

Metagenomica nella rizosfera: il ruolo dei nematodi

INTRODUZIONE

La pianta è una fonte di sostentamento essenziale per il biota del suolo. Attraverso il materiale organico derivante dalla parte aerea, che costituisce la lettiera, e quello derivante dalle radici, essudati radicali, cellule in disfacimento e mucigel, la pianta regola l'abbondanza e la distribuzione degli organismi edafici. Attraverso l'essudazione radicale, la regione del suolo immediatamente intorno alle radici si arricchisce di molecole a basso peso molecolare e carboidrati facilmente degradabili, fornendo le basi per una complessa rete trofica comprendente batteri, funghi, protozoi, nematodi e microartropodi (Viketoft et al., 2005). Questa regione del suolo è stata definita nel 1904 con il termine rizosfera e il suo spessore dipende sostanzialmente dalla struttura del suolo e dalla specie vegetale. Nella rizosfera avvengono le principali trasformazioni legate ai cicli biogeochimici degli elementi e al riciclo dei nutrienti, e viene considerata come una componente essenziale per il mantenimento e la funzionalità dell'ecosistema suolo. La rizosfera inoltre presenta una notevole resistenza agli stress abiotici e meccanici dovuti a erosione e inondazioni (Jeffery et al., 2010).

I nematodi sono probabilmente il gruppo di animali più abbondanti e che ha riscosso maggior successo nel corso dell'evoluzione, affermandosi in tutti gli ambienti sia acquatici che terrestri (Khan e Kim, 2007). Sono piccoli organismi vermiformi che occupano una posizione centrale all'interno della catena trofica del suolo dove ne occupano tutti i livelli e dove sono coinvolti, direttamente o indirettamente, in numerosi processi ecologici. Nel suolo i ne-

* Centro di ricerca per le Colture Industriali, CRA-CIN, Bologna

** Centro di ricerca per l'Agrobiologia e la Pedologia, CRA-ABP, Firenze

matodi possono condurre una vita libera, cibandosi di batteri, funghi o altri nematodi, oppure possono vivere come parassiti di piante o animali. I vari gruppi trofici rispondono in maniera diversa alle diverse condizioni ambientali e alle diverse pratiche agronomiche. Anche le proprietà chimiche e fisiche del suolo contribuiscono nel determinare la diversità sia tassonomica che funzionale della comunità nematodica. Per tale ragione la fauna nematodica risulta essere un buon indicatore nel predire gli effetti sull'agroecosistema delle diverse pratiche agricole e gestioni del suolo (Sanchez-Moreno et al., 2008).

L'identificazione dei nematodi è stata fino a ora principalmente basata sulla microscopia ottica, lasciando le analisi ecologiche sulla comunità del suolo spesso ambigue e superficiali. Una identificazione classica a livello di specie, genere, famiglia, necessita di un elevato livello di conoscenza delle caratteristiche morfologiche di ciascun gruppo e molto tempo per poter ottenere risultati affidabili. Vi è poi il problema che spesso l'identificazione della specie sia possibile solo quando l'individuo si trova allo stadio di adulto, attraverso il riconoscimento di speciali strutture maschili e/o femminili, che rappresenta solo una piccola percentuale dell'intera comunità (Floyd et al., 2002; Donn et al., 2008; Chea et al., 2010). Pertanto i nematodi sono stati da sempre considerati tra gli organismi più difficili da identificare.

Le tecniche di biologia molecolare rappresentano un metodo alternativo alla caratterizzazione classica della biodiversità della fauna nematodica del suolo. L'utilizzo di queste tecniche ci permette di definire dei profili biologici specifici evitando la necessità di coltivare comunità complesse, riducendo il tempo di indagine e la necessità di competenze tassonomiche specifiche (Donn et al., 2008). L'applicazione di tecniche basate sull'amplificazione PCR alla comunità nematodica del suolo ha permesso di risolvere diverse ambiguità morfologiche mettendo in luce l'esistenza di una sorprendente biodiversità e di affascinanti relazioni tra i vari organismi abitanti la rizosfera (Cardon e Gage, 2006; Porazinska et al., 2009). Recentemente l'analisi metagenomica applicata al mondo dei procarioti ha permesso di espandere le conoscenze di questi microrganismi di diversi ordini di grandezza e similamente l'analisi metagenomica applicata ai nematodi offrirà la possibilità di espandere enormemente la nostra conoscenza di un'altra componente importante del biota del suolo (Porazinska et al., 2009).

I NEMATODI

I nematodi costituiscono un gruppo importante di metazoi, sono organismi vermiformi, non segmentati, hanno un corpo cilindrico o fusiforme, rotondo



Fig. 1 *Nematode fitoparassita Bursaphelencus* (foto di T. Irdani)

in sezione trasversale e sono generalmente trasparenti (fig. 1). Essi sono diffusi in pressoché tutti gli ambienti compatibili con la vita, ma sono stati isolati anche da ambienti estremi: artici e desertici. Si stima che al phylum dei nematodi appartengano da 1 a 10 milioni di specie diverse e di queste circa 25.000 sono state descritte in letteratura (Dieterich e Sommer, 2009; Jeffery et al., 2010). Nel suolo i nematodi sono considerati tra i più abbondanti organismi animali sia per ricchezza di specie che per abbondanza, e si suppone possano superare il milione di individui per metro quadro (Dieterich e Sommer, 2009; Porazinska et al., 2009; Jeffery et al., 2010). In questo ambiente essi occupano un'ampia varietà di nicchie ecologiche vivendo soprattutto come parassiti o predatori, oppure presentando esigenze trofiche non ben precisate (onnivori).

I nematodi sono considerati specie chiave nell'ecosistema suolo essendo implicati in processi come la decomposizione della sostanza organica e il riciclo dei nutrienti. Influiscono sulla composizione della comunità edafica nutrendosi di microrganismi e facilitandone la dispersione (adesi sulla loro superficie o in forma vitale all'interno del loro intestino). Con la loro attività i nematodi contribuiscono a modificare la struttura, stabilità e regime idrico (porosità) del suolo (Chen et al., 2010; Jeffery et al., 2010). Sono organismi importanti nella catena trofica del suolo dove ne occupano tutti i livelli, si nutrono di specie vegetali, cellule batteriche e ife fungine e possono a loro volta essere fonte di cibo per animali a un livello trofico superiore. In base alla disponibilità di cibo o allo stadio di crescita (giovane o adulto) alcune specie di nematodi (onnivori) possono nutrirsi di diverse fonti alimentari. *Dorylaimus* può agire come predatore e mediante un grosso dente cavo bucare altri organismi animali e succhiarne il contenuto, oppure, quando la prima fonte di sostentamento viene a mancare, nutrirsi di batteri e funghi (Jeffery et al., 2010). I nematodi batteriofagi e fungivori del suolo svolgono un ruolo fondamentale nel controllo della microflora edafica e nel riciclo dei nutrienti. In certi ecosistemi è stato visto che questo gruppo di nematodi contribuisce per valori superiori al 40% alla mineralizzazione dei nutrienti stimolando la crescita vegetale (Horiuchi et al., 2005).

I nematodi predatori rappresentano circa il 5% della comunità nematodica del suolo e appartengono a 4 gruppi tassonomici: *Mononchidae*, *Dorylaimidae*, *Dyplogasteridae* e *Aphelenchidae*. Ciascun gruppo presenta una specifica strategia alimentare, nutrendosi di una più o meno ampia varietà di organismi. Sono dotati di un caratteristico apparato boccale o di un dente cavo che viene utilizzato per bucare le prede e succhiarne il contenuto (Khan e Kim, 2007). I nematodi predatori sono potenziali agenti di biocontrollo di specie animali fitoparassite. Le caratteristiche fondamentali da ricercare per scopi di biocontrollo sono efficienza nella predazione, un ciclo vitale breve e un tasso elevato di riproduzione, fattori che aiutano un predatore a mantenere alta la sua popolazione a differenza di molti fitoparassiti che posseggono un ciclo vitale lungo (30-40 giorni; Khan e Kim, 2007). Il gruppo dei *Mononchidae* si è dimostrato efficiente nella riduzione di popolazioni di fitoparassiti quali *Tylenchulus semipenetrans*, *Globodera rostochiensis*, *Meloidogyne incognita* ma risulta molto suscettibile alle fluttuazioni ambientali, ha un basso tasso di riproduzione, un ciclo di vita lungo e cannibalismo che ne limitano fortemente l'impiego (Khan e Kim, 2007). I predatori dorylamidi e diplogasteridi sono molto selettivi ed efficienti nella ricerca delle prede suggerendo la presenza di attrattori chemiotattici e per questo promettenti agenti di biocontrollo. In

particolare il gruppo dei *Dorylaimidae* risulta il miglior candidato in quanto ampiamente e abbondantemente distribuito nel suolo (Khan e Kim, 2007). Esistono tuttavia dei meccanismi di resistenza che permettono alle prede di difendersi dai predatori come una spessa cuticola (*Hoplolaimus*), una matrice gelatinosa (*Meloidogyne*), secrezioni tossiche (*Helicotylenchus*) e rapidi movimenti ondulatori del corpo (*Rhabditis*) (Khan e Kim, 2007).

Molti taxon di nematodi del suolo rappresentano una delle più grandi fonte di stress biotico per le piante agrarie causando ogni anno ingenti perdite economiche stimate intorno agli 80 miliardi di dollari (Holterman et al., 2009). I danni provocati alle colture possono essere diretti, dovuti alle lesioni e alle alterazioni che i nematodi arrecano agli organi vegetali, o indiretti che derivano dalla capacità dei nematodi di disseminare e inoculare nelle piante funghi, batteri o virus patogeni (Marinari Palmisano e Irdani, 1996). I nematodi che si cibano di radici o di altre parti della pianta (fitofagi) sono i maggiori e diretti responsabili della riduzione della performance vegetale, facilitano inoltre la successione ecologica di altre comunità nematodiche come i fitoparassiti che invadono l'apparato radicale (Mck Bird, 2004; Bonkowski et al., 2009; Dieterich e Sommer, 2009). I nematodi fitoparassiti sono pesti cosmopolite, attaccano sia gli organi aerei che quelli ipogei, compresi bulbi e tuberi, dove si nutrono a spese della pianta (Barker et al., 1994). Essi hanno un'azione devastante, riducendo la funzionalità della pianta e di conseguenza la produttività della coltura e il valore di mercato del prodotto finale. Le specie fitoparassite possono essere distinte in ectoparassite, che si nutrono dall'esterno, ed endoparassite, che penetrano entro gli organi della pianta. Le prime (*Paratrichodorus*, *Hirschmaniella*) sono provviste di uno stiletto boccale, protrattile, cavo all'interno e connesso direttamente con l'esofago, che inseriscono nei tessuti della pianta succhiandone il contenuto. Le dimensioni e la forma dello stiletto variano a seconda del nematode, per esempio *Trichodorus* si nutre di cellule epidermiche e ha uno stiletto corto mentre *Xiphinema* o *Longidorus* presentano uno stiletto molto più lungo e possono penetrare negli strati più profondi della corteccia radicale (Bonkowski et al., 2009). Le specie endoparassite appartenenti alla famiglia dei *Tylenchidae* sono la causa della maggior parte dei danni a livello economico delle colture agrarie, e in particolare le specie appartenenti ai generi *Meloidogyne*, *Heterodera* e *Globodera* che inducono modificazioni nel tessuto vegetale con la formazione di sofisticate strutture con cui alimentarsi: galle (fig. 2) o cisti (Mck Bird, 2004; Dieterich e Sommer, 2009). Quasi tutte le specie sono polifaghe e hanno una cerchia più o meno ampia di piante ospiti, condizione questa che ne favorisce la persistenza nel suolo. Negli intervalli fra colture o, in condizioni

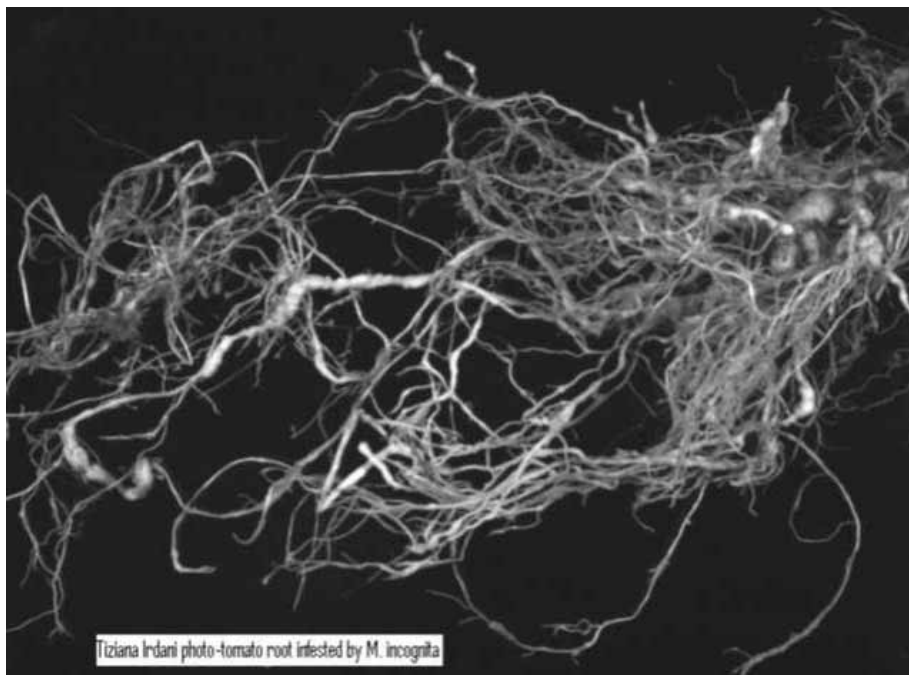


Fig. 2 Radici di pomodoro infestate da *M. incognita* (foto di T. Irdani)

ambientali avverse, molte specie sopravvivono all'interno di piante spontanee o, entro parti di piante rimaste nel terreno, avvalendosi spesso di una notevole capacità di resistere in uno stato di quiescenza al disseccamento, agli estremi termici e all'inedia.

Le interazioni che intercorrono a livello della rizosfera tra nematode fitoparassita e pianta ospite, sono alla base di un complesso scambio di segnali tra i due organismi (Bais et al., 2004). Per trovare le radici e iniziare a invaderle i nematodi fitoparassiti vengono attratti chemiotatticamente da gradienti di concentrazione di specifiche molecole secrete dalle radici oppure da determinanti specifici delle superfici radicali (Bonkowski et al., 2009). Una volta localizzata la regione vegetale da invadere entrano nella radice secernendo un'ampia varietà di molecole enzimatiche (cellulasi, pectinasi, estensine) che degradano e attaccano specificatamente il tessuto ospite. Inizialmente si riteneva che questa capacità di degradare le pareti cellulari vegetali dipendesse dalla presenza di batteri cellulolitici simbiotici mentre in realtà circa un decina di anni fa, è stato scoperto che i nematodi fitoparassiti sono in grado di produrre e secernere cellulasi, unico caso a tutt'oggi messo in luce nel regno animale. Dalla identificazione della prima cellulasi di origine nematodica a

ora sono stati identificati numerosi altri enzimi degradanti la parete vegetale (Mitrev et al., 2009; Dietrich e Sommer, 2009). Tutte le cellulasi scoperte all'interno della famiglia *Tylenchidae* appartengono a una sola famiglia di glicosil-idrolasi, e una vasta gamma di batteri del suolo possiede questo tipo di cellulasi. La similarità riscontrata tra i geni nematodici codificanti per tali cellulasi e quelli appartenenti a organismi batterici e l'assenza di questi enzimi degradativi in nematodi a vita libera, ha portato la comunità scientifica a ipotizzare che questi geni possano essere stati acquisiti nel corso dell'evoluzione da batteri del suolo mediante un meccanismo di trasferimento genico orizzontale (Dietrich e Sommer, 2009). Il meccanismo di trasferimento genico orizzontale (Horizontal Gene Transfer, HGT) è frequente tra batteri e archea, mentre è un evento reputato piuttosto raro se avviene tra individui procarioti ed eucarioti o all'interno degli stessi eucarioti (Mitrev et al., 2009). L'acquisizione via HGT richiede un contatto fisico tra donatore e ricevente che può essere raggiunto per esempio mediante una relazione trofica o ospite-simbionte. Tale meccanismo di acquisizione genica rimane però incerto ma potrebbe essere una chiave dell'adattamento dei nematodi al parassitismo vegetale (Dietrich e Sommer, 2009).

Molti nematodi endoparassiti una volta penetrati all'interno della radice inducono un sostanziale cambiamento nel pattern di espressione genica della pianta e la formazione di strutture vegetali specializzate (per esempio le cellule giganti indotte dall'infezione di *M. incognita*) caratterizzate da un'intensa attività metabolica che provvedono al nutrimento del nematode (Bonkowski et al., 2009). Tuttavia le piante non subiscono passivamente l'invasione del nematode ma hanno evoluto strategie difensive atte a respingere i nematodi, così mentre i nematodi sintetizzano molecole ad azione litica nei confronti della parete delle cellule vegetali, stimolano contemporaneamente la pianta a sintetizzare altre molecole endogene con azione litica nei confronti delle cellule nematodiche (Bonkowski et al., 2009).

LA RIZOSFERA E LE INTERAZIONI PIANTA - NEMATODE - MICRORGANISMO

Per anni ci siamo limitati a considerare la fauna della rizosfera solo come deleteria perché legata esclusivamente all'insorgere di malattie nella piante coltivate, mentre la connessione tra radici vegetali e comunità nematodica è più complessa che una semplice relazione tra produttori e consumatori. La fauna del suolo influisce positivamente sulla fertilità del suolo e la mineralizzazione dei nutrienti stimolando la produzione primaria (Huhta, 2007). Dal

canto loro le radici giocano un ruolo attivo nel difendere se stesse dall'attacco di organismi erbivori e mediante il rilascio di essudati radicali orchestrano le complesse interazioni che si svolgono nella rizosfera (Bonkowski et al., 2009; Napoli et al., 2008). Le specie vegetali agiscono direttamente e indirettamente sul numero, composizione e funzionalità della comunità batterica così come sulla fauna nematodica: la pianta rilascia essudati che stimolano la crescita dei batteri, la cui abbondanza richiama batteriofagi che cibandosi di batteri contribuiscono al rilascio di sostanze nutritive utili per la crescita vegetale (Viketoft et al., 2005; Bonkowski et al., 2009). La specie vegetale o l'appartenenza di questa a un particolare gruppo funzionale (graminacee, leguminose ecc. ecc.) è comunque un elemento determinante per l'abbondanza e composizione delle comunità nematodiche (Viketoft et al., 2005).

I nematodi batteriofagi sono implicati nell'avvicinamento dei batteri alle radici e nella dispersione di questi nella rizosfera, infatti molti batteri non sono mobili, ma anche quelli mobili possono percorrere distanze molto limitate. Molte cellule batteriche o ife fungine possono essere trasportate adese alla cuticola mucillaginosa dei nematodi e inoltre i batteriofagi possono defecare il 30-60% dei batteri ingeriti in forma attiva, proteggendo i batteri da condizioni ambientali avverse. Studi recenti hanno mostrato come questo meccanismo di veicolo dei batteri sia implicato nell'instaurarsi della simbiosi leguminosa-*Rhizobium*. Le radici della leguminosa liberano composti volatili (per esempio dimetil-sulfide) che attraggono chemiotatticamente i nematodi batteriofagi facilitando un'eventuale dispersione di rhizobi ingeriti o adesi, nelle vicinanze delle radici (Horiuchi et al., 2005). Altre evidenze hanno suggerito un ruolo significativo dei nematodi fungivori sul successo della simbiosi pianta-funghi micorrizici arbuscolari (Viketoft et al., 2005).

La dimensione e la forma della cellula batterica giocano un ruolo fondamentale nella scelta del cibo da parte del nematode batteriofago. La differenza nel consumare una particolare specie batterica piuttosto che un'altra dipende principalmente dalle dimensioni dell'apparato boccale del nematode, dal numero di batteri ingeriti e dalla capacità del batteriofago di digerire la preda. Certi taxon di nematodi possiedono una cuticola sclerotizzata nella porzione terminale del bulbo che viene utilizzata per ridurre il cibo, attraverso questo amminutamento i nematodi possono nutrirsi di batteri altrimenti indigeribili (Bonkowski et al., 2009). Numerose evidenze hanno comunque messo in luce il fatto che i nematodi batteriofagi presentino spiccate preferenze per specie batteriche piuttosto che altre. Nel corso dell'evoluzione i batteri hanno messo in atto sofisticate strategie fisiche e chimiche per difendersi dall'attacco dei batteriofagi, come la produzione di tossine o la formazione di biofilm (Bonkowski et al., 2009). La

capacità dei batteri rizosferici di organizzarsi in biofilm è regolata da un meccanismo dipendente da segnali chimici e dalla densità della comunità batterica (quorum sensing). Di conseguenza i nematodi hanno evoluto meccanismi che gli consentono di evitare popolazioni batteriche con individui che producono tossine e di percepire i segnali di quorum sensing, imparando così a evitare colonie batteriche ben-difese (Bonkowski et al., 2009). Anche i nematodi fungivori possono presentare preferenze alimentari, e i funghi micorrizici sembrano essere i meno prelibati (Bonkowski et al., 2009). Inoltre i nematodi possono rappresentare una fonte di cibo per la comunità fungina, le ife di *Drechsleria anthonia* formano una specie di lazo con il quale catturano i nematodi, dopo di che il fungo penetra nel suo ospite assorbendo nutrienti utili per la sua crescita e riproduzione (Jeffery et al., 2010).

Molti composti organici volatili (VOC) vengono rilasciati dalle radici vegetali per attirare chemiotatticamente nematodi entomopatogeni. Questo meccanismo di difesa all'attacco di insetti erbivori sembra essere ampiamente distribuito nel regno vegetale e risulta una promettente strategia di lotta biologica (Bonkowski et al., 2009). Per esempio numerose specie vegetali, tra cui il mais, rilasciano β -cariofillene, sesquiterpene biciclico naturale che attrae specificatamente le larve di nematodi *Heterorhabditis megidis*, nemici delle larve di Diabrotica. Questi nematodi conducono la maggior della loro vita all'interno delle cavità di questo insetto ospite e possono trasportare nel loro intestino batteri simbiotici appartenenti al genere *Photorhabdus*. Una volta entrati nell'ospite i nematodi rilasciano il batterio che si moltiplica velocemente fornendo cibo essenziale per la crescita e riproduzione del nematode e portando di conseguenza alla morte dell'insetto (Boff et al., 2001).

Il ruolo dei nematodi nell'induzione di malattie di patogeni del suolo è ampiamente dimostrato e più frequentemente ci troviamo davanti a interazioni sinergiche in cui l'associazione tra nematode e patogeno può risultare in un maggiore danno (effetto additivo) rispetto a quello determinato dal parassita o patogeno presi da soli (Back et al., 2002). Le ferite all'apparato radicale provocate dai nematodi, sia ecto che endoparassiti, durante il loro processo di infezione sono le maggiori responsabili della diffusione e dell'insorgere di malattie di origine fungina. Il primo caso registrato di interazione nematode-fungo è stato quello tra *Fusarium oxysporum* e *Meloidogyne* spp. nella rizosfera di piante di cotone; successivamente la stessa interazione è stata rilevata in altre piante tra cui alfa-alfa, cece, fagiolo, fava, lenticchia, pomodoro, caffè e banana (Back et al., 2002). I funghi approfittano delle micropunture create dallo stiletto o dai canali di infezione, per penetrare e colonizzare la radice (Back et al., 2002). I nematodi ectoparassiti come *Belonolaimus* e *Trichodorus*

sono stati raramente descritti in interazione sinergica con funghi patogeni e questo probabilmente è dovuto al loro tipo di alimentazione che causa danni minori all'apparato radicale vegetale mentre *Xiphinema* e *Longidorus*, provvisti di un lungo stileto, sono implicati nella trasmissione di numerose malattie di origine virale (Back et al., 2002). Un altro interessante meccanismo è offerto dalle femmine di endoparassiti sia galligeni che formanti cisti, che provocano la formazione di fessure della galla o nella ciste in modo da consentire la fecondazione da parte dei maschi. Queste fessure sembrano facilitare la penetrazione di funghi opportunisti consentendogli di superare la corteccia e raggiungere più facilmente i tessuti radicali interni (Back et al., 2002).

I NEMATODI COME INDICATORI DELLA QUALITÀ DEL SUOLO

I nematodi possono essere molto sensibili alle perturbazioni e ai cambiamenti ambientali e la struttura e funzionalità della comunità nematodica del suolo variano in risposta all'uso del suolo, all'arricchimento di nutrienti a seguito di fertilizzazione organica o minerale, alla coltivazione, al drenaggio, alla composizione ed età della comunità vegetale, alle introduzioni di sostanze tossiche come metalli pesanti o idrocarburi policiclici aromatici. I nematodi rappresentano pertanto uno strumento diagnostico importante per la misura dei cambiamenti dello stato biotico e funzionale del suolo (Neher, 2001; Neher et al., 2005; Donn et al., 2008; Chen et al., 2010).

I nematodi del suolo presentano particolari caratteristiche che li rendono ottimi bioindicatori offrendo numerosi vantaggi al loro utilizzo rispetto alla microflora edafica: occupano una posizione centrale, una o due grandezze più in alto, nella catena trofica del suolo; possono essere raggruppati in diversi gruppi trofici, la cui distribuzione riflette i vari stadi successionali dell'ambiente in cui vivono; hanno un tempo di generazione più lungo (da giorni a anni) rispetto ai microrganismi metabolicamente attivi (da ore a giorni) rendendo la popolazione più stabile nel tempo e non fluttuante in relazione ai flussi effimeri di nutrienti; hanno una cuticola permeabile che gli permette di rispondere rapidamente a un'ampia varietà di sostanze inquinanti; molti taxon hanno la capacità di sopravvivere per lungo tempo in una forma inattiva (cisti e criptobiosi) in modo da superare condizioni ambientali sfavorevoli; al contrario alcune specie (*Dorylaimidae*) non hanno uno stadio di resistenza e pertanto risultano molto sensibili ai cambiamenti ambientali (Neher, 2001); sono ubiquitari e certe specie sono gli ultimi animali a scomparire in suoli disturbati e/o inquinati; (Neher, 2001). Inoltre nei nematodi sono

state identificate numerose proteine “heat shock” altamente conservate, la cui espressione aumenta notevolmente in caso di esposizione a condizioni di stress come elevate temperature, metalli pesanti o composti organici tossici, e che possono essere utilizzate come biomarker (Neher, 2001).

Gli indici basati sulla biodiversità ci permettono di caratterizzare la comunità nematodica e di determinare gli effetti su questa degli stress ambientali (Viketoft et al., 2005; Dupont et al., 2008). Indici come quelli che determinano richness, similarità (Jaccard, Sørensen) o diversità (Shannon-Weiner, Simpson) sono molto popolari perché facili da determinare, ma presentano dei limiti per una loro ampia diffusione nella valutazione delle qualità del suolo. Si ottengono dalla somma delle proporzioni dei vari gruppi tassonomici senza considerare il peso qualitativo di ciascun taxon. Per esempio suoli con il 100% di specie native o il 100% di specie esotiche possono avere lo stesso valore di diversità, ma presentare caratteristiche di qualità e salute completamente diverse. L'indice di maturità (Maturity Index, MI) sviluppato per i nematodi terrestri, e successivamente esteso anche a quelli marini o di sedimenti salmastri, ha dimostrato una migliore capacità di discriminare le diverse condizioni ecologiche del suolo su scala regionale (Neher, 2001; Sanchez-Moreno et al., 2008). L'indice di maturità si basa sul principio che differenti taxon, per le loro caratteristiche innate, hanno una diversa sensibilità allo stress, pratica agronomica, specie vegetale e tipo di suolo. Una sequenza successionale nematodica può essere interrotta a vari livelli da una semplice pratica agronomica come per esempio l'applicazione di fertilizzanti o pesticidi. La composizione e funzionalità di una comunità nematodica riflette pertanto la storia delle perturbazioni a cui è stata sottoposta e valori bassi di MI sono indicativi di un minor disturbo dell'ambiente (Neher, 2001; Neher et al., 2005). L'evoluzione e l'utilizzo dell'indice di maturità (MI) lo include tra gli indici più comunemente utilizzati in campo agronomico, utile anche per una valutazione di ambienti naturali come le praterie, pascoli e foreste. Nonostante i suoi utili attributi, MI presenta comunque dei limiti come la necessità di una buona conoscenza della tassonomia dei nematodi e come il fatto che i nematodi possano mostrare delle preferenze alimentari conducendo a risultati che non sempre rispecchiano a pieno la sequenza degli agenti di disturbo (Neher, 2001).

METODI MOLECOLARI PER L'ANALISI DELLE COMUNITÀ DI NEMATODI

Si stima che le specie di nematodi attualmente descritte rappresentino solo il 5% delle specie realmente esistenti nel suolo. La diversità dei nematodi nel

suolo è ancora essenzialmente sconosciuta questo perché l'identificazione morfologica a livello di specie presenta difficoltà tecniche dovute all'enorme abbondanza di specie, alla piccola taglia dell'organismo e alla necessità di competenze tassonomiche specializzate. La sola identificazione morfologica comunque non può essere sufficiente a descrivere la comunità nematodica del suolo dato che si basa su un esiguo numero di individui scelti a caso. È quindi necessario lo sviluppo di un sistema di riconoscimento più potente, applicabile a livello di taxon, gruppo, genere e specie (Floyd et al., 2002). Le tecniche di biologia molecolare vengono sempre più utilizzate per l'identificazione dei nematodi, portando a notevoli progressi nella tassonomia dei nematodi del suolo. Numerose tecniche di fingerprinting possono essere applicate alla caratterizzazione della biodiversità delle diverse comunità di nematodi del suolo, consentendo di ottenere informazioni ecologiche rilevanti. La Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) risulta utile anche in un contesto ecologico, come per differenziare batteriofagi strettamente correlati non distinguibili a livello morfologico (Van Der Knaap et al., 1993; Foucher et al., 2004; Chen et al., 2010). La Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) è stata utilizzata con successo nello studio di comunità di nematodi sia marini che terrestri (Waite et al., 2003; Foucher et al., 2004; Okada e Oba; 2008). Nella DGGE regioni specifiche del DNA (generalmente regioni variabili del 18S rDNA) vengono amplificate e separate mediante un gel di elettroforesi con gradiente di denaturazione; contando il numero di bande si ottengono informazioni sul numero di gruppi nematodici presenti mentre l'intensità delle bande può essere interpretata come abbondanza dei vari gruppi rispetto alla totalità della comunità (Foucher et al., 2004; Chen et al., 2010). La tecnica T-RFLP utilizza un prodotto di amplificazione fluorescente analizzabile e quantificabile mediante sequenziatore automatico, può essere progettata selezionando le combinazioni enzimatiche adatte a separare i vari taxon nematodici, utilizzando librerie geniche presenti nei vari database pubblici (Donn et al., 2008; Hermann et al., 2008). Il risultato è che ogni picco del profilo può essere considerato come un taxon nematodico, l'inclusione di uno standard interno in ciascun campione permette la comparazione tra profili diversi (Chen et al., 2010). Il maggior vantaggio di questa tecnica è rappresentato dalla possibilità di utilizzare plate format di 96 o 384 pozzetti che insieme a software di analisi sofisticati, la rende una tecnica high-throughput per rapide analisi permettendo estesi studi a scopi di monitoraggio (Chen et al., 2010).

La Real-time PCR è molto più rapida, specifica e sensibile della PCR convenzionale. È stata ampiamente utilizzata per la quantificazione di specie nematodiche di particolare importanza agronomica come i nematodi fitoparassiti

che formano cisti nella patata (*Globodera*; Chen et al., 2010). I risultati sono velocemente analizzabili e facilmente interpretabili rispetto a dati di tipo morfologico, rappresentando una alternativa conveniente specialmente se si ha disposizione poco materiale da analizzare (Chen et al., 2010). Jones et al. (2006) utilizzano la microscopia ottica in combinazione con Real-time PCR, dimostrando una chiara correlazione tra risultati ottenuti dai metodi convenzionali basati su caratteristiche morfologiche e metodi molecolari. Risultati simili sono stati ottenuti da Hamilton et al. (2009), paragonando dati di sequenziamento del DNA con dati ottenuti da un approccio tradizionale basato sulla microscopia ottica. Esistono errori per ciascun metodo è quindi chiaro che un approccio combinato fornisce una visione più affidabile dell'intera comunità e risulta uno strumento importante nel processo di transizione da una identificazione di tipo morfologico a futuri scenari molecolari (Chen et al., 2010).

Con il termine "DNA-Barcode" si intende un codice genetico con cui ottenere un nuovo tipo di catalogazione e definizione degli organismi viventi. Il DNA barcoding è una tecnica applicabile a tutti gli organismi viventi basata sul sequenziamento di un piccolo frammento di genoma, nucleare e/o mitocondriale, che fornisca informazioni a livello di specie o informazioni filogenetiche tali da permettere una identificazione tassonomica del campione biologico (Chen et al., 2010). Le possibilità di utilizzo del DNA barcoding sono numerose e attraverso l'uso di primer universali per i nematodi si può studiare la biodiversità nematodica dei vari ambienti terrestri, consentendo una rapida e facile identificazione sia di un individuo, sia di sequenze isolate direttamente dall'ambiente. Questo approccio molecolare può essere applicato a nematodi a tutti gli stadi di sviluppo, sia larva che adulto (Donn et al., 2008). Hamilton et al. (2009) hanno estratto il DNA direttamente dal suolo e utilizzato primer specifici per lo studio della diversità di comunità di micro e meso-fauna, capaci di catturare gruppi di fauna abbondanti come nematodi, collemboli, acari, tardigradi, enchitreidi e, sebbene i nematodi restino suddivisi esclusivamente all'interno della due principali unità tassonomiche (Chromadorea e Enoplea), hanno fornito una risoluzione tassonomica sufficiente a descrivere la struttura della comunità della fauna del suolo.

L'efficienza di questa tecnica dipende dall'identità della regione genica analizzata. La maggior parte delle ricerche svolte sui nematodi marini o terrestri, hanno utilizzato una regione del gene per l'rRNA 18S, che offre il vantaggio di un esteso database disponibile nel web. Il primo passo per la identificazione di specifici taxon all'interno di popolazioni miste è appunto la costruzione di un discreto e affidabile database di informazioni genetiche. Idealmente ciascuna sequenza di DNA contenuta nel database dovrebbe essere accompagnata anche

da una adeguata descrizione del campione dal quale la sequenza deriva (Powers, 2004). Numerosi progetti di sequenziamento di genomi e/o regioni specifiche del genoma nematodico hanno portato allo sviluppo di estesi database pubblici (WormBase, <http://wormbase.org>, Bieri et al., 2007; Nematode.net, <http://www.nematode.net>, Wylie et al., 2004; NemATOL, <http://nematol.unh.edu/>; Comprehensive Phytopathogen Genome Resource CPRG, <http://cpgr.tigr.org/index.html>; NEMrRNA, <http://www.nemamex.ucr.edu>; Subbotin et al., 2007; NEMBASE <http://www.nematodes.org>; PPNEMA, <http://www.ppnema.uniba.it>, Rubino et al., 2008). Tuttavia le informazioni contenute nei database sono ancora insufficienti a permettere una identificazione estesa della specie mediante rRNA 18S, ma attraverso la costruzione di alberi filogenetici si può valutare la possibile appartenenza a un taxon di un campione sconosciuto (Floyd et al., 2002; Powers, 2004). Questi database sono però fortemente arricchiti di taxa riferiti a patogeni vegetali (Giorgi et al., 2002) o animali mentre sono ancora scarse le risorse che riguardano i nematodi a vita libera, che comprendono la maggior parte della nematofauna del suolo. Un campione di suolo (100 gr) può contenere 50-100 differenti specie di nematodi diverse e migliaia di individui a tutti gli stadi di sviluppo (Powers, 2004). I dati provenienti dalle sequenze del DNA sono il cuore della rivoluzione genomica in biologia e il numero dei taxon di nematodi a vita libera classificati è in continuo aumento (Porazinska et al., 2009).

Il prossimo passo sarà quello di applicare le nuove tecniche di sequenziamento high-throughput (tipo pirosequenziamento) che forniscono l'opportunità di generare una grande quantità di basi sequenziate in breve tempo e a basso costo. I recenti progressi tecnologici di clonaggio e sequenziamento hanno reso sempre più facile l'applicazione delle tecniche molecolari a un maggior numero di organismi che altrimenti sarebbe stato difficile studiare (Green Tringe e Rubin, 2005). È ora possibile estrarre il DNA dagli organismi direttamente nel loro ambiente come tessuti vegetali, e clonarlo all'interno di vettori producendo delle librerie eterogenee contenenti popolazioni miste a livello di specie o di ceppo. Di conseguenza i dati contenuti in queste librerie forniscono una ricchezza di informazioni sulle dinamiche interne alla comunità come per esempio riguardo l'interazione tra le specie e ai processi di selezione (Green Tringe e Rubin, 2005). Questi approcci sono ben applicabili agli studi di comunità di nematodi (Chen et al., 2010).

Porozinska et al. (2009) hanno utilizzato un approccio metagenomico per determinare primer che meglio potessero rappresentare la comunità nematodica del suolo e i cui prodotti di amplificazione potessero poi essere utilizzati successivamente con metodi di sequenziamento high-throughput. Hanno creato due distinti campioni metagenomici in modo da valutare la scelta dei primer e

delle regioni di DNA target scelte (gene per rRNA 18S) evidenziando due possibili vantaggi: l'alto livello di ripetibilità dell'analisi qualitativa della comunità nematodica e il minimo errore di sottostima della diversità nematodica.

RIASSUNTO

La biodiversità presente all'interno del biota suolo è essenziale per la funzionalità dell'intero ecosistema e gli invertebrati ne costituiscono una componente fondamentale il cui ruolo, nella formazione e trasformazione del suolo, è ben riconosciuto. I nematodi sono probabilmente il gruppo di animali più abbondanti nel suolo dove ne occupano diversi livelli trofici. Possono condurre una vita libera, cibandosi di batteri funghi o altri nematodi, oppure possono vivere come parassiti di piante o animali. Si stima che le specie di nematodi attualmente descritte rappresentino solo il 5% delle specie realmente esistenti nel suolo. Questa discrepanza è dovuta probabilmente alle limitazioni dei metodi analitici convenzionali basati principalmente sul riconoscimento mediante microscopia ottica. L'avvento delle tecniche molecolari può contribuire allo studio dell'ecologia dei nematodi mettendo in luce la loro grande diversità in natura.

ABSTRACT

The below-ground diversity is essential for above-ground ecosystem function and the soil invertebrates are a key component of soil biota. Nematodes occupy a central position in the soil food web and are correlate, directly or indirectly, with ecological processes such as nitrogen cycling and plant growth. Nematodes are among the most numerous and diverse soil organisms occurring in all soil on the globe. They can live in waterfilms around soil particles, consuming bacteria, fungi or other nematodes or can live mainly as parasite of plants and animals. It has been estimated that the currently described Nematoda represents less than 5% of the total number of species. The discrepancy between "know" and estimated species richness may be partially due to the limitations of analytical techniques such as light microscopy. Application of molecular techniques and the development of DNA sequence-based approaches have led to considerable progresses in nematode identification, revealing a larger diversity. The metagenomics approach aimed to nematodes has the potential to greatly expand our understanding of this component of the microbiota.

BIBLIOGRAFIA

- BACK M.A., HAYDOCK P.P.J., JENKINSON P. (2002): *Disease complexes involving plant parasitic nematodes and soilborne pathogens*, «Plant Pathology», 51, pp. 683-697.
- BAIS H.P., PARK S.W., WEIR T.L., CALLAWAY R.M., VIVANCO J.M. (2004): *How plants communicate using the underground information superhighway*, «Trends in Plant Science», 9, pp. 26-32.

- BARKER K.R., HUSSEY R.S., KRUSBERG L.R., BIRD G.W., DUNN R.A., FERRIS H., FERRIS V.R. ET AL. (1994): *Plant and soil nematodes: societal impact and focus for the future*, «Journal of Nematology», 26, pp. 127-137.
- BIERI T., BLASIER D., OZERSKY P., ANTOSHECHKIN I., BASTIANI C., CANARAN P., CHAN J., CHEN N. ET AL. (2007): *WormBase: new content and better access*, «Nucleic Acids Research», 35, pp. D506-D510.
- BOFF M.I.C., ZOON F.C., SMITS P.H. (2001): *Orientation of Heterorhabditis megidis to insect hosts and plant roots in a Ytubes and olfactometer*, «Entomologia Experimentalis et Applicata», 98, pp. 329-337.
- BONKOWSKI M., VILLENAVE C., GRIFFITHS B. (2009): *Rhizosphere fauna: functional and structural diversity of intimate interactions of soil fauna with plant roots*, «Plant and Soil», 321, pp. 213-233.
- CARDON Z.G., GAGE D.J. (2006): *Resource exchange in the rhizosphere: molecular tools and the microbial perspective*, «Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics», 37, pp. 459-488.
- CHEN X.Y., DANIELL T.J., NEILSON R., O'FLAHERTY V., GRIFFITHS B.S. (2010): *A comparison of molecular methods for monitoring soil nematodes and their use as biological indicators*, «European Journal of Soil Biology», 46, pp. 319-324.
- DIETERICH C., SOMMER R.J. (2009): *How to become a parasite-lessons from the genomes of nematodes*, «Trends in Genetics», 25, pp. 203-209.
- DONN S., GRIFFITHS B.S., NEILSON R., DANIELL T.J. (2008): *DNA extraction from soil nematodes for multi-sample community studies*, «Applied Soil Ecology», 38, pp. 20-26.
- DUPONT S.T., FERRIS H., VAN HORN M. (2008): *Effects of cover crop quality and quantity on nematode-based soil food webs and nutrient cycling*, «Applied Soil Ecology», 41, pp. 157-167.
- FLOYD R., ABEBE E., PAPERT A., BLAXTER M. (2002): *Molecular barcodes for soil nematode identification*, «Molecular Ecology», 11, pp. 839-850.
- FOUCHER A.L.J.L., BONGERS T., NOBLE L.R., WILSON M.J. (2004): *Assessment of nematode biodiversity using DGGE of 18S rDNA following extraction of nematodes from soil*, «Soil Biology & Biochemistry», 36, pp. 2027-2032.
- GIORGI C.D., VERONICO P., DE LUCA F., NATILLA A., LANAVE C., PESOLE G. (2002): *Structural and evolutionary analysis of the ribosomal genes of the parasitic nematode Meloidogyne artiellia suggests its ancient origin*, «Molecular and Biochemical Parasitology», 124, pp. 91-94.
- GREEN TRINGE S., RUBIN E.M. (2005): *Metagenomics: DNA sequencing of environmental samples*, «Nature Review», 6, pp. 805-814.
- HAMILTON H.C., STRICKLAND M.S., WICKINGS K., BRADFORD M.A., FIERER N. (2009): *Surveying soil faunal communities using a direct molecular approach*, «Soil Biology and Biochemistry», 41, pp. 1311-1314.
- HERMANN E., GAUTHERON N., ALABOUVETTE C., STEINBERG C. (2008): *Fingerprinting methods to approach multitrophic interactions among microflora and microfauna communities in soil*, «Biology and Fertility of Soils», 44, pp. 975-984.
- HORIUCHI J., PRITHIVIRAL B., BAIS H.P., KIMBALL B.A., VIVANCO J.M. (2005): *Soil nematodes mediate positive interactions between legume plants and rhizobium bacteria*, «Pianta», 222, pp. 848-857.
- HUHTA V. (2007): *The role of soil fauna in ecosystems: a historical review*, «Pedobiologia», 50, pp. 489-495.
- HOLTERMAN M., KARSSSEN G., VAN DEN ELSSEN S., VAN MEGEN H., BAKKER J., HELDER

- J. (2009): *Small Subunit rDNA-based phylogeny of the Tylenchida sheds light on relationships among some high-impact plant-parasitic nematodes and the evolution of plant feeding*, «Phytopatopoly», 99, pp. 227-235.
- JEFFERY S., GARDI C., JONES A., MONTANARELLA L., MARMO L., MUCCO L., RITZ K., PERES G., RÖMBKE J., VAN DER PUTTEN W.H. (2010): *European atlas of soil biodiversity*, Editore da European Commission, Publications Office of the European Union, Luxembourg.
- JONES K.L., TODD T.C., BEAM J.L.W., COOLON J.D., BLAIR J.M., HERMAN M.A. (2006): *Molecular approach for assessing responses of microbial-feeding nematodes to burning and chronic nitrogen enrichment in a native grassland*, «Molecular Ecology», 15, pp. 2601-2609.
- KHAN Z., KIM Y.H. (2007): *A review on the role of predatory soil nematodes in the biological control of plant parasitic nematodes*, «Applied Soil Ecology», 35, pp. 370-379.
- MARINARI PALMISANO A., IRDANI T. (1996): *Nematodi negli ecosistemi forestali*, «Atti Giornate Fitopatologiche», 1, pp. 253-260.
- MCK BIRD D. (2004): *Signaling between nematodes and plants*, «Current Opinion in Plant Biology», 7, pp. 372-376.
- MITREVA M., SMANT G., HELDER J. (2009): *Role of horizontal gene transfer in the evolution of plant parasitism among nematodes*, «Methods in Molecular Biology», 532, pp. 517-535.
- NAPOLI C., MELLO A., BONFANTE P. (2008): *Dissecting the rhizosphere complexity: the truffle-ground study case*, «Rendiconti Lincei», 19, pp. 241-259.
- NEHER D.A. (2001): *Role of nematodes in soil health and their use as indicators*, «Journal of Nematology», 33, pp. 161-168.
- NEHER D.A., WU J., BARBERCHECK M.E., ANAS O. (2005): *Ecosystem type affects interpretation of soil nematode community measures*, «Applied Soil Ecology», 30, pp. 47-64.
- OKADA H., OBA H. (2008): *Comparison of nematode community similarities assessed by Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) and by morphological identification*, «Nematology», 10, pp. 689-700.
- POWERS T. (2004): *Nematode molecular diagnostics: from bands to barcodes*, «Annual Review of Phytopatology», 42, pp. 367-383.
- PORAZINSKA D.L., GIBLIN-DAVIS R.N., FALLER L., FARMERIE W., KANZAKI N., MORRIS K., POWERS T.O., TUCKER A.E., SUNG W., THOMAS K. (2009): *Evaluating high-throughput sequencing as a method for metagenomic analysis of nematode diversity*, «Molecular Ecology Resource», 9, pp. 1439-1450.
- RUBINO F., VOUKELATOU A., DE LUCA F., DE GIORGI C., ATTIMONELLI M. (2008): *PP-NEMA: A Resource of Plant-Parasitic Nematodes Multialigned Ribosomal Cistrons*, «International Journal of Plant Genomics», 2008, pp. 1-5.
- SANCHEZ-MORENO S., SMUKLER S., FERRIS H., O'GEEN A.T., JACKSON L.E. (2008): *Nematode diversity, food web condition, and chemical and physical properties in different soil habitats of an organic farm*, «Biology and Fertility of Soil», 44, pp. 727-744.
- SUBBOTIN S.A., STURHAN D., VOVLAS N., CASTILLO P., TAMBE J.T., MOENS M., BALDWIN J.G. (2007): *Application of the secondary structure model of rRNA for phylogeny: D2-D3 expansion segments of the LSU gene of plant-parasitic nematodes from the family Hoplolaimidae Filipjev, 1934*, «Molecular Phylogenetics and Evolution», 43, pp. 881-890.
- VAN DER KNAAP E., RODRIGUEZ R.J., FRECKMAN D.W. (1993): *Differentiation of bacterial feeding nematodes in soil ecological studies by means of arbitrarily-primed PCR*, «Soil Biology and Biochemistry», 25, pp. 1141-1151.

- VIKETOFT M., PALMBORG C., SOHLENIUS B., HUSS-DANEL K., BENGTSSON J. (2005): *Plant species effects on soil nematode communities in experimental grasslands*, «Applied Soil Ecology», 30, pp. 90-103.
- WAITE I.S., O'DONNELL A.G., HARRISON A., DAVIES J.T., COLVAN S.R., EKSCHMITT K., DOGAN H. ET AL. (2003): *Design and evaluation of nematode 18S rDNA primers for PCR and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) of soil community DNA*, «Soil Biology and Biochemistry», 35, pp. 1165-1173.
- WYLIE T., MARTIN J.C., DANTE M., MITREVA M.D., CLIFTON S.W., CHINWALLA A., WATERSTON R.H., WILSON R.K., MCCARTER J.P. (2004): *Nematode.net: a tool for navigating sequences from parasitic and free-living nematodes*, «Nucleic Acids Research», 32, pp. D423-D426.