi C ed L4) per 1 minuto, per essere poi trapiantate in terreno sterile in vasi da 20 cm di diametro e tenute in osservazione per 96 ore. Considerato che nessun isolato ha determinato effetti nocivi evidenti sulle piante, si è proceduto con l'inoculazione della soluzione batterica (tesi E ed L4+E) attraverso l'uso di una pipetta in tre punti equidistanti intorno alla pianta e ad una profondità di circa 10 cm. Dopo 5 ore, le piante delle tesi L4 ed L4+E sono state inoculate con 2000 nematodi per vaso, mediante una pipetta, in 3 punti del terreno intorno alla radice, ad una profondità di circa 10 cm come. A intervalli settimanali e per tutta la durata dell'esperimento, sono stati rilevati dati riguardanti la crescita in altezza delle piante. L'esperimento si è stato considerato concluso 70 giorni dopo il trapianto, prevedendo che tale tempo fosse stato sufficiente per la realizzazione di almeno due generazioni di *M. incognita*.

Al termine della prova, oltre ai dati sulla crescita delle piante, sono stati rilevati anche i dati relativi alla densità dei nematodi. La densità delle J2 estratte è stata determinata tramite filtrazione di una sospensione di 100 cc di terreno con il metodo dei setacci di Cobb (diam. 700 e 75 μm) (Thorne, 1961) che sfrutta la differente dimensione e il diverso peso specifico dei nematodi e delle particelle di terreno, contando i nematodi in un vetrino a volume noto (Hawksley chamber) da 1 ml. Il numero totale di larve presente nei 100 cc di terreno è stato stimato moltiplicando la media delle larve in 1 ml per il volume totale delle sospensioni. Per ottenere le uova, la radice di ciascuna pianta è stata frammentata e portata in agitazione per 20 minuti in soluzione di ipoclorito allo 0.5%, per garantire lo scioglimento della sostanza gelatinosa che ricopre le masse d'uova presenti sulle radici infestate. Successivamente si è proceduto al filtraggio di questa soluzione con due setacci molecolari (diam. 750 e 50 μm) posti in sequenza, che hanno permesso rispettivamente di eliminare i frammenti di radice e di trattenere le uova, sottoposte di seguito a due lavaggi mediante un lieve getto di acqua corrente. La concentrazione di uova è stata valutata contando le uova come descritto per le J2. E' stato inoltre rilevato il Root Gall Index (RGI) (Bridge e Page, 1980). I dati sono stati sottoposti ad analisi statistica utilizzando il *t* di Student e la One Way Anova.

3.3 Risultati e discussione

Dall'analisi dei terreni infestati da *M. incognita* sono stati ottenuti 74 isolati batterici, posti in collezione presso l'Istituto per la protezione

delle piante del CNR di Bari. L'elenco degli isolati è riportato in Tabella 3.1.

Tabella 3.1 Isolati batterici ottenuti in tre differenti località pugliesi da piante di pomodoro infestate da *Meloidogyne*.

Codice isolati	Gruppo di isolati	Specie identificate	Origine	Provenienza
E1	1 - 16	<i>Pseudomonas</i> spp.; <i>Pseudomonas plecoglossicida</i> ; <i>Pseudomonas fluorescens</i> ; <i>Pseudomonas brassicacearum</i>	Dall'esterno di masse d'uova	Gallipoli
E2	1 - 12	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Dall'esterno di masse d'uova	Terlizzi
E3	1 - 10	<i>Pseudomonas</i> spp	Dall'esterno di masse d'uova	Terlizzi
E4	1 - 11	<i>Bacillus</i> spp.; <i>Bacillus aryabhatai</i>	Dall'esterno di masse d'uova	Leverano
N1	1-5	<i>Pseudomonas</i> spp.; <i>Pseudomonas brassicacearum</i>	Da J2 in colonia batterica	Gallipoli
N2	1-2	<i>Pseudomonas</i> spp.	Da masse d'uova in colonia batterica	Terlizzi
N3	1	<i>Pseudomonas</i> spp	Da masse d'uova	Terlizzi

Essendo le specie appartenenti al genere *Bacillus* e *Pseudomonas*, generi che includono antagonisti di nematodi galligeni, sono stati selezionati gli isolati E4.2, E4.4, E4.6, E4.9, E3.7 ed E3.9. identificati sulla base della sequenza del 16S analizzata con BLAST (Altschul *et al.*, 1997) (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) come appartenenti al genere *Bacillus* o a taxa vicini, e E1.16 e E2.4 identificati come appartenenti al genere *Pseudomonas*. Sulla base dei risultati ottenuti dall'analisi BLAST, le sequenze dei *Bacillus* spp. non sono comunque risultate sufficientemente informative a livello di specie, per cui sono state effettuate ulteriori analisi di tipo molecolare e biochimico per l'identificazione.

Dal punto di vista biochimico, i diversi isolati sono stati saggiati attraverso l'uso del kit commerciale Microgen Bacillus-ID, per uso esclusivo diagnostico in vitro. Il kit è costituito da due serie di test a micropozzetti (identificate dalle etichette BAC 1 e BAC 2, Fig. 3.1), ciascuna delle quali contiene 12 substrati disidratati per l'esecuzione di test di fermentazione dei carboidrati o altri test biochimici. L'ultimo pozzetto della seconda striscia è dedicato al controllo della fermentazione dei carboidrati e viene utilizzato come pozzetto di riferimento per l'interpretazione del test.

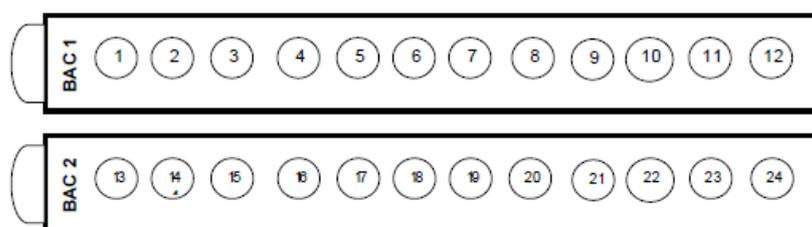


Fig. 3.1 Serie di strips per i test a micropozzetti.

Si perviene all'identificazione degli isolati registrando i risultati evidenziati da un cambiamento di colore dopo 24 e 48 ore d'incubazione a 30°C e l'aggiunta, dopo 48 ore, di reagenti appropriati (reattivo di Kovac, nitrati e VP). I risultati vengono quindi analizzati utilizzando il software Microgen Identification System (MID-60).

Ogni test Microgen Bacillus-ID comprende 24 reazioni biochimiche, illustrate nella Tabella 3.2. La lettura delle strisce viene effettuata dopo 24 e 48 ore avendo come riferimento i parametri del test illustrati di seguito nella figura 3.2.

Tabella 3.2 Substrati e reazioni del kit d'identificazione di *Bacillus* spp.

Pozzetto	Substrato	Reazione	Positivo	Negativo
1	Arabinosio	La fermentazione di zuccheri specifici dà luogo a prodotti finali acidi che includono un cambiamento di colore dell'indicatore rosso fenolo da rosso a giallo	Giallo	Rosso
2	Cellobiosio			
3	Inositolo			
4	Mannitolo			
5	Mannosio			
6	Raffinosio			
7	Ramnosio			
8	Salicina			
9	Sorbitolo			
10	Saccarosio			
11	Trealosio			
12	Xilosio	La fermentazione di zuccheri specifici dà luogo a prodotti finali acidi che includono un cambiamento di colore dell'indicatore rosso fenolo da rosso a giallo	Giallo	Rosso
13	Adonitolo			
14	Galattosio			
15	Metil-D-annoside			
16	Metil-D-lucoside			
17	Inulina			
18	Melezitosio			
19	Indolo	L'indolo viene prodotto dal triptofano e dà luogo a un complesso rosa/rosso in seguito all'aggiunta del reattivo di Kovac	Rosa/Rosso	Incolore/ giallo
20	ONPG (O-nitrofenil galattoside)	L'idrolisi dell'ONPG ad opera della B-galattosidasi dà luogo alla produzione di un orto-nitrofenolo giallo	Giallo	Incolore
20 Reagente plus	Nitrato	Il nitrato viene ridotto a nitrito, il quale forma un complesso rosso scuro in seguito all'aggiunta di α -naftilammia e acido sulfanilico	Rosso	Incolore/ giallo
21	Arginina diidrolasi	L'arginina viene trasformata in ornitina, ammoniaca e CO ₂ dall'arginina diidrolasi, determinando così un aumento del pH e una variazione di colore del blu di bromotimolo da verde a blu. A 48 ore le reazioni verdi sono negative	Verde/Blu Blu	Giallo/ Giallo Verde
22	Utilizzo del citrato	L'utilizzo del citrato (esclusivamente di origine carbonica) porta a un aumento del pH dando luogo ad una variazione del colore del blu di bromotimolo da giallo-verde a blu	Blu	Giallo/ Verde chiaro

23	Voges Proskauer	Si individua la produzione di acetoina dal glucosio dalla formazione di un complesso rosa/rosso in seguito all'aggiunta di α -naftolo e creatina in presenza di KOH	Rosa/Rosso	Giallo paglierino
24	Contollo	Controllo carboidrati	Rosso	Rosso

WELL/ NAPFCHEN /GODET/P OZZETTO	24	Da 1 a 18	Da 1 a 18	19	20	21	22	23	(20) Reagenti +
Reazione	Controllo negativo carboidrati 24/48 ore	Fermentazione carboidrati 24 ore	Fermentazione carboidrati 48 ore (*)	Indolo 48 ore	O.N.P.G 24/48 ore	Arginina 24/48 ore	Citrato 24/48 ore	VP 48 ore	Nitrato 48 ore
Negativo (Pozzetto 24 (**))									
Positivo									

Fig. 3.2 Reattività del test per l'identificazione di *Bacillus* spp.

I dati della lettura sono riportati su un modulo di registrazione, in cui i substrati sono organizzati in gruppi di 3 reazioni. Ad ogni substrato è stato assegnato un valore (1, 2 o 4). La somma delle reazioni positive di ogni gruppo costituisce una cifra in un codice ottale utilizzato per identificare l'isolato (Fig. 3.3) Il codice ottale viene immesso nel software Microgen Identification System (MID-60), che genera un referto dei cinque organismi più probabili nel database selezionato. Il software fornisce un'identificazione basata su probabilità, % di probabilità e verosimiglianza con un'analisi qualitativa della separazione.

MICROGEN BACILLUS-ID 24 TEST
REPORT FORM

Lab. No. F4560 Specimen Type COOKED RICE
Date 12-10-04

MICROGEN BIOPRODUCTS

Well Number	Bacillus Strip 1 (BAC 1)												Bacillus Strip 2 (BAC 2)														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24			
Reaction	PAR	CEL	INC	BAR	MNS	RAF	BVA	BAL	SGR	BUC	TRE	PYL	ADD	GAL	MDM	MDG	IND	MLZ	IND	ONPG	ARG	DT	VP	NT	NEG		
24 hours	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-		
48 hours	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-		
Reaction Index	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4		
Sum of Positive Reactions	0			0			2			6			0			0			1			3					

Profile No: 00260013 Final Identification: Bacillus cereus group

Fig 3.3 Esempio di modulo di registrazione

Di seguito sono riportati i dati relativi alla lettura delle strips (Fig. 3.4-3.5)



Fig 3.4 Test biochimico per l'identificazione degli isolati E4.2, E4.4, E4.6, E4.9

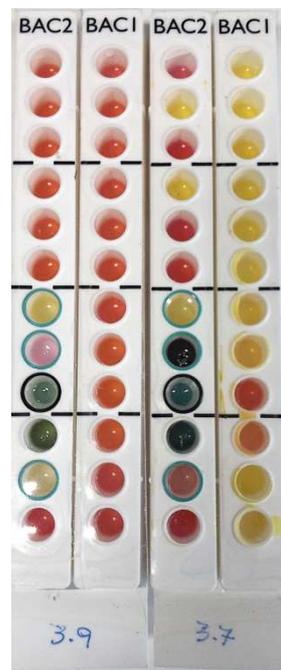


Fig 5 Test biochimico per l'identificazione degli isolati: E 3.7, E 3.9.

Dall'analisi del software è stato possibile identificare i seguenti isolati:

Campione	Identificazione (P)
E4.2	<i>Bacillus cereus</i> group (92.72%)
E4.4	<i>Bacillus licheniformis</i> (99.40%)
E4.6	<i>Bacillus brevis</i> (94.44%)
E3.7	<i>Bacillus licheniformis</i> (76.22%)
E3.9	<i>Bacillus firmus</i> (94.7%)

L'analisi filogenetica effettuata con le sequenze del 16S utilizzando il metodo della Maximum Likelihood col modello di Jukes-Cantor (1969), effettuata con Mega5 (Tamura *et al.*, 2011) mostra la

posizione e la distanza filogenetica dei vari isolati ottenuti da larve e uova di *M. incognita* (Fig. 3.6).

L'isolato E1.10 non è risultato appartenere ai due raggruppamenti indicati, mostrando una maggiore prossimità al genere *Chryseobacterium*. In base alla percentuale di identità nucleotidica con la specie più vicina (96 %) esso è stato considerato come specie non ancora descritta (Fig. 8 e 9). In relazione al gruppo di *Pseudomonas*, altri isolati (N2.6, N3.1b ecc.) si sono anch'essi separati, ma solo in conseguenza del sequenziamento parziale del 16S (Fig. 3.7).

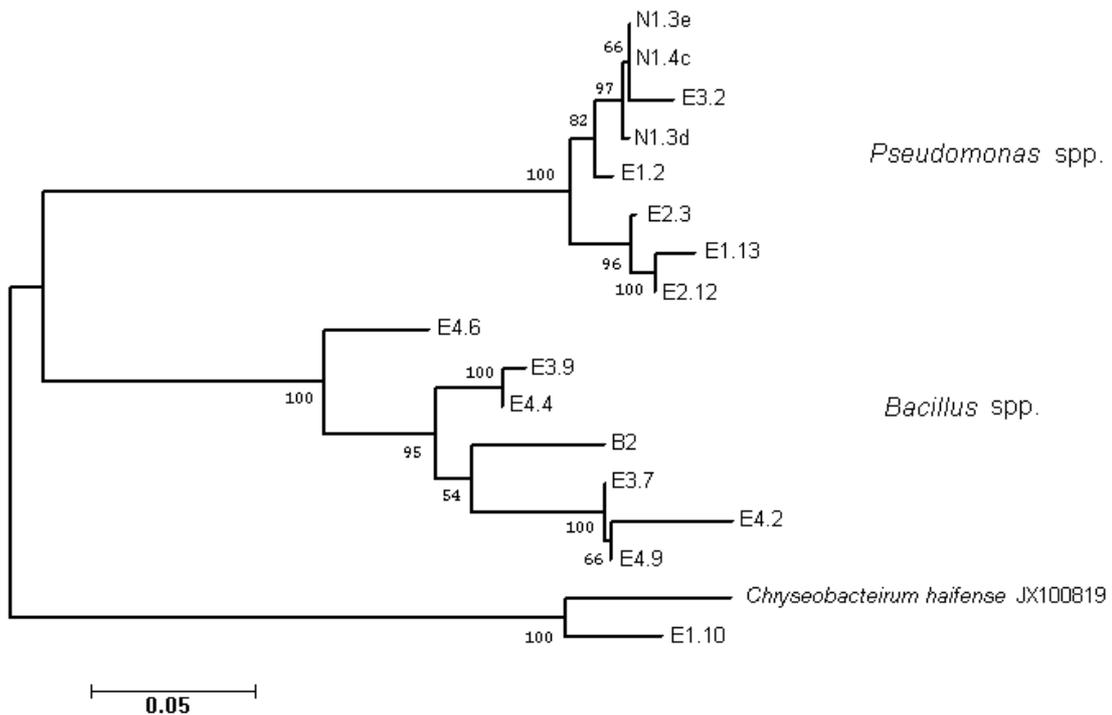


Figura 3.6 Distanza filogenetica degli isolati descritta dal dendrogramma di massima probabilità, costruito col metodo della Maximum Likelihood ed il modello di Jukes-Cantor. La percentuale di alberi in cui i taxa associati si raggruppano insieme è indicata in prossimità dei rami del dendrogramma, misurati in numero di sostituzioni per sito.

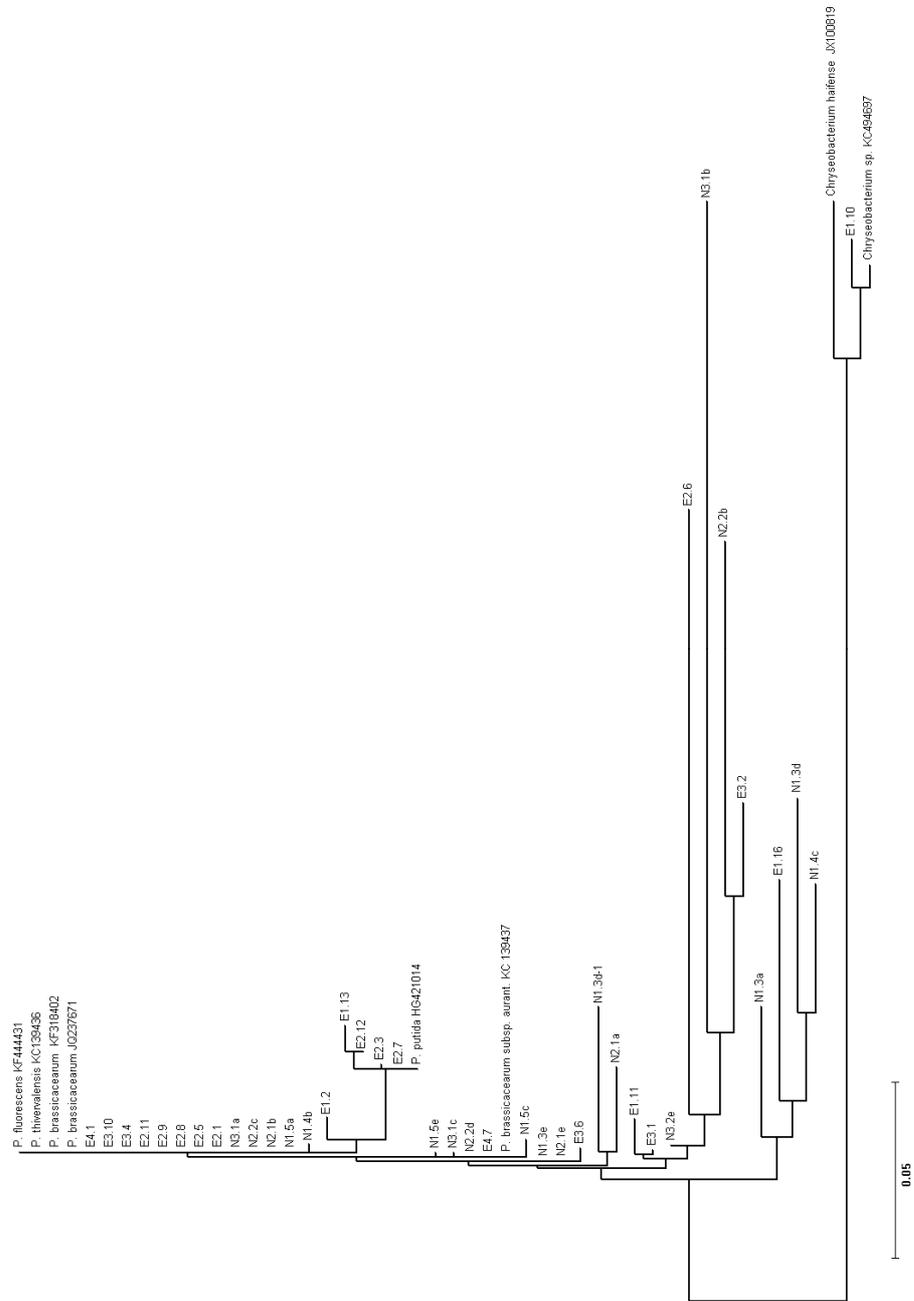


Figura 3.7 Distanza filogenetica degli isolati afferenti al genere *Pseudomonas*, descritta dal dendrogramma di massima probabilità costruito col metodo della Maximum Likelihood ed il modello di Jukes-Cantor. La lunghezza dei rami è in numero di sostituzioni per sito.

I dati osservati al termine dell'esperimento mostrano che gli isolati hanno avuto effetti diversi sulla popolazione di *M. incognita*. Gli isolati E1.16, E4.4, E3.7 hanno mostrato una riduzione significativa sul numero delle uova per g di radice, rispetto al controllo L4, (LSD-Test $P=0.05$). Gli isolati E4.6 e E 3.9 hanno indotto un aumento del numero di uova anche se non significativo. Gli isolati E4.2 e E4.6 hanno indotto una riduzione significativa sul numero delle J2/100cc di terreno, mentre gli isolati E2.4 e E3.7 hanno mostrato un leggero incremento sul numero delle J2. Inoltre tutti gli isolati non hanno mostrato una riduzione per l'indice di galle (RGI), rispetto al controllo L4 (Fig. 3.8-3.9).

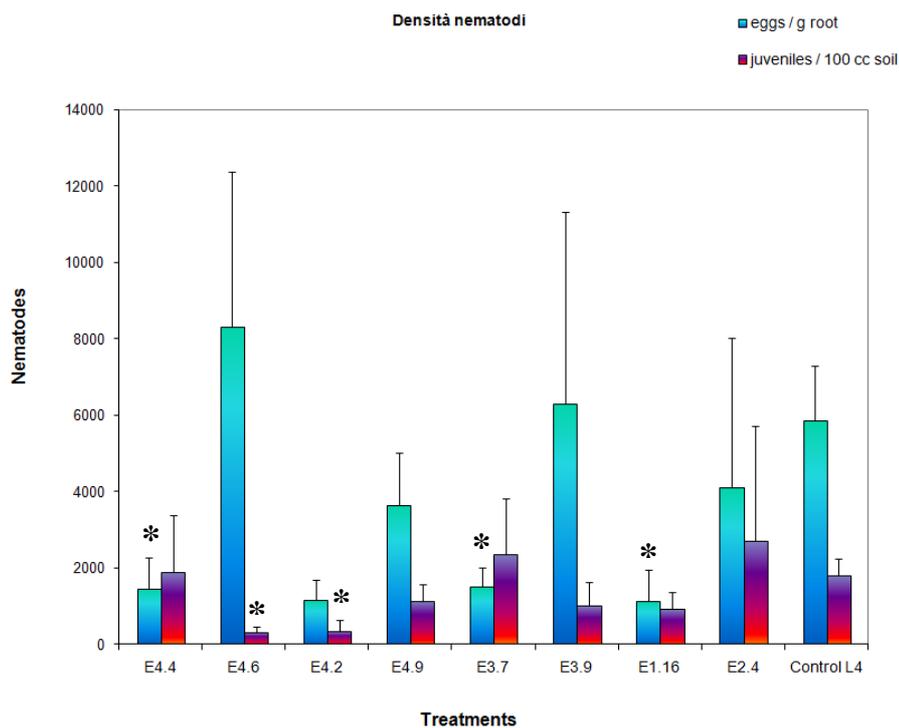


Fig. 3.8 Densità delle J2 in 100 cc di terreno e delle uova per g di radice su pomodoro cv Tondino, per i diversi isolati saggati. Gli asterischi indicano valori statisticamente significativi ($P<0.05$) rispetto al controllo L4.

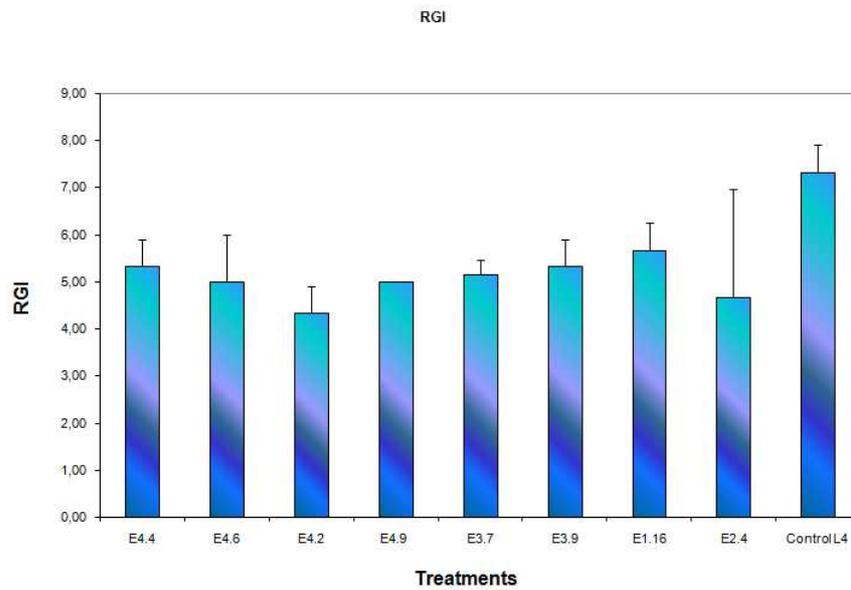


Fig. 3.9 Valori dell'indice di galle (RGI) osservati sulle radici di pomodoro inoculate, per i diversi isolati.

Riguardo il peso delle radici, l'isolato E3.9 ha incrementato significativamente (LSD test $P = 0.05$) lo sviluppo radicale in presenza di nematodi, rispetto al controllo. Anche gli isolati E4.4, E3.7, E1.16 e E2.4 hanno favorito lo sviluppo radicale in presenza del nematode, anche se non in modo significativo. Una riduzione del peso radicale è stata osservata per gli isolati E4.6 e E4.2. Non sono state osservate differenze significative per il peso secco delle piante (Fig. 3.10-3.11).

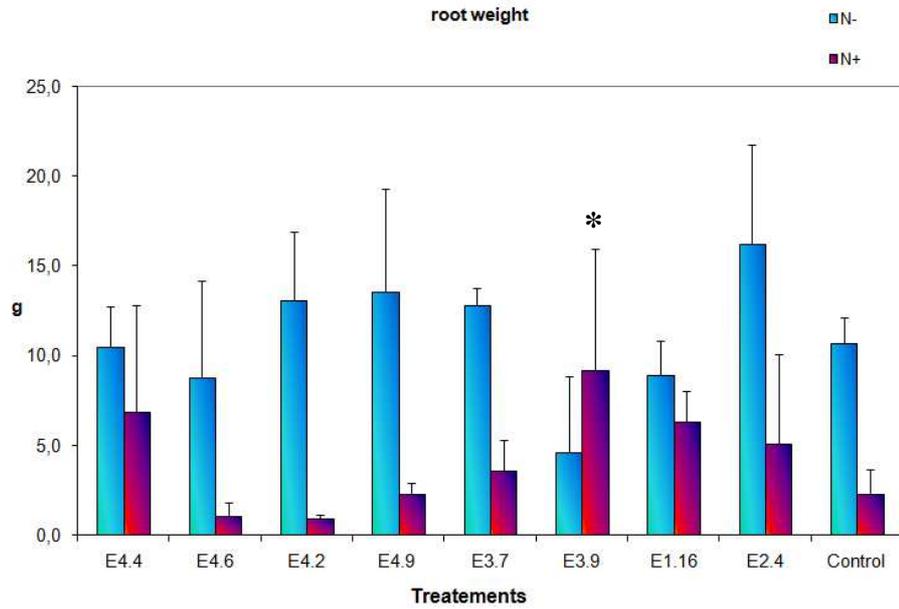


Fig. 3.10 Peso delle radici delle piante trattate con i diversi isolati, in presenza (N+) o assenza (N-) di *M. incognita*.

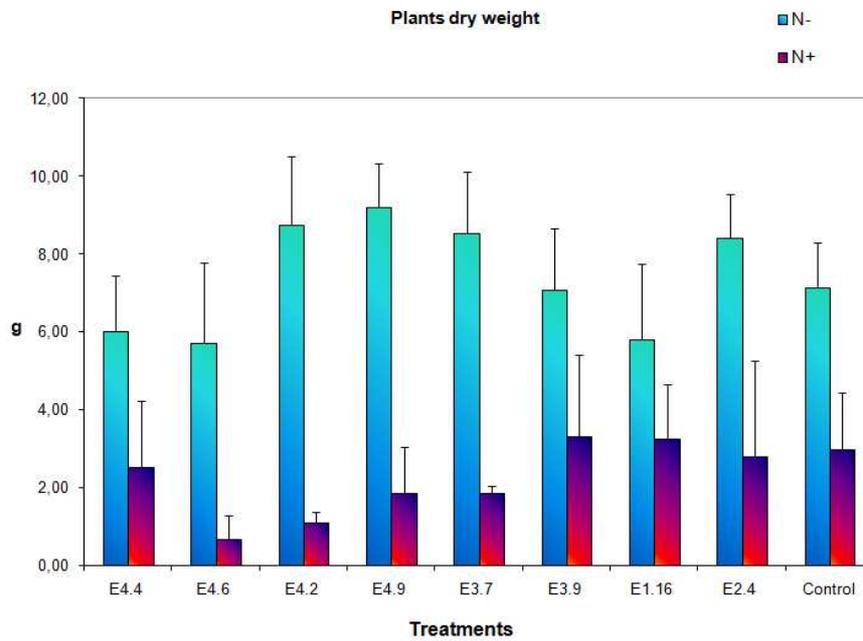


Fig. 3.11 Peso secco delle piante trattate con i diversi isolati, in presenza (N+) o assenza (N-) di *M. incognita*.

Diverse specie di *Bacillus* e *Pseudomonas* sono note come promotori della crescita e sono in grado di contrastare vari agenti patogeni responsabili d'importanti malattie delle piante. Esse sono in grado d'inibire l'azione di agenti patogeni e d'indurre la risposta di resistenza dell'ospite alla colonizzazione radicale da parte dei nematodi, stimolando in tal modo la crescita radicale (Kloepper *et al.*, 1980; Weller, 1988; Siddiqui & Mahmood, 1999; Siddiqui, 2006). I risultati ottenuti dalla prova effettuata con gli isolati batterici hanno confermato che la capacità di *Pseudomonas* di colonizzare la rizosfera è fondamentale per il controllo biologico di patogeni radicali (Bull *et al.*, 1991; Chin-A-Woeng *et al.*, 2000) e che essa si osserva anche con basse concentrazioni dell'ordine di $3.3 \cdot 10^2$ cellule/g di terreno. Molte specie di *Pseudomonas* tra cui *P. fluorescens*, *P. putida* e *P. syringae* sono riportate come possibili agenti di biocontrollo (Janisiewicz *et al.*, 1992). L'attività di biocontrollo da parte di *Pseudomonas* potrebbe essere dovuta sia ad un'azione diretta attraverso la produzione di antibiotici e altri metaboliti secondari, sia ad un'azione indiretta attraverso la stimolazione delle difese della pianta (Haas *et al.*, 2003; Raaijmakers *et al.*, 2002). Inoltre è stata riportata anche l'azione sinergica di alcune specie di *Pseudomonas*, come ad esempio *P. fluorescens*, che in formulazione con *Pochonia chlamydospora* ha mostrato di agire contro *M. incognita* (Rao *et al.*, 2004).

Anche vari batteri del genere *Bacillus* sono riportati come agenti di controllo biologico di nematodi (McSpadden Gardener, 2004). L'inoculazione di alcuni dei bacilli isolati in questo studio ha causato una riduzione del numero di J2, molto probabilmente dovuta alla capacità da parte dei batteri di produrre cellule in grado di aderire alla cuticola del nematode e/o di produrre sostanze tossiche per i nematodi. Gli studi sugli effetti nematocidi di *Bacillus* sono stati finalizzati

principalmente allo sviluppo di preparati batterici efficaci ed economicamente vantaggiosi contro nematodi fitoparassiti come *M. incognita* (Deviddas *et al.*, 1992).

Nonostante questi esperimenti siano stati condotti con terreno sterilizzato ed in vaso, le analisi dei dati ottenuti suggeriscono che i migliori isolati di *Pseudomonas* e *Bacillus* potrebbero avere un ruolo importante nella gestione e nel controllo di nematodi. Tuttavia, è necessario selezionare specifici ceppi batterici per una particolare specie di nematodi (in questo caso *M. incognita*) e comprenderne il meccanismo d'azione per una corretta applicazione. Sono previsti ulteriori studi per valutare l'utilizzo di questi isolati batterici come formulati da applicare in condizioni di pieno campo.

Introduzione

CONCLUSIONI

La caratterizzazione tassonomica e genetico-funzionale del microbioma del terreno, in funzione di diversi fattori di ordine fitopatologico, rappresenta l'obiettivo primario degli studi di metagenomica condotti. Gli esperimenti con le piattaforme NGS hanno generato una quantità enorme d'informazioni e ciò rappresenta una sfida per la gestione, l'archiviazione e, soprattutto, l'analisi dei dati (Pop e Salzberg, 2008).

Dall'analisi delle informazioni ottenute dal sequenziamento metagenomico è stato possibile definire ciascun campione come un microcosmo unico per quanto riguarda la composizione dei vari generi batterici presenti. Nonostante la comune origine del terreno di partenza a partire da un'azienda "bio", il grado di biodiversità osservato suggerisce una componente iniziale legata all'eterogenea distribuzione di specie nel terreno all'origine. Su questa base, il trattamento chimico e la presenza di *M. incognita* hanno indotto ulteriori cambiamenti sulla biodiversità del terreno, sia riducendo che incrementando alcuni generi rispetto ad altri. Particolarmente interessante risulta essere l'incremento di *Bacillus* spp. associati a nematodi nel trattamento L4 al tempo t_2 . L'importanza di questo gruppo è stata confermata anche dal secondo esperimento in cui, attraverso l'isolamento dei batteri dalle larve e uova di *Meloidogyne* spp., si sono potute identificare varie specie di *Bacillus*.

L'analisi metagenomica ha rilevato una significativa variazione nella biodiversità batterica in relazione ai trattamenti effettuati sullo stesso terreno. Questo risultato, non ipotizzabile a priori in considerazione del fatto che il terreno di partenza era lo stesso, è stato

rivelato con dati quantitativi e qualitativi nel presente lavoro, confermando che la biodiversità batterica del terreno non sia da considerare come un dato statico e definitivo, ma come un elemento soggetto ad una serie di cambiamenti indotti da numerose variabili ambientali, presenti anche su scale e volumi molto ridotti. Queste includono come predominanti i fattori legati alle attività dell'uomo (operazioni colturali, uso di sostanze chimiche, presenza di organismi fitopatogeni, ecc.) ed altri fattori come la presenza di radici e lo sviluppo d'invertebrati nel terreno.

Inoltre, gran parte della biodiversità non ancora esplorata racchiude certamente specie utili dal punto di vista agrario, come per altro indicato dalle prove condotte in serra con alcuni isolati. Tuttavia, l'analisi del grado di biodiversità osservata in entrambi gli esperimenti indica che una parte significativa, se non maggioritaria, delle specie batteriche sequenziate è ancora poco conosciuta dal punto di vista tassonomico. Ciò è indicato dalla presenza di OTU appartenenti ai generi *Pseudomonas* e *Bacillus* per le quali non è possibile ancora assegnare una specie, come dimostrato anche dalle analisi filogenetiche eseguite. In parallelo le stesse conclusioni possono essere dedotte dalla presenza di numerose sequenze osservate nell'analisi metagenomica per le quali non è ancora possibile definire una classificazione certa.

I risultati dei test svolti sui nematodi suggeriscono che alcuni isolati selezionati possono essere potenzialmente utilizzabili in alternativa all'uso di agrofarmaci, con possibili ricadute produttive ed industriali per via della diffusione dei nematodi galligeni su colture di grande interesse agroalimentare. Infine, le basi di dati e le conoscenze prodotte sulla biodiversità microbica del terreno possono essere considerate come indicatori della qualità e stabilità del suolo, sia dal punto di vista della produzione agraria che dal punto di vista biologico ed ecologico

più generale. Pertanto è auspicabile che questo genere di studi possa essere replicato in altre situazioni e con altri terreni al fine di costituire una base informativa ampiamente utilizzabile in diverse circostanze quali la gestione della microbiologia della rizosfera, la lotta contro parassiti e patogeni tellurici, l'analisi dell'impatto di diverse pratiche agronomiche e di tipologie di gestione (aziende biologiche o convenzionali), l'effetto dell'inquinamento o lo studio del cambiamento climatico e di altre variabili ambientali.

Bibliografia

Bibliografia

- Abad P., *et al.* (2008). Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. *Nature Biotechnology* 26: 909–915.
- Altschul S.F., *et al.* (1997). Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acid Research* 25: 3389–3402.
- Backer G.C., Smith J.J., Cowan D.A. (2003). Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods* 55: 541–555.
- Bartram A.K., Lynch M.D., Stearns J.C., Moreno-Hagelsieb G., Neufeld J.D. (2011). Generation of multimillion-sequence 16S rRNA gene libraries from complex microbial communities by assembling paired-end Illumina reads. *Applied Environmental Microbiology* 77: 3846–3852.
- Bloem J., Breure A. M. (2003). Microbial indicators. In: *Bioindicators/biomonitoring - principles, assessment, concepts*. B.A. Markert, A.M. Breure e H.G. Zechmeister (Eds). Elsevier, Amsterdam: 259-282.
- Bokhari F.M. (2009). Efficacy of some *Trichoderma* species in the control of *Rotylenchulus reniformis* and *Meloidogyne javanica*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 42: 361–369.
- Bridge J., Page S.L.J. (1980). Estimation of root knot infestation levels on roots using a rating chart. *Tropical Pest Management* 26: 296–298.
- Bull, C. T., Weller, D. M., and Thomashow, L. S. (1991). Relationship between root colonization and suppression of *Gaeumannomyces graminis* var *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* strain 2-79. *Phytopathology* 81:954–959.
- Campbell P.J., *et al.* (2008). Identification of somatically acquired rearrangements in cancer using genome-wide massively parallel paired-end sequencing. *Nature Genetics* 40: 722–729.

- Caporaso J.G., *et al.* (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods* 10: 1038/nmeth.f.303.
- Caporaso J.G., *et al.* (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 108: 4516–4522.
- Chen Z.X., Dickson D.W., McSorley R., Mitchell D.J., Hewlett T.E. (1996). Suppression of *Meloidogyne arenaria* race 1 by soil application of endospores of *Pasteuria penetrans*. *Journal of Nematology* 28: 159–168.
- Ciancio A. (2005). Current perspectives in nematode regulation by microbial soil communities. *Nematropica* 35, 67 [Atti XXXVII Annual Meeting ONTA, 17-21 ottobre 2005, Viña del Mar, Cile].
- Chin-A-Woeng, T. F. C., Bloemberg, G. V., Mulders, I. H. M., Dekkers, L. C., and Lugtenberg, B. J. J. (2000). Root colonization by phenazine-1-carboxamide-producing bacterium *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 is essential for biocontrol of tomato foot and root rot. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13:1340–1345.
- Ciancio A. (2008). *Modeling nematodes regulation by bacterial endoparasites*. In: Integrated management and biocontrol of vegetable and grain crops nematodes, A. Ciancio e K.G. Mukerji (Eds). Springer, The Netherlands: 315–331.
- Ciancio A., Molinari S., D'Addabbo T. (2009). Innovazioni nella difesa delle colture da nematodi fitoparassiti. *I Georgofili - Quaderni VII*: 945–973.
- Claesson M.J., *et al.* (2010). Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions. *Nucleic Acids Research* 38: e200.
- Deviddas P. and Rehberger LA. (1992). The effects of exotoxin (Thuringiensin) from *Bacillus thuringiensis* on *Meloidogyne incognita* and *Caenorhabditis elegans*. *Plant Soil*. 145: 115-120.

- De Mesel I., Derycke S., Moens T., Van der Gucht K., Vincx M., Swings J. (2004). Top-down impact of bacterivorous nematodes on the bacterial community structure: a microcosm study. *Envir. Microbiol.* 6: 733–744.
- Dohm J. C., Lottaz C., Borodina T., Himmelbauer H. (2008). Substantial biases in ultra-short read data sets from high-throughput DNA sequencing. *Nucleic Acids Research* 36: e105.
- Dubreuil G., Magliano M., Deleury E., Abad P., Rosso M. N. (2007). Transcriptome analysis of root-knot nematode functions induced in the early stages of parasitism. *New Phytologist* 176: 426–436.
- Eisenback J.D., Hirschmann H., Sasser J.N., Triantaphyllou A.C. (1981). *A guide to the four most common species of root-knot nematodes, (Meloidogyne species) with a pictorial key.* A Coop. Publ. Depts. Plant Pathol. and Genetics and U.S. Agency for International Development, Raleigh, NC.
- Ferris H., Bongers T., de Goede R.G.M. (2001). A framework for soil food web diagnostics: extension of the nematode faunal analysis concept. *Applied Soil Ecology* 18: 13–29.
- Gowen S., Tzortzakakis E. (1994). Biological control of *Meloidogyne* spp. with *Pasteuria penetrans*. *Bulletin EPPO* 24: 495–500.
- Haas D., Keel C. (2003). Regulation of antibiotic production in rootcolonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 41: 117-153.
- Huber J.A., *et al.* (2007). Microbial population structures in the deep marine biosphere. *Science* 318: 97–100.
- Hussey R.S, Grundler F.M.W. (1998). Nematode parasitism of plants. In: The physiology and biochemistry of free-living and plant-parasitic nematodes. R. N. Perry e D. J. Wright (Eds). CABI, Wallingford, UK: 213–243.
- Jaffee B.A. (2003). Correlations between most probable number and activity of nematode-trapping fungi. *Phytopathology* 93: 1599–1605.

- Janisiewicz, W. J., and Marchi, A. (1992). Control of storage rots on various pear cultivars with saprophytic strain of *Pseudomonas syringae*. *Plant Dis.* 76: 555-560.
- Jones, M.G.K. (1981). Host cell responses to endoparasitic nematode attacks: Structure and function of giant cells and syncytia. *Annals of Applied Biology* 97: 353–372.
- Jukes T.H., Cantor C.R. (1969). *Evolution of protein molecules*. New York, Academic Press: 21–132.
- Keijser B.J.F., *et al.* (2008). Pyrosequencing analysis of the oral microflora of healthy adults. *Journal of Dental Research* 87: 1016–1020.
- Kerry B.R. (2000). Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of plant-parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology* 38: 423–424.
- Kloepper JW. Leong J. Teintze M. Schroth MN. (1980) Enhanced plant growth by plant growth promoting rhizobacteria. *Nature* 286: 885 – 886.
- Korbel J.O., *et al.* (2007). Paired-end mapping reveals extensive structural variation in the human genome. *Science* 318: 420-426.
- Ladygina N., *et al.* (2009). Diversity of bacteria associated with grassland soil nematodes of different feeding groups. *FEMS Microbiol Ecol* 6: 53–61
- Liu Z., Lozupone C., Hamady M., Bushman F.D., Knight R. (2007). Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. *Nucleic Acids Research* 35: e120.
- Liu Z., DeSantis T.Z., Andersen G.L., Knight R. (2008). Accurate taxonomy assignments from 16S rRNA sequences produced by highly parallel pyrosequencers. *Nucleic Acids Research* 36: e120.
- Mankau R. (1980). Biological control of nematode pests by natural enemies. *Annual Review of Phytopathology* 18: 415-440.
- Mankau R. (1975). *Bacillus penetrans* n. comb. causing a virulent disease of plant-parasitic nematodes. *J. of Invertebrate Pathology* 71: 333-339.

- Masella A.P., Bartram A.K., Truszkowski J.M, Brown D.G, Neufeld J.D. (2012). PANDAseq: PAired-eND assembler for Illumina sequences. *BMC Bioinformatics* 13: 31.
- McSpadden Gardener B. B. (2004). Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in Agricultural Systems. *Phytopathology* 94: 1252-1258
- Metting F.B. (1993). Structure and physiological ecology of soil microbial communities. In: *Soil Microbial Ecology. Applications in Agricultural and Environmental Management*. Metting, F.B. (Ed.), Marcel Dekker, NY: 3–25.
- Nannipieri P., et al. (2003). Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science* 54: 655–670.
- Nicholson W. L. (2002). Roles of *Bacillus* endospores in the environment. *CMLS Cellular and Molecular Life Sciences* 59:410-416
- Nunan N., et al. (2002). In situ spatial patterns of soil bacterial populations, mapped at multiple scales, in an arable soil. *Microbial Ecology* 44:296–305.
- Pace N. R., Olsen G.J., Woese C.R. (1986). Ribosomal RNA phylogeny and the primary lines of evolutionary descent. *Cell* 45:325–326.
- Pierson, L. S., III, and Pierson, E. A. 2007. Roles of diffusible signals in communication among plant-associated bacteria. *Phytopathology* 97: 227-232.
- Poinar GO Jr, Hansen E.D. (1986). Associations between nematodes and bacteria. *Helminth. Abstr. Ser. B* 55: 61–79.
- Polesani M., et al. (2008). cDNA-AFLP analysis of plant and pathogen genes expressed in grapevine infected with *Plasmopara viticola*. *BMC Genomics* 9:142-155.
- Pop M., Salzberg S.L.(2008). Bioinformatics challenges of new sequencing technology. *Trends in Genetics* 24:142–149.

- Raaijmakers, J. M., Vlami, M., and de Souza, J. T. (2002). Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81: 537-547
- Raaijmakers J.M., Paulitz T.C., Steinberg C., Alabouvette C., Moenne-Loccoz Y. (2009). The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant and Soil* 321:341-361.
- Ranjard L., Richaume A.S. (2001). Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil. *Research in Microbiology* 152:707–716.
- Rao M.S., Dhananjay Naik, Shylaja M. (2004). Bio-intensive management of root-knot nematodes on bell pepper using *Pochonia chlamydosporia* and *Pseudomonas fluorescens*. *Nematol. medit.* 32: 159-163
- Sambrook J., Russell D.W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Volume 1.m CSHL Press, NY: 2344 pp.
- Sayre R.M., Starr M.P. (1988). Bacterial diseases and antagonism of nematodes. In: *Diseases of nematodes*. G.O. Poinar e H. B. Jansson (Eds). CRC Press, Vol. I: 69–101.
- Sasser J.N. (1980). Root knot nematodes: a global menace to crop production. *Plant Disease* 64: 36–41.
- Sasser J.N. (1989). Economic importance of plant parasitic nematodes. In: *The farmer hidden enemy*. North Carolina State University, Raleigh, USA.
- Sessitsch A., Weilharter A., Gerzabek M.H., Kirchmann H., Kandeler E. (2001). Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. *Applied Environmental Microbiology* 67, 4215–4224.
- Sharon E., *et al.* (2001). Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 91:687-693.

- Siddiqui ZA. (2006). PGPR: Prospective biocontrol agents of plant pathogens. In: Siddiqui ZA, editor. PGPR: Biocontrol and Biofertilization. *The Netherlands: Springer*. pp 111–142
- Siddiqui ZA., Mahmood I. (1999). Role of bacteria in the management of plant parasitic nematodes, *A Review. Bioresource Technol* 69: 167–179.
- Sogin M.L., *et al.* (2006). Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 103: 12115-12120.
- Sleator R.D., Shortall C., Hill C. (2008). Metagenomics. *Letters in Applied Microbiology* 47: 361–366.
- Standing D., Knox O.G.G., Mullins C.E., Killham K.K., Wilson M.J. (2006). Influence of nematodes on resource utilization by bacteria – an in vitro study. *Microbiol. Ecol.* 52: 444–450.
- Stirling G. R., 1991. Biological control of plant parasitic nematodes: progress, problems and prospects. CAB International, Wallingford, UK, 282 pp.
- Talavera M., Ito K., Mizukubo T. (2002). Combined application of *Glomus* sp. and *Pasteuria penetrans* for reducing *Meloidogyne incognita* (Tylenchida: Meloidogynidae) populations and improving tomato growth. *Applied Entomology and Zoology* 37:61–67.
- Tamura K., *et al.* (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- Thorne G. (1961). Principles of Nematology. *McGraw-Hill Book Company*, London 553 pp.
- Torsvik V., Goksøyr J., Daae F.L. (1990). High diversity in DNA of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 56:782-787.

- Turnbaugh P.J., *et al.* (2009). The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Science Translational Medicine* 1: 6ra14.
- Turnbaugh P.J., Bäckhed F., Fulton L., Gordon J.I. (2008). Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe* 3: 213–223.
- Urich T., *et al.* (2008). Simultaneous assessment of soil microbial community structure and function through analysis of the meta-transcriptome. *PLoS One* 3: e2527.
- Viaene N.M.M., Abawi G.S. (2000). *Hirsutella rhossiliensis* and *Verticillium chlamydosporium* as biocontrol agents of the root-knot nematode *Meloidogyne hapla* on lettuce. *Journal of Nematology* 32:85-100.
- Vogel T.M., *et al.* (2009). TerraGenome: a consortium for the sequencing of a soil metagenome. *Nature Review Microbiology* 7:252.
- Wei J.Z., *et al.* (2003). *Bacillus thuringiensis* crystal proteins that target nematodes. *PNAS*, 100:2760 – 2765.
- Weller DM. (1988). Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annu Rev Phytopathol* 26: 379 – 407
- Whittaker R. H. (1960). Vegetation of the Siskiyou Mountains, Oregon and California. *Ecological Monographs*, 30, 279–338.