

ANALISI COMBINATA DI DATI MORFOLOGICI E MOLECOLARI PER LO STUDIO DEGLI ARTROPODI TERRESTRI DELL'ANTARTIDE

ANTONIO CARAPELLI - CLAUDIA BRUNETTI - CLAUDIO CUCINI - CHIARA LEO
FRANCESCO NARDI - PIETRO PAOLO FANCIULLI

Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Siena, Via Aldo Moro 2, 53100 Siena. E-mail: antonio.carapelli@unisi.it
Lettura tenuta durante la Seduta pubblica dell'Accademia, tenuta da remoto, 5 novembre 2021

Combined analysis of morphological and molecular data for the study of the terrestrial arthropods of Antarctica

The terrestrial fauna of Antarctic invertebrates is the subject of growing interest in discovering how life interacts with the polar environment and how millions of years of evolution have shaped its biodiversity. Classical taxonomic approaches, complemented by molecular tools, are improving our understanding on the systematic relationships between species, changing the nomenclature of some taxa and challenging the taxonomic status of others. Furthermore, profiles of gene expression of mites and springtails and the study of their associated microbiome could represent additional tools for understanding the mechanisms of resistance of the endemic species of Antarctica in the light of recent global climate changes.

KEY WORDS: Ecosistema Terrestre dell'Antartide; acari, collemboli; marcatori molecolari; tassonomia; analisi del microbioma.

INTRODUZIONE

L'Antartide è il continente più meridionale, freddo ed isolato della Terra. Tuttavia, durante la sua storia geologica, l'Antartide non è sempre stato il luogo coperto di ghiacci che conosciamo oggi, posizionato com'è all'estremo sud del Pianeta. Difatti l'esteso raffreddamento del Continente Antartico iniziò nel tardo Eocene - inizio Oligocene (ca. 34 Mya), quando diminuirono le concentrazioni atmosferiche di CO₂, comparvero le prime calotte glaciali e l'Antartide iniziò ad essere completamente isolato da tutte le altre masse continentali attraverso la formazione del Passaggio di Drake (CONVEY, 2017) e l'origine sia della Corrente Circumpolare Antartica (ACC) che della Zona Frontale Polare (PFZ).

A partire da quel periodo geologico, l'Antartide ha subito modificazioni ambientali e climatiche, alternate da periodi di maggiore stabilità, che hanno notevolmente influenzato la distribuzione e la composizione del biota terrestre.

La fauna antartica degli invertebrati terrestri ha oggi una distribuzione discontinua ed è divisa in due regioni biogeografiche ben definite (Antartide Marittimo e Continentale) dalla "Linea di Gressitt" (CHOWN & CONVEY, 2007). Questi territori condividono pochissime specie (solo il 3% di esse mostra una distribuzione pan-antartica) con un'alta incidenza di endemismi e con molti taxa che hanno una diffusione locale e piuttosto limitata (PUGH & CONVEY, 2008). Le regioni dell'Antartide che, almeno per un breve periodo del-

l'anno, sono prive di ghiacci e neve, sono abitate principalmente da micro-artropodi e micro-invertebrati. Tra i primi si annoverano due specie endemiche di chironomidi (Diptera, Hexapoda) ma soprattutto numerosi rappresentanti di collemboli (Collembola) e acari (Acari) (Fig. 1, A e B).

Si pensa che l'attuale composizione delle comunità di collemboli ed acari antartici sia un residuo di una più ricca biodiversità pre-pleistocenica, che è stata quasi completamente cancellata da eventi paleogeologici (STEVENS *et al.*, 2006) antichi e recenti.

Le specie di artropodi antartici sono distribuite nelle poche aree prive di ghiaccio (GREENSLADE, 1995), che corrispondono ad un trascurabile 0,3% dell'intera massa continentale (SINCLAIR & STEVENS, 2006). I taxa endemici sono isolati dalle altre specie, che vivono nei continenti vicini, a causa della posizione geografica dell'Antartide e dell'effetto barriera causato dalla Corrente Circumpolare Antartica (FRASER *et al.*, 2012), anche se una manciata di specie invasive si sono stabilite, di recente con successo, nelle località caratterizzate da una qualche attività geotermica (GREENSLADE, 2010).

La distribuzione delle oltre 20 specie conosciute di collemboli antartici (GREENSLADE, 1995; 2010) è quasi equamente suddivisa tra l'Antartico Marittimo e Continentale. Tra le 30 famiglie di Collembola conosciute a livello globale, solo quattro, tutte appartenenti agli ordini Entomobryomorpha e Poduromorpha, hanno taxa antartici, senza alcun rappresentante dei due ordini Neelipleona e Symphypleona. Le specie

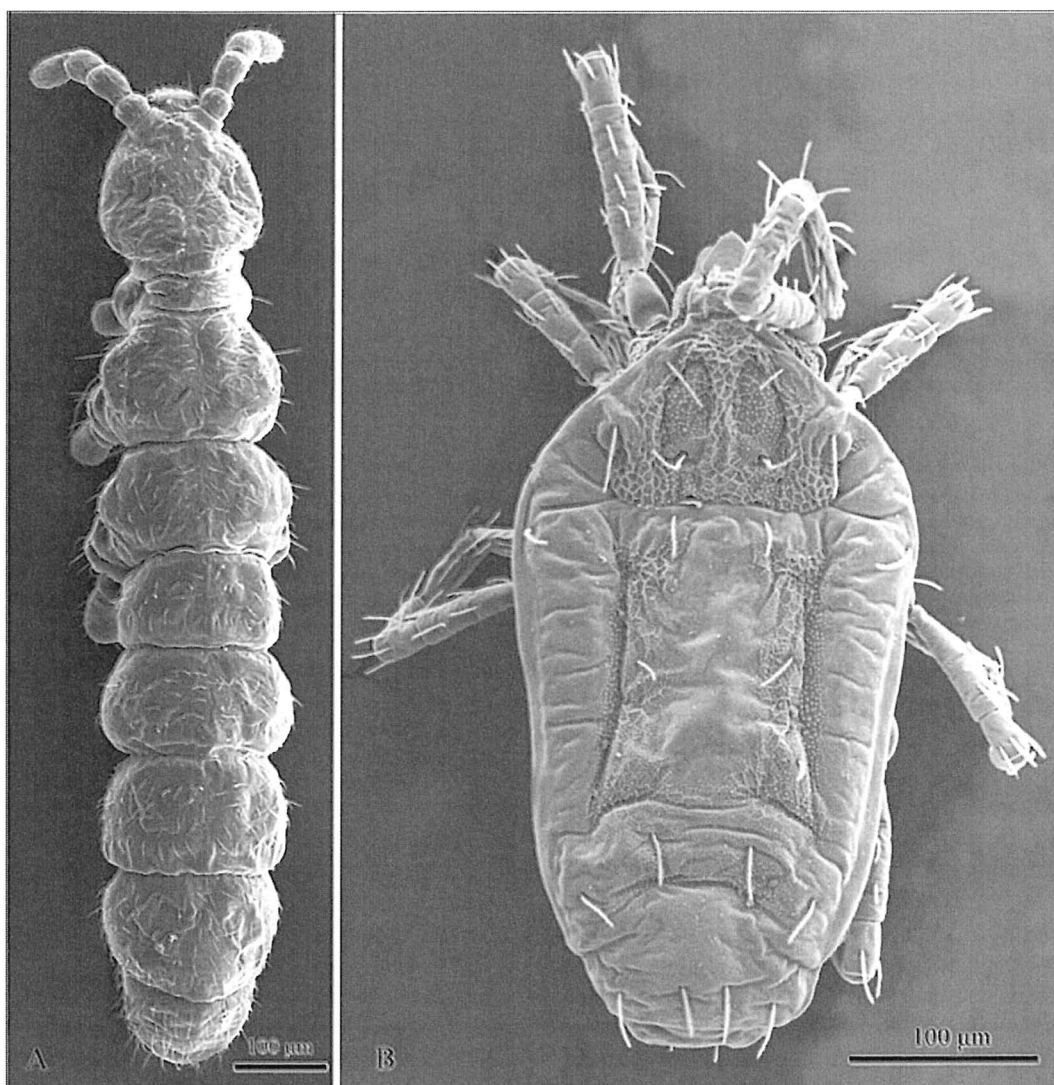


Fig. 1 – Foto di microscopia elettronica a scansione per: A) *Cryptopygus terranovus* (Collembola: Isotomidae); B) *Stereotydeus* spp.

più comuni dell'intero Continente sono quelle appartenenti ai generi *Cryptopygus* e *Friesea*, che vantano rappresentanti in entrambe le bioregioni. In effetti, la maggior parte degli studi di genetica di popolazione sosterrebbe la presenza di specie criptiche, attualmente poste in sinonimia con le poche ufficialmente riconosciute.

Gli acari sono il gruppo di artropodi più abbondante e diffuso dell'Antartico e sono rappresentati da Prostigmata, Oribatida e Mesostigmata. All'interno delle regioni antartiche continentali e marittime, sono state descritte 40 specie, solo considerando i due primi ordini (12 generi di sei famiglie per Prostigmata e otto generi di sette famiglie per Oribatida). Tra i Prostigmata, una delle famiglie più rappresentate è Penthalodidae, che comprende il genere cosmopolita *Stereotydeus* Berlese, 1860. Ad oggi, un totale di 15 specie di *Stereotydeus* sono state descritte in Antartide:

7 dall'Antartide Continentale, uno da quello Marittimo e sette dal Sub-antartico.

I cambiamenti climatici e ambientali rapidi ed improvvisi che si stanno verificando a livello globale minacciano fortemente anche il biota e l'ecosistema terrestre dell'Antartide. È quindi necessario conoscere la composizione e le caratteristiche degli invertebrati del Continente, in modo da individuare la loro capacità di resilienza e da individuare delle strategie di salvaguardia e di preservazione della biodiversità del continente ghiacciato. Per questi motivi, diversi studi di tassonomia, filogenesi, espressione genica e genetica di popolazione di acari e collemboli, insieme ad altri che hanno preso in esame il loro microbioma, sono stati completati dal gruppo di Zoologia Evoluzionistica e Sistematica dell'Università di Siena. Alcuni risultati di questa ricerca sono descritti in questo numero degli atti dell'Accademia Nazionale Italiana di Entomologia.

RISULTATI

Le comunità microbiche associate a quattro specie di collemboli antartici

Negli ultimi anni è stata posta particolare attenzione allo studio del microbioma del suolo e dei suoi abitanti invertebrati per approfondire la struttura e il funzionamento degli ecosistemi terrestri. Per esempio, si è dimostrato che la fauna di invertebrati può modificare attivamente le comunità microbiche del suolo e la sua biomassa, nutrendosi direttamente di materia organica o indirettamente frammentando la lettiera e pascolando sia sui funghi che sui batteri. Ciononostante, poche informazioni sono disponibili sulla componente microbica presente nell'apparato digerente dei collemboli, o comunque a loro associata.

L'applicazione di tecniche di Next Generation Sequencing per studiare il microbioma associato ai collemboli ha finora riguardato specie modello che vivono in ambienti temperati, come *Folsomia candida* (AGAMENNONE *et al.*, 2015) e *Orchesella cincta* (BAHRNDORFF *et al.*, 2018). L'applicazione di tecniche di sequenziamento massivo ha permesso la rilevazione di specie batteriche predominanti, appartenenti ai phyla Proteobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes (AGAMENNONE *et al.*, 2015; BAHRNDORFF *et al.*, 2018). Lo studio del microbiota associato alle specie di collemboli antartici annovera pochi lavori pubblicati, ma può essere rilevante per descrivere ulteriormente il funzionamento dell'ecosistema terrestre dell'Antartico. Nonostante l'importanza dei collemboli per la dinamica del suolo, pochi studi, fino ad oggi, si sono concentrati sui loro microbiomi associati, limitando così la nostra conoscenza sul loro ruolo nel regolare, ad esempio, le varie funzioni fisiologiche e immunologiche degli organismi del suolo.

Per questo motivo, due specie di collemboli, *Cryptopygus antarcticus antarcticus* e *Friesea antarctica* sono state campionate nella Penisola Antartica nord-occidentale, in particolare nelle Isole Shetland Meridionali. Le altre due specie, *Cryptopygus terranovus* e *Friesea propria*, sono state invece campionate nell'Antartico Continentale, più precisamente nella Terra di Vittoria del Nord. Le quattro specie sono state analizzate attraverso una procedura di metagenomica, sequenziando e comparando i ceppi batterici mediante lo studio della regione V3 del gene che codifica per l'RNA ribosomiale 16S batterico (rRNA) (LEO *et al.*, 2021).

L'analisi condotta ha rilevato che tra le 1026 linee batteriche identificate, quelle dominanti sono i Proteobacteria (frequenza relativa media 33%), gli Actinobacteria (27%), i Firmicutes (14%) ed i Bacteroidetes (11%). Questi taxa batterici sono principalmente coinvolti nei processi di decomposizione dei composti organici, oltre ad essere candidati a

svolgere una funzione di difesa degli ospiti attraverso la produzione di sostanze antimicrobiche. Il microbiota dominante sembra essere simile a quello osservato nelle specie di collemboli che vivono a latitudini temperate, sebbene la loro ricchezza complessiva diminuisca a latitudini più elevate.

Le analisi della diversità beta hanno identificato una maggiore somiglianza tra i microbiomi associati ai diversi generi collemboli originari della stessa bioregione antartica rispetto a quella rilevabile tra specie appartenenti allo stesso genere, ma provenienti da diverse bioregioni. Difatti, il numero di OTUs condivisi tra *C. a. antarcticus* e *F. antarctica* (63) (Antartide Marittimo) e tra *C. terranovus* e *F. propria* (89) (Antartide Continentale) erano superiori ai numeri condivisi tra specie appartenenti allo stesso genere.

Diversità criptica tra le specie del genere Friesea

Il genere di collemboli *Friesea* dalla Torre 1895 (Collembola: Neanuridae) comprende 190 specie descritte a livello globale. In Antartide, fino ad alcuni anni fa era conosciuta la sola *Friesea grisea* che era diffusa sia nella Regione Marittima che in quella Continentale e che era ritenuta l'unica specie di collemboli a diffusione pan-antartica. Recenti studi di sistematica, hanno invece dimostrato che *F. grisea* comprenderebbe in realtà un complesso di specie criptiche, tra le quali solo quella presente nell'Isola Georgia del Sud (la sua località tipica) sarebbe attribuibile a questo taxon. Difatti, le popolazioni distribuite in diverse località della Penisola Antartica, delle Isole dell'Arcipelago delle Shetland Meridionali e della Terra Vittoria, dopo un approfondito studio di sistematica e di genetica di popolazione, risulterebbero appartenere ad entità tassonomiche diverse.

L'analisi combinata di caratteri morfologici e molecolari (tassonomia integrata) supporterebbe la suddivisione delle *Friesea* antartiche in tre specie: *Friesea antarctica* (Willem, 1901), distribuita nell'Antartide Marittimo e nell'Arcipelago delle Isole Shetland del Sud; *Friesea propria*, presente in gran parte della Terra Vittoria del Nord; *Friesea gretae*, identificata nelle località di Redcastle Ridge e Cape Hallett. Nonostante la similarità delle principali caratteristiche morfologiche osservabili nelle tre specie sopra elencate, un carattere (numero di setae in subcoxa 2) è fissato nel modello 0-3-3 nelle popolazioni della Penisola Antartica ed in quello 0-2-2 nelle popolazioni della Terra Vittoria. Altre tre caratteristiche morfologiche (lunghezza del corpo, setole sulle aperture genitali maschili e femminili), pur essendo di natura quantitativa, mostrano una differenza statisticamente significativa tra gruppi di popolazioni appartenenti alle tre specie.

Questa suddivisione viene supportata dall'analisi filogenetica "multi locus" basata sullo studio di geni mitocondriali e nucleari e dalla comparazione di intere

molecole del genoma mitocondriale. Inoltre, anche mediante uno studio di delimitazione di specie, i dati genetici suggerirebbero la presenza di tali tre specie come entità distinte con un'elevata confidenza statistica (CARAPPELLI *et al.*, 2020; 2021).

L'approccio combinato di dati morfologici e molecolari ha quindi permesso di identificare tre diverse specie di *Friesea*, e di ridisegnare l'inquadramento tassonomico delle linee evolutive dell'Antartide per questo genere di collemboli.

Analisi del trascrittoma del collembolo antartico *Cryptopygus terranovus*

Le conseguenze del riscaldamento globale del Pianeta hanno ricadute importanti sugli ecosistemi polari e sul loro biota. Per questo motivo abbiamo condotto uno studio mirato a valutare la capacità di resilienza di una delle specie di collemboli maggiormente diffuse nella Terra Vittoria del Nord attraverso un esperimento di analisi del trascrittoma di esemplari sottoposti a stress termico.

Alcuni collemboli di *Cryptopygus terranovus* sono stati esposti in laboratorio per 20 giorni a temperature di 18°C (superiore di ~12.5 °C rispetto a quanto registrato all'esterno), in modo da poter confrontare i loro dati di espressione genica con quelli di esemplari della stessa specie campionati nel loro ambiente naturale.

I risultati ottenuti hanno evidenziato che alcuni meccanismi biologici sembrano attivarsi in via preferenziale negli esemplari di *C. terranovus* sottoposti a stress termico (CUCINI *et al.*, 2021). In particolare, quelli che promuovono il catabolismo proteico e l'attività degli acidi grassi, probabilmente in risposta al ripiegamento errato delle proteine dovuto all'incremento di temperatura dell'ambiente dove sono stati allevati gli esemplari. Sorprendentemente, anche lo sviluppo degli spermatici negli esemplari sottoposti a stress termico sembra essere incrementato rispetto a quelli campionati in ambiente naturale. Questo dato potrebbe essere dovuto alla condizione sperimentale di allevamento, in quanto la vicinanza e l'aggregazione tra gli esemplari avrebbe promosso lo scambio di segnalatori chimici che innescano la risposta sessuale.

Revisione tassonomica e genetica di popolazione *delle specie di acari del genere Stereotydeus*

Le popolazioni del genere di acari *Stereotydeus*, distribuite lungo la fascia costiera della Terra Vittoria, sono state studiate sia per le loro caratteristiche morfologiche (BRUNETTI *et al.*, 2021a), che per le loro relazioni genetiche. L'analisi integrata ha evidenziato che le relazioni tra gli aplotipi mitocondriali delle popolazioni del Nord della Terra Vittoria erano ben definite, con chiare delimitazioni nei rapporti interspecifici, mentre la distribuzione delle specie centro-

meridionali risultava più complessa. Grazie all'analisi "multi-locus" e allo studio di nuovi caratteri morfologici (BRUNETTI *et al.*, 2021b) è stato comunque possibile rilevare differenti livelli di diversità tassonomica che hanno portato alla identificazione delle due nuove specie: *Stereotydeus ineffabilis* e *Stereotydeus nunatakis*. La distribuzione delle specie di *Stereotydeus* della Terra Vittoria segue un modello latitudinale ben definito, con un "cluster" di taxa geneticamente differenziato nella regione settentrionale, caratterizzato da popolazioni delle specie *Stereotydeus belli* e *Stereotydeus punctatus*, ed un secondo gruppo, più complesso in termini di composizione di specie, che comprende le popolazioni del sud della Terra Vittoria. Quest'ultimo insieme include le specie *Stereotydeus delicatus*, *S. ineffabilis*, *S. nunatakis*, *Stereotydeus mollis* e *Stereotydeus shoupi*.

CONCLUSIONI

Gli ambienti degli ecosistemi terrestri dell'Antartide sono popolati da specie di artropodi appartenenti alle classi Collembola e Acari. La loro lunga storia evolutiva sul Continente è stata plasmata dagli eventi paleoclimatici che si sono susseguiti nel corso delle ere geologiche e che hanno portato alla forte riduzione delle specie attualmente presenti in Antartide.

La sopravvivenza di questi taxa è fortemente minacciata dal riscaldamento globale del Pianeta, che colpisce rapidamente gli ambienti polari ed il biota ad essi associato. Rimane quindi evidente che la conoscenza dell'attuale composizione di specie antartiche e delle loro caratteristiche fisiologiche e molecolari appare una priorità assoluta ed un prerequisito per mettere in atto strategie di salvaguardia e conservazione. Gli studi condotti nel nostro laboratorio, incentrati sull'analisi combinata di dati morfologici e molecolari degli organismi campionati in Antartide, insieme allo studio del microbioma ad essi associato, rappresenta un tentativo di ampliare le conoscenze sull'evoluzione e sui processi di adattamento delle specie endemiche del Continente. Uno dei risultati più importanti di questa ricerca avrebbe dimostrato che l'Antartide è popolato da un numero di specie superiore a quello che si ipotizzava all'inizio di questo secolo. Questi taxa presentano alcune caratteristiche comuni; in particolare sono molto simili tra di loro dal punto di vista morfologico (specie criptiche), ma sono ben differenziate a livello genetico. La loro presenza sul Continente Antartico precede gli ultimi eventi glaciali (ultimo massimo glaciale ~20.000 anni fa) e non è frutto di eventi di colonizzazione post-glaciali. Questi risultati saranno fondamentali per guidare i ricercatori che cooperano verso l'obiettivo condiviso di salvaguardare le specie minacciate dai cambiamenti climatici e rap-

presentano un punto di partenza per incrementare le nostre conoscenze sulla sistematica degli invertebrati di uno dei luoghi più inaccessibili ed affascinanti del nostro Pianeta.

RIASSUNTO

La fauna terrestre degli invertebrati dell'Antartide è oggetto di un crescente interesse per scoprire come la vita interagisce con l'ambiente polare e come milioni di anni di evoluzione ne hanno plasmato la biodiversità. Gli approcci tassonomici classici, integrati da strumenti molecolari, stanno migliorando la nostra comprensione delle relazioni sistematiche tra le specie, modificando la nomenclatura di alcuni taxa e cambiando lo status tassonomico di altri. Gli strumenti di espressione genica e di studio del microbioma associato ad acari e collemboli, inoltre, può rappresentare un utile strumento per comprendere i meccanismi di resistenza delle specie endemiche dell'Antartide alla luce dei recenti cambiamenti climatici a livello globale.

AUTORI CITATI

- AGAMENNONE V., JAKUPOVIĆ D., WEEDON J.T., SURING W.J., VAN STRAALLEN N.M., ROELOFS D., RÖLING W.F.M., 2015 - *The microbiome of Folsomia candida: An assessment of bacterial diversity in a Wolbachia-containing animal.* - FEMS Microbiol. Ecol., 91(11): 1-10. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiv128>.
- BAHRNDORFF S., DE JONGE N., HANSEN J.K., LAURITZEN J.M.S., SPANGGAARD L.H., SØRENSEN M.H., YDE M., NIELSEN J.L., 2018 - *Diversity and metabolic potential of the microbiota associated with a soil arthropod.* - Sci. Rep., 8: 2491. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20967-0>.
- BRUNETTI C., SIEPEL H., FANCIULLI P.P., NARDI F., CONVEY P., CARAPELLI A., 2021a - *Two New Species of the Mite Genus Stereotydeus Berlese, 1901 (Prostigmata: Penthalodidae) from Victoria Land, and a Key for Identification of Antarctic and Sub-Antarctic Species.* - Taxonomy, 1: 116-141. <https://doi.org/10.3390/taxonomy1020010>.
- BRUNETTI C., SIEPEL H., CONVEY P., FANCIULLI P.P., NARDI F., CARAPELLI A., 2021b - *Overlooked Species Diversity and Distribution in the Antarctic Mite Genus Stereotydeus.* - Diversity, 13: 506. <https://doi.org/10.3390/d13100506>.
- CARAPELLI A., GREENSLADE P., NARDI F., LEO C., CONVEY P., FRATI F., FANCIULLI P.P., 2020 - *Evidence for Cryptic Diversity in the "Pan-Antarctic" Springtail Friesea antarctica and the Description of Two New Species.* - Insects, 11(3): 141. doi: 10.3390/insects11030141.
- CARAPELLI A., CUCINI, C., FANCIULLI P.P., FRATI F., CONVEY P., NARDI F., 2020 - *Molecular Comparison among Three Antarctic Endemic Springtail Species and Description of the Mitochondrial Genome of Friesea gretae (Hexapoda, Collembola).* - Diversity, 12: 450. <https://doi.org/10.3390/d12120450>.
- CHOWN S.L., CONVEY P., 2007 - *Spatial and temporal variability across life's hierarchies in the terrestrial Antarctic.* - Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci., 362(1488): 2307-2331. <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1949>.
- CONVEY P., 2017 - *Antarctic ecosystems.* In: *Reference Module in Life Sciences.* Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.02182-8>.
- CUCINI C., LEO C., NARDI F., GRECO S., MANFRIN C., GIULIANINI P., CARAPELLI A., 2021 - *First de novo transcriptome analysis of the Antarctic springtail Cryptopygus terranovus (Collembola: Isotomidae) following mid-term heat exposure.* - Antarct. Sci., 33(5), 459-468. doi:10.1017/S0954102021000195.
- FRASER C.I., NIKULA R., RUZZANTE D.E., WATERS J.M., 2012 - *Poleward bound: biological impacts of Southern Hemisphere glaciation.* - Trends Ecol. Evol., 27, 462-471. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2012.04.011>.
- GREENSLADE P., 1995 - *Collembola from the Scotia Arc and Antarctic Peninsula including descriptions of two new species and notes on biogeography.* Pol. Pismo Entomol. 64, 305-319.
- GREENSLADE P., 2010 - *South Shetlands Collembola fauna revisited.* - Antarct. Sci., 22:233-242. <https://doi.org/10.1017/S095410200999071X>.
- LEO C., NARDI F., CUCINI C., FRATI F., CONVEY P., WEEDON J.T., ROELOFS D., CARAPELLI A., 2021 - *Evidence for strong environmental control on bacterial microbiomes of Antarctic springtails.* - Sci. Rep., 11, 2973. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82379-x>
- PUGH P.J.A., CONVEY P., 2008 - *Surviving out in the cold: Antarctic endemic invertebrates and their refugia.* - J. Biogeogr., 35(12): 2176-2186. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2008.01953.x>.
- SINCLAIR B.J., STEVENS M.I., 2006 - *Terrestrial microarthropods of Victoria Land and Queen Maud Mountains, Antarctica: implications of climate change.* - Soil Biol. Biochem., 38 (10), 3158-3170. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.11.035>.
- STEVENS M.I., GREENSLADE P., HOGG I.D., SUNNUCKS P., 2006 - *Southern hemisphere springtails: Could any have survived glaciation of Antarctica?* - Mol. Biol. Evol., 23(5): 874-882. <https://doi.org/10.1093/molbev/msj073>.