



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO

DIPARTIMENTO DI SCIENZE ECOLOGICHE E BIOLOGICHE

DOTTORATO DI RICERCA IN EVOLUZIONE BIOLOGICA E BIOCHIMICA

XXVII CICLO

***Studio della biodiversità fungina nelle comunità
endolitiche antartiche***

(s.s.d. BIO/02)

Coordinatore: Prof.ssa Laura Zucconi Galli Fonseca

Tutori: Prof. Silvano Onofri

Prof.ssa Laura Selbmann

Dottoranda: Dott.ssa Clarissa Cecchini

INDICE

1. INTRODUZIONE	3
1.1.L'ANTARTIDE.....	3
1.1.1.LA GEOGRAFIA.....	4
1.1.2.IL CLIMA.....	6
1.1.3.LA TERRA VITTORIA.....	9
1.1.3.IMPATTI UMANI IN ANTARTIDE	13
1.2.LA VITA NELLA ROCCIA	15
1.2.1.IL SUBSTRATO ROCCIOSO.....	15
1.2.2.LE COMUNITÀ CRIPTOENDOLITICHE	18
1.3.I FUNGHI NERI MERISTEMATICI DELLE ROCCE (RIF)	21
1.3.1.CARATTERI GENERALI.....	21
1.3.2.STRATEGIE DI SOPRAVVIVENZA	22
1.3.3.STUDI FILOGENETICI SUI FUNGHI NERI ANTARTICI	25
1.4.ANALISI MOLECOLARI APPLICATE ALLA SISTEMATICA	26
1.4.1.GENI TARGET.....	28
1.4.2.ANALISI FILOGENETICA.....	30
1.5.METODICHE PER LO STUDIO DI COMUNITÀ MICROBICHE	34
1.5.1.METODICHE COLTURA-DIPENDENTI.....	34
1.5.2.METODICHE COLTURA-INDIPENDENTI.....	34
2. SCOPO DELLA RICERCA.....	38
3. MATERIALI E METODI.....	39
3.1.CAMPIONI DI ROCCIA	39
3.2.ISOLAMENTI.....	42
3.3.ANALISI MOLECOLARI DEGLI ISOLATI	42
3.3.1.ESTRAZIONE DEL DNA E AMPLIFICAZIONI	42
3.3.2.ELETTROFORESI SU GEL D'AGAROSIO	44
3.3.3.SEQUENZIAMENTO, RICOSTRUZIONE DELLE SEQUENZE E CONFRONTO IN BANCA DATI NCBI.....	44
3.3.4.ALLINEAMENTO SEQUENZE E COSTRUZIONE DEGLI ALBERI.....	45
3.4.METODI COLTURA-INDIPENDENTI	46
3.4.1.ESTRAZIONE E QUANTIFICAZIONE DEL DNA METAGENOMICO.....	46

3.4.2.	REAZIONI DI PCR	46
3.4.3.	DGGE (DENATURING GRADIENT GEL ELECTROPHORESIS)	48
3.4.4.	ANALISI DEI PROFILI DGGE	48
3.4.5.	ELABORAZIONE STATISTICA DEI DATI	51
4.	RISULTATI E DISCUSSIONE	52
4.1.	ISOLAMENTI	52
4.2.	ANALISI MOLECOLARI	59
4.3.1.	ALBERI ITS NEIGHBOUR JOINING	67
4.3.2.	ALBERI MAXIMUM LIKELYHOOD	70
4.4.	ANALISI DELLE COMUNITÀ FUNGINE ENDOLITICHE MEDIANTE DGGE....	80
4.4.1.	CLUSTER ANALYSIS DEI PROFILI DGGE	84
4.4.2.	AFFILIAZIONE TASSONOMICA DELLE BANDE PRINCIPALI	87
4.4.3.	NUMERO DI BANDE E INDICI DI DIVERSITÀ NEI PROFILI DGGE.....	94
5.	CONCLUSIONI	103
6.	BIBLIOGRAFIA.....	108
7.	ODOGRAFIA	123

1. INTRODUZIONE

1.1.L'ANTARTIDE

La storia dell'Antartide risale almeno all'antica Grecia, ben prima della sua scoperta. L'uomo era, infatti, già affascinato dalle speculazioni su questo continente. Gli antichi Greci furono i primi ad ipotizzare la sfericità della terra e ad immaginare un emisfero australe più o meno simile al boreale. Questa supposta terra meridionale fu da loro detta *Antarktos* perché opposta ad *Arktos* (orso, riferito alla costellazione dell'Orsa Minore che indica, appunto, il Nord). Oggi noi la conosciamo come "Antartide" (Figura 1.1) (Frank, 1957).



Fig.1.1. L'Antartide

L'esistenza di terre a sud è stata però confermata solo nei primi decenni del XIX secolo, quando iniziò l'esplorazione della regione della Penisola Antartica e di altre aree a sud del Circolo Polare Antartico. Tuttavia, a causa dell'ospitalità del continente, della mancanza di risorse e dell'isolamento, la scoperta venne ignorata per il resto del XIX secolo.

Solo più tardi, dopo la Seconda Guerra Mondiale, il continente antartico è stato oggetto di crescente interesse. Molti Paesi hanno stabilito qui la propria stazione di ricerca e alcuni di essi hanno cominciato a manifestare rivendicazioni. Alla luce di questo, il 1° dicembre 1959 a Washington è stato negoziato e infine firmato da dodici paesi il *Trattato Antartico*, entrato in vigore nel 1961. Questo trattato ha definito l'Antartide come continente dedicato a ricerche scientifiche a scopi pacifici e ha congelato rivendicazioni territoriali. Al giorno d'oggi, la maggior parte delle attività umane in Antartide riguardano attività scientifiche e di supporto logistico relativo.

È ormai un fatto accettato che l'Antartide ha valori scientifici e ambientali unici e inestimabili. Qui gli scienziati studiano l'evolversi del clima, il Big Bang che ha dato origine all'universo, l'attività del sole, la deriva dei continenti, gli adattamenti della vita alle condizioni ambientali più ostili. Ciò che rende unica l'Antartide è, tra l'altro, il fatto che racchiude informazioni sulla storia dell'evoluzione terrestre per milioni di anni. Questo potrebbe rivelarsi una conoscenza molto utile per capire i problemi ambientali di domani.

Negli ultimi anni, la consapevolezza ambientale si è notevolmente sviluppata all'interno della comunità scientifica; sempre più azioni sono state intraprese al fine di preservare l'ambiente dell'Antartide. Di conseguenza, nel 1991 è stato firmato a Madrid il Protocollo sulla Sicurezza Ambientale del Trattato Antartico, noto anche come Protocollo Ambientale Antartico, che promuove a sua volta il rispetto e la tutela dell'ambiente in Antartide e degli ecosistemi associati, rafforzando la responsabilità dei Membri Consultivi nell'assicurare che ogni attività intrapresa sia conforme al Trattato Antartico e che venga svolta nell'interesse della comunità internazionale.

Per quanto riguarda la posizione italiana, il nostro Paese è membro consultivo (con diritto di voto) del Trattato Antartico (che ha sottoscritto nel 1981), e ha istituito con legge n. 84/1985 il Programma Nazionale di Ricerche in Antartide (PNRA) individuando contemporaneamente il sito della Stazione Italiana, la Baia di Terranova nella regione del Mare di Ross.

1.1.1.LA GEOGRAFIA

L'Antartide è il quarto continente per dimensioni, estendendosi per 13.5 milioni di km². E' formato da due masse di terra, *Greater*, o *East Antarctica*, e *Lesser*, o *West Antarctica*, che hanno entrambe raggiunto il Polo Sud nella posizione attuale circa 60 milioni di anni fa. L'Antartide include tutte le terre localizzate sopra il livello del mare a sud del 60°S (Figura 1.2)



Fig.1.2. Mappa del continente antartico

E' il continente più isolato fisicamente a causa della distanza dagli altri continenti e dalle correnti oceaniche ed aeree (Ellis-Evans, 1985). Le sue coste si trovano a 950 km dal Sudamerica, 2300 km dalla Tasmania, 2200 km dalla Nuova Zelanda, 3600 km dall'Africa. Nell'oceano, attorno a questo continente, si viene a creare una barriera biogeografia causata dall'alto gradiente termico; esso è creato dalle temperature basse dell'oceano Antartico (-2°C) che sono separate, attraverso la Convergenza Antartica, da acque più calde e ricche di nutrienti, la cui temperatura in superficie raggiunge i 15°C .

Strati di ghiaccio perenne, con uno spessore medio di 2500 m, ricoprono la maggior parte del continente, all'incirca il 98%, pari al 90% del ghiaccio terrestre ed il 70% dell'acqua dolce totale, nascondendone la morfologia interna. Le coste sono poco articolate ad eccezione della frastagliata Penisola Antartica e delle due grandi insenature del mare di Ross e del mare di Weddell.

Il continente è attraversato per quasi 4000 km da un imponente sistema montuoso, la Catena Transantartica, con cime elevate fino a 4500 m. L'alta catena divide l'Antartide in due subcontinenti: l'Antartide Occidentale e l'Antartide Orientale. L'Antartide Occidentale è in

realità costituito da una serie di isole, la cui separazione è nascosta dalla coltre di ghiaccio; con una superficie complessiva di circa 2,5 milioni di km², comprende anche la Penisola Antartica protesa verso l'America Meridionale e percorsa da una catena montuosa che costituisce il prolungamento geologico della catena delle Ande. L'Antartide Orientale, con oltre 10 milioni di km² di superficie, è un'alta e ininterrotta distesa di altipiani glaciali.

La calotta di ghiaccio che copre quasi interamente il continente si protende oltre la terraferma a creare tavolati di ghiaccio che invadono i mari fino a 150 km dalla costa. Le piattaforme maggiori occupano i due mari interni di Ross e di Weddell.

1.1.2.IL CLIMA

Alla base del clima e del paesaggio inusuale e uniforme dell'Antartide, vi sono la sua posizione sulla Terra e la distribuzione dell'illuminazione solare in due periodi di luce e di buio alternati nell'arco dell'anno.

Per via dell'inclinazione dell'asse di rotazione terrestre rispetto al piano dell'eclittica (ovvero l'orbita che il nostro pianeta percorre intorno alla sua stella), la calotta polare antartica si trova rivolta verso il sole durante la primavera e l'estate australi (21 settembre-23 marzo), mentre è orientata verso l'esterno durante le altre due stagioni.

Per questo motivo, durante l'anno si alternano due periodi di illuminazione, uno prevalentemente diurno ed uno prevalentemente notturno (Nienow & Friedmann, 1993).

Nel corso della primavera e dell'estate, soprattutto spostandosi con la latitudine verso il polo, i giorni si allungano fino a durare anche mesi, mentre le notti diventano sempre più brevi. Al contrario, in autunno ed in inverno, le notti si estendono progressivamente e i giorni si accorciano; al polo sud, in un anno, ci sono una sola alba ed un solo tramonto, e sei mesi di notte continua si alternano a sei mesi di giorno continuo.

Il clima Antartico è il più rigido sulla Terra. Le temperature non superano mai, se non eccezionalmente in qualche punto lungo la costa, gli 0°C e possono raggiungere punte estreme che sfiorano i -90°C. Le precipitazioni sono scarse e quasi esclusivamente nevose. Le nevicate, principalmente distribuite lungo le coste, diminuiscono verso l'entroterra e sono pressoché inesistenti nella regione centrale. L'Antartide è anche il continente più ventoso (Onofri et al., 2007b). I venti catabatici, cioè di discesa dal Plateau Polare, sono generati dallo scontro di aria fredda e densa che scende dagli altipiani centrali con aria più calda che proviene dall'oceano; questi venti raggiungono velocità di 200-250 km/h. Nel 1972 alla stazione francese Dumont d'Urville furono superati i 320 km/h (Manzoni, 2001).

L'Antartide può essere suddiviso in tre regioni climatiche, denominate regione sub-antartica, regione antartica marittima e regione continentale antartica, corrispondenti a differenti aree biogeografiche (Holdgate, 1977) (Figura 1.3).

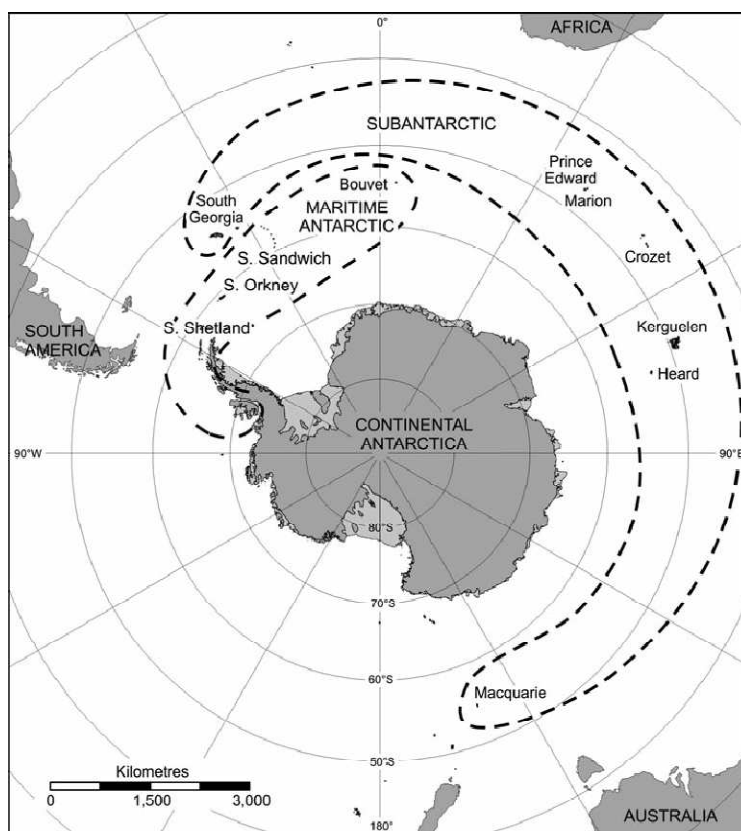


Fig.1.3. Mappa del continente Antartico e dell'Oceano Meridionale circostante, con indicazione delle tre regioni biogeografiche terrestri comunemente riconosciute all'interno della regione (Convey 2010)

La *regione sub-antartica* è composta dalla maggior parte delle isole antartiche a nord del 60° sud. È caratterizzata da un fresco clima oceanico, con temperature medie mensili oltre lo zero per almeno sei mesi, precipitazione media annuale sopra i 1000 mm e tundra come vegetazione. La vegetazione è dominata da piante vascolari a basse altitudini e da briofite e licheni a più alte altitudini.

La *regione antartica marittima* è caratterizzata da un freddo clima marittimo, umido nell'area settentrionale e secco in quella meridionale. Le temperature medie mensili sono sopra gli 0°C nei periodi più caldi e raramente inferiori a -15°C in inverno a sud e a -10/-12°C a nord. Le precipitazioni annuali oscillano fra meno di 350 a più di 500 mm. Spettacolari associazioni di muschi e licheni multicolori, fogliosi e fruticosi appartenenti ai generi *Himantormia*, *Umbilicaria* ed *Usnea*, altri crostosi tra cui i generi *Acarospora*, *Buellia*, *Caloplaca*, *Lecanora*, *Lecidea*, *Rizhoplaca* (Figura. 1.4), sono prevalenti nelle aree rocciose costiere della

zona marittima dove il clima freddo marittimo, umido nel versante nord e secco in quello sud, raggiunge temperature medie mensili sopra gli 0°C per circa 3 mesi durante l'anno. Le piante superiori sono presenti in Antartide con sole due specie *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. (*Caryophyllaceae*) e *Deschampsia antarctica* Desv. (*Poaceae*) (Onofri, 2007b), la cui presenza è comunque confinata nell'Antartide marittima e nelle zone subantartiche (Figura 1.5).



Fig.1.4. A sinistra distesa di licheni, a destra *Usnea* sp. (www.mna.it)



Fig.1.5. A sinistra *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. (*Caryophyllaceae*); a destra *Deschampsia antarctica* Desv. (*Poaceae*) a King Gorge Island, South Shetland Islands, Antartide marittima (barra = 10 cm). Foto Silvano Onofri, 2002

L'*Antartide continentale* comprende tutto il continente antartico ad esclusione sia delle isole che delle zone costiere e nord-est della penisola Antartica; è caratterizzata da un clima freddo arido nelle aree costiere; qui crescono licheni, muschi e alghe mentre le piante a fiore e le felci sono assenti e le marcanzie sono molto rare. La presenza di forme di vita aumenta e le

popolazioni diventano più abbondanti andando dal Plateau polare, dove non c'è vita, verso la costa, poiché le condizioni diventano meno ostili e il periodo con la superficie del suolo sopra il punto di congelamento diventa più lungo. Una stretta striscia di costa del continente antartico è libera dai ghiacci ed è qui che si concentra la vita degli ecosistemi terrestri. I produttori primari sono cianobatteri, alghe, licheni e briofite; i muschi sono per lo più incapaci di completare il loro ciclo vitale e quindi si riproducono quasi solo asessualmente. I licheni riescono a sopravvivere a condizioni estremamente secche e fredde, e quindi costituiscono la parte più cospicua della flora antartica. Durante l'inverno antartico, il loro metabolismo è ridotto o inattivo ed essi sopravvivono in uno stato disidratato; quando le temperature aumentano, l'acqua è nuovamente disponibile e i licheni lentamente si reidratano e metabolizzano (Onofri et al., 2007b).

In generale, comunque, l'umidità è sempre molto scarsa a causa delle basse temperature: il clima continentale dell'Antartide ha le basse quantità di precipitazioni e di umidità tipiche dei deserti; paradossalmente, quindi, malgrado contenga la maggior parte delle riserve di acqua dolce globale (circa 70%), mai disponibile in forma liquida, risulta il più grande deserto della Terra (Manzoni, 2001).

Le prevalenti condizioni Antartiche di bassa temperatura, bassa disponibilità di acqua allo stato liquido, frequenti cicli di gelo-disgelo, scarse precipitazioni, forti venti, alta incidenza solare e specialmente radiazione UV, costituiscono insieme importanti fattori limitanti per la vita (Ruisi et al., 2007). Per questo la biologia dell'Antartide continentale, più che quella di qualsiasi altro continente, è dominata da microrganismi (Nienow & Friedmann, 1993), che presentano un alto livello di adattamento e resistenza alle estreme condizioni ambientali.

1.1.3.LA TERRA VITTORIA

La Terra Vittoria è una regione dell'Antartide continentale, individuabile nella parte inferiore del continente, così chiamata da James Clark Ross (che la scoprì nel gennaio 1841), in onore della sovrana britannica Vittoria. Si estende su un'area di circa 140 mila km²; confina ad est con il Mare di Ross e ad ovest con la Terra di Wilkes. Questa regione viene normalmente "suddivisa" in due aree (Terra Vittoria del Nord e Terra Vittoria del Sud).

L'area della Terra Vittoria del Nord si estende in un'area che va da 72° 19' S 170° 16' E a 75° 59' S 159° 30' E mentre l'area di Terra Vittoria del Sud è compresa tra 76° 55' S 160° 55' E e 78° 12' 166° 25' e include le caratteristiche Valli Secche di McMurdo (Figura 1.6).

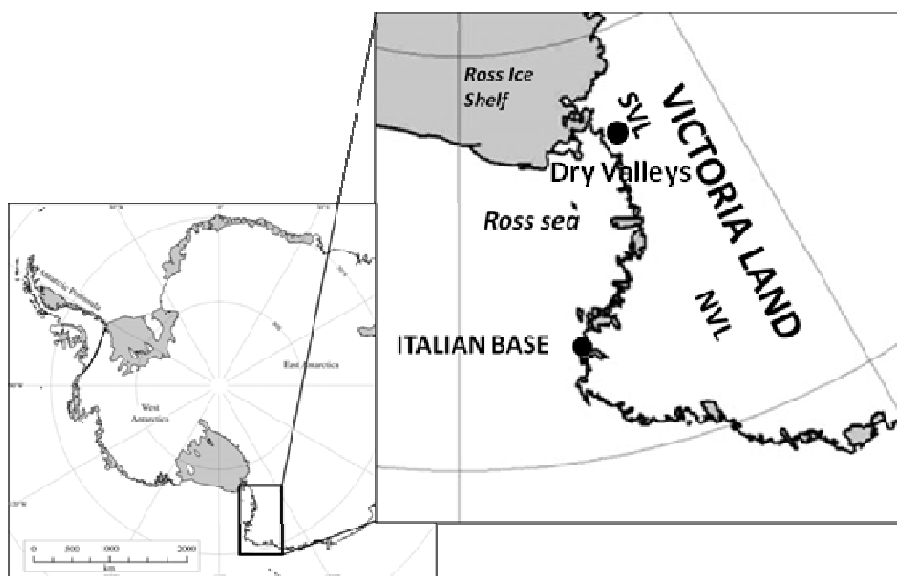


Fig.1.6. Terra Vittoria

Il clima della Terra Vittoria del Nord è tipico delle zone costiere dell'Antartide Continentale: la temperatura media mensile oscilla tra -2°C e -5°C durante il mese di gennaio, e può raggiungere $-26^{\circ}\text{C}/-30^{\circ}\text{C}$ durante il mese più freddo (agosto), con medie annuali comprese tra $-17^{\circ}\text{C}/-19^{\circ}\text{C}$. Le precipitazioni, presenti soltanto sotto forma nevosa, sono piuttosto scarse, con medie annue che oscillano tra 100 e 200 mm. L'umidità dell'aria invece tende ad aumentare durante la stagione estiva, grazie alle masse di aria umida provenienti dal mare (Grigioni et al., 1992). La Terra Vittoria del Nord include il territorio di Baia Terra Nova (Figura 1.7) che è la zona più ventosa della regione, caratterizzata da venti particolarmente intensi (venti catabatici) che si incanalano nelle valli con velocità pari a circa 160 km orari (Kurtz & Bromwich, 1985). Nelle zone più interne, a causa della distanza dal mare e l'aumentare dell'altitudine, le condizioni si fanno molto più stringenti e le temperature scendono significativamente. In alcune zone montuose ad elevata altitudine, la temperatura raramente supera i -30°C anche in piena estate australe. Nella Terra Vittoria del nord sono presenti aree periodicamente prive dai ghiacci, essenzialmente rappresentate da zone lungo le coste e vette di montagne; il substrato roccioso qui è piuttosto vario e include arenarie, graniti, rocce vulcaniche, basalti ecc. (Orombelli, 1986).



Fig.1.7. Terra Nova Bay, Terra Vittoria del Nord, Antartide

Le Valli Secche di McMurdo (Figura 1.8), note anche come Deserto di Ross, situate ad ovest dello Stretto di McMurdo, all'interno della Terra Vittoria del Sud, rappresentano il più grande e caratteristico deserto del Continente Antartide che si estende su una superficie di circa 7.000 Km². Il paesaggio è dominato da un'alternanza di catene montuose e valli glaciali, o “valli secche”, costituite da depositi sedimentari di arenaria del *Beacon Supergroup* (il substrato roccioso più importante per la colonizzazione da parte di organismi) che giacciono su rocce metamorfiche e intrusive (prevalentemente graniti e doleriti). Nel Deserto di Ross le Valli Secche di McMurdo in particolare costituiscono nel loro insieme, la più grande regione del Continente relativamente libera dai ghiacci. Da nord verso sud, le valli più importanti sono Victoria Valley, Wright Valley, Taylor Valley e Beacon Valley.



Fig.1.8. Wright Valley, Valli Secche di McMurdo

Questa regione rappresenta un ecosistema desertico freddo. Il clima è uno dei più rigidi della Terra a causa delle basse temperature che si registrano durante l'intero anno, delle scarse precipitazioni e dei forti venti. Durante la stagione invernale la temperatura esterna oscilla tra -20°C e -50°C , ma può raggiungere anche valori molto più bassi. In estate la temperatura aumenta e può raggiungere -15°C ; durante questo periodo le condizioni climatiche diventano favorevoli per i processi biologici degli organismi che vivono in questo ambiente. L'unica forma di precipitazione nel Deserto di Ross è costituita da neve; nell'arco di un anno si raggiungono in totale meno di 10 cm circa di neve nelle valli e una quantità forse leggermente superiore sulle montagne.

Per gli scienziati questa regione risulta essere l'ambiente terrestre più simile al Pianeta Marte, in virtù del suo clima estremo; viene perciò considerata un importante modello terrestre per gli studi relativi alla possibile esistenza di vita extraterrestre (Onofri et al., 2004).

Gli studi sugli organismi che occupano la Terra Vittoria sono costantemente aumentati nel tempo (Friedmann et al., 1988; Onofri & Tosi, 1992; Onofri & Friedmann, 1998; Green et al., 1999; Onofri, 1999; Onofri et al., 1999, 2000, 2005a, 2005b, 2007a, 2007b; Smith, 2000; Tosi et al., 2002; Castello, 2003; Selbmann et al., 2005, 2008, 2013; Adams et al., 2006; Zucconi et al., 2014) aprendo una finestra sulla loro biodiversità ed incredibile capacità di sopravvivenza. Molto importanti sono tutti gli studi che forniranno informazioni sui

meccanismi biologici di tolleranza e adattamento sviluppati dagli organismi che colonizzano questa regione, caratterizzata da stress ambientali tanto spinti.

1.1.3.IMPATTI UMANI IN ANTARTIDE

Oggi l'Antartide è considerato uno dei luoghi meno influenzati dalla presenza umana e per questo più naturale, un vero simbolo per la conservazione globale. In realtà il suo ambiente non è incontaminato, in quanto esposto all'impatto delle attività antropiche globali e locali (Bargagli et al., 2005; Bargagli, 2008). Tra le conseguenze delle attività umane che agiscono indirettamente sull'Antartide troviamo il buco nell'ozono, il riscaldamento globale e la diffusione di inquinanti.

L'attività umana in Antartide è aumentata notevolmente dal 1950, inizialmente a causa di crescenti interessi geo-politici e scientifici da parte delle nazioni nella regione e la conseguente creazione di stazioni di ricerca e di altre infrastrutture, seguita dalla rapida espansione del settore turistico dall'inizio del nuovo millennio (Hughes et al., 2015).

Anche l'Italia, negli ultimi anni, ha aumentato la ricerca scientifica in quest'area mentre i primi turisti sono comparsi nel 1993 (Harris, 1998). Da anni si cerca di sviluppare procedure appropriate per valutare e limitare il danno provocato dall'impatto della ricerca e del turismo nell'ambiente antartico (Onofri et al., 2007b). La sensibilità di questo ambiente all'impatto antropico è dovuta anche alla sua bassa capacità di assorbire e recuperare dai cambiamenti (Harris, 1998); questo è dovuto in primo luogo alle basse temperature e quindi ai tassi metabolici lenti della componente biologica, ma anche al territorio che si è evoluto attraverso migliaia di anni in assenza di presenza umana, fattore per il quale l'Antartide è di estremo interesse scientifico (Harris, 1998).

Alcune aree sono classificate come ASPA (Antarctic Specially Protected Areas, secondo il Protocollo di Madrid del 1991); in esse l'accesso è limitato per preservare la natura e l'ambiente oltre ai valori scientifici, storici ed estetici (Onofri et al., 2007; Terauds et al., 2012). Nonostante questi tentativi, spesso la flora fungina riflette proprio la presenza umana. Infatti, esaminando ad esempio la distribuzione di lieviti in numerosi campioni di suolo antartico (prelevati dalle Valli Secche, lungo le Transantarctic Mountains e a Mt. Howe), il maggiore numero è stato riscontrato proprio vicino alla stazione di McMurdo, contaminata dalle attività umane (Meyer et al., 1962). Anche tracce di contaminati, che possono influenzare negativamente la composizione delle comunità fungine del suolo, quali metalli pesanti (piombo, zinco e rame) derivanti dalle attività umane, sono stati rinvenuti in alcuni suoli della regione di McMurdo Sound (Claridge et al., 1995).

L'impatto dei cambiamenti climatici sull'Antartide è un tema trattato in molti articoli scientifici (Turner et al., 2005; Convey, 2011; Hogg & Wall, 2011), in particolare gli effetti dell'aumento della temperatura, che causa lo scioglimento dei ghiacci e dei ghiacciai, e l'assottigliamento dello strato di ozono, che aumenta l'esposizione ai raggi UV da parte di molti organismi (Day et al., 1999; Ferreyra et al., 1999; Onofri et al., 2007).

Nel corso degli ultimi 50 anni, in alcune aree antartiche e sub-antartiche si è assistito ad uno degli aumenti della temperatura media dell'aria più drammatici del pianeta. Per esempio, recenti dati diffusi dalla NASA hanno mostrato che le temperature medie dell'aria annuali lungo la Western Antarctic Ice Sheet (WAIS) sono già aumentate di circa 1°C e più di 2°C nell'Antartide marittima (Turner et al. 2005; Steig et al., 2009), valori molto più alti rispetto all'aumento generale della temperatura della superficie della Terra che è stato tra 0,3 e 0,6° C nel secolo scorso (Cane et al., 1997).

Nello stesso periodo, le introduzioni di specie non indigene sono continuate ad aumentare in particolare nelle isole sub-antartiche (Frenot et al., 2005), con conseguente scomparsa degli ecosistemi limite preesistenti (Parmesan & Yohe, 2003; Pimm, 2008; Root et al., 2003; Thomas et al., 2004); gli organismi adattati alle particolari condizioni ambientali intanto, possono essere facilmente sostituite da specie meno specializzate, ma più competitive (Selbmann et al., 2012).

Nei siti terrestri antartici, l'introduzione di piante e animali invasivi non autoctoni o l'inquinamento chimico possono essere ben visibili, con un impatto chiaro. Al contrario, la contaminazione microbica o genetica non è visivamente evidente e non è considerata di routine dai non microbiologi. Tuttavia, si possono verificare impatti a lungo termine sulla biodiversità microbica (Hughes et al., 2015). I microrganismi non-nativi introdotti da aree al di fuori dell'Antartide, o da altri territori biologicamente distinti dall'Antartide, possono possedere capacità ecologiche, biochimiche o fisiologiche che alterano la struttura e la funzione della comunità indigena. L'introduzione di microrganismi invasivi alloctoni potrebbe potenzialmente portare ad una perdita di biodiversità microbica nativa. In aggiunta a questo, specie non indigene possono contenere geni che codificano per proprietà che non si trovano normalmente nelle comunità microbiche antartiche incontaminate (ad esempio, la resistenza agli agenti antimicrobici o altri vantaggi fisiologici o biochimici). Questi geni possono essere trasferiti dalle specie non indigene ai microrganismi autoctoni attraverso trasferimento genico laterale. Se questi geni sono espressi nei microrganismi autoctoni, potrebbero alterare le proprietà funzionali delle singole specie e della comunità nel suo insieme (Baker et al, 2003; Storrie-Lombardi e Williamson, 2010; Cowan et al, 2011).

Mentre il dibattito in corso, spesso motivato politicamente, continua a dominare la discussione sul cambiamento climatico e le sue conseguenze, è praticamente certo che l'aumento della temperatura e le introduzioni di specie aliene si intensificheranno e continueranno ad influenzare gli ecosistemi terrestri dell'Antartide nei prossimi 50 anni.

Pertanto è oggi di primaria importanza approfondire le conoscenze sugli ecosistemi terrestri antartici prima che qualunque cambiamento ulteriore ne alteri l'equilibrio in modo da poter utilizzare questi dati per monitorare variazioni future dell'ecosistema (Hogg & Wall, 2011).

1.2.LA VITA NELLA ROCCIA

1.2.1.IL SUBSTRATO ROCCIOSO

La roccia può essere definita come composto naturalmente formato, consolidato da uno o più minerali. I minerali sono solidi cristallini inorganici con una definita composizione chimica (Plummer & McGeary, 1996).

La superficie della roccia, nell'interfaccia tra atmosfera e litosfera, è un esempio di antica nicchia terrestre poiché i microrganismi iniziarono a colonizzarla già da quando la terra era popolata unicamente da biofilm microbici. Queste comunità microbiche altamente specializzate, chiamate biofilm subaerei (SAB; Gorbushina & Krumbein, 2000; Gorbushina, 2007), rappresentano un gruppo di colonizzatori ubiquitari dei sedimenti e delle superfici rocciose in una varietà di ambienti estremi caldi e freddi come pure nelle più avverse condizioni chimiche e fisiche misurabili su questo pianeta.

La superficie rocciosa può essere considerata un ambiente estremo esposto ad alta radiazione solare, elevate temperature, bassa disponibilità di nutrienti, alte concentrazioni di elettroliti e bassa umidità (Cary et al., 2010).

I SAB sono composti da un complesso consorzio di batteri, alghe, funghi e licheni, la cui composizione varia nel tempo in rapporto alla disponibilità di nutrienti e delle fluttuazioni dei fattori di stress, anche se i meccanismi di interazione tra i componenti e con il substrato minerale sono ancora poco conosciuti (Gorbushina, 2007). Le comunità litiche sono caratterizzate dalla produzione di matrici extra-cellulari di natura polisaccaridica (EPS) (Wimpenny, 2000; de los Rios et al 2002; Kemmling et al 2004; Omelon et al 2006), fondamentale nel promuovere le interazioni tra gli organismi, l'atmosfera e il substrato. In particolare, la matrice esopolisaccaridica (i) facilita le connessioni tra i microrganismi, che stimolano la crescita batterica e il contatto con i fotobionti (Gorbushina et al., 2005); (ii) varia in base a modificazioni atmosferiche e climatiche; (iii) limita lo stress osmotico, grazie alla

capacità di ritenzione idrica, permettendo la sopravvivenza della comunità durante i periodi di scarsa disponibilità di acqua (Neu, 1996; Potts, 1999; Decho, 2000; Gorbushina, 2007). I biofilms subaerei producono anche dei pigmenti scuri, come ad esempio i carotenoidi e le melanine, che proteggono dall'esposizione agli UV e da fattori chimici e biologici. Pigmenti ed EPS costituiscono insieme i più importanti meccanismi di sopravvivenza dei microrganismi epilitici.

Gli habitat offerti dalle rocce per la crescita dei microrganismi sono diversi (Golubic et al., 1981). Il primo, partendo dalla superficie, è l'habitat epilitico costituito dalla stessa superficie rocciosa. L'interno della roccia invece rappresenta la "nicchia endolitica" e viene diversamente sfruttata dalle comunità microbiche esistenti: così mentre gli organismi *euendolitici* (prevalentemente licheni) penetrano attivamente nella roccia formando una sorta di tunnel (anche se continuano a possedere una porzione epilitica) mediante processi attivi di dissoluzione della matrice, i *casmoendolitici* (Fig. 1.9) colonizzano spaccature e fessure già esistenti di rocce che hanno subito una qualche forma di erosione. I *criptoendolitici* infine, vivono negli interstizi di rocce porose (compresi i tunnel lasciati dagli organismi euendolitici), completamente al di sotto della superficie rocciosa (Friedmann & Ocampo-Friedmann, 1984).

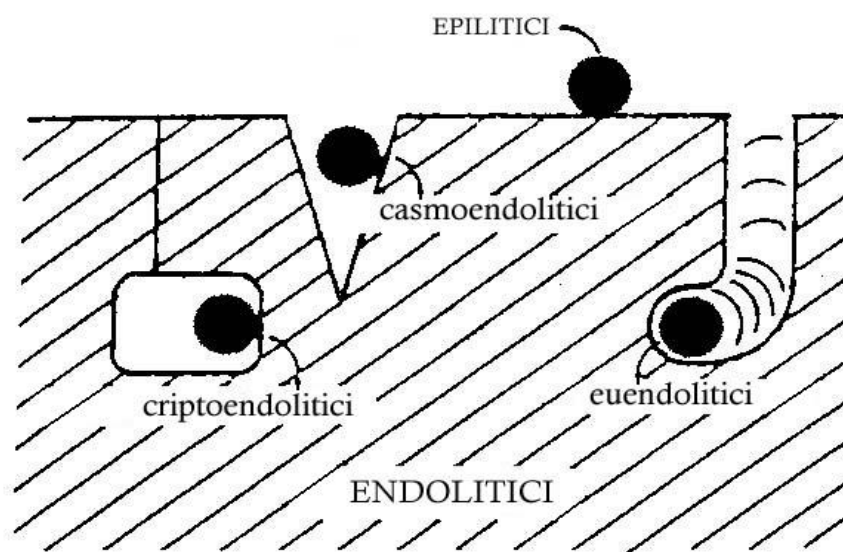


Fig.1.9. La vita nella roccia (Golubic et al., 1981)

Nella zona costiera dell'Antartide continentale, caratterizzata da un clima relativamente più mite, la superficie delle rocce offre un ambiente favorevole per la crescita di muschi e licheni che svolgono il ruolo di produttori primari, ma procedendo verso l'interno, il clima diventa più rigido e i microrganismi endolitici, adattati a vivere dentro la roccia, sono la forma di vita dominante (Nienow & Friedmann, 1993).

Sebbene esistano altri tipi di habitat estremi, essi, a differenza delle rocce, sono raramente soggetti a fluttuazioni così rapide nei parametri fisico-chimici. In generale, differenze considerevoli nelle condizioni microclimatiche derivano dall'esposizione della roccia. La temperatura di superficie può mostrare cambiamenti giornalieri e annuali, spesso variando all'interno di ampi intervalli. Il nanoclima risultante (clima su scala millimetrica), dipende sostanzialmente dalla radiazione solare incidente e dalla temperatura dell'aria. Durante l'inverno antartico, da metà aprile ad agosto, non essendoci luce solare, la temperatura delle rocce è solitamente 1°C o 2°C più bassa di quella dell'aria circostante, mentre in estate la temperatura può essere addirittura 20°C superiore a quella dell'aria (Friedmann et al., 1987).

Il substrato roccioso è caratterizzato anche da variazione nel tasso di irraggiamento e nella disponibilità idrica. La presenza di acqua allo stato liquido non è costante: si passa da fasi di congelamento (l'acqua è assente o presente sotto forma di ghiaccio o neve) a momenti del giorno o a periodi dell'anno in cui l'acqua ricopre i biofilm. Questi estremi cambiamenti ambientali, costringono gli abitanti delle rocce a periodi di dormienza indotti dallo stress, dai quali possono rapidamente riattivarsi a seguito del ripresentarsi di condizioni più permissive. Solo organismi con un ampio range di tolleranza a molteplici e variabili stress possono vivere stabilmente in queste condizioni; i microrganismi presentano infatti un elevatissimo grado di specializzazione e di adattamento. Il termine *poikilo-tollerante* (resistente a variabili stress; dal greco *poikilos*: variegato) è stato coniato per descrivere il comportamento di organismi che vivono in ambienti in cui la tolleranza a parametri multipli e variabili è essenziale per la sopravvivenza (Gorbushina, 2007).

Al fine di colonizzare con successo le superfici rocciose, i microrganismi impiegano diverse strategie fisiche di penetrazione della roccia, per conquistare un riparo contro gli agenti ambientali estremi. Possono insinuarsi in fessure e crepe esistenti (Pinna & Salvadori, 1999) o negli spazi intercristallini del materiale roccioso (Friedmann, 1982; Urzi & Realini, 1998; Sterflinger et al., 1997). È stata anche osservata la penetrazione intracristallina (Gorbushina, 2007; Favero-Longo et al., 2011).

Sebbene i microrganismi siano particolarmente versatili nella colonizzazione delle rocce è bene specificare che molto dipende anche dalle caratteristiche della roccia stessa. Infatti, le proprietà fisiche, come per esempio la porosità, e gli elementi che compongono la roccia ospite (per esempio C, P, K, S ed il contenuto in metalli) possono essere determinanti nell'iniziale colonizzazione come pure nella crescita e sopravvivenza delle comunità microbiche (Gleeson et al., 2005). Per esempio è stato dimostrato che Al, Si, e Ca hanno un impatto significativo sulla struttura della comunità fungina dimostrando che la composizione

chimica dei substrati minerali è in grado di esercitare una pressione selettiva sulle popolazioni fungine *in situ* (Gleeson et al., 2005).

I microrganismi viventi sulla superficie rocciosa raramente crescono come colonie comprendenti singole specie: essi formano comunità complesse da cui deriva il loro successo e la loro sopravvivenza (Cary et al., 2010).

In Antartide sono state descritti numerosi tipi di comunità endolitiche (Nienow & Friedmann, 1993; Hughes & Lawley, 2003), ma la più diffusa e studiata è sicuramente la comunità criptoendolitica.

1.2.2.LE COMUNITÀ CRIPTOENDOLITICHE

Nelle zone più proibitive dei freddi deserti antartici, le comunità microbiche criptoendolitiche rappresentano la forma predominante di vita terrestre. La roccia come substrato, riveste un ruolo preponderante nei deserti freddi dell'Antartide (Nienow & Friedmann, 1993) poiché quando le condizioni sulla superficie rocciosa diventano proibitive per la vita microbica, queste comunità formano un particolare ecotipo (Golubic et al., 1981) concentrando la crescita in microscopiche nicchie sotto la superficie di rocce porose (Nienow & Friedmann, 1993).

All'interno del substrato roccioso, si assiste infatti ad importanti cambiamenti di luce, di temperatura e di umidità (nanoclima) tali da caratterizzare un ambiente con differenti condizioni fisico-chimiche. Quindi, dove i licheni epilitici sono rari o assenti e organismi casmoendolitici si trovano solo occasionalmente nelle fessure e nelle spaccature delle rocce, gli organismi criptoendolitici colonizzano frequentemente le porosità delle rocce. Sono state descritte comunità criptoendolitiche dominate dai licheni e cianobatteriche nel Deserto di Ross, sensibilmente influenzate dal livello di umidità dei substrati (Friedmann et al., 1988).

I microrganismi criptoendolitici antartici costituiscono comunità molto semplici comprendenti solo poche specie (Blackhurst et al., 2003). La comunità dominata da licheni nel Deserto di Ross è quella più intensamente studiata (Friedmann, 1982). I licheni possono essere considerati gli organismi pionieri di ambienti terrestri estremi (Kappen, 1974) mostrando diverse strategie di crescita e distribuzione (Kappen, 1993); nonostante i licheni siano comunemente descritti come il prodotto di una simbiosi mutualistica tra funghi e alghe, diversi studi basati su metodi coltura-dipendenti e -indipendenti hanno messo in luce la presenza di diverse popolazioni batteriche e fungine associate ai licheni ed i loro potenziali ruoli nella simbiosi (Grube et al., 2009; Selbmann et al., 2010; 2013b).

La transizione da un morfotipo epilittico ad uno endolitico, dove i licheni perdono le proprie caratteristiche morfologiche e modificano la loro normale modalità di crescita per occupare gli spazi tra cristalli di rocce porose, è uno degli adattamenti più sorprendenti alle proibitive condizioni di queste aree (Friedmann et al., 1987). Ad ogni modo questi licheni (criptoendolitici) sembrano aver conservato la potenziale capacità di formare il tallo: quando colonizzano la superficie in nicchie protette, come piccole depressioni e crepe poco profonde, formano nuovamente le strutture sessuali epilittiche, gli apotecii. Nelle Valli Secche di McMurdo, il ritrovamento di licheni epilittici (*Buellia grisea* Dodge et Baker, *B. pallida* Dodge et Baker, *Carbonea capsulata* (Dodge et Baker) Hale, *Lecanora fuscobrunnea* Dodge et Baker, *Lecidea cancriformis* Dodge et Baker e *L. siplei* Dodge et Baker) (Friedmann, 1982; Hale, 1987), presenti in nicchie protette sulla superficie di rocce colonizzate da forme criptoendolitiche, sembra dimostrare una qualche connessione fisica, anche se non sempre chiara, tra la forma criptoendolitica e quella epilittica al cambiamento delle condizioni estreme.

All'interno della roccia il nanoclima è assai più favorevole rispetto alle condizioni esterne: la luce del sole può penetrare attraverso la roccia semi-traslucida grazie alla sua natura quarzica e fornire abbastanza energia per la fotosintesi di alghe e cianobatteri; i minerali sono garantiti dalle rocce stesse o da minime deposizioni di polvere su queste; piccole quantità di acqua penetrano grazie alla porosità e l'umidità interna si può mantenere per periodi considerevoli (Friedmann & Weed, 1987); la temperatura è maggiormente stabile che sulla superficie grazie all'inerzia termica delle rocce e alla non esposizione diretta ai venti raggiungendo spesso livelli significativamente più alti rispetto a quella esterna (McKay & Friedmann, 1985).

Tipicamente, in risposta ad un gradiente di luce, la comunità forma strati diversamente colorati e biologicamente distinti sotto la crosta (Figura 1.10): nell'ordine, dalla superficie verso l'interno della roccia, c'è una zona nera dove sono presenti funghi lichenizzati insieme a funghi neri meristemati non lichenizzati, una zona bianca occupata da un'associazione lichenica composta da funghi e alghe cloroficee incorporate nella matrice rocciosa, una zona verde, caratterizzata dalla presenza di alghe cloroficee endemiche non lichenizzate e, occasionalmente, una zona bluastro dove predominano cianobatteri. Le alghe includono i generi *Trebouxia* e *Pseudotrebouxia*, che sono i fotobionti dell'associazione lichenica, presenti nella banda bianca, e *Hemicloris antarctica*, un'alga verde endemica non lichenizzata, nella zona verde.

Il cianobatterio *Chroococcidiopsis* spp. è spesso presente nella zona verde, occasionalmente con il genere *Gloeocapsa*. Nelle zone bianche e nere, si trovano ife fungine pigmentate e

ialine; la pigmentazione nel livello più alto sembra costituire un adattamento ad una maggiore intensità di luce (Nienow & Friedmann, 1993).

Altri funghi non lichenizzati dalla parete spessa e i pigmenti scuri, che mostrano una crescita meristemica, sono stati isolati nella zona nera e descritti come nuovi taxa, alcuni probabilmente endemici per l'Antartide.

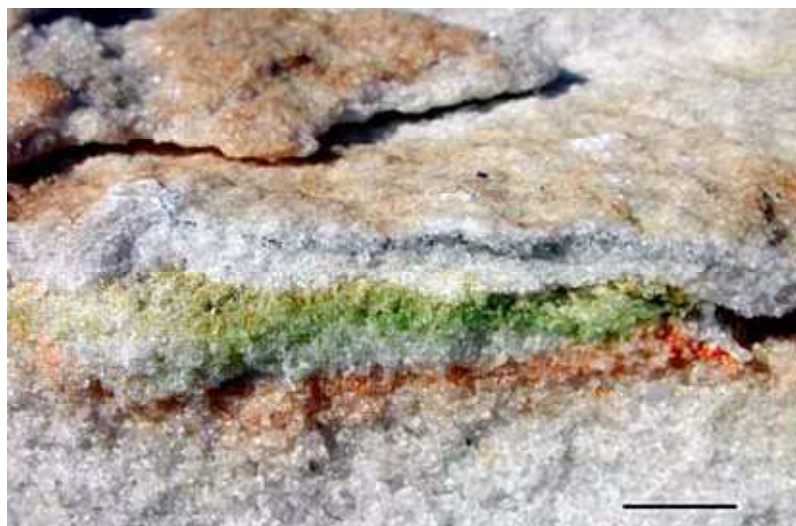


Fig.1.10. Colonizzazione criptoendolitica di una comunità dominata dai licheni lungo una frattura di arenaria (Battleship Promontory, Convoy Range, Valli Secche di McMurdo). (barra = 10 mm) (Onofri et al., 2007b)

A volte, in relazione all'ambiente, una o due delle zone precedentemente descritte possono essere assenti; quando l'intensità della luce è alta, può capitare che sia presente soltanto la zona nera; laddove l'intensità sia bassa, può esserci solo la zona verde (Friedmann, 1982). Questa particolare stratificazione è mantenuta a causa dei differenti requisiti fisiologici; ad esempio la tolleranza a differente radiazione solare, e delle diverse competenze degli organismi membri della comunità; la produzione di sostanze antibiotiche che regolano la crescita di altri componenti.

I funghi, sia lichenizzati che non, producono sostanze biologicamente attive, che inibiscono almeno alcuni dei membri fotosintetici della comunità e sono responsabili della suddivisione zonale degli organismi nella comunità (Friedmann, 1993). I cianobatteri e i fotobionti sono i produttori primari, i micobionti sono i consumatori e i batteri incolore sono i decompositori.

Comunità endolitiche con la tipica stratificazione sopra descritta per le rocce arenarie, con una crosta marrone-rossastra seguita da una zona nera, una bianca, una verde non ben delineata e discontinua, e una zona basale marrone-rossastra di accumulo, sono state trovate anche in campioni di pegmatite, una roccia vulcanica e quindi scarsamente porosa (Onofri & Friedmann, 1998).

1.3.I FUNGHI NERI MERISTEMATICI DELLE ROCCE (RIF)

1.3.1.CARATTERI GENERALI

I funghi neri meristematici (de Hoog & Hermanides-Nijhof, 1977), o lieviti neri (Sterflinger, 2006), rappresentano un gruppo ubiquitario di funghi estremofili o estremotolleranti, capaci di formare aggregati di cellule con pareti ispessite e melanizzate.

Per la loro capacità di formare colonie microscopiche sul substrato roccioso sono stati anche definiti funghi microcoloniali (*microcolonial fungi*, MCF, Staley et al., 1982) o funghi neri delle rocce (*rock inhabiting fungi*, RIF, Ruibal et al., 2009) mentre la denominazione di funghi meristematici deriva dalla loro capacità di formare aggregati lenta espansione che assumono la tipica forma a cavolfiore a seguito del loro accrescimento isodiametrico non polare (Sterflinger et al., 1999).

Sono stati ritrovati dapprima nei deserti caldi dell'Arizona (Stanley et al., 1982), e successivamente nei freddi deserti antartici (Friedmann et al., 1987). Oggi, è noto che i RIF hanno una distribuzione assai più ampia, in ambienti caratterizzati da condizioni estreme come scarsa disponibilità di nutrienti, mancanza di acqua, alta radiazione solare e temperature estreme: regioni semi-aride del Mediterraneo, le Valli Secche antartiche, ghiacciai artici e regioni alpine (Urzì et al., 1995; Wollenzien et al., 1995; Sterflinger et al., 1997; Sterflinger & Prillinger, 2001; Ruibal et al., 2005; Gorbushina, 2007; Sert et al., 2007a; Selbmann et al., 2008, 2014e; Ruibal et al., 2009).

Un tipico habitat per questi organismi è costituito da superfici rocciose in zone desertiche calde o in climi più miti quali quello mediterraneo dove però rocce naturali e monumenti sono soggetti a forte irraggiamento solare e periodi prolungati di assenza di acqua e nutrienti. Nelle aree mediterranee generi quali *Pseudotaeniolina*, *Coniosporium*, *Knufia* e *Capnobotryella* sono i più frequenti sia su rocce naturali che su monumenti (Sterflinger et al., 1999; De Leo et al., 2003; Sert et al., 2007a, b, c; Sterflinger et al., 2012; Tsuneda et al., 2011).

Nei freddi deserti polari e nelle regioni di alta montagna i funghi neri sono altamente specializzati e mostrano un optimum di crescita intorno ai 12°C. Nuovi taxa sono stati recentemente descritti da rocce raccolte al di sopra dei 3000 m di quota sulle Alpi quali *Cryomyces montanus* e *C. funiculosus*, *Saxomyces alpinus*, *S. penninicus* e *Bradomyces alpinus* (Selbmann et al., 2014e; Hubka et al., 2014). Altri taxa, quali *Recurvomyces mirabilis* ed *Elasticomyces elasticus*, pur essendo stati rinvenuti sempre ad alta quota, presentano una diffusione più ampia e sono stati isolati da rocce raccolte in diversi continenti, incluso l'Antartide (Selbmann et al., 2008). I funghi neri meristematici sono una presenza ricorrente

nella comunità endolitiche antartiche dalle quali sono stati descritti diversi nuovi taxa (Selbmann et al., 2005, 2008; Egidi et al., 2014).

1.3.2.STRATEGIE DI SOPRAVVIVENZA

I funghi neri meristemati mostrano alcune caratteristiche peculiari estremamente importanti per la loro sopravvivenza nell'ambiente litico (Sterflinger et al., 1999).

La crescita meristemica, ad esempio, assicura un'ottimizzazione del rapporto superficie/volume; caratteristica questa che, data la minore superficie esposta, migliora l'abilità di sopravvivenza in condizioni di stress come alta e bassa temperatura (Wollenzien et al., 1995), elevato irraggiamento UV (Urzi et al., 1995), mancanza di nutrienti (Sterflinger et al., 1999) e alta concentrazione salina (Zalar et al., 1999).

Un altro importante fattore nella stress-tolleranza dei funghi neri è la presenza di melanina nelle pareti cellulari. La melanina, responsabile della colorazione marrone e nera degli organismi, gioca un ruolo decisamente importante contro la radiazione UV. Nelle comunità criptoendolitiche dell'Antartide, i funghi neri vivono in associazione con organismi allo stesso modo resistenti agli stress come i licheni (Onofri et al., 2007a; Harutyunyan et al., 2008; Selbmann et al., 2013) e i cianobatteri (de los Ríos et al., 2014). È stato suggerito che i funghi neri possono giocare un anche ruolo nell'idratazione e nella protezione dei fotobionti nei licheni epilitici dissipando l'eccessiva radiazione solare (Harutyunyan et al., 2008); nelle comunità criptoendolitiche antartiche, i funghi neri formano una barriera proprio sopra la stratificazione del foto bionte che lo protegge dalla dannosa esposizione alla radiazione solare (Selbman et al., 2013b).

Le melanine risultano importanti non solo nell'azione foto-protettiva, ma anche nella tolleranza al disseccamento e allo stress osmotico, grazie alla riduzione della permeabilità della parete e maggiore ritenzione di zuccheri osmoprotettori. La presenza di melanina nella parete cellulare e la morfologia meristemica rappresentano dunque meccanismi utili a limitare la perdita di acqua intracellulare, un rischio che si presenta in ambienti estremamente secchi sia caldi che freddi (Gorbushina et al., 2008).

La melanina non è la sola sostanza coinvolta nella risposta allo stress idrico. Esistono infatti diversi soluti osmo-regolatori con il ruolo di protezione dell'attività enzimatica. I polioli (glicerolo e mannitolo), ad esempio, che agiscono come osmoliti intracellulari volti a stabilizzare il potenziale osmotico delle cellule, mantenendo l'integrità e le funzioni cellulari (Crowe et al., 1984). Il disaccaride trealosio è un altro importante composto di *storage* nelle

cellule, che permette di stabilizzare la membrana mantenendone struttura e funzionalità in risposta alle basse temperature e alla disidratazione (Goodrich et al., 1988).

Ci sono considerevoli evidenze che suggeriscono come la composizione della membrana plasmatica possa determinare l'abilità di questi funghi a crescere a basse temperature (Cooke & Whipps, 1993). La strategia utilizzata da questi microrganismi, in Antartide, come in altri ambienti freddi, passa attraverso un'alterazione della composizione nei lipidi di membrana (Russel, 1990). In particolare, la considerevole presenza di acidi grassi insaturi che sostengono le funzioni cellulari a basse temperature. Un aumento nella produzione di acido linoleico e arachidonico è stato osservato in alcune specie antartiche come *Mortierella alpina* Peyronel e *M. antartica* Linnem, coltivate a basse temperature (Maggi et al., 1991).

La produzione di esopolisaccaridi (EPS) rappresenta un'altra risposta a condizioni di stress: essi sono coinvolti nel proteggere le cellule a continui cicli di gelo-disgelo e nella cattura di sostanze nutritive (Selbmann et al., 2002, 2005; Gorbushina, 2003).

La scoperta di enzimi attivi anche a basse temperature prodotti da alcune specie antartiche può condurre alla comprensione di come questi funghi crescano a basse temperature: specie fungine antartiche mostrano ampie competenze enzimatiche che, di certo, aumentano le possibilità di sopravvivenza in ambiente ostile (Fenice et al., 1997).

I funghi neri meristemati mostrano una notevole semplificazione del loro ciclo vitale: la maggior parte, infatti, non produce strutture riproduttive ben differenziate e non è mai stata osservata in loro una fase teleomorfa (Sterflinger et al., 2012). I funghi delle rocce sono infatti invariabilmente asessuati: mantenere il meccanismo genetico per la ricombinazione attivo implica una elevata spesa energetica, dato che le fasi teleomorfe fungine tendono ad essere elaborate, con strutture specializzate in cui avviene la ricombinazione. Così, in un contesto in cui tutti gli sforzi della cellula si concentrano sulla produzione di alcuni metaboliti cruciali per proteggersi da stress ambientali, la sessualità rappresenta un costo energetico che un fungo che risiede in condizioni estreme non può permettersi.

Perciò i funghi neri hanno la capacità di sopravvivere per lunghi periodi riducendo il loro metabolismo. In questo modo, non producendo metaboliti possono rimanere per decenni in *resting state* in attesa di condizioni più permissive (Gorbushina, 2007).

Inoltre i funghi neri sono poco esigenti da un punto di vista nutrizionale, essendo a crescita lenta e in grado di passare a stato latente anche per lunghi periodi; hanno solo bisogno di zuccheri semplici per la crescita o di polimeri facilmente degradabili derivanti dalla fotosintesi delle alghe e dei cianobatteri vicini (Selbmann et al., 2013).

La maggior parte dei lieviti neri hanno un tasso di crescita molto lento, che non mostra aumenti significativi neanche quando sono coltivati su substrati ricchi e in condizioni fisiche ottimali; sono così ben adattati alle condizioni oligotrofiche dei loro ambienti naturali che alcuni mantengono una crescita visibile del micelio, anche per brevi periodi, quando coltivati su terreni privi di fonti di carbonio.

Recentemente, Gostinčar et al. (2012) hanno ipotizzato l'esistenza di pathways non convenzionali per l'acquisizione di carbonio come fonte supplementare di energia alternativa alla loro convivenza con le alghe. È stato osservato, attraverso il metodo del ^{14}C , che i funghi neri isolati da comunità criptoendolitiche antartiche delle McMurdo Dry Valleys, l'analogo terrestre più vicino a Marte, possono realmente assorbire CO_2 (Palmer & Friedman, 1988). L'ipotesi degli autori è che i funghi antartici possono effettivamente incorporare CO_2 per carbossilazione del piruvato (Moses et al., 1959) come è stato riportato in precedenza per un certo numero di funghi (Selbmann et al., 2014b). Tali meccanismi potrebbero rappresentare una possibilità di sostegno vitale per i funghi neri a crescita lenta in ambienti estremi oligotrofici e senza competitori. La sorprendente capacità di sopravvivere, ma anche di prosperare in ambienti normalmente trascurati o preclusi alla maggior parte delle forme di vita, come le superfici rocciose esposte, può essere spiegato da queste insolite abilità utilizzate dai funghi delle rocce per ottenere energia. (Selbmann et al. 2014b)

Negli ultimi anni, l'adattamento dei funghi neri a fattori di stress è stato indagato anche a livello proteomico. L'aumento dell'espressione di chaperoni come le *Heat Shock Proteins* (HSPs) e *Cold Shock Proteins* (CSPs) rappresenta uno dei principali effetti dell'esposizione a temperature sub-ottimali di funghi mesofili. Viceversa, l'analisi dell'espressione effettuata sui funghi neri delle rocce antartiche ha messo in luce una *down-regulation* dell'espressione genica quando messi a temperature sub-ottimali (28°C) ed un aumento delle *Cold Acclimation Proteins* (CAPs) (Tesei et al., 2012). Questa risposta consente a questi organismi di entrare rapidamente in uno stato di dormienza piuttosto che "reagire" attivamente ad uno stress esterno dovuto ad elevate temperature, permettendo anche un notevole risparmio energetico. Viceversa la produzione di CAPs a basse temperature ha un effetto protettivo per il congelamento.

La pressione ambientale e l'isolamento genetico e geografico promuovono la radiazione adattativa ed i processi di speciazione. I nuovi taxa descritti per i funghi neri criptoendolitici antartici ne sono un esempio significativo.

1.3.3. STUDI FILOGENETICI SUI FUNGHI NERI ANTARTICI

I funghi neri delle rocce rappresentano un gruppo di funghi le cui relazioni filogenetiche rimangono ancora non completamente chiarite.

Inizialmente la loro descrizione è stata effettuata esclusivamente sulla base delle caratteristiche morfologiche osservate (Onofri et al., 1999), ma in seguito, con l'affinarsi delle tecniche molecolari applicate alla sistematica, attraverso studi filogenetici basati su geni target ed in particolare le regioni ITS e SSU dell'rDNA (Selbmann et al., 2005).

Durante studi micologici effettuati in Antartide, sono stati isolati in differenti siti molti funghi neri endolitici.

Anche i RIF isolati in Antartide ricadono principalmente nella classe Dothideomycetes; e questa correlazione con temperature antartiche è molto probabilmente legata alla storia evolutiva del gruppo: i funghi in questa classe, infatti, si sono evoluti nel periodo Siluriano-Devoniano, circa 430 milioni di anni fa quando le temperature erano molto basse rispetto a quelle odierne; i RIF appartenenti all'ordine Chaetothyriales invece hanno subito un'estinzione di massa nel Permiano-Triassico e una successiva espansione in terre aride circa 250 milioni di anni fa, quando la temperatura globale era relativamente elevata (Gueidan et al., 2011).

Alcuni RIF isolati in Antartide sono stati descritti come le specie *Friedmanniomyces endolithicus* Onofri (Onofri et al., 1999), *F. simplex* Selbmann et al., *Cryomyces minteri* Selbmann et al. e *C. antarcticus* Selbmann et al. (Selbmann et al., 2005) all'interno di due nuovi generi *Friedmanniomyces* Onofri (Onofri et al., 1999) e *Cryomyces* Selbmann et al. (Selbmann et al., 2005).

Il genere *Cryomyces* è stato recentemente ritrovato nelle Alpi, con le due nuove specie *C. funiculosus* Selbmann & de Hoog and *C. montanus* Isola & Zucconi (Selbmann et al., 2014e). Specificatamente il genere *Friedmanniomyces*, che ricade nell'ordine *Capnodiales*, è stato isolato in diversi siti della Terra Vittoria del Nord e del Sud in Antartide continentale. Le specie *C. antarcticus* e *C. minteri* presentano una limitata distribuzione; una possibile spiegazione risiede nel fatto che rocce arenarie sono maggiormente presenti nelle Valli Secche di McMurdo piuttosto che nella Terra Vittoria del Nord, e i substrati rocciosi in quest'area sono maggiormente rappresentati da rocce metamorfiche e vulcaniche scarsamente porose (Selbmann et al., 2005).

Sono stati istituiti su base morfologica e molecolare (basate su porzioni geniche ITS e SSU dell'rDNA) anche nuovi generi e specie tra cui: *Recurvomyces mirabilis* Selbmann & de Hoog, *Elasticomyces elasticus* Zucconi & Selbmann (Selbmann et al. 2008).

Recurvomyces mirabilis (Capnodiales), è un esempio di fungo nero ad ampia distribuzione, essendo stato isolato sia in Antartide che in aree mediterranee. Questi ambienti presentano differenti regimi di temperatura, ma condividono un'elevata radiazione solare e scarsità d'acqua in alcuni periodi dell'anno, suggerendo che la tolleranza a questi stress è promossa dallo stesso set di fattori morfo-fisiologici (Ruisi et al., 2007). Pertanto sembra che l'adattamento ad altre condizioni estreme sia possibile, purché si inserisca nello stesso quadro generale di estremotolleranza (Selbmann et al., 2008).

Elasticomyces elasticus (Capnodiales), isolato anche da licheni epilitici antartici, ha mostrato una più ampia gamma di temperature per la crescita rispetto al ceppo criptoendolitico antartico *R. mirabilis*. La capacità di crescere a 0°C così come a 25°C, può essere spiegata come una strategia adattativa per resistere non solo a temperature molto basse, ma anche alle ampie fluttuazioni termiche molto più marcate in habitat epilitico piuttosto che endolitico (Selbmann et al., 2008).

Recentemente, mediante analisi multilocus, sono stati istituiti nuovi generi e specie di funghi antartici: *Extremus antarcticus* (Selbmann & de Hoog) Quaedvlieg & Crous, isolato da Linnaeus Terrace nelle Valli secche di McMurdo, *Vermiconia antartica* Egidi & Selbmann, anche questo nelle Valli secche di McMurdo, *Oleoguttula mirabilis* Selbmann & de Hoog dal sito Lachman, *Rachicladosporium antarcticum* Onofri & Egidi dalla Penisola Antartica, e *Rachicladosporium mcmurdoi* Selbmann & Onofri, da Battleship Promontory, Valli secche di McMurdo (Egidi et al., 2014).

1.4.ANALISI MOLECOLARI APPLICATE ALLA SISTEMATICA

La classificazione tassonomica e l'identificazione dei funghi si basano tradizionalmente sui classici criteri morfologico-morfometrici, sui parametri di crescita, sulla compatibilità sessuale e/o caratteristiche biochimiche. Questi parametri possono non essere sufficienti per una identificazione univoca a livello di specie, infatti molti caratteri morfologici precedentemente ritenuti indicativi di parentela si sono dimostrati essere omoplasie o comunque non informativi (Begerow et al., 2007; Lumbsch & Huhndorf, 2007); inoltre casi di evoluzione morfologica convergente così come stati di carattere plesiomorfici sembrano essere diffusi in tutti i funghi (Blackwell et al., 2006; Hibbett et al., 2007). Nel caso dei funghi neri, una differenziazione morfologica scarsa e la produzione massiccia di melanina nella parete cellulare, che è responsabile della pigmentazione scura (nero, verde, marrone), sono tratti comuni (Jacobson, 2000).

L'identificazione su base morfologica (fenetica) ha portato, in passato, a raggruppare assieme organismi che poi con la filogenesi molecolare si sono rivelati tra loro evolutivamente molto distanti: i funghi possono assumere morfologie molto differenti in funzione delle condizioni ambientali, possono accrescersi senza sporificare e senza produrre alcuna struttura che ne consenta il riconoscimento, presentano fasi anamorfiche e teleomorfiche morfologicamente e talvolta ecologicamente distinte.

La scarsità di caratteri morfologici discriminatori e facilmente accessibili rende l'identificazione di un compito difficile, che porta a possibili errori di classificazione, se l'approccio tradizionale non è associato a metodi di identificazione alternativi.

Per queste ragioni lo studio sistematico dei funghi oggi si avvale necessariamente di tecniche molecolari e tutti gli studi filogenetici sono oggi condotti utilizzando come caratteri sequenze di DNA. Studi basati sul confronto delle sequenze geniche offrono non solo un rapido metodo per il riconoscimento di specie ma anche un approccio ottimale per lo studio delle loro relazioni filogenetiche. Nelle ricerche filogenetiche, sono confrontate le sequenze nucleotidiche di geni selezionati e si presume che una similarità elevata rifletta un antenato comune recente (Olsen & Woese, 1993).

Le tecniche di biologia molecolare applicate alla sistematica costituiscono dunque un potente mezzo di indagine nello studio della filogenesi. Il sequenziamento del DNA ha rivoluzionato la visione del processo dell'evoluzione, fino ad allora limitata alla comparazione morfologica degli organismi in esame; esso ha permesso di ottenere una quantità enorme di informazioni e ha permesso di indagare più in dettaglio le relazioni evolutive tra gli organismi ed i meccanismi evolutivi; gli studi filogenetici quindi non mirano solo alla classificazione tassonomica delle specie ma anche a ricostruire le relazioni evolutive tra gli individui (Moore & Frazer Novak, 2002).

La filogenesi non rappresenta dunque soltanto uno strumento tassonomico; sulla base delle relazioni filogenetiche è, infatti, possibile fare ipotesi sulle potenzialità di un determinato organismo in esame, dato che le tendenze generali all'interno di un gruppo filogenetico sono simili. Pertanto la filogenesi rappresenta un importante strumento di predittività.

Grazie ad approcci di questo tipo, negli ultimi dieci anni, la sistematica dei funghi ha subito un forte riarrangiamento. Gli schemi di classificazione sono stati ridefiniti su base biochimica, ultrastrutturale e, soprattutto, molecolare. Questi cambiamenti sono il risultato di un intenso lavoro nell'ambito del progetto AFTOL (*Assembling the Fungal Tree Of Life*), che ha prodotto una vera e propria rivoluzione nella sistematica di questo Regno (Lutzoni et al., 2004).

1.4.1.GENI TARGET

La scelta dei target genici deve essere effettuata rispettando alcuni criteri. Innanzitutto devono essere presenti in tutto il gruppo in esame; è necessario che siano funzionalmente omologhi in ogni organismo, quindi che svolgano la stessa funzione. Più specificatamente devono essere ortologhi in quanto le differenze accumulate nei diversi geni devono essere frutto della speciazione. I geni paraloghi, di contro, non possono essere utilizzati perché essendo frutto di una duplicazione genica possono assumere nel tempo caratteri e funzioni completamente diversi rispetto al gene originario. La duplicazione svincola la sequenza dalla costrizione della selezione naturale e le due copie del gene tendono ad evolvere in modo differente.

L'uso dei geni ribosomali per analisi molecolari offre diversi vantaggi: sono (i) invariabilmente presenti in tutti gli organismi, (ii) in più copie, e (iii) l'evoluzione delle sequenze è omogenea secondo la teoria dell'evoluzione concertata (Felinier & Rosselò, 2007). I geni ribosomali nucleari (rDNA) comprendono da qualche centinaio a qualche migliaio di copie e sono organizzati in disposizioni tandem (Figura 1.11). Negli organismi eucarioti, ogni unità ripetuta consiste in una regione trascritta separata dalla successiva da regioni non codificanti e di dimensione variabile, chiamate spaziatori intergenici (IGS). La subunità piccola, SSU (*Small SubUnit* o 18S), e la subunità grande, LSU (*Large SubUnit* o 26 S), sono separate da un gene più piccolo (5.8S) e l'intero insieme di geni viene trascritto come singola unità. Ci sono sequenze non codificanti tra i tre geni chiamate spaziatori trascritti interni (*Internal Transcribed Spacers*, ITS): l'ITS1 è compreso tra le sequenze 18S e 5.8S, l'ITS2 è compreso tra le sequenze 5.8S e 28S. Ogni insieme di tre geni è separato dal seguente oltre che dalla sequenza IGS, anche dallo spaziatore extragenico (EGS) e dallo spaziatore non trascritto (NTS).



Fig.1.11. Struttura dei geni ribosomali eucarioti

I geni ribosomali nucleari mostrano al loro interno un diverso grado di variabilità: mentre le regioni 5.8S, 18S e 28S (codificanti) hanno sequenze altamente conservate, le regioni ITS1 e ITS2 (non codificanti) vengono escisse dall'RNA mediante *splicing* post-trascrizionale e

quindi, non codificando per nessun prodotto genico, mutano più velocemente rispetto alle regioni conservate.

Mentre le regioni codificanti possono essere utilizzate per il confronto di organismi distanti filogeneticamente, le ITS sono più adatte allo studio di relazioni tra organismi evolutivamente più vicini permettendo di distinguere anche variazioni intraspecifiche.

Recentemente la regione ITS è stata eletta come barcode ufficiale per i funghi (Schoch et al., 2012) dal momento che ha una lunga storia come marcatore molecolare per l'identificazione a livello specifico dei funghi in studi ecologici e tassonomici (Hibbett et al., 2011).

Nonostante il suo impiego universale, l'ITS è una regione che, in qualità di barcode universale per i funghi, presenta potenziali complicanze. Infatti è presente una variabilità intra-specifica e intra-individuale (Smith et al 2007; Simon & Weiß, 2008), che può complicare l'identificazione delle specie. Inoltre, la regione multicopia ITS mostra una variabilità non uniforme tra specie di diversi gruppi tassonomici (Nilsson et al. 2008). Nello stesso operone, sono presenti le subunità ribosomiali nucleari grande (nLSU) e piccola (nSSU). L'LSU contiene due regioni ipervariabili, chiamate domini D1 e D2, che si affiancano alle regioni relativamente conservate nella maggior parte dei funghi. Questa disposizione consente alle sequenze geniche LSU di essere facilmente allineate per l'analisi filogenetica; queste regioni rappresentano un marcatore comunemente utilizzato in alcuni gruppi tassonomici, come le linee che si sono separate precocemente e i lieviti ascomiceti, poiché danno una risoluzione maggiore (James et al., 1996; Kurtzman & Robnett, 2003). Appare utile, quindi, sequenziare sia il D1/D2 sia l'ITS quando si paragonano specie strettamente imparentate.

Relativamente ai metodi di identificazione molecolare, si è cercato di definire un valore soglia per determinare quando una sequenza di studio è abbastanza vicina a una sequenza di riferimento da essere considerata conspecifica. Nella consuetudine della pubblicazione di nuove specie batteriche, la soglia per la variabilità intraspecifica per l'intera sequenze SSU batterica è fissata al 3% (Sneath, 1992). Il valore soglia del 3% è considerato uno standard valido anche per i funghi: se due sequenze ITS differiscono di meno del 3%, sono tipicamente considerate conspecifiche (Hughes et al., 2009). Mentre il valore del 3% può essere considerato valido per alcuni gruppi di funghi, risulta essere non applicabile per altri (Nilsson et al., 2008). Per gli organismi come *Aspergillus* e *Penicillium* (Nilsson et al., 2009) questo valore è troppo alto, mentre è troppo basso per altri (ad esempio, *Cantharellus* e *Craterellus*; Feibelman et al., 1994). Le differenze nel tasso di variabilità intraspecifica ITS all'interno del Regno dei funghi suggeriscono cautela nei confronti di approcci semplificati per la

delimitazione di specie basata sull'ITS e di prendere in considerazione un approccio "caso per caso" basato sulle caratteristiche dei taxa.

La descrizione di specie su base molecolare è basata tradizionalmente su dati provenienti da un singolo locus; nel corso degli ultimi 20 anni molti studi hanno suggerito che la genealogia di un singolo gene non rappresenta necessariamente la filogenesi di un organismo (Pamilo & Nei 1988; Takahata 1989; Avise & Wollenberg 1997; Rosenberg 2002).

A causa delle difficoltà di allineamento, le regioni e rami basali sono mal risolti e l'ITS da solo risulta essere scarsamente informativo (Moncalvo et al., 2002). Tuttavia, l'uso dell'analisi simultanea di diversi geni (analisi multilocus) per ottenere un'ipotesi ben risolta e solidamente sostenuta per la classificazione recentemente ha dimostrato di essere efficace per l'identificazione a livello di specie come pure per la classificazione a più alti ranghi tassonomici.

Taylor et al. (2000) ha proposto la *Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition* (GCPSR), un criterio basato sulla concordanza filogenetica di geni multipli non collegati, per identificare le specie che non possono essere riconosciute con altri criteri. Il criterio GCPSR si è rivelato estremamente utile nei funghi, perché in molti casi è più finemente discriminante rispetto agli altri criteri ed è attualmente il più utilizzato nel Regno fungino (es Dettman et al., 2003; Fournier et al., 2005; Koufopanou et al., 2001; Le Gac et al., 2007; Pringle et al., 2005).

In un recente studio, Schoch et al. (2009) ha proposto un approccio multilocus per risolvere le relazioni filogenetiche nella classe *Dothideomycetes*. Sono stati considerati quali target genici i geni codificanti proteine, comprese la subunità grande e la seconda più grande dell'RNA polimerasi II (RPB1 e RPB2) e il fattore di allungamento-1 α (TEF1), le subunità ribosomiali nucleari grande (nLSU) e piccola (nSSU), e la subunità mitocondriale piccola del gene ribosomiale (mSSU); l'RPB2 è stato identificato come il gene più informativo, tuttavia è importante anche dell'utilizzo dei geni ribosomiali nella risoluzione delle relazioni filogenetiche.

1.4.2.ANALISI FILOGENETICA

Passo preliminare per lo studio dei geni oggetto dell'analisi filogenetica, è la reazione di amplificazione del DNA, la *Polymerase Chain Reaction* (PCR; Mullis et al., 1986), un processo in grado di amplificare un miliardo di volte il DNA di una regione selezionata.

Una volta amplificato, il prodotto di reazione viene sequenziato per la determinazione dell'ordine, o sequenza, dei suoi nucleotidi. Le sequenze vengono ricostruite utilizzando

programmi dedicati che consentano di leggere ed eventualmente correggere i cromatogrammi ottenuti con il sequenziamento. Viene poi effettuata una ricerca nelle Banche Dati dedicate per similarità di sequenza.

Esistono vari programmi che permettono di confrontare la sequenza fornita con quelle depositate nelle Banche Dati. Tra i diversi algoritmi disponibili in rete, BLAST permette di effettuare ricerche nella Banca Dati NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

Per determinare il grado di distanza filogenetica tra gli organismi studiati, si procede con l'allineamento delle sequenze di interesse, con quelle scaricate dalla Banca Dati. Il concetto alla base è di trovare l'allineamento ottimale, il migliore tra tutti quelli possibili. Allineare le sequenze spesso non è un'operazione semplice a causa di delezioni o inserzioni che fanno slittare la posizione di alcune basi tra le sequenze a confronto. Esistono programmi che effettuano tali allineamenti automaticamente ma in genere è necessario correggerli manualmente.

Il fine dell'analisi filogenetica è di rappresentare le relazioni evolutive tra gruppi attraverso la produzione di un albero filogenetico (Figura 1.12). L'albero filogenetico è la rappresentazione grafica del percorso evolutivo che ha riguardato un gruppo di organismi e si configura come un grafico bidimensionale costituito da nodi, rami e nodi terminali o foglie, in un albero risolto ogni ramo mette in relazione tra loro due soli nodi. I nodi terminali rappresentano le unità tassonomiche ovvero le specie in esame e sono detti anche *Operational Taxonomic Units* (OTU). I rami definiscono le relazioni tra queste in termini di discendenza e di progenitore e la lunghezza è proporzionale al numero di mutazioni che ha avuto luogo, mentre gli internodi rappresentano la specie ancestrale, il progenitore comune di due stirpi.

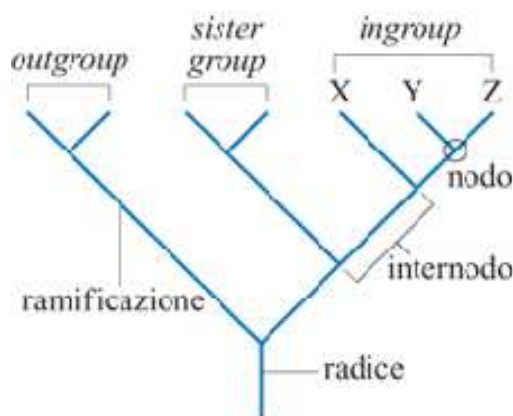


Fig.1.12. Struttura di un albero filogenetico

Possiamo distinguere tre tipi di alberi filogenetici: il cladogramma, l'albero additivo o filogramma e l'albero ultrametrico (Figura 1.13). Il cladogramma dà solo una indicazione delle condivisioni dell'ancestore comune più recente. L'albero additivo o filogramma contiene informazioni aggiuntive riguardo alla quantità di cambiamenti evolutivi mentre l'albero ultrametrico esprime il tempo relativo al processo evolutivo usando l'orologio molecolare.

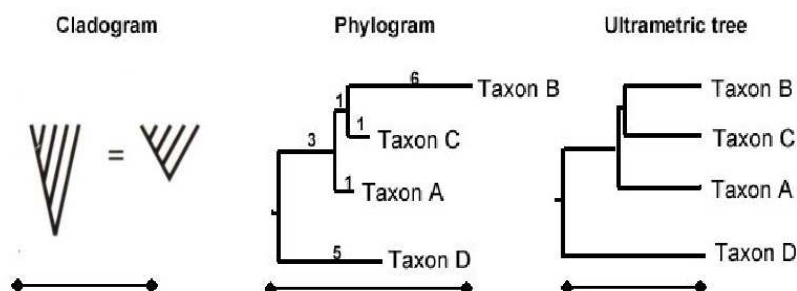


Fig.1.13. Tipi di alberi filogenetici

I metodi principalmente utilizzati per la costruzione di alberi filogenetici possono essere distinti in due categorie: i metodi basati sulla matrice delle distanze (*distance methods*) e quelli basati sull'uso di caratteri discreti (*discrete methods*) (Salemi & Vandamme, 2003).

Nei *distance methods* la distanza tra le specie viene misurata semplicemente come “quantità di differenza” nelle sequenze esaminate tra i più usati vi sono il *Neighbour-Joining* (NJ) e l'UPGMA. Il metodo *Neighbour-Joining* (NJ) analizza il numero di differenze tra le sequenze a confronto paragonandole a due a due; la coppia di sequenze con il minor numero di cambiamenti è denominata *neighbors* e le coppie di *neighbors* condividono un nodo in un sottoalbero risultante. Ogni confronto viene quindi trasformato in una misura di distanza e ad ogni passaggio vengono uniti i sottoalberi fino ad ottenere l'albero completo.

L'UPGMA (acronimo di *Unweighted Pair Group with Arithmetic Means*) è il metodo più semplice fra quelli basati sul clustering. Esso assume come valida l'ipotesi dell'orologio molecolare, cioè che la velocità di evoluzione delle sequenze sia costante lungo tutti i rami degli alberi. Per questo motivo tale metodo viene definito ultrametrico, cioè impone che la lunghezza di tutti i rami discendenti da un nodo interno fino ai nodi più esterni sia la stessa. Il metodo lavora utilizzando un algoritmo interattivo che raggruppa due unità tassonomiche o gruppi di unità ad ogni interazione, partendo da quelle che inizialmente appaiono come le più simili e proseguendo fino a determinare una radice dell'albero.

La caratteristica saliente dei *distance methods*, ovvero la traduzione delle sequenze in misure di distanze, rappresenta allo stesso tempo anche un difetto in quanto determina la perdita dell'informazione relativa alle sequenze stesse.

I *discrete methods* operano invece direttamente sulle sequenze piuttosto che su misure di distanza. Ogni posizione nelle sequenze allineate viene considerata un “carattere” ed i nucleotidi o gli amminoacidi in quella posizione sono detti “stati”. Tutti i caratteri vengono di norma analizzati separatamente ed indipendentemente dagli altri. Tra i *discrete methods* ricordiamo i metodi Massima parsimonia e Massima verosimiglianza (Salemi & Vandamme, 2003; Baxevanis & Oullette, 2005).

La Massima parsimonia (MP) parte dal principio che la migliore spiegazione dei dati è anche la più semplice e quindi tende a ricercare quell’albero la cui topologia può essere spiegata con il più piccolo numero di mutazioni (cioè cambiamenti di carattere).

Nella Massima verosimiglianza (ML, *Maximum likelihood*) l’esame di ogni possibile topologia dell’albero viene fatta valutando ogni posizione della sequenza e porta alla creazione dell’albero filogenetico che più verosimilmente è in grado di produrre i dati osservati.

Al fine di determinare la robustezza dell’albero è necessario utilizzare dei metodi statistici, quali per esempio l’analisi di bootstrap. Utilizzato per la prima volta da Felsenstein (1985) in applicazione all’analisi filogenetica è un sistema di ricampionamento casuale di sequenze a cui vengono applicate le stesse procedure applicate alle sequenze vere. In questo modo ottengo due risultati: uno effettivo, quello delle sequenze in analisi e uno che rappresenta il valore che otterrei con un campione casuale. Dal loro confronto è possibile ottenere una stima della veridicità del risultato. Maggiore è il numero di operazione di bootstrapping, maggiore è l’attendibilità dei valori. Di seguito è stato riportato lo schema che viene di norma seguito per la costruzione di un albero filogenetico (Figura 1.14).

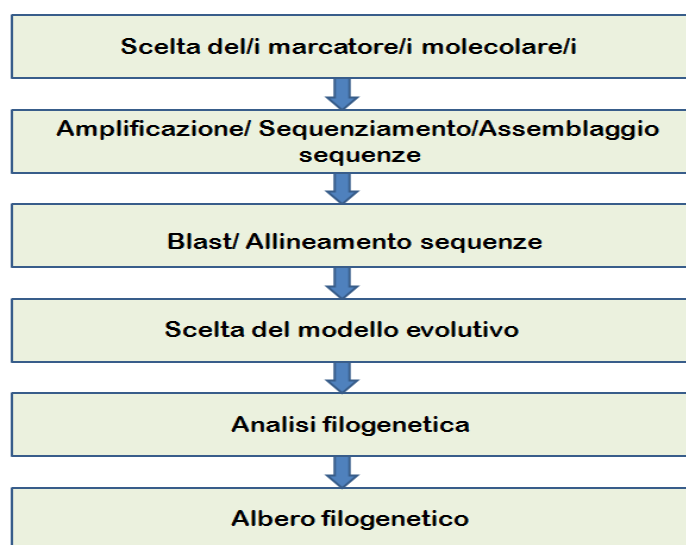


Fig.1.14. Procedimento per l’analisi filogenetica

1.5.METODICHE PER LO STUDIO DI COMUNITÀ MICROBICHE

1.5.1.METODICHE COLTURA-DIPENDENTI

Per metodi coltura-dipendenti si intendono metodi colturali tradizionali in combinazione con analisi fenotipiche (fisiologiche e biochimiche) e genotipiche (PCR specie-specifica o RAPD) necessarie per la corretta identificazione e tipizzazione. I metodi colturali consistono nella coltivazione di microrganismi su terreni selettivi, nel successivo isolamento dei ceppi e nella loro identificazione. Questi metodi possono fallire nel descrivere la diversità di comunità microbiche nella loro interezza, a causa della predominanza di alcune specie e dell'incapacità di altre di svilupparsi al di fuori del loro ambiente naturale (Head et al., 1998). I terreni di coltura permettendo tipicamente la crescita solo di una piccola frazione di microrganismi, non sono in grado di riprodurre le nicchie ecologiche e le interazioni simbiotiche presenti in ambienti naturali complessi. A parte il fatto della selezione che permette la crescita solo di alcune specie sopprimendo la crescita di altre, la composizione della comunità della frazione coltivabile è distorta durante la semina perché i tempi di replicazione variano e le specie che crescono efficientemente mandano fuori competizione le altre. Inoltre la maggior parte dei terreni di coltura sono fonti estremamente ricche di carbonio rispetto ai substrati che si ritrovano normalmente in situ, e questo potrebbe influenzare la composizione della comunità microbica coltivata verso copiotrofi (microorganismi che crescono in presenza di elevati livelli di fattori nutritivi) (Nocker et al., 2007).

1.5.2.METODICHE COLTURA-INDIPENDENTI

Negli ultimi due decenni, i metodi utilizzati per descrivere la diversità di comunità microbiche, hanno subito un forte cambiamento nel passare da approcci coltura-dipendenti ai metodi coltura-indipendenti. Questo è di primaria importanza, poiché i tradizionali metodi colturali per l'isolamento di microrganismi rendono conto solo di una frazione limitata di essi (Valášková & Baldrian, 2009).

La tendenza verso queste nuove metodiche è legata al superamento di problematiche associate alle coltivazioni selettive ed isolamenti di microrganismi dai loro ambienti naturali. La principale ragione nell'uso di metodi coltura-indipendenti è la mancanza di conoscenza riguardo le reali condizioni sotto cui molti microrganismi crescono nel loro habitat naturale e, di conseguenza, la difficoltà a sviluppare terreni di coltura che simulino con precisione queste condizioni (Ercolini, 2004).

Questi metodi sono caratterizzati dal fatto che i microrganismi non vengono più coltivati ed isolati, ma si rilevano direttamente all'interno del campione attraverso l'analisi del loro DNA ed RNA. La principale novità di questi procedimenti è l'estrazione diretta degli acidi nucleici dalle matrici in esame, i quali, successivamente, vengono analizzati con strumenti molecolari in grado di definire la loro diversità, la quale è in stretta connessione con la complessità microbica del sistema in studio (Giraffa et al., 2001).

Queste metodiche si basano sia sul clonaggio e sequenziamento diretto dei frammenti di DNA o spesso sull'amplificazione di sequenze *target* utilizzando la PCR. Nel secondo caso il pool dei prodotti di PCR può essere clonato e sequenziato oppure gli ampliconi possono essere soggetti a varie tecniche di "*genetic profiling*" (Nocker et al., 2007).

Per determinare come possono influire determinati parametri ambientali nella diversità di comunità microbiche, sono necessarie rapide e comparative analisi di molti campioni; a questo proposito le tecniche di *fingerprinting* sono in grado di fornire un profilo che rappresenta la diversità genetica di una comunità in un dato ambiente (Muyzer et al., 1997).

Le metodiche coltura-indipendenti su cui si basano gli studi di ecologia microbica sono: *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* (DGGE), *Temperature Gradient Gel Electrophoresis* (TGGE), *Single Strand Conformation Polymorphism* (SSCP), *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism* (T-RFLP), *Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis* (ARISA), clonaggio e sequenziamento di librerie.

Tecniche di *fingerprinting* quali la DGGE e la TGGE, si basano sulla separazione elettroforetica di molecole di dsDNA in base al loro comportamento di dissociazione in presenza di un gradiente denaturante e di temperatura rispettivamente. L'elemento comune fra queste procedure è il fatto che entrambe si basano sulla separazione di prodotti di PCR derivati dall'amplificazione di geni marcatori presenti in tutti i membri della comunità microbica studiata. Vengono quindi prodotti una varietà di profili, chiamati appunto *fingerprint*, che rappresentano la diversità dei geni polimorfici di interesse, ossia la diversità delle specie microbiche della comunità esaminata. Queste tecniche presentano diversi vantaggi quali: rapidità e possibilità di processare molti campioni contemporaneamente; affidabilità ed alta riproducibilità; possibilità di ottenere sia informazioni qualitative che quantitative; possibilità di comprensione delle relazioni filogenetiche tra i membri della comunità che si sta analizzando (Duarte et al., 2012).

DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

La DGGE è la più comune tecnica utilizzata fra i metodi coltura-indipendenti; la combinazione PCR/DGGE di DNA ribosomale è stata introdotta in ecologia microbica da Muyzer et al. (1993), ed è stata usata con successo in molti campi: frequentemente utilizzata per l'analisi di comunità batteriche del suolo (Norris et al., 2002), del mare (Bano & Hollibaugh, 2002) e di campioni clinici (Burton et al., 2003), oggi è anche applicata a comunità fungine del suolo (Van Elsas et al., 2000), del compost (Marshall et al., 2003) e di opere d'arte (Möhlenhoff et al., 2001).

La tecnica di DGGE si basa sulla separazione di prodotti di PCR dello stesso peso molecolare ma di diversa sequenza di basi nucleotidiche, anche quando questa differenza è rappresentata da una sola coppia di basi; tale separazione di frammenti di DNA avviene in base alle loro differenti proprietà di dissociazione o *melting*. Essa si basa sul principio secondo cui molecole di DNA, sottoposte ad un gradiente di agenti denaturanti chimici (urea e formammide), vanno incontro a denaturazione e quindi ad un cambiamento nella conformazione che rallenta la velocità di migrazione sul gel. La concentrazione di agenti denaturanti per l'apertura della doppia elica varia in molecole caratterizzate da sequenze diverse, infatti, è inversamente proporzionale all'energia di legame tra i due filamenti. Poiché le condizioni richieste per la denaturazione delle molecole di DNA sono strettamente correlate con la loro sequenza e, dato che la denaturazione influisce sulla velocità di migrazione degli ampliconi, molecole con sequenza diversa migreranno diversamente in questo tipo di gel.

Tutti i prodotti di PCR, caricati l'uno accanto all'altro su gel di DGGE, si dissocieranno quindi in punti diversi del gradiente denaturante e saranno distinguibili in base alla diversa migrazione elettroforetica, delineando in questo modo un profilo di composizione microbica. Una ottimale risoluzione è ottenuta quando le molecole non sono completamente denaturate, infatti per la reazione di PCR vengono utilizzati *primers*, specifici per l'amplificazione delle regioni bersaglio, che hanno un "GC CLAMP" di circa quaranta basi, ossia una pinza di basi formate unicamente da G e C per ottimizzare la corsa ed impedire che il frammento di dsDNA si dissocia completamente.

Dopo la colorazione del gel, il numero di bande sarà indicativo della diversità genetica del campione iniziale (Muyzer et al., 1993).

I vantaggi offerti da questa tecnica sono molteplici: l'ampia varietà di scopi per cui può essere impiegata come analisi di complesse comunità, monitoraggio di cambiamenti strutturali e funzionali nelle popolazioni, analisi di eterogeneità di sequenza e la possibilità di ottenere in modo rapido un profilo delle popolazioni principalmente rappresentative delle comunità stesse; in aggiunta a questo un grande vantaggio della tecnica è che è possibile ottenere

informazioni tassonomiche poiché le bande possono essere escisse dal gel, ri-amplificate e sequenziate; inoltre specifiche bande possono essere ibridizzate con specifiche sonde oligonucleotidiche (Heuer et al., 1999; Riemann & Widing, 2001). Pertanto, la DGGE combina i vantaggi del clonaggio, sequenziamento e T-RFLP (Nikolcheva & Bärlocher, 2005).

I principali svantaggi nell'uso di questa tecnica sono: efficienza variabile di estrazione del DNA metagenomico; errori di amplificazione e formazione di eteroduplex durante la reazione di PCR; variazioni da gel a gel (soprattutto nei casi di profili complessi). In aggiunta a questo, solo piccoli frammenti (<500 bp) possono essere separati in DGGE e ciò limita fortemente le informazioni di sequenza. Inoltre, differenti sequenze di DNA possono avere stessa mobilità elettroforetica dovuta ad un identico contenuto in GC e, pertanto, una banda può non necessariamente rappresentare una singola specie (Michaelsen et al., 2006).

Questi metodi sono difficilmente applicabili allo studio di comunità estremamente complesse che producono profili con centinaia di bande, e diventano quindi praticamente impossibili da distinguere. Un altro importante limite di questa tecnica riguarda la capacità risolutiva: solo DNA derivati da organismi che rappresentano più dell'1% nella comunità studiata possono essere visualizzati (Muyzer et al., 1993).

Nonostante queste limitazioni, la DGGE offre un ottimo compromesso tra il numero dei campioni da analizzare e l'informazione ottenuta, risultando fondamentali in situazioni in cui si conosce poco o nulla della comunità stessa.

2. SCOPO DELLA RICERCA

L'aumento della temperatura media sulla Terra sta causando la riduzione o la scomparsa di ecosistemi marginali e delle specie ad essi associate. Gli ambienti polari sono estremamente sensibili agli effetti dei cambiamenti climatici. Pertanto è oggi di primaria importanza approfondire le conoscenze sugli ecosistemi terrestri antartici prima che qualunque cambiamento ulteriore ne alteri l'equilibrio in modo da poter utilizzare questi dati per monitorare variazioni future.

L'endolitismo è uno degli adattamenti più spettacolari dei microrganismi alla pressione ambientale ed è la forma di vita predominante nelle zone interne del continente antartico. Le comunità endolitiche, vivono al limite del loro potenziale biologico e sono tra i più resistenti oggi conosciuti. Per quanto molto resistenti, le specie microbiche che compongono queste comunità sono fortemente minacciate dal cambiamento climatico in atto. Lo stabilirsi di condizioni più permissive, infatti, potrebbe portare all'insediamento di specie alloctone più competitive, con conseguente possibile estinzione delle specie autoctone, fortemente adattate. La presente ricerca si colloca all'interno di un ben più ampio progetto inserito nel Programma Nazionale di Ricerche in Antartide (PNRA) che prevede un approccio multidisciplinare per lo studio della distribuzione delle comunità epi- ed endolitiche e della biodiversità dei diversi compartimenti biologici che le comunità endolitiche ospitano, studiando come questa vari in funzione di parametri quali latitudine, altitudine e distanza dal mare, fino al limite di estinzione della comunità stessa, non trascurando il ruolo della natura del substrato.

Al fine di ottenere un quadro completo della biodiversità fungina delle comunità endolitiche, campioni di roccia raccolti durante la XXVI Spedizione Antartica Italiana in diverse località della Terra Vittoria del Nord e del Sud (Antartide continentale) sono stati analizzati attraverso metodi coltura-dipendenti, quali isolamento diretto dei funghi delle rocce, inclusi lieviti e licheni, seguito da analisi molecolari degli isolati per risolverne la posizione tassonomica, e metodi coltura-indipendenti, DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), che rappresentano un primo approccio di studio della distribuzione della biodiversità fungina in funzione di diversi parametri ambientali.

I dati ottenuti, oltre a fornire una conoscenza più approfondita sulla biodiversità degli organismi endolitici antartici, ancora per lo più ignota, e a garantire la conservazione "ex situ" presso la *Culture Collection of Fungi From Extreme Environments* (CCFEE), Sezione di Micologia del Museo Nazionale dell'Antartide "Felice Ippolito" (DEB, Università della Tuscia), rappresenteranno il punto di partenza per monitorare eventuali future variazioni di tali peculiari forme di vita dovute ai cambiamenti climatici.

3. MATERIALI E METODI

3.1. CAMPIONI DI ROCCIA

I campioni di roccia oggetto di questo studio sono stati raccolti dall'11 Dicembre 2010 al 2 Febbraio 2011 nella Terra Vittoria, Antartide Continentale, durante la XXVI Spedizione Antartica Italiana (2010/2011) da Laura Selbmann & Laura Zucconi (Università della Tuscia). Sono stati ispezionati 72 siti relativi a 48 località della Terra Vittoria.

I siti di campionamento sono distribuiti lungo un transetto latitudinale che va da 73°26'46"S (Chisholm Hills, Cosmonaut Glacier) a 76°54'36"S (Battleship Promontory, McMurdo Dry Valleys) e un gradiente altitudinale dal livello del mare fino a circa 3.600 m slm (Mt Adamson). È stata inoltre considerata una distanza dal mare da 0 (Kay Island, Vegetation Island, Inexpressible Island, Prior Island) a circa 100 km (Chisholm Hills, Archambault Ridge, Ambalada Peak, Trio Nunatak, Ricker Hills, Bobby Rocks). Sono stati raccolti più campioni (da 1 a 8, vedere Tabella 3.1) per ogni sito, per un totale di più di 200 campioni.

I campioni di roccia sono stati prelevati asetticamente con uno scalpello sterile e riposti in buste di plastica sterili. Fino al momento delle analisi sono stati conservati a -20°C.

Per ogni campione sono stati verificati la presenza e il tipo di colonizzazione attraverso osservazione diretta utilizzando lenti di ingrandimento.

La classificazione e la porosità delle rocce sono state determinate utilizzando lenti di ingrandimento o osservando piccoli frammenti allo stereomicroscopio. Le rocce sono state classificate come arenaria (S), conglomerato di arenaria (CS), granito (G), quarzo (Q), e dolerite (D), mentre il grado di porosità definito come basso (l), medio (m) e alto (h).

Nella Figura 3.1 è riportata la mappa relativa alla distribuzione dei siti di campionamento nella Terra Vittoria del nord con indicazione del tipo di colonizzazione trovata.

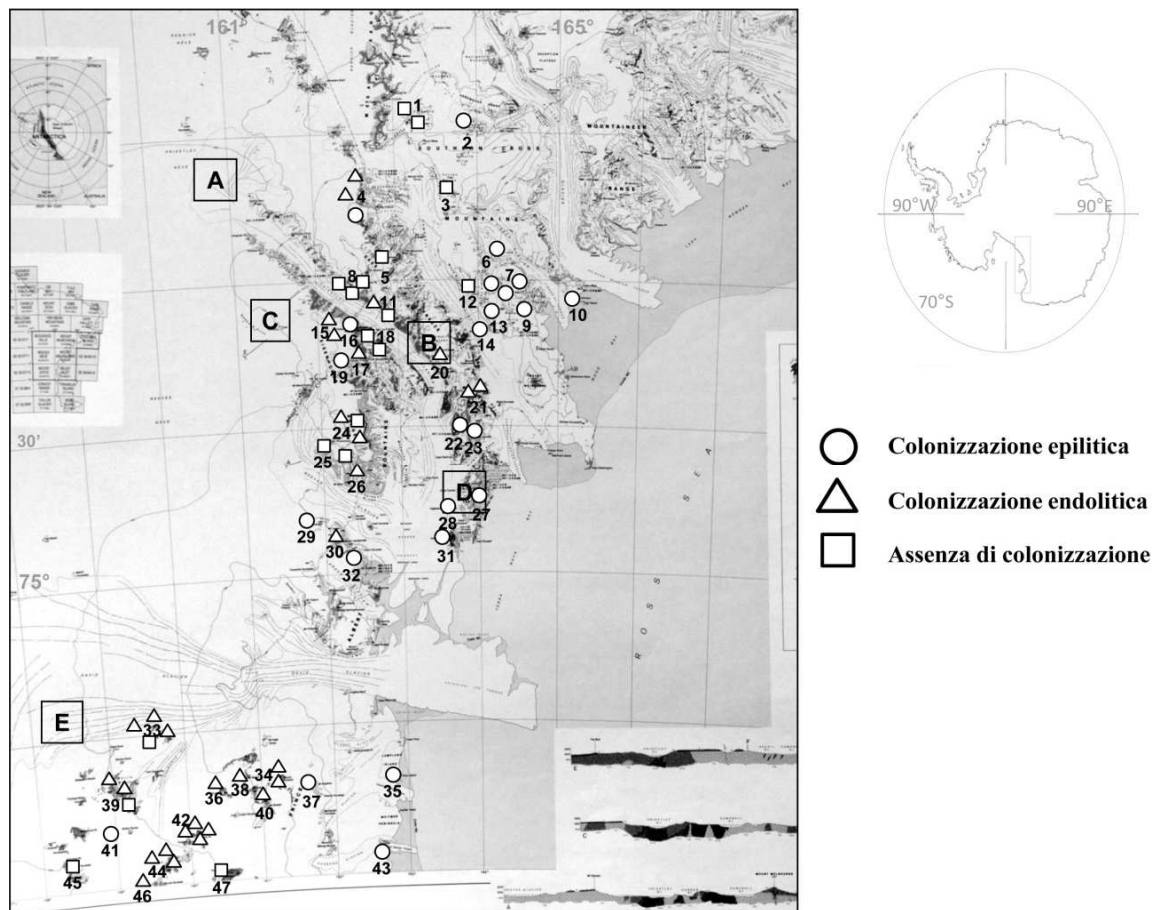


Fig.3.1. Mappa dei siti visitati (con l'esclusione di Battleship Promontory nelle McMurdo Dry Valleys non incluso nella mappa). Le lettere indicano la posizione delle stazioni meteorologiche (A Modesta, B Lola, C Zoraida; D Eneide, E Sofia-b). Le località hanno lo stesso numero riportato nella Tabella 1

Per questo studio sono stati analizzati 72 campioni di roccia; 70 provenienti dalla Terra Vittoria del Nord e 2 dalla Terra Vittoria del Sud (Battleship Promontory). I campioni di roccia analizzati nel corso del presente lavoro sono riportati in Tabella 3.1, insieme all'indicazione del sito di campionamento, all'altitudine e alla distanza dal mare. Nella Figura 3.2 sono riportate alcune rocce da cui sono stati effettuati gli isolamenti.

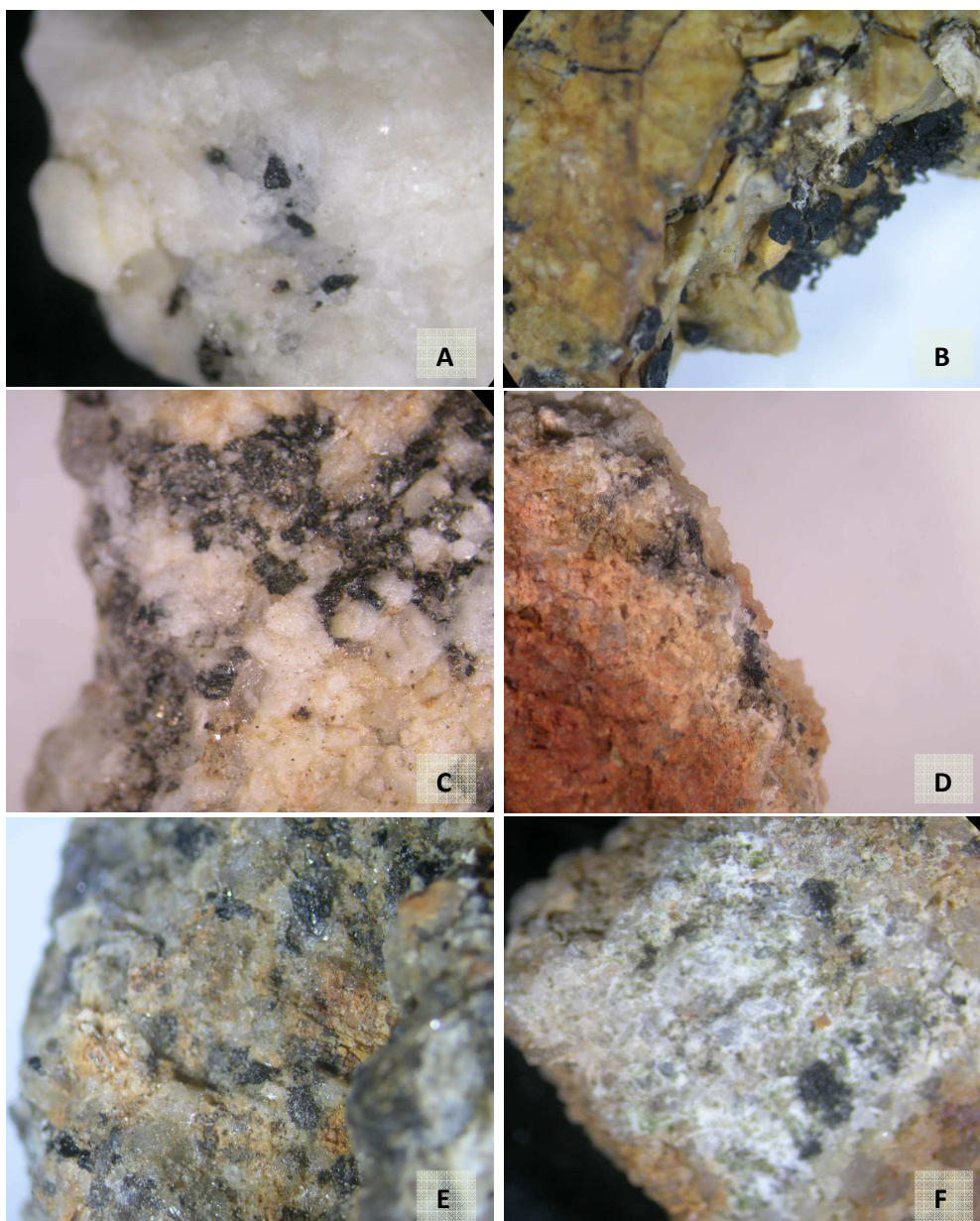


Fig.3.2. Immagini prese allo stereomicroscopio di alcuni dei campioni di roccia da cui sono stati effettuati gli isolamenti. A: Quarzo, Inexpressible Island, Terra Vittoria del nord, Antartide. B: Granito, Mt McGee, Terra Vittoria del nord, Antartide. C:Granito, Archambault Ridge sito 2, Terra Vittoria del nord, Antartide. D: Arenaria, Mt Nansen sito 2, Terra Vittoria del nord, Antartide. E:Conglomerato di arenaria, Archambault Ridge sito 1, Terra Vittoria del nord, Antartide. F:Conglomerato di arenaria, Pudding Butte, Terra Vittoria del nord, Antartide

3.2.ISOLAMENTI

Sono stati processati 63 campioni di roccia provenienti da 42 delle 48 località campionate. I campioni di roccia sono stati frantumati in condizioni di sterilità e i singoli frammenti sono stati seminati su Piastre Petri contenenti *Malt Extract Agar* MEA (Malt extract 3%, agar 1.5%) (AppliChem GmbH, Darmstadt-Germany) con aggiunta di cloramfenicolo 100 ppm per inibire la crescita batterica. Le piastre sono state incubate a 10°C e per diversi mesi ogni settimana è stata verificata la crescita di eventuali organismi. Le colonie sviluppatesi sono state isolate in Piastre Petri sterili contenenti MEA. Una volta ottenuta biomassa sufficiente, si è proceduto all'estrazione del DNA.

Tutti i ceppi fungini ottenuti sono stati coltivati su agar slant (MEA) in tubi di vetro (15x2 cm) e depositati nella *Culture Collection of Fungi from Extreme Environments* (CCFEE) dell'Università degli Studi della Tuscia (DEB), Sezione micologica del Museo Nazionale dell'Antartide "Felice Ippolito".

3.3.ANALISI MOLECOLARI DEGLI ISOLATI

3.3.1.ESTRAZIONE DEL DNA E AMPLIFICAZIONI

L'estrazione del DNA è stata effettuata da colture di 6 mesi mediante l'utilizzo di un kit specifico, il NUCLEOSPIN PLANT (Macherey-Nagel, GmbH & Co. KG, Düren, Germany), seguendo il protocollo ottimizzato per i funghi.

Il DNA estratto dai campioni è stato utilizzato nelle reazioni di *Polymerase chain reaction* (PCR) per l'amplificazione di diverse regioni dell'rDNA, *Internal Transcribed Spacer* (ITS) compreso il gene 5.8S, *Large SubUnit* (LSU), *Small Sub Unit* (SSU) e la seconda subunità maggiore (RPB2) dell' RNA-polimerasi.

Ciascuna reazione di PCR, da 25 µl, è stata preparata utilizzando le seguenti quantità: 12 µl di miscela Mastermix (Biomix, BioLine Ltd. London: BioTaq DNA Polymerase, 32 mM (NH₄)₂ SO₄, 125 mM Tris HCl, pH 8.8 a 25°C, 0.02% Tween 20.2 mM dNTPs, stabilizzatore, colorante inerte della BioMix), 1 µl di ciascun primer (alla concentrazione di 5 pmol/µl), 1 µl di DNA (10-50 ng), l'acqua distillata sterile è stata aggiunta in quantità tale da portare il volume della soluzione a 25 µl (10 µl).

Nella tabella 3.2 sono riportati i nomi e la sequenza dei primers utilizzati.

Tab. 3.2. Primers utilizzati per lo studio molecolare dei campioni e relative sequenze.

Locus	Primer	Sequenza primer (5'→ 3')	Riferimento bibliografico
ITS	ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	White et al., 1990.
ITS	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White et al., 1990.
ITS	ITS4a	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	White et al., 1990.
LSU	LR0R	ACCCGCTGAACTTAAGC	Vilgalys unpublished [http://www.botany.duke.edu/fungi/mycolab]
LSU	LR7	TACTACCACCAAGATCT	Vilgalys and Hester, 1990.
SSU	SR1R	TACCTGGTTGATQCTGCCAGT	Vilgalys unpublished [http://www.botany.duke.edu/fungi/mycolab]
SSU	NS8	TCCGCAGGTTACCTACGGA	White et al., 1990.
RPB2	fRPB2-5F	GAYGAYMGWGATCAYTTYGG	Liu et al. (1999)
RPB2	fRPB2-414R	ACMANNCCCCARTGNGWRTTRTG	Quaedvlieg et al. (2011)

Per le reazioni di amplificazione ci si è serviti di un apparecchio termociclatore T100 THERMAL™ CYCLER (Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Germany) e dell'apparecchio BIORAD MYCYCLER™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Germany).

I cicli termici seguiti per le reazioni di amplificazione delle regioni ITS, LSU e SSU sono riportati nella Tabella 3.3.

Tab. 3.3. Condizioni di amplificazione.

Coppie di primer	Denaturazione iniziale temp. (°C), tempo (min)	No. cicli	Denaturazione temp. (°C), tempo (s)	Annealing temp. (°C), tempo (s)	Estensione temp. (°C), tempo (s)	Estensione finale temp. (°C), tempo (m)
ITS5/ITS4-ITS4a	95,3	35	95,30	55,30	72,32	72,5
LR0R/LR7	94,5	35	94,45	52,30	72,2	72,7
SR1R/ NS8	95,5	35	95,45	52,30	72,3	72,3
fRPB2-5F/ fRPB2-414R	95,3	35	95,45	52,90	72,2	72,10

3.3.2.ELETTROFORESI SU GEL D'AGAROSIO

Mediante un'elettroforesi su gel di agarosio si è stati successivamente in grado di valutare i risultati delle amplificazioni.

Il gel di agarosio all'1,5% è stato preparato sciogliendo 0,75 g di agarosio (Agarose IBI–Shelton Inc., Shelton, Conn. USA) in 50 ml di buffer TAE 1× (40 mM Tris acetato, 1 MmEDTA, pH 8,0 della Brinkmann Instruments, INC.-NY) e aggiungendo Gel Red™ Nucleic Acid Gel Stain; questo ha la funzione di rendere il DNA visibile se esposto a radiazioni ultraviolette, indicando così l'esatta posizione dei frammenti sul gel. La soluzione è stata così versata nella cella elettroforetica, contenente un pettine che, a solidificazione avvenuta è stato estratto formando una fila di pozzetti; la cella è stata riempita con il tampone di corsa (TAE 1×) facendo attenzione a che il livello di quest'ultimo coprisse il gel, che deve risultare, infine, sommerso.

In ogni pozzetto sono stati caricati 5 µl di DNA amplificato miscelati con 1 µl di loading buffer (tampone di caricamento al 25% di blu di bromo fenolo e 40% w/v di saccarosio in acqua). In un altro pozzetto, a titolo di riferimento, è stato sempre caricato un marker (GeneRuler™ 100 bp Ladder Plus) che genera nel gel una serie di bande con cui poter effettuare un confronto.

La corsa è avvenuta applicando una differenza di potenziale di 30 V fino alla fuoriuscita dal pozzetto da parte dei campioni per poi proseguire con un voltaggio pari circa a 80 V.

Terminata la corsa, il gel è stato esposto ad una luce ultravioletta con lunghezza d'onda di 260 nm (mediante un transilluminatore Vilber Lourmat Genenco), al fine di valutare la presenza, la dimensione e, approssimativamente, la quantità di DNA, che è direttamente proporzionale all'intensità della fluorescenza delle bande che rappresentano il frammento amplificato.

3.3.3.SEQUENZIAMENTO, RICOSTRUZIONE DELLE SEQUENZE E CONFRONTO IN BANCA DATI NCBI

Le reazioni di sequenziamento sono state effettuate con il metodo Sanger et al., (1977) utilizzando il kit BigDye™ terminator (Applied Biosystems-Perkin-Elmer, Foster City-CA U.S.A.).

Per la seguente ricerca, il sequenziamento dei frammenti è stato condotto dalla Ditta MACROGEN, Pathfinder in Genomics Research, 1001 World Meridian Center, Seoul, Korea (<http://www.macrogen.com>).

L'analisi delle sequenze è stata effettuata utilizzando il programma CHROMAS (versione 1.45, 32-bit, 1996-1998, Griffith University, Southport, Queensland, Australia), che

permette di visualizzare il risultato del sequenziamento come cromatogramma, ovvero come una serie di picchi corrispondenti ciascuno ad un nucleotide della sequenza. In questo modo è stato possibile correggere manualmente eventuali errori dovuti a letture inesatte delle sequenze durante il sequenziamento, che si manifestano come picchi incerti, poco definiti, a volte anche sovrapposti.

Una volta ricostruite, le sequenze sono state confrontate con quelle depositate presso Banche Dati internazionali on-line, al fine di individuare le specie con cui le nostre sequenze mostrano il grado di similarità più elevato. La Banca Dati utilizzata nella presente ricerca è stata la NCBI Genbank (*National Center for Biotechnology Information*) ed è disponibile on-line all'indirizzo web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Il programma BLASTN (*Basic Alignment Search Tool Nucleotide*) è stato utilizzato per il confronto delle sequenze e la ricerca di massima similarità (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

3.3.4. ALLINEAMENTO SEQUENZE E COSTRUZIONE DEGLI ALBERI

Le sequenze dei funghi neri sono state confrontate mediante allineamento con le sequenze disponibili nella banca dati NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>); quelle più simili sono state utilizzate per costruire allineamenti utilizzando il programma MEGA6 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) utilizzando l'opzione di allineamento automatico MUSCLE. Gli allineamenti sono stati poi migliorati manualmente.

Gli alberi ITS sono stati costruiti utilizzando l'opzione NJ (*Neighbour Joining*) in Mega6 con un'analisi di bootstrap (Felsenstein, 1985) con 1000 ri-campionamenti.

L'analisi multilocus basata sulle sequenze ITS, SSU, LSU e RPB2 è stata effettuata su un gruppo ampio di organismi. Le sequenze sono state concatenate, utilizzando il software *sequence joiner* disponibile in rete (http://users-birc.au.dk/biopv/php/fabox/alignment_joiner.php), e successivamente allineate mediante il programma MEGA 6, utilizzando l'opzione di allineamento automatico MUSCLE. Gli allineamenti sono stati poi migliorati manualmente. Le regioni ambigue sono state escluse dagli allineamenti. L'allineamento è stato esportato ed il miglior modello evolutivo è stato determinato, su 56 testati, utilizzando il programma Modeltest MrAic.pl 1.4.3 (Nylander, 2004) stimato utilizzando Phyml (Guindon & Gascuel, 2003) attraverso il test che determina la verosimiglianza gerarchica. Gli alberi filogenetici sono stati costruiti con il principio della massima verosimiglianza (ML) utilizzando Treefinder (Jobb et al., 2004) e i risultati sono stati visualizzati utilizzando Treeview 1.6.6 (Page, 1996). La robustezza dell'inferenza

filogenetica è stata effettuata utilizzando l'analisi di bootstrap con 1000 pseudorepliche generate ed analizzate con Treefinder.

3.4.METODI COLTURA-INDIPENDENTI

L'analisi della biodiversità fungina sui diversi campioni oggetto di questo studio è stata condotta mediante l'applicazione della tecnica DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*).

3.4.1.ESTRAZIONE E QUANTIFICAZIONE DEL DNA METAGENOMICO

Il DNA metagenomico è stato estratto direttamente da 72 campioni di roccia, dopo essere stati macinati in condizioni di sterilità con il Vibromulino MM 400 RETSCH (Verder Scientific, Bologna, Italia), utilizzando il KIT NUCLEOSPIN PLANT (Macherey-Nagel, GmbH & Co. KG, Duren, Germany) come descritto nel paragrafo 3.3.1. Il DNA estratto è stato quantificato utilizzando il fluorimetro QubitTM Quantitation kit (Invitrogen molecular probes- Eugene, Oregon, USA).

3.4.2.REAZIONI DI PCR

Una prima reazione di PCR è stata condotta per amplificare il gene ITS utilizzando i primers ITS1F/ITS4. Ciascuna reazione di PCR, da 25 µl, è stata preparata come descritto nel paragrafo 3.3.1.

I prodotti di questa prima amplificazione sono stati utilizzati come stampo per una successiva amplificazione (Nested-PCR) della porzione ITS1 dell'ITS con i primers ITS1F-GC/ITS2.

Ciascuna reazione di PCR, da 100 µl, è stata preparata utilizzando le seguenti quantità: 50 µl di miscela Mastermix (Biomix, BioLine Ltd. London), 4 µl di ciascun primer (5 pmol/µl), 4 µl di DNA (10-50 ng), l'acqua distillata sterile e stata aggiunta in quantità tale da portare il volume della soluzione a 25 µl (38 µl).

Nella tabella 3.4 sono riportati i primers utilizzati nelle reazioni di PCR.

Il protocollo termico per le reazioni di Nested-PCR è stato il seguente: denaturazione iniziale a 94°C per 5 minuti seguita da 35 cicli consecutivi a 94°C per 30 secondi, annealing dei primers a 55°C per 30 secondi ed estensione della catena a 72°C per 30 secondi e la fase finale di estensione a 72°C per 5 minuti.

Tab. 3.4. Primers utilizzati per l'analisi DGGE.

Locus	Primer	Sequenza primer (5'→ 3')	Riferimento bibliografico
ITS	ITS1F	CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A	Gardes & Bruns, 1993
ITS	ITS1F-GC	cgc ccg ccg cgc gcg gcg ggc ggg gcg ggg gca cgg ggg gcT TGG TCA TTT AGA GGA AGT AA	Gardes & Bruns, 1993
ITS	ITS2	GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC	White et al., 1990

Per impedire la completa denaturazione del frammento durante la corsa elettroforetica, una coda GC è attaccata all'estremità 5' di uno dei due primers usati nella reazione di PCR (Muyzer et al., 1993).

È stato inoltre creato un marker di riferimento miscelando i DNA di 7 ceppi fungini noti ottenuti dalla CCFEE per permettere le analisi comparative dei profili DGGE derivati da diversi gel e come controllo della qualità della corsa. I risultati delle amplificazioni sono stati valutati mediante un'elettroforesi su gel di agarosio 1.5% come descritto nel paragrafo 3.3.2. le specie di riferimento utilizzate sono riportate nella Tabella 3.5.

Tab. 3.5. Specie di riferimento utilizzate come marker.

Ceppi	Numero CCFEE	Campione	Località di campionamento
<i>Cryomyces antarticus</i>	515	arenaria	Linnaeus Terrace, Terra Vittoria del Sud, Antartide
<i>Friedmanniomyces endolithicus</i>	524	suolo	Linnaeus Terrace, Terra Vittoria del Sud, Antartide
<i>Elasticomyces elasticus</i>	5313	tallo <i>Usnea antarctica</i>	Key Island, Terra Vittoria del Nord, Antartide
<i>Debaryomyces hansenii</i>	5366	roccia	Ford Peak, Terra Vittoria del Nord, Antartide
<i>Cryptococcus vishniacii</i>	5375	roccia	Morris Basin, Terra Vittoria del Nord, Antartide
<i>Recurvomyces mirabilis</i>	5391	roccia	P.ta Indren, M.te Rosa, Italia
<i>Saxomyces penninicus</i>	5495	roccia	P.ta Indren, M.te Rosa, Italia

I singoli prodotti di amplificazione ottenuti sono stati purificati e concentrati direttamente dalla miscela di PCR, allo scopo di rimuovere dalla miscela residui di primers, sali, oligonucleotidi di polimerizzazione ancora presenti, utilizzando il kit di purificazione KIT

NUCLEOSPIN EXTRACT II 2007 (Macherey-Nagel, GmbH & Co. KG, Düren, Germany). I prodotti di PCR purificati sono stati caricati in ogni pozzetto per DGGE

3.4.3.DGGE (DENATURING GRADIENT GEL ELECTROPHORESIS)

L'analisi DGGE dei frammenti è stata effettuata con il sistema DGGE-1 (ELETTROFOR, Scientific Instruments, Rovigo, Italia). Per la corsa elettroforetica è stato utilizzato un gel di poliacrilammide al 7.5% in TAE 1X (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA, pH 8,0) contenente un gradiente denaturante di urea-formammide da 20 a 60%.

La corsa elettroforetica è stata condotta per 5 ore a 200 V alla temperatura costante di 60°C. Terminata la corsa il gel è stato colorato in una soluzione (1.36g NaCl, 200ml H₂O) di GelRed 0.03% (Gelred Nucleic Acid Gel Stain, Biotium) a temperatura ambiente per 40 minuti e l'immagine è stata rilevata per mezzo di un transilluminatore UV dotato di macchina fotografica (ChemiDoc, BioRad). Dal gel sono state ritagliate le bande di interesse con un bisturi sterile e poste in 100 µl di elution buffer PE. È stata effettuata una re-amplificazione con lo stesso protocollo di NESTED-PCR descritto nel paragrafo 3.4.2 ed effettuato il gel di controllo come descritto nel paragrafo 3.3.2. I prodotti di PCR sono stati sottoposti a sequenziamento, ricostruzione delle sequenze e confronto in banca dati NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

3.4.4.ANALISI DEI PROFILI DGGE

L'analisi d'immagine è stata effettuata mediante il software Phoretix 1D Pro (TotalLab Ltd, Newcastle, UK).

La similarità tra i profili di DGGE è stata determinata calcolando il coefficiente di DICE. Questo indice di similarità si basa su presenza/assenza delle bande in ogni profilo, senza tener conto della loro intensità (Liu et al., 2007).

Il band-matching (assegnazione di banda) viene eseguito automaticamente dal software Phoretix 1D Pro e poi migliorato manualmente. Nell'assegnazione delle bande, è stata applicata una tolleranza di posizione del 2% (rispetto alla lunghezza totale del gel), che indica lo spostamento massimo consentito affinché due bande, in diverse lanes DGGE, siano considerate identiche. Il dendrogramma relativo al pattern di similarità delle bande è stato automaticamente calcolato mediante algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). La significatività del clustering UPGMA è stata stimata calcolando i coefficienti di correlazione cofenetica (Sokal, 1962). Per verificare la riproducibilità dei profili DGGE, le reazioni PCR e la corsa sono state effettuate in duplicato.

Anche le intensità relative delle bande sono state calcolate utilizzando Phoretix 1D Pro.

La biodiversità fungina dei campioni è stata misurata utilizzando diversi indici teorici basati sui profili delle bande ottenuti. Gli indici sono stati calcolati per ciascun campione utilizzando il numero e l'intensità delle bande in ogni profilo come rappresentazioni del numero e dell'abbondanza relativa delle diverse specie in quel campione.

L'indice *Richness* (S) rappresenta il numero di bande in ogni linea.

L'indice di diversità di Shannon-Weaver (H') (Shannon & Weaver, 1963), è stato calcolato per ogni lanes DGGE utilizzando la formula di seguito riportata.

$$H' = -\sum p_i \ln p_i$$

Questo indice è calcolato tramite l'intensità relativa di una determinata banda nella curva densitometrica corrispondente. Infine, le abbondanze relative delle specie presenti in un campione (H') sono state calcolate sommando le intensità relative di ciascuna banda presente sulla corrispondente lane.

H' assume valori crescenti all'aumentare della ricchezza di specie e dell'uniformità dell'abbondanza relativa delle diverse specie. H' tende a 0 quanto più la ripartizione all'interno della comunità è sbilanciata a favore di una specie.

L'indice di Pielou (J') (Pielou, 1966) o di equiripartizione prende in considerazione la modalità di distribuzione dei singoli individui nelle varie specie ed è calcolato in base al valore dell'indice di Shannon secondo la seguente formula:

$$J' = H' / \ln S$$

dove H' è il valore dell'indice di diversità di Shannon-Weaver e S è il numero di bande presenti in un profilo.

L'equiripartizione tende a 1 quanto più gli organismi sono distribuiti uniformemente tra le specie. Tende a 0 quanto più alcune specie dominano numericamente sulle altre.

Inoltre è stato calcolato l'indice di diversità di Simpson (Simpson, 1949). Questo indice misura la probabilità che due individui scelti a caso da un campione appartengano alla stessa specie ed è fortemente influenzato dall'abbondanza delle specie dominanti. Può essere calcolato dalla seguente formula:

$$1-D = 1 - \sum (p_i^2)$$

dove p è la proporzione di intensità della singola banda rispetto alla somma delle intensità di tutte le bande. Il valore $1-D$ è compreso tra 0 e 1. Con questo indice, 1 rappresenta la diversità infinita e 0, nessun diversità. Più alto è il valore di $1-D$, più alta è la diversità.

Le curve di Pareto Lorenz (PL) sono state utilizzate per stimare l'uniformità e l'organizzazione funzionale all'interno delle comunità endolitiche, come descritto da Marzorati et al., 2008 (Figura 3.3). Sugli assi x e y sono state riportate rispettivamente, le bande cumulative normalizzate e le intensità cumulative normalizzate di ogni banda. Le curve sono state numericamente interpretate attraverso l'indice organizzazione funzionale (F_o). L'intercetta è stata fissata al 20% della popolazione (0,2 sull'asse x) per determinare l'intensità cumulativa proporzionale, mentre l'uniformità perfetta è rappresentata a 45° (Marzorati et al., 2008). Più la curva PL si discosta dalla diagonale a 45° (perfetta *evenness* teorica), minore uniformità può essere osservata nella struttura della comunità studiata. Tanto maggiore è il parametro F_o , misurato come valore %, tanto più una comunità è specializzata e adattata alle condizioni ambientali in cui vive. Una comunità di questo tipo può avere una alta organizzazione funzionale, ma d'altro canto è fragile a cambiamenti esterni in quanto ogni perturbazione può richiedere tempi di recupero molto lunghi.

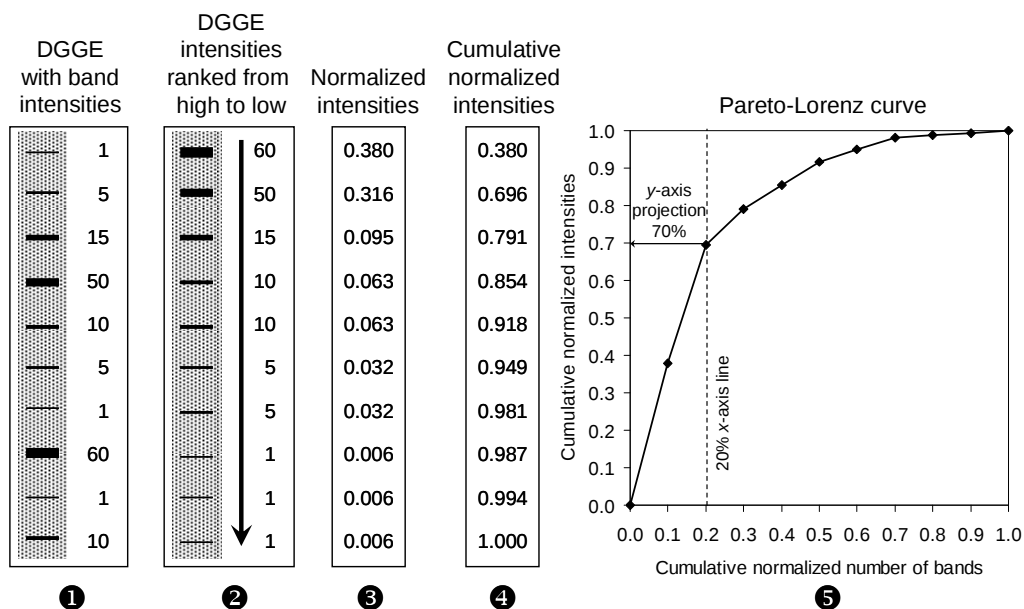


Fig.3.3 Construzione delle curve di distribuzione di Pareto-Lorenz, (Marzorati et al., 2008)

3.4.5.ELABORAZIONE STATISTICA DEI DATI

È stata effettuata un'analisi statistica multivariata per determinare l'influenza dei parametri ambientali sulla comunità fungina in termini di biodiversità utilizzando il software PAST (PAleontological STatistics, ver. 2.17, Hammer et al., 2001). I dati ottenuti sono stati ordinati mediante analisi n-MDS (Non-metric multidimensional scaling) utilizzando il metodo di distanza Bray-Curtis. Le seguenti variabili ambientali sono state incluse nella mappa n-MDS: altitudine (m slm), distanza dal mare (Km), tipologia e porosità del substrato roccioso, tipo di colonizzazione.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1.ISOLAMENTI

Le rocce da cui sono stati effettuati gli isolamenti provengono tutte da diverse località dell'Antartide continentale, in particolare 61 dalla Terra Vittoria del Nord e 2 dalla Terra Vittoria del Sud.

Dai 63 campioni di roccia analizzati è stato possibile isolare in coltura pura 90 ceppi fungini, tra cui 55 funghi neri meristemati, 8 meristemati bianchi e 23 lieviti.

Le colonie si sono sviluppate in tempi diversi per i diversi isolati: le prime colonie fungine sono comparse dopo un intervallo di tempo variabile ma mai inferiore a un mese e in alcuni casi anche dopo 5 o 6 mesi, mentre i primi lieviti sono stati osservati dopo circa 15 giorni dalla data della semina. Tutti i ceppi fungini ottenuti sono stati inseriti nella CCFEE (*Culture Collection of Fungi from Extreme Environments*), Sezione Tematica di Micologia del Museo Nazionale dell'Antartide "Felice Ippolito", custodita presso l'Università degli Studi della Tuscia (DEB). I lieviti sono stati depositati anche presso la Collezione dei Lieviti Industriali DBVPG (Dipartimento di Biologia Applicata, Università di Perugia, <http://www.dbvpg.unipg.it>).

Nella Tabella 4.1 sono riportati i siti di campionamento selezionati e i campioni di roccia raccolti con indicazione dei microrganismi isolati da ogni campione.

Di seguito si riportano inoltre foto rappresentative di alcuni dei microrganismi fungini isolati in coltura, allo scopo di evidenziare la grande diversità di microrganismi associati ai campioni esaminati (Figura 4.1).

Da 18 campioni, l'isolamento eseguito con le tecniche descritte in materiali e metodi (paragrafo 3.2) non ha permesso di ottenere isolati in coltura.

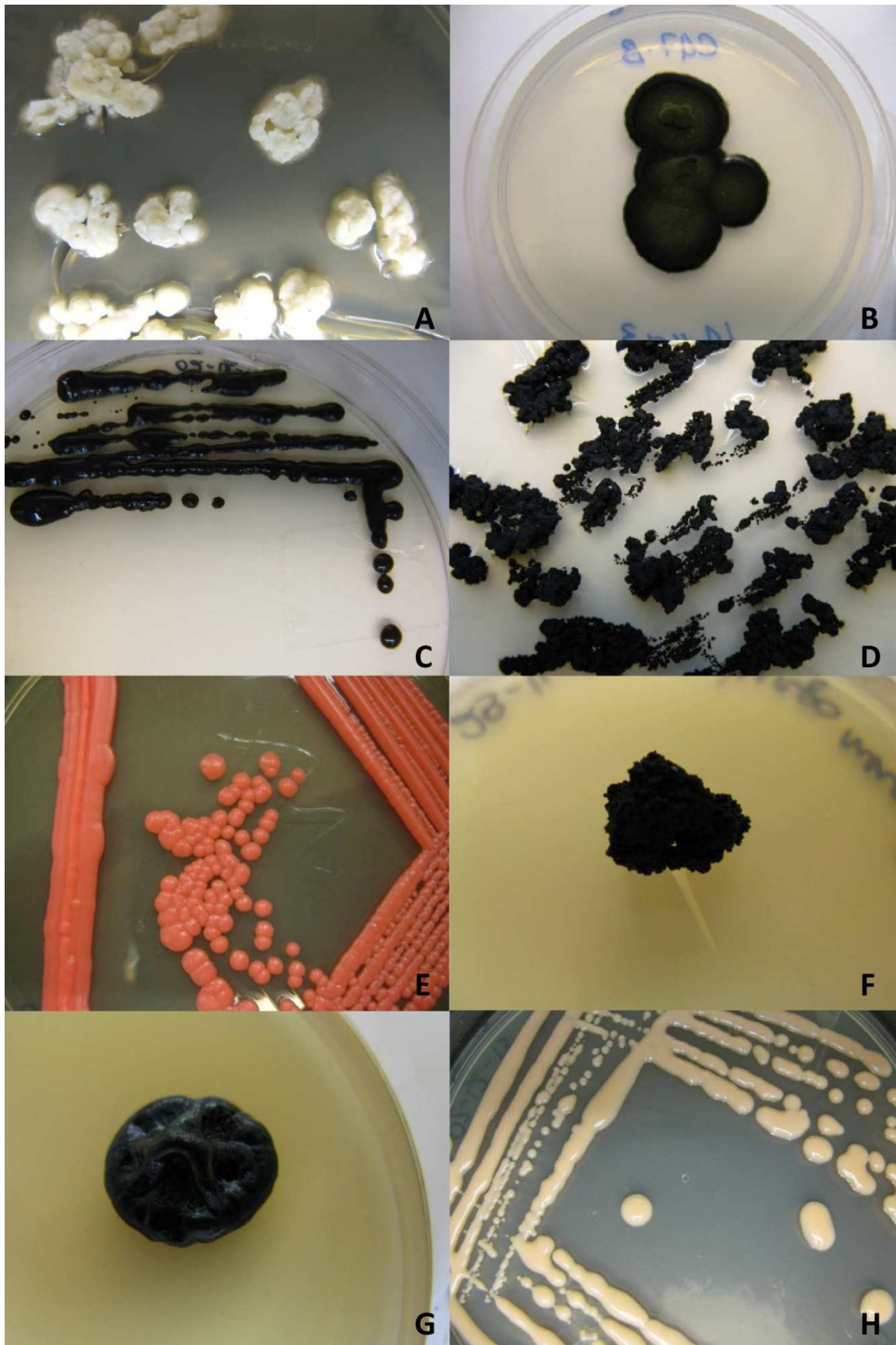


Fig.4.1. Immagine rappresentativa della biodiversità dei funghi isolati dalle rocce antartiche: A) fungo ialino; B,C,D,F,G) funghi neri; E,H) lieviti

Tab. 4.1. Lista degli isolati ottenuti dai campioni esaminati.

	Località e siti di campionamento	Altitudine (m) asl	Distanza dal mare (km)	Roccia	N° isolati	Funghi neri	Funghi ialini	Lieviti
1	Chisholm Hills							
	sito 1	2500	81	S	1	1	-	-
	sito 1	2500	81	D	1	1	-	-
	sito 2	2580	80	S	-	-	-	-
2	Stewart Heights							
	sito 1	2670	74	CS	4	3	1	-
	sito 1	2670	74	G	-	-	-	-
4	Archambault Ridge							
	sito 1	3200	90	CS	2	1	-	1
	sito 2	2725	80	G	6	3	1	2
	sito 3	3400	87	CS	1	1	-	-
5	Mt Adamson							
	sito 1	3600	60	S	-	-	-	-
7	Mt McGee							
	sito 1	1350	18	G	2	1	-	1
	sito 2	1000	19	G	3	1	1	1
	sito 3	230	13	G	5	1	1	3
8	Shafer Peak							
	sito 1	3100	59	CS	-	-	-	-
9	Harrow Peak							
	sito 1	1230	6.5	G	2	2	-	-
10	Kay Island							
	sito 1	80	0	Q	11	5	1	4
12	Pinkard Table							
	sito 1	1550	13.5	G	1	-	-	1
13	Random Hills							
	sito 1	1700	13	G	3	2	-	1
14	Bier Point							
	sito 1	1460	8	G	1	1	-	-
15	Timber Peak							
	sito 1	2800	49.5	CS	-	-	-	-
	sito 2	2800	50	CS	1	1	-	-
16	Mt New Zealand							
	sito 1	2888	47	S	1	1	-	-
17	Mt. Meister							
	sito 1	1632	41	G	1	1	-	-

18	Unnamed site							
	sito 1	2700	40.5	S	-	-	-	-
19	Eskimo Point							
	sito 1	1816	37	Q	-	-	-	-
20	Mount Burrows							
	sito 1	2000	26.6	G	1	1	-	-
21	Mt Dickason							
	sito 1	1840	21	G	2	2	-	-
	sito 2	1586	21.5	G	-	-	-	-
22	Wishbone Ridge							
	sito 1	1396	17	G	2	1	-	1
23	Mt Keinath							
	sito 1	385	5.2	G	-	-	-	-
24	Mt Nansen							
	sito 1	2240	12.5	G	2	1	-	1
	sito 2	2349	20	S	1	1	-	-
	sito 3	1200	23.2	CS	-	-	-	-
25	Thern Promontory							
	sito 1	1500	29	S	-	-	-	-
26	Anderson Ridge							
	sito 1	500	4.7	G	1	1	-	-
27	Campo Icaro							
	sito 1	60	0.1	G	1	-	-	1
28	Vegetation Island							
	sito 1	200	0	G	2	1	1	-
29	Reed Nunatak							
	sito 1	1133	19	G	1	-	1	-
30	Mt Larsen							
	sito 1	935	10	G	2	1	-	1
31	Inexpressible Island							
	sito 1	0	0	Q	5	2	-	3
	sito 1	0	0	G	-	-	-	-
32	Olson Nunatak							
	sito 1	200	2	G	2	1	1	-
33	Trio Nunatak							
	sito 1	1025	85.3	S	1	1	-	
	sito 1	1025	85.3	S	-	-	-	
	sito 3	1000	82	S	1	1	-	
	sito 4	1400	84.5	S	2	2	-	

34	Mt Howard							
	sito 1	1200	33.8	CS	1	1	-	-
	sito 2	1352	33.8	CS	1	1	-	-
	sito 2	1352	33.8	CS	1	1	-	-
35	Prior Island							
	sito 1	50	0	G	2	1	-	1
36	Ford Peak							
	sito 1	1190	57	CS	1	1	-	-
38	Mt Billing							
	sito 1	1300	44	CS	-	-	-	-
39	Ricker Hills							
	sito 3	1820	91.5	S	2	1	-	1
40	Mt Bowen							
	sito 1	1874	30.5	S	1	1	-	-
41	Bobby Rocks							
	sito 1	1680	91	S	-	-	-	-
42	Pudding Butte							
	sito 2	1600	58.6	CS	1	1	-	-
	sito 3	1600	64	S	1	1	-	-
43	Starr Nunatak							
	sito 1	1420	3.2	G	2	2	-	-
44	Richard Nunatak							
	sito 3	2000	70.2	CS	-	-	-	-
	sito 3	2000	70.2	CS	1	1	-	-
45	Ambalada Peak							
	sito 1	1800	105.5	CS	-	-	-	-
46	McLea Nunatak							
	sito 1	2100	75.6	S	1	1	-	-
	sito 1	2100	75.6	D	-	-	-	-
48	Battleship Promontory							
	sito 1	1000	33.5	S	2	2	-	-

Tipo di roccia: CS:conglomerato di arenaria; D: dolerite; G: granito; S:arenaria; Q:quarzo; LD: lava-dike.

Di seguito (Tabella 4.2.) sono riportati in dettaglio i funghi isolati, con numero di isolamento e relativo numero di collezione (CCFEE), insieme al tipo di roccia e alla località geografica.

Tab. 4.2. Elenco dei funghi neri isolati con codice di isolamento e numero di accesso alla CCFEE (*Culture Collection of Fungi from Extreme Environments*).

CCFEE	Numero isolamento	Descrizione	Campione	Roccia
6074	C01-A	fungo nero	Stewart Heights campione 3	CS
6075	C01-B	fungo nero		
6076	C01-H	fungo nero		
6290	C01-H2	meristematico ialino		
6077	C02-A	fungo nero	Mt New Zealand campione 4	S
6078	C03-A	fungo nero	Mt Nansen sito 2 campione 1	S
6079	C04-C	fungo nero	Ricker Hills sito 3 campione 2	S
6080	C04-F	lievito		
6081	C05-A	fungo nero	Mt Bowen campione 1	S
6082	C06-A	fungo nero	Pudding Butte sito 3 campione 1	S
6083	C07-A	fungo nero	McLea Nunatak	S
6084	C09-A	fungo nero	Kay Island campione 1	Q
6085	C09-C			
6086	C09-D	fungo nero		
6087	C09-E	fungo nero		
6088	C09-F	meristematico ialino		
6089	C09-G	lievito		
6090	C09-H	lievito		
6091	C09-L	lievito		
6092	C09-O	lievito		
6247	C09-B	fungo nero verde		
6248	C09-R	colonia rosa		
6093	C10-A	fungo nero	Random Hills campione 2	G
6095	C10-C	lievito		
6094	C10-B	fungo nero		
6291	C11-A	fungo nero	Mt Nansen sito 1 campione 4	G
6301	C11-C	lievito bianco		
6096	C12-D	fungo nero	Anderson Ridge campione 2	G
6097	C13-C	fungo nero	Inexpressible Island campione 9	Q
6098	C13-E	lievito		
6099	C13-G	lievito		
6100	SS13	fungo nero		
6292	C13-N	lievito rosa		
6101	C15-A	fungo nero	Starr Nunatak campione 2	G
6102	C15-B	fungo nero		
6103	C17-A	lievito	Archambault Ridge sito 1 campione 4	CS
6104	C17-D	fungo nero		
6105	C18-A	lievito	Archambault Ridge sito 2 campione 3	G
6106	C18-B	lievito		
6107	C18-D	fungo nero		
6293	C18-P	fungo nero		
6108	C18-Q	fungo nero		
6109	C18-T	meristematico ialino		
6110	C19-A	fungo nero	Archambault Ridge sito 3 campione 1	CS

6112	C21-D	fungo nero	Mt McGee sito 2	G
6113	C21-A	meristematico ialino		
6111	C21-B	lievito		
6294	C22-A	fungo nero	Vegetation Island campione 1	G
6302	C22-B	meristematico ialino		
6249	C27-E	fungo nero	Timber Peak sito 2 campione 4	CS
6250	C28-A	fungo nero	Trio Nunatak sito 3 campione 5	S
6251	C29-D	fungo nero	Trio Nunatak sito 4 campione 3	S
6158	C29-C	fungo nero		
6159	C30-A	fungo nero	Mt Howard sito 2 campione 1	CS
6160	C31-A	fungo nero	Pudding Butte sito 2	CS
6114	C33-A	fungo nero	Richard Nunatak sito 3 campione 2	CS
6161	C34-E	fungo nero	Mt Howard sito 2 campione 2	CS
6295	C35-A	fungo nero	Mt Larsen campione 2	G
6252	C35-D	lievito rosa		
6116	C36-D		Prior Island campione 1	G
6115	C36-C	lievito rosa		
6296	C37-A	fungo nero	Ford Peak campione 3	CS
6253	C38-A	fungo nero	Mt Dickason sito 1 campione 5	G
6297	C38-B	fungo nero		
6162	C39-E	fungo nero	Battleship Promontory campione 9	S
6270	C39-C	fungo nero		
6254	C41-A	lievito	Campo Icaro/Base campione 1	G
6163	C44-A	fungo nero	Olson nunatak (Widow. Pass) campione	G
6255	C44-B	meristematico ialino	3	
6164	C45-B	fungo nero	Mt Burrows	G
6257	C46-A	fungo nero	Mt Howard sito 1 campione 8	CS
6165	C47-A	fungo nero	Harrow Peak	G
6259	C47-B	fungo nero		
6166	C48-B	fungo nero	Chisholm Hills sito 1 campione 2	S
6260	C49-A	fungo nero	Chisholm Hills sito 1 campione 1	D
6261	C51-A	lievito arancio	Mt McGee sito 1 campione 1	G
6262	C51-B	fungo nero		
6303	C51-C	lichene arancio		
6263	C52-A	lievito bianco	Mt McGee sito 3 campione 1	G
6264	C52-B	lievito rosa		
6265	C52-C	lievito arancio		
6256	C52-D	fungo nero		
6304	C52-E	meristematico ialino		
6266	C55-A	fungo nero	Trio Nunatak sito 1 campione 2	S
6267	C61-A	lievito chiaro	Pinkard Table	G
6298	C62-A	fungo nero	Bier Point	G
6299	C63-A	fungo nero	Mt Meister	G
6300	C66-A	fungo nero	Wishbone Ridge	G
6268	C66-B	lievito chiaro		
6269	C67-A	meristematico ialino	Reed Nunatak	G

Tipo di roccia: CS:conglomerato di arenaria; D: dolerite; G: granito; S:arenaria; Q:quarzo; LD: lava-dike.

4.2.ANALISI MOLECOLARI

Per tutti gli isolati fungini riportati in Tabella 4.2. (esclusi i lieviti) è stato amplificato e sequenziato il target genico ITS. Le analisi molecolari e fisiologiche sui lieviti isolati sono state condotte dal DPVG di Perugia. Sul totale di 90 dei microrganismi fungini isolati, 8 erano costituiti da funghi ialini non riconducibili a taxa specifici dal confronto delle sequenze variabili ITS. Il resto degli isolati (esclusi i lieviti) invece era costituito da funghi neri che sono stati sottoposti ad analisi approfondite mediante le quali è stato possibile individuare 16 taxa distinti, come verrà descritto nei successivi paragrafi. Nel caso in cui non si era ottenuta una identificazione certa dell'isolato si è deciso di estendere lo studio ad altri markers genici quali SSU, LSU e RPB2. I risultati del confronto in banca dati delle sequenze ITS ottenute sono riportati nella Tabella 4.3.

Tabella 4.3. Percentuali di similarità più elevate ottenute dal confronto delle sequenze ITS dei 90 ceppi fungini con le sequenze depositate in Banca Dati NCBI Genbank (*National Center for Biotechnology Information*).

CCFEE N.	Identificazione	Copertura	Max identità	Numero di accesso
6074	<i>Friedmanniomyces endolithicus</i>	97%	99%	JN885543.1
6075	<i>Friedmanniomyces endolithicus</i>	98%	99%	JN885543.1
6076	<i>Botryosphaeriales</i>	-	87-88%	-
6077	<i>Friedmanniomyces endolithicus</i>	97%	99%	JN885543.1
6078	<i>Friedmanniomyces endolithicus</i>	100%	100%	JN885567.1
6079	<i>Friedmanniomyces endolithicus</i>	97%	99%	JN885543.1
6081	<i>Friedmanniomyces endolithicus</i>	100%	100%	JN885564.1
6082	<i>Friedmanniomyces endolithicus</i>	97%	99%	JN885543.1
6083	<i>Oleoguttula mirabilis</i>	100%	98%	KF310031.1
6084	<i>Helotiales</i>	-	81-82%	-
6085	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	100%	100%	KM816685.1
6086	<i>Elasticomyces elasticus</i>	93%	99%	KF309952.1
6087	Uncultured <i>Cladophialophora</i>	97%	90%	KC876149.1
6088	<i>Lecanoromicetidae</i>	-	86%	-
6093	<i>Botryosphaeriales</i>	-	87-88%	-
6094	<i>Chaetothyriales</i>	-	87-88%	-
6096	<i>Friedmanniomyces endolithicus</i>	100%	99%	JN885567.1
6097	<i>Oleoguttula mirabilis</i>	87%	94%	KF310031.1
6100	<i>Herpotrichiellaceae</i>	-	90%	-
6101	<i>Botryosphaeriales</i>	-	86-87%	-
6102	<i>Botryosphaeriales</i>	-	86-87%	-
6104	<i>Oleoguttula mirabilis</i>	88%	98%	KF310031.1
6107	<i>Dothideales</i>	-	88-91%	-
6108	<i>Botryosphaeriales</i>	-	87-88%	-
6109	<i>Verrucariales</i>	99%	92%	EF373588.1
6110	<i>Friedmanniomyces endolithicus</i>	-	81-82%	-

6112	<i>Botryosphaeriales</i>	-	87-88%	-
6113	<i>Lecanoromicetidae</i>	-	90%	-
6114	<i>Friedmanniomyces endolithicus</i>	99%	100%	JN885560.1
6115	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	100%	100%	KM816685.1
6158	<i>Friedmanniomyces endolithicus</i>	99%	99%	JN885567.1
6159	<i>Oleoguttula mirabilis</i>	87%	98%	KF309972.1
6160	<i>Oleoguttula mirabilis</i>	91%	98%	KF309972.1
6161	<i>Botryosphaeriales</i>	-	87-88%	-
6162	<i>Friedmanniomyces endolithicus</i>	100%	99%	JN885564.1
6163	<i>Botryosphaeriales</i>	-	87-88%	-
6164	<i>Oleoguttula mirabilis</i>	99%	99%	KF310031.1
6165	<i>Botryosphaeriales</i>	-	87%	-
6166	<i>Cryomyces antarcticus</i>	100%	99%	KC315855.1
6247	<i>Elasticomyces elasticus</i>	93%	99%	KF309952.1
6248	<i>Thelebolus microsporus</i>	100%	99%	KM822751.1
6249	<i>Friedmanniomyces endolithicus</i>	100%	99%	JN885564.1
6250	<i>Friedmanniomyces endolithicus</i>	100%	99%	JN885565.1
6251	<i>Friedmanniomyces endolithicus</i>	100%	99%	JN885567.1
6253	<i>Dothideales</i>	-	90-91%	-
6255	<i>Verrucariales</i>	-	81-82%	-
6256	<i>Dothideales</i>	-	90-91%	-
6257	<i>Cryomyces antarcticus</i>	100%	99%	KC315855.1
6259	<i>Elasticomyces elasticus</i>	93%	99%	KF309952.1
6260	<i>Cryomyces antarcticus</i>	100%	99%	KC315855.1
6262	<i>Vermiconia antarctica</i>	90	99%	KF309983.1
6266	<i>Oleoguttula mirabilis</i>	88%	98%	KF310031.1
6269	<i>Lecanoromicetidae</i>	-	86%	-
6270	<i>Friedmanniomyces endolithicus</i>	100%	99%	JN885564.1
6290	<i>Verrucariales</i>	-	81-82%	-
6291	<i>Friedmanniomyces endolithicus</i>	99%	99%	JN885565.1
6293	<i>Helotiales</i>	-	81%	-
6294	<i>Botryosphaeriales</i>	91%	90%	FR682251.1
6295	<i>Extremus antarcticus</i>	85%	99%	KF309980.1
6296	<i>Friedmanniomyces endolithicus</i>	98%	100%	JN885560.1
6297	<i>Extremus antarcticus</i>	86%	100%	KF309980.1
6298	<i>Extremus antarcticus</i>	86%	99%	KF309980.1
6299	<i>Extremus antarcticus</i>	87%	100%	KF309980.1
6300	<i>Friedmanniomyces endolithicus</i>	98%	99%	JN885543.1
6302	<i>Verrucariales</i>	97%	92%	EF373588.1
6303	<i>Xanthoria elegans</i>	-	81-82%	-
6304	<i>Verrucariales</i>	-	81-82%	-

Tramite l'analisi con Blastn delle sequenze ITS è stato possibile identificare a livello specifico 35 dei ceppi studiati: di questi 19 come *Friedmanniomyces endolithicus*, 6 come *Oleoguttula mirabilis*, 3 come *Elasticomyces elasticus*, 3 *Cryomyces antarcticus*, 2 come *Cladosporium cladosporioides*, 1 come *Thelebolus microsporus* e infine 1 lichene come *Xanthoria elegans* (Tabella 4.3). Come già osservato, questi dati sembrano confermare che il genere *Friedmanniomyces*, ed in particolare la specie *F. endolithicus*, sia particolarmente diffuso nelle comunità endolitiche della Terra Vittoria (Selbmann et al., 2014c). Un dato da segnalare riguardava la specie *C. antarcticus*; infatti questa specie fino ad oggi era sempre stata ritrovata nella Terra Vittoria del Sud, mentre in questo studio è stata isolata da rocce raccolte nella Terra Vittoria del Nord (Chisholm Hills e Mt Howard).

Per tutti gli altri le similarità trovate in Banca dati erano molto basse oppure dubbie in quanto erano presenti match con molte specie diverse; pertanto è stato possibile avere solamente un inquadramento a livello di classe, ordine o famiglia.

Nella Figura 4.2 è mostrato un grafico in cui sono riportate le percentuali delle principali tipologie fungine isolate (A) e delle specie di funghi neri identificate (B).

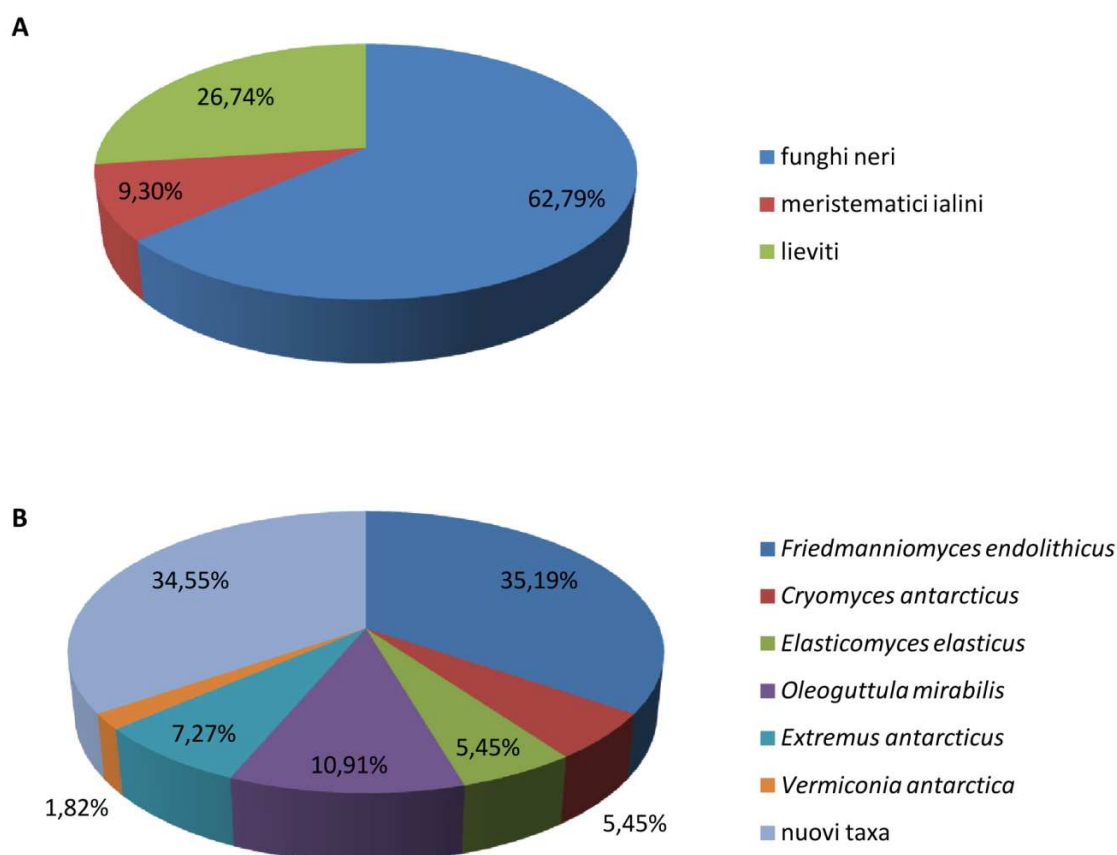


Fig.4.2. Frequenza (%) di funghi neri, meristematici ialini e lieviti isolati (A); frequenza delle specie di funghi neri (B)

Per quanto riguarda i lieviti, la maggior parte dei ceppi caratterizzati in questo studio appartenevano ai generi *Cryptococcus* (ordine *Filobasidiales* e *Tremellales*) e *Rhodotorula* (ordine *Cystobasidiales*) che rappresentano i generi più frequentemente isolati in Antartide, ma anche da altri ecosistemi freddi. La capacità ben nota di *Cryptococcus* di produrre una capsula polisaccaridica extracellulare (Vishniac 2006a; Selbmann et al., 2014b) e la sua superiore abilità di assimilare fonti di carbonio e di azoto (Connel et al., 2008) sono tra le caratteristiche che facilitano la sua apparente dominanza nelle popolazioni di lieviti coltivabili all'interno degli ecosistemi freddi.

Entrambi i generi appartengono al Phylum Basidiomycota. Altri lavori incentrati sullo studio delle popolazioni di lieviti da ambienti freddi hanno già evidenziato come la presenza di lieviti basidiomiceti rispetto agli ascomiceti in ambienti freddi sia prevalente (Buzzini et al., 2012, Selbmann et al., 2014a).

Significativo è stato il ritrovamento di due ceppi appartenenti al genere *Taphrina*, che rappresenta la seconda segnalazione di questo genere in Antartide; Selbmann et al. (2014d) riportano infatti per la prima volta l'isolamento di ceppi appartenenti al genere *Taphrina* nel continente antartico e da substrati diversi da piante. Il genere *Taphrina* appartiene all'ordine *Taphrinales* e al subphylum Taphrinomycotina e rappresenta una linea basale del Phylum Ascomycota (Hibbett et al., 2007); comprende specie che, nella forma filamentosa, sono parassite di diverse piante vascolari, mentre nello stato di lievito sono saprotrofe e possono essere coltivate su terreni artificiali (Rodrigues & Fonseca, 2003); questo comportamento potrebbe spiegare la loro presenza in Antartide, in una regione dove non sono presenti piante. In particolare il ceppo CCFEE 6252, isolato da un campione di granito proveniente dalla località Mt Larsen a 935 m s.l.m. e a 10 Km dalla costa, appartiene alla specie psicrofila *Taphrina antartica* Selbmann & Turchetti recentemente descritta e rappresentata da due soli ceppi isolati appunto per la prima volta in Antartide, nella Terra Vittoria del Nord e del Sud (Selbmann et al. 2014d).

Per i funghi neri per cui è stata ottenuta un'identità bassa con le porzioni ITS, che sono altamente variabili, si è proceduto con l'amplificazione dei geni ribosomali conservati *nucLSU* e *nucSSU* e della seconda subunità maggiore (RPB2) dell'RNA-polimerasi II.

I risultati del confronto in banca dati delle sequenze LSU, SSU e RPB2 ottenute sono riportati nelle tabelle 4.4 e 4.5.

Tabella 4.4. Percentuali di similarità più elevate ottenute dal confronto delle sequenze LSU con le sequenze depositate in Banca Dati NCBI Genbank (*National Center for Biotechnology Information*).

CCFEE N.	Identificazione	Copertura	Max identità	Numero di accesso
6076	<i>Cf. Arthoniales</i> sp.	100%	99%	GU250373.1
6083	<i>Capnodiales</i> sp.	100%	99%	GU250384.1
6084	<i>Coniosporium apollinis</i>	99%	94%	GU250898.1
6087	<i>Exophiala dermatitidis</i>	100%	93%	DQ823100.1
6093	<i>Cf. Arthoniales</i> sp.	100%	99%	GU250373.1
6094	<i>Chaetothyriomycetidae</i> sp.	99%	93%	FJ358257.1
6097	<i>Capnodiales</i> sp.	100%	99%	GU250384.1
6100	<i>Exophiala dermatitidis</i>	100%	93%	DQ823100.1
6101	<i>Cf. Arthoniales</i> sp.	100%	99%	GU250373.1
6102	<i>Cf. Arthoniales</i> sp.	100%	99%	GU250373.1
6104	<i>Capnodiales</i> sp.	100%	99%	GU250384.1
6107	<i>Teratosphaeriaceae</i> sp.	100%	98%	EU019252.2
6108	<i>Cf. Arthoniales</i> sp.	100%	99%	GU250373.1
6112	<i>Cf. Arthoniales</i> sp.	100%	99%	GU250373.1
6159	<i>Capnodiales</i> sp.	100%	99%	GU250384.1
6160	<i>Capnodiales</i> sp.	99%	99%	GU250384.1
6161	<i>Cf. Arthoniales</i> sp.	100%	99%	GU250373.1
6163	<i>Cf. Arthoniales</i> sp.	100%	99%	GU250373.1
6164	<i>Capnodiales</i> sp.	99%	99%	GU250384.1
6165	<i>Cf. Arthoniales</i> sp.	100%	99%	GU250373.1
6253	<i>Catenulostroma elginense</i>	100%	98%	EU019252.2
6256	<i>Catenulostroma elginense</i>	100%	98%	EU019252.2
6262	<i>Vermiconia foris</i>	100%	99%	GU250390.1
6266	<i>Capnodiales</i> sp.	99%	99%	GU250384.1
6293	<i>Cf. Arthoniales</i> sp.	99%	94%	GU250896.1
6294	<i>Cf. Arthoniales</i> sp.	100%	99%	GU250373.1
6295	<i>Dothideomycetes</i> sp.	99%	99%	GU323973.1
6297	<i>Extremus antarcticus</i>	99%	99%	GU250360.1
6298	<i>Extremus antarcticus</i>	99%	99%	GU250360.1
6299	<i>Extremus antarcticus</i>	99%	99%	GU250360.1

Tabella 4.5. Percentuali di similarità più elevate ottenute dal confronto delle sequenze SSU con le sequenze depositate in Banca Dati NCBI Genbank (*National Center for Biotechnology Information*).

CCFEE N.	Identificazione	Copertura	Max identità	Numero di accesso
6083	<i>Meristemomyces frigidum</i>	100%	99%	GU250358.1
6084	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	99%	97%	AB454201.1
6093	<i>Cf. Arthoniales</i> sp.	100%	100%	GU250330.1
6097	<i>Meristemomyces frigidum</i>	100%	99%	GU250346.1
6101	<i>Cf. Arthoniales</i> sp.	100%	99%	GU250330.1
6102	<i>Cf. Arthoniales</i> sp.	100%	99%	GU250330.1
6104	<i>Capnodiales</i> sp.	100%	99%	GU250341.1
6107	<i>Teratosphaeriaceae</i> sp.	100%	99%	GU250351.1

6108	Cf. <i>Arthoniales</i> sp.	100%	99%	GU250330.1
6112	Cf. <i>Arthoniales</i> sp.	100%	99%	GU250330.1
6159	<i>Teratosphaeriaceae</i> sp.	100%	99%	GU250358.1
6160	<i>Capnodiales</i> sp.	100%	99%	GU250341.1
6161	Cf. <i>Arthoniales</i> sp.	100%	99%	GU250330.1
6163	Cf. <i>Arthoniales</i> sp.	100%	99%	GU250330.1
6164	<i>Capnodiales</i> sp.	100%	99%	GU250341.1
6165	Cf. <i>Arthoniales</i> sp.	99%	99%	GU250330.1
6253	<i>Teratosphaeriaceae</i> sp	100%	99%	GU250353.1
6256	<i>Teratosphaeriaceae</i> sp	99%	99%	GU250351.1
6266	<i>Teratosphaeriaceae</i> sp.	100%	99%	GU250358.1
6293	<i>Dothideomycetes</i> sp.	76%	97%	GU324000.1
6294	Cf. <i>Arthoniales</i> sp.	100%	99%	GU250330.1

Tabella 4.5. Percentuali di similarità più elevate ottenute dal confronto delle sequenze RPB2 con le sequenze depositate in Banca Dati NCBI Genbank (*National Center for Biotechnology Information*).

CCFEE N.	Identificazione	Copertura	Max identità	Numero di accesso
6083	<i>Teratosphaericola pseudaficana</i>	98%	79%	KF902499.1
6097	<i>Teratosphaeria fimbriata</i>	94%	78%	KF902430.1
6104	<i>Ramularia eucalypti</i>	99%	78%	KF252333.1
6107	<i>Hyphoconis sterilis</i>	84%	79%	KF310045.1
6159	<i>Teratosphaericola pseudaficana</i>	98%	79%	KF902499.1
6160	<i>Teratosphaericola pseudaficana</i>	98%	79%	KF902499.1
6164	<i>Teratosphaericola pseudaficana</i>	98%	79%	KF902499.1
6253	<i>Davidiellaceae</i> sp.	78%	85%	GU371755.1
6256	<i>Davidiellaceae</i> sp.	78%	85%	GU371755.1
6262	<i>Vermiconia antarctica</i>	81%	91%	KF310089.1
6266	<i>Teratosphaericola pseudaficana</i>	97%	79%	KF902499.1
6295	<i>Extremus antarcticus</i>	82%	96%	KF310087.1
6297	<i>Extremus antarcticus</i>	100%	99%	KF310086.1
6298	<i>Extremus antarcticus</i>	87%	99%	KF310073.1
6299	<i>Extremus antarcticus</i>	85%	96%	KF310087.1

Tramite l'analisi Blastn sui geni conservati LSU e SSU si è potuto inquadrare meglio la posizione di alcuni ceppi. Ad esempio, i ceppi CCFEE 6076, 6093, 6101, 6102, 6108, 6112, 6161, 6163, 6165, e 6294, ottenevano valori di similarità del 99% con l'ordine *Arthoniales*, mentre dal confronto delle sequenze ITS avevano ottenuto basse similarità con l'ordine *Botryosphaeriales* (87-88%), mentre per i ceppi CCFEE 6107, 6253 e 6256 è stato possibile passare da una identificazione a livello di ordine (*Capnodiales*) ad una a livello di famiglia (*Teratosphaeriaceae*) con valori di similarità del 99%.

Orientandosi con quanto ottenuto dall'analisi Blastn è stato possibile effettuare una selezione degli organismi su cui basare le analisi filogenetiche successive.

4.3.ANALISI FILOGENETICHE

Inizialmente è stata effettuata un'analisi multilocus basata sulle sequenze conservate SSU e LSU, che per questo permettono di dirimere i rapporti filogenetici più particolareggiati tra gli organismi, per delineare l'affiliazione tassonomica degli isolati e stabilire, sulla base dei raggruppamenti ottenuti, le successive analisi filogenetiche.

La Figura 4.3 mostra l'albero generale basato su un allineamento combinato delle sequenze conservate SSU e LSU, generato utilizzando l'opzione Neighbour-Joining (NJ) in Mega6. L'albero è stato costruito sulla base di una selezione di 96 organismi e 3023 posizioni, inclusi i gaps necessari all'allineamento. Considerando la distanza filogenetica delle classi inserite nell'analisi, si è deciso di radicare l'albero con *Taphrina deformans*, una specie appartenente ad una linea filetica basale del phylum Ascomycota. Il risultato ottenuto evidenziava come la maggior parte degli organismi isolati ricadeva nell'Ordine *Capnodiales* (classe *Dothideomycetes*), in particolare 31 ceppi ricadono nella famiglia *Teratosphaeriaceae* che include le specie rappresentative *Teratosphaeria* come pure funghi neri delle rocce appartenenti ai generi *Friedmanniomyces*, *Elasticomyces* e *Recurvomyces*, e 5 nella famiglia *Extremaceae* recentemente introdotta da Quaedvlieg et al. (2014), i cui membri si ritrovano in habitat estremi e sono ecologicamente molto diversi, in quanto lichenicoli, acidofili, abitanti delle rocce, endofitici, saprobi o fitopatogeni. Tre ceppi risultavano appartenere al genere *Cryomyces* che, insieme al genere *Saxomyces*, ricade nella sottoclasse *Dothideomycetidae*, anche se finora non sono stati chiaramente attribuiti a nessun ordine o famiglia.

Solo 3 ceppi ricadevano nell'ordine *Chaetothyriales* (classe *Eurotiomycetes*) che comprende taxa con diverse ecologia e morfologia, dai funghi lichenizzati mutualistici ai patogeni umani opportunisti. Molte specie appartenenti alle famiglie *Herpotrichiellaceae* e *Trichomeriaceae* sono da ambienti estremi, come la superficie delle rocce.

Ben 12 isolati ricadevano nella classe *Arthoniomycetes*, costituita per la gran parte da funghi lichenizzati.

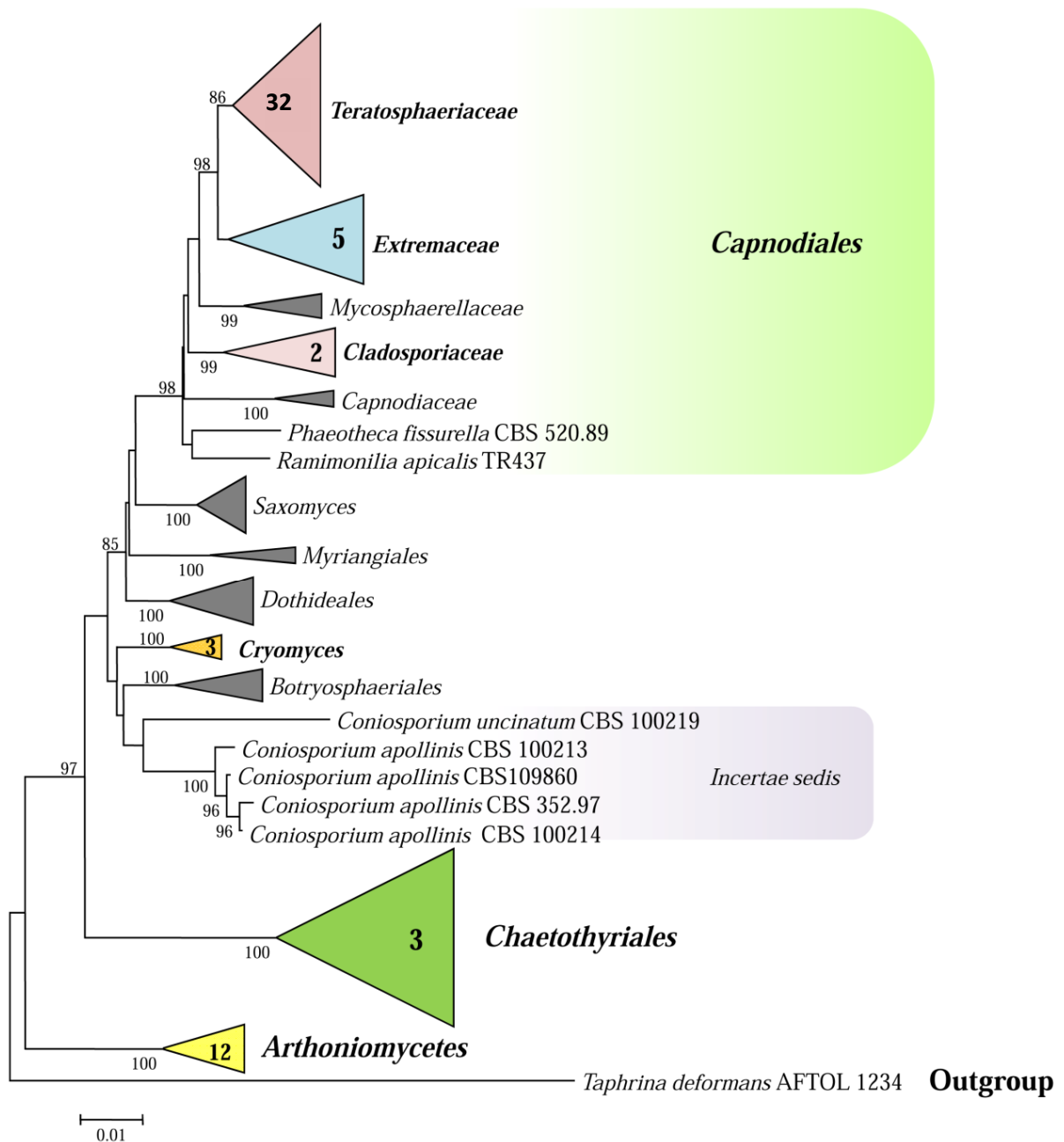


Fig. 4.3. Albero multilocus SSU-LSU ottenuto con analisi Neighbour Joining. I valori di bootstrap sono stati calcolati su 1000 pseudoreplicati e vengono mostrati i valori superiori all'80%. I rami sono collassati a livello di ordine e famiglia. I gruppi nei quali ricadono i funghi oggetto del presente studio sono riportati in grassetto

4.3.1. ALBERI ITS NEIGHBOUR JOINING

Sono stati costruiti due alberi ITS separati con il criterio NJ per illustrare la posizione sistematica delle specie *Friedmanniomyces endolithicus* ed *Elasticomyces elasticus* (Famiglia *Teratosphaeriaceae*, ordine *Capnodiales*) e della specie *Cryomyces antarcticus*, rispettivamente (Fig. 4.4 e 4.5), dove ricadevano diversi dei funghi neri isolati in questo studio.

Il genere *Friedmanniomyces*, con le due specie *F. endolithicus* Onofri and *F. simplex* Selbmann et al., è strettamente endemico di una delle regioni più fredde della Terra, la Terra Vittoria in Antartide (Selbmann et al., 2005).

I generi *Cryomyces* e *Elasticomyces*, isolati originariamente da rocce antartiche, mostrano una più ampia distribuzione (Selbmann et al., 2005; 2013a), anche se sempre legata ad ambienti freddi. Il genere *Cryomyces* Selbmann et al., riportato per la prima volta dalle McMurdo Dry Valleys con le specie *C. antarcticus* Selbmann et al. e *C. minteri* Selbmann et al., è stato recentemente ritrovato nelle Alpi a circa 3200 m s.l.m., con le due nuove specie *C. funiculosus* Selbmann & de Hoog and *C. montanus* Isola & Zucconi. Queste specie mostrano una differenza dell'8-10% nelle sequenze ITS rispetto alle specie antartiche. *Elastiomyces* spp. è stato isolato da rocce delle Ande e dell'Himalaya, le più alte cime montuose del mondo.

L'analisi filogenetica ha confermato che i ceppi CCFEE 6074, 6075, 6077, 6078, 6079, 6081, 6082, 6096, 6110, 6114, 6158, 6162, 6249, 6250, 6251, 6270, 6291, 6296 e 6300 appartenevano tutti alla specie *Friedmanniomyces endolithicus*, che come già sottolineato, risultava essere la specie isolata predominante. Le differenze del 3.7% nelle sequenze ITS rispetto al ceppo tipo rientrano nella variabilità intraspecifica del 4.5% mostrata dalla specie *F. endolithicus*. Questa specie è stata isolata nella maggior parte dei casi da arenarie e conglomerati di arenaria raccolte in località d'alta quota e distanti dal mare oltre 20 Km, ma anche da 3 campioni di granito, che però provengono da località più vicine alla costa.

I ceppi CCFEE 6086, 6247 e 6259, isolati da un campione di quarzo di Kay Island e un campione di granito di Harrow Peak, due località situate sulla costa, clusterizzavano con *Elasticomyces elasticus* Zucconi & Selbmann con il 100% di bootstrap e sono stati assegnati a questa specie (Fig. 4.4). I ceppi antartici di *Elasticomyces* sono stati isolati da talli lichenici.

Mentre i ceppi sopra elencati ricadevano nella classe Dothideomycetes ed in particolare nell'ordine Capnodiales, i ceppi CCFEE 6166, 6257 e 6260 clusterizzavano con il 99% di bootstrap con *Cryomyces antarcticus* Selbmann, de Hoog, Mazzaglia, Friedmann & Onofri, il cui posizionamento sistematico resta ancora incerto (Fig 4.4). Questo è stato il primo

ritrovamento della specie *C. antarcticus* al di fuori della Terra Vittoria del Sud. I ceppi CCFFE 6166 e 6260 sono stati isolati da due diversi campioni, arenaria e dolerite mista ad arenaria, raccolti nella località di Chisholm Hills, che rappresentava il sito di campionamento più a nord e uno dei più distanti dalla costa (2500 m s.l.m. e a 81 Km). Da una prima analisi questo sito era risultato non colonizzato; le colonie si sono sviluppate dopo più di 6 mesi di incubazione. Il ceppo CCFFE 6257, invece, è stato isolato da un campione di arenaria proveniente da Mt Howard a 1200 m s.l.m. e 34 Km dalla costa.

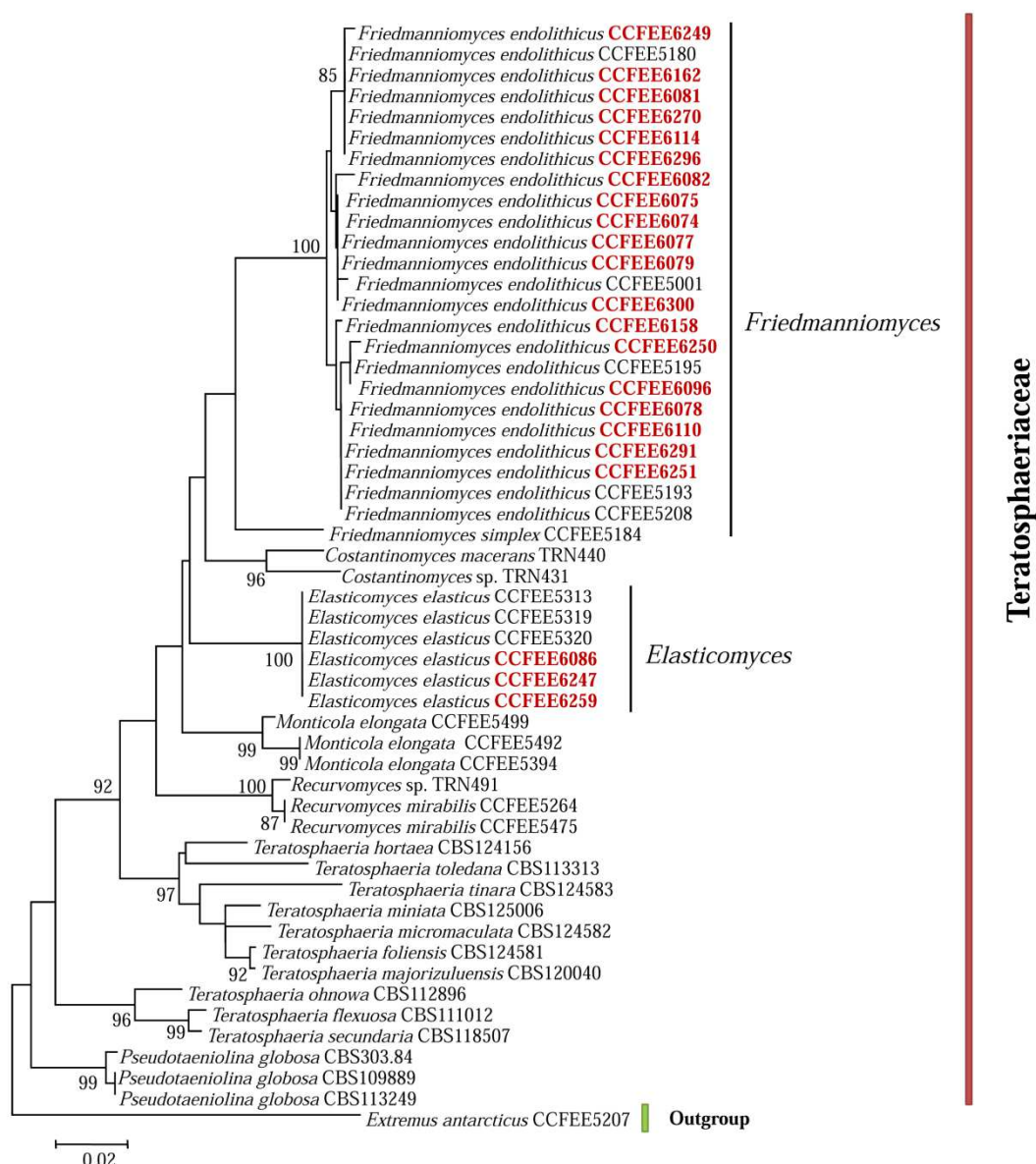


Fig. 4.4. Albero ITS delle specie *Friedmanniomyces endolithicus* e *Elasticomyces elasticus* ottenuto con analisi Neighbour Joining. I valori di bootstrap sono stati calcolati su 1000 pseudoreplicati e vengono mostrati i valori superiori all'80%. I funghi oggetto del presente studio sono riportati in grassetto di colore rosso

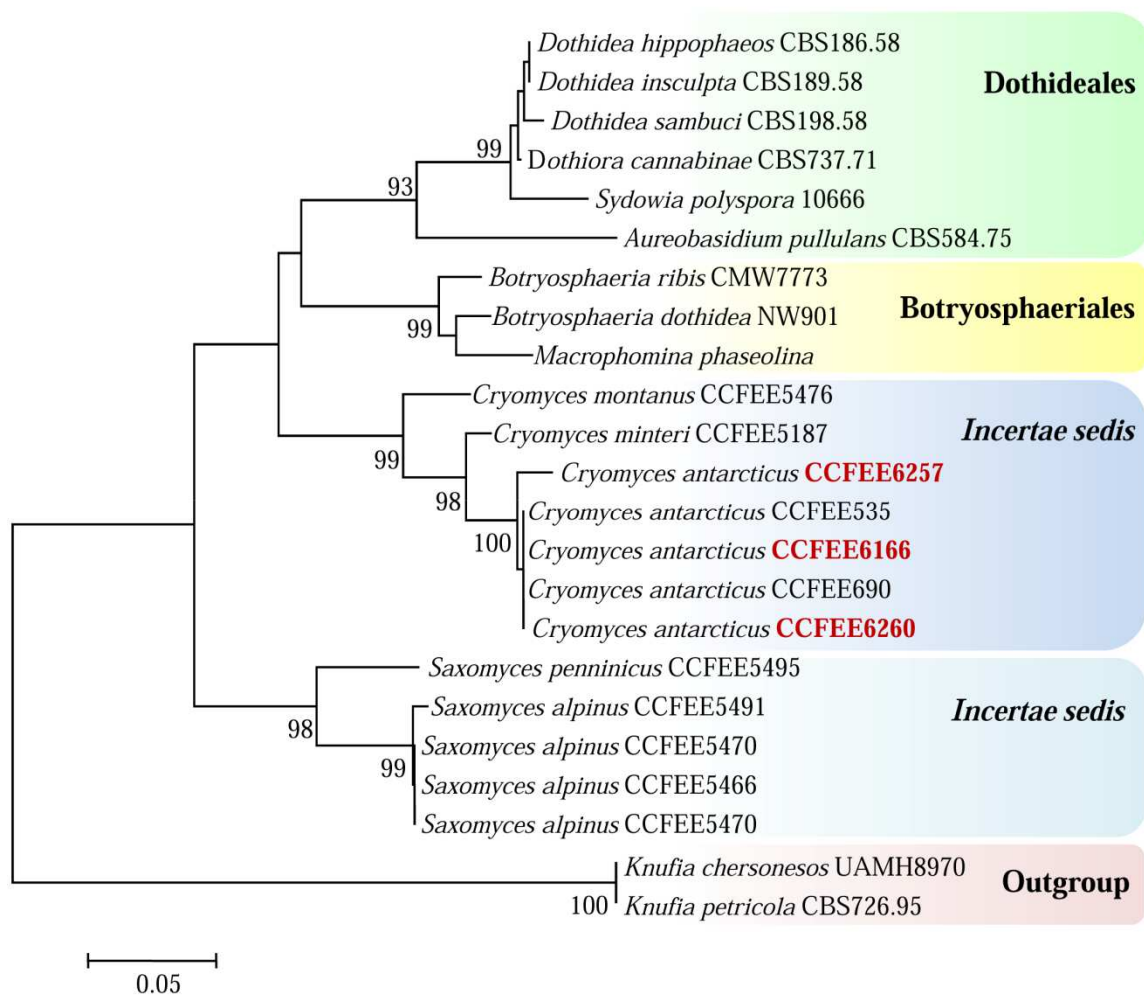


Fig. 4.5. Albero ITS della specie *Cryomyces antarcticus* ottenuto con analisi Neighbour Joining. I valori di bootstrap sono stati calcolati su 1000 pseudoreplicati e vengono mostrati i valori superiori all'80%. I funghi oggetto del presente studio sono riportati in grassetto di colore rosso

4.3.2. ALBERI MAXIMUM LIKELYHOOD

Non avendo ottenuto una identificazione certa per tutti i ceppi studiati, si è deciso di procedere con un'analisi filogenetica multilocus basata sulle porzioni variabili ITS, sui geni ribosomali conservati *nucLSU* e *nucSSU* e sulla seconda subunità maggiore (RPB2) dell'RNA-polimerasi II. L'ITS e le regioni introniche di *nucSSU*, *nucLSU* e RPB2 hanno mostrato un alto grado di polimorfismi, e spesso non sono state allineabili con sufficiente confidenza quando si consideravano ceppi filogeneticamente distanti, per questa ragione le regioni ambigue sono state rimosse dagli allineamenti. Per quanto riguarda la classe Dothideomycetes, i ceppi appartenenti alla famiglia *Teratosphaeriaceae* sono stati analizzati insieme nello studio filogenetico, mentre i ceppi ricaduti nella famiglia *Extremaceae* sono stati analizzati separatamente. Anche i ceppi appartenenti all'ordine *Chaetothyriales* essendo inclusi in una diversa classe (Eurotiomycetes) distinta dalla precedente, sono stati analizzati separatamente. Infine è stata effettuata una analisi sugli isolati della classe *Arthoniomycetes*.

Analisi filogenetiche relative alla famiglia Teratosphaeriaceae basate sull'allineamento dei geni ITS-SSU-LSU-RPB2

Le analisi sono state basate sullo studio delle sequenze ITS, SSU, LSU e RPB2. La Figura 4.6 mostra l'albero multi-locus generato usando il modello evolutivo GTR+G, calcolato in base al criterio Maximum Likelihood. La frequenza delle basi stimata da Treefinder è stata la seguente: T=0,2342122; C=0,2395638; A=0,2460289; G=0,2801951. L'albero è stato costruito sulla base di una selezione di 57 organismi e 3918 posizioni, inclusi i gaps necessari all'allineamento, le cui sequenze potevano essere confidentemente allineate con quelle dei funghi oggetto di studio. Gli organismi di tale selezione appartenevano alla famiglia *Teratosphaeriaceae*, ordine *Capnodiales* (classe Dothideomycetes). L'albero è stato radicato con la specie *Dothidea insculpta*, appartenente ad un diverso ordine (*Dothideales*).

Come risulta dall'albero in Fig. 4.6, i ceppi CCFEE 6083, 6104, 6159, 6160, 6164 e 6266 raggruppavano con il 99% di bootstrap con la specie *Oleoguttula mirabilis* Selbmann & de Hoog. Questa specie, recentemente descritta (Egidi et al., 2014), è rappresentata da due soli ceppi (CCFEE 5522 e 5523) isolati da campioni di roccia della Penisola Antartica. L'intero raggruppamento, è però diviso in due distinti sottogruppi. Il fatto che i ceppi oggetto di questo studio, isolati dall'Antartide continentale, si trovino in un gruppo sister a quello costituito dai ceppi della Penisola Antartica può essere spiegato dalla distanza geografica. La variabilità della porzione ITS interno dell'intero gruppo è del 4.08% e rientra nella variabilità intraspecifica del 4.5% riscontrata nella specie *Friedmanniomyces endolithicus*; si può

ragionevolmente dire che i ceppi CCFEE 6083, 6104, 6159, 6160, 6164 e 6266 appartengano alla specie *O. mirabilis*.

Il ceppo CCFEE 6097 si trovava, invece, in un ramo piuttosto lungo ed esterno a questo gruppo. La variabilità tra questo ceppo e il ceppo tipo era del 6.5%, ciò lascia supporre che si tratti di una specie appartenente al genere *Oleoguttula*. Inoltre, mentre i ceppi CCFEE 6083, 6104, 6159, 6160, 6164 e 6266 sono stati isolati tutti da rocce raccolte in località che vanno da 1000 a 3200 m s.l.m. e ad una distanza dalla costa da 27 a 85 Km circa, il ceppo 6097 è stato isolato da un campione di quarzo prelevato nella località di Inexpressible Island che si trova sulla costa. Questo risultato si accordava perfettamente con le similarità ritrovate in banca dati (Tabella 4.3.), in cui il ceppo CCFEE 6097 presentava una percentuale più bassa di similarità in ITS (94%) con la specie *O. mirabilis* rispetto ai restanti ceppi di questo gruppo (98%). Evidentemente in questo caso la distanza genetica riflette una distanza geografica; una tale separazione geografica dei genotipi ritrovati può essere una conseguenza legata alla dispersione di questi funghi. Generalmente, infatti, la colonizzazione fungina di nuovi habitat avviene attraverso il trasporto aereo di spore, un processo che può operare su lunghe distanze e permette l'instaurarsi di flussi genici (Vincent, 2000). Tuttavia i funghi delle rocce non sono in grado di formare spore aerodisperse ma un meccanismo alternativo associato alla dispersione è stato descritto da Friedmann (1982) e definito come fenomeno "dell'esfoliazione biogena" della roccia nelle comunità criptoendolitiche antartiche. Gli organismi criptoendolitici, infatti, crescendo all'interno delle rocce, destabilizzano la coerenza del substrato litico che con il tempo si disgrega (Friedmann, 1982; Nienow & Friedmann, 1993), in questo modo dalla superficie rocciosa si staccano dei frammenti. Alcuni di questi, contenendo piccole porzioni della comunità, possono essere funzionali alla propagazione vegetativa della componente fungina (Friedmann, 1982). Il frammento stesso di roccia colonizzata, agendo da propagulo, potrebbe quindi fornire un mezzo di dispersione alternativo alle spore, sebbene meno efficiente, pur essendo efficace per distanze ridotte.

I ceppi CCFEE 6107, 6253 e 6256, isolati tutti da graniti provenienti da tre località differenti (Archambault Ridge, Mt Dickason e Mt McGee), formavano un gruppo supportato dal 100% di bootstrap all'interno del clade costituito dal genere *Constantinomyces* e in cui si ritrovava la specie *Constantinomyces macerans* de Hoog & Onofri. Questo genere è stato recentemente descritto (Egidi et al., 2014) e comprende 4 specie isolate da rocce provenienti dal Sistema Montuoso Centrale della Spagna (Ruibal et al., 2008). I tre ceppi mostravano una variabilità del 10.9% nella regione ITS rispetto alla specie *Constantinomyces macerans*, pertanto, molto

probabilmente, rappresentano una nuova specie del genere *Constantinomyces*, considerando, inoltre, una variabilità intraspecifica dell'1,32 % nella regione ITS.

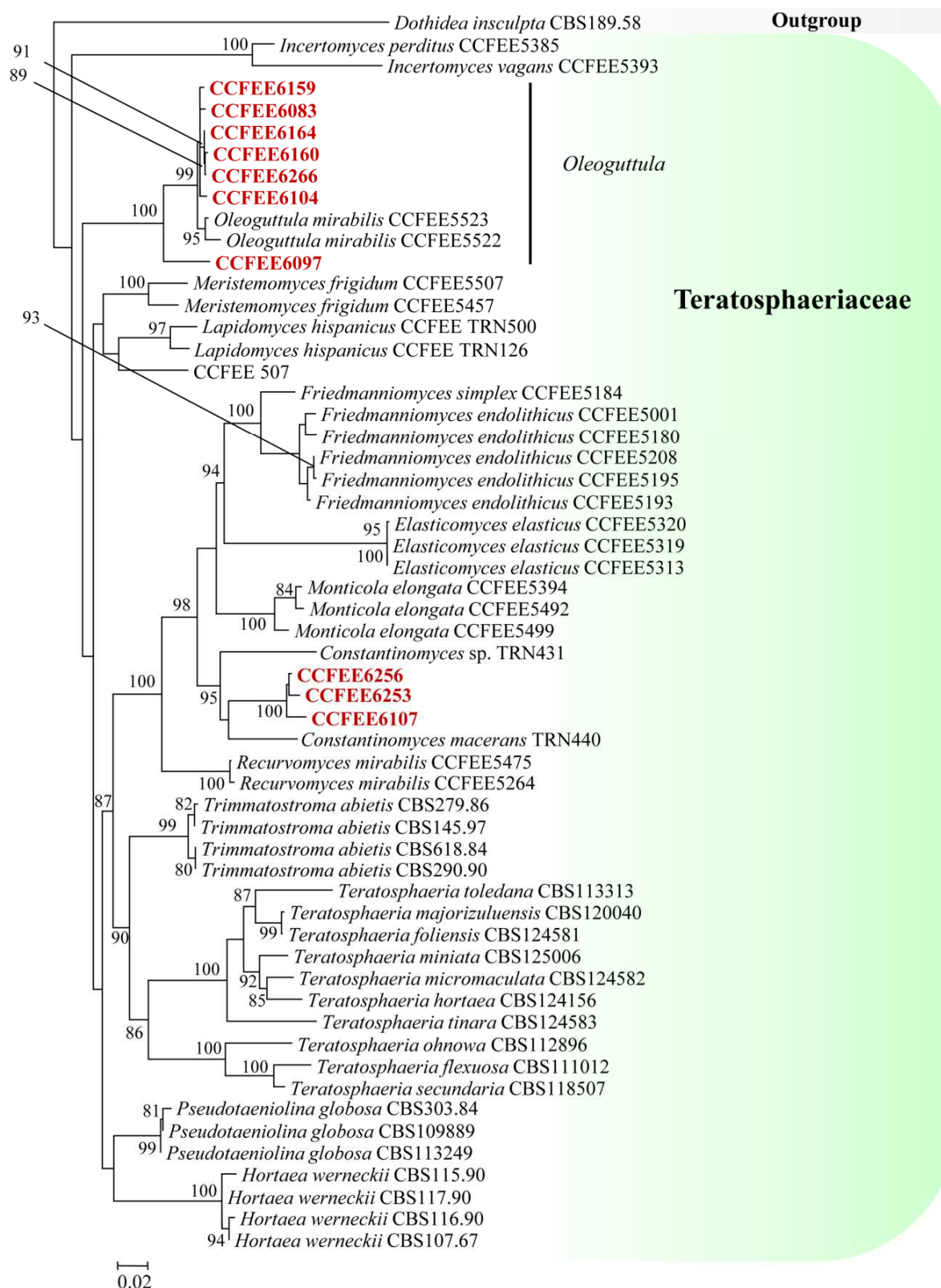


Fig. 4.6. Albero multilocus ITS-SSU-LSU-RPB2 della famiglia *Teratosphaeriaceae* costruito usando il criterio Maximum Likelihood. I valori di bootstrap sono stati calcolati su 1000 pseudoreplicati e vengono mostrati i valori superiori all'80%. I funghi oggetto di studio sono riportati in grassetto di colore rosso

Analisi filogenetiche relative alla famiglia Extremaceae basate sull'allineamento dei geni ITS-LSU-RPB2

Le analisi sono state basate sullo studio delle sequenze ITS, *nucLSU* e RPB2. La Figura 4.7 mostra l'albero multilocus generato usando il modello evolutivo GTR+G, calcolato in base al criterio Maximum Likelihood. La frequenza delle basi stimata da Treefinder è stata la seguente: T=0,227089; C=0,2471648; A=0,2466248; G=0,2791183. L'albero è stato costruito sulla base di una selezione di 70 organismi e 2097 posizioni, inclusi i gaps necessari all'allineamento, le cui sequenze potevano essere confidentemente allineate con quelle dei funghi oggetto di studio. Gli organismi di tale selezione appartengono alle due famiglie *Extremaceae* e *Neodevriesiaceae*, recentemente introdotte da Quaedvlieg et al. (2014) per accomodare un gruppo di funghi estremofili che si ritrovano in diversi substrati. L'albero è stato radicato con le specie *Cladosporium langeronii*, *Cladosporium sphaerospermum* e *Davidiella tassiana*, appartenenti alla famiglia *Davidiellaceae*.

I ceppi CCFEE 6295, 6297, 6298, e 6299 sono stati assegnati alla specie *Extremus antarcticus* (Selbmann & de Hoog) Quaedvlieg & Crous, in quanto raggruppano in un clade costituito esclusivamente da tale specie e supportato con un valore di bootstrap pari a 100. Questa specie, recentemente istituita mediante analisi multilocus, è stata esclusivamente isolata in Antartide, a Linnaeus Terrace nelle Valli secche di McMurdo.

I ceppi qui studiati, sono stati isolati da campioni di granito di Mt Larsen (935m s.l.m.), Mt Dickason (1840), Mt Meister (1632) e Bier Point (1460); non sono stati ritrovati quindi a oltre 2000 m di altitudine.

Il ceppo CCFEE 6262, isolato da un granito di Mt McGee, tramite l'analisi Blastn aveva ottenuto un valore di similarità del 99% con il ceppo CCFEE 5489. Quest'ultimo, isolato a Battleship Promontory nella Terra Vittoria del Sud, rappresenta la nuova specie *Vermiconia antarctica* recentemente descritta (Egidi et al., 2014).

L'analisi filogenetica multilocus basata su ITS, *nucLSU* e RPB2 ha permesso di confermare l'appartenenza a questa specie del ceppo CCFEE6262, in quanto ricadeva nel gruppo formato da *Vermiconia antarctica* e *Capnobotryella* sp. e considerando una differenza dello 0.65% nella sequenza ITS rispetto al ceppo tipo.

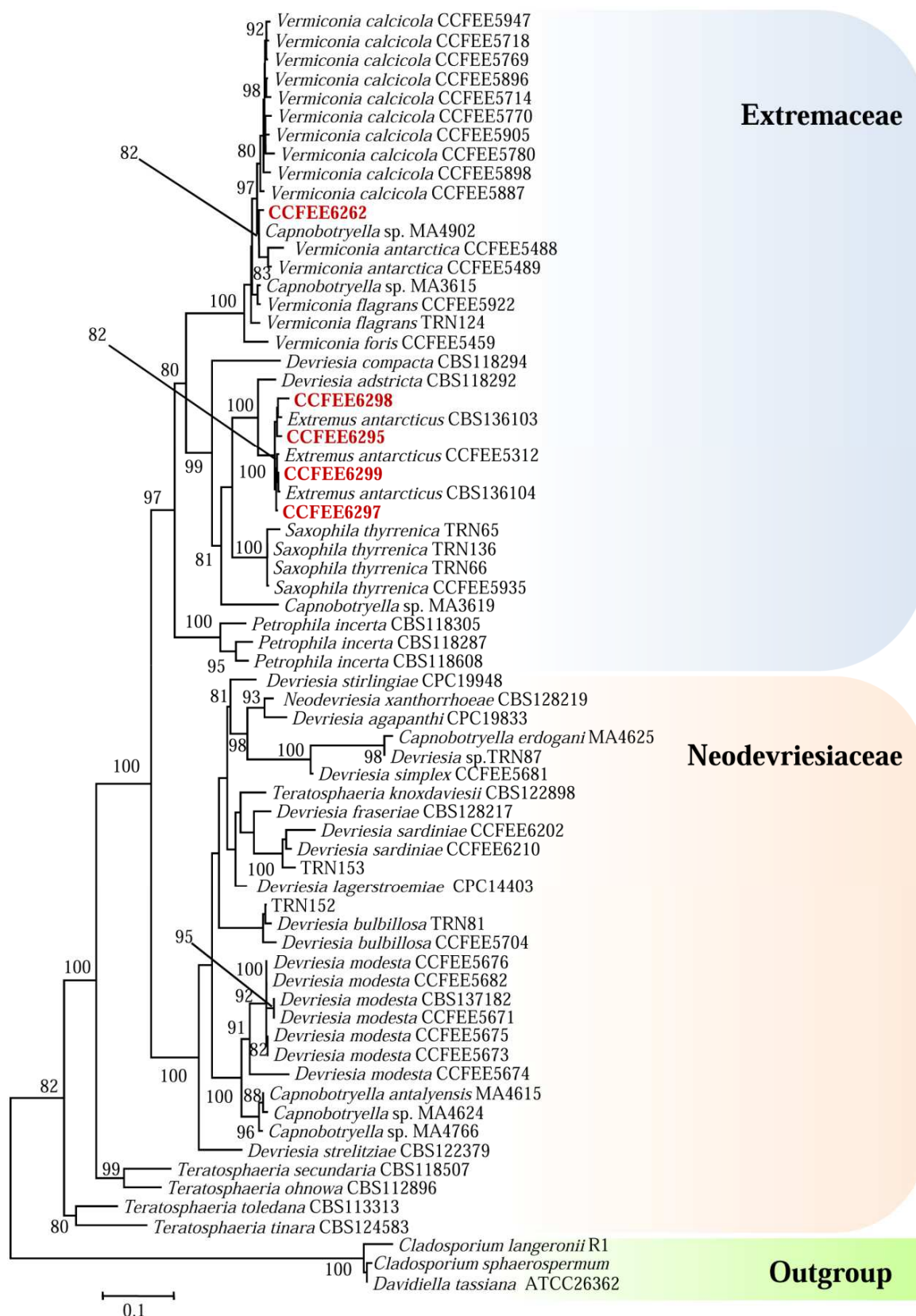


Fig. 4.7. Albero multilocus ITS-LSU-RPB2 della famiglia *Extremaceae* costruito usando il criterio Maximum Likelihood. I valori di bootstrap sono stati calcolati su 1000 pseudoreplicati e vengono mostrati i valori superiori all'80%. I funghi oggetto di studio sono riportati in grassetto di colore rosso

Analisi filogenetiche relative all'ordine Chaetothyriales basate sull'allineamento dei geni ITS-LSU

Le analisi sono state basate sullo studio delle sequenze ITS e LSU. La Figura 4.8 mostra l'albero multi-locus generato usando il modello evolutivo GTR+G, calcolato in base al criterio Maximum Likelihood. La frequenza delle basi stimata da Treefinder è stata la seguente: T=0,2402532; C=0,233773; A=0,249; G=0,2764291. L'albero è stato costruito sulla base di una selezione di 74 organismi e 2169 posizioni, inclusi i gaps necessari all'allineamento, le cui sequenze potevano essere confidentemente allineate con quelle dei funghi oggetto di studio. Gli organismi di tale selezione appartenevano agli ordini *Chaetothyriales* e *Verrucariales* nella sottoclasse *Chaetothyriomycetidae* (Classe *Eurotiomycetes*). L'albero è stato stato radicato con la specie *Aspergillus nidulans* appartenente ad un diverso ordine (*Eurotiales*, sottoclasse *Eurotiomycetidae*).

All'interno dell'ordine *Chaetothyriales* è possibile distinguere cinque famiglie, *Chaetothyriaceae*, *Herpotrichiellaceae*, *Cyphellophoraceae*, *Epibryaceae* e *Trichomeriaceae*, delle quali le ultime tre sono state introdotte recentemente sulla base di dati molecolari (Gueidan et al., 2014; Chomnunti et al., 2012; Réblová et al., 2013).

Sul totale di 90 ceppi fungini isolati in questo studio, solo 3 ricadevano all'interno della classe *Eurotiomycetes*, e in particolare nell'ordine *Chaetothyriales*. Quest'ordine che comprende taxa con diversa ecologia e morfologia, rappresenta un insieme vario di specie oligotrofiche ritrovate in diversi substrati (rocce, piante, ambienti interni) o in differenti ospiti animali (invertebrati e vertebrati, inclusi gli esseri umani) (Gueidan et al., 2014).

I ceppi CCFEE 6087 e 6100 formavano un gruppo supportato da un valore di bootstrap di 100 all'interno della famiglia *Herpotrichiellaceae*. Molto probabilmente questi due ceppi rappresentano una nuova specie del genere *Exophiala*. Sorprendentemente i due ceppi CCFEE 6087 e 6100 ricadevano all'interno di un clade di funghi fortemente pigmentati opportunisti di animali a sangue caldo. Non si tratterebbe, comunque di un caso isolato: altri funghi da roccia o siti inquinati sono risultati inclusi in questa particolare famiglia (Isola et al., 2013); la presenza di pareti melanizzate costituisce evidentemente un carattere che permette a questi funghi di adattarsi a condizioni ambientali stressanti anche molto diverse tra loro. Inoltre bisogna considerare che i due ceppi in questione sono stati isolati da campioni di quarzo raccolti in due località costiere, Kay Island e Inexpressible Island, rispettivamente, dove è stabile la presenza di uccelli marini che si nutrono nell'oceano circostante e si riproducono e riposano a terra. Questi animali, che depositano grandi quantità di escrementi (guano) e altro

materiale organico, come piume, uova e carcasse, vanno ad eutrofizzare un ecosistema terrestre altrimenti povero di nutrienti e potrebbero aver veicolato queste specie.

Il ceppo CCFEE 6094 è stato isolato da un granito di Random Hills, a 1700 m di altitudine e 13 Km dal mare. Questo ceppo formava un clade basale nell'ordine *Chaetothyriales* insieme a funghi neri delle rocce precedentemente isolati e non ancora identificati, depositati nella CCFEE. Questo gruppo, che si trova in una posizione separata con un alto valore di bootstrap, non mostrava chiare relazioni con nessuna specie descritta o non ancora descritta presente nell'albero. All'interno del clade è possibile individuare due sottogruppi: uno formato da due ceppi isolati dal Mt Rosa, Alpi (CCFEE 5411 e 5412); l'altro costituito esclusivamente da ceppi isolati in Antartide. È in questo gruppo che ricadeva il ceppo isolato in questo studio, il quale raggruppa con un bootstrap di 100 con il ceppo CCFEE 5317. È evidente che questi due sottogruppi possiedono una chiara connotazione geografica e ambientale; è noto, infatti, che le forti pressioni ambientali e l'isolamento geografico e genetico a cui gli organismi sono sottoposti per tempi significativamente lunghi guidano la radiazione adattativa e i processi di speciazione (Vincent, 2000). All'interno del clade è probabile individuare un nuovo genere e 4 nuove specie.

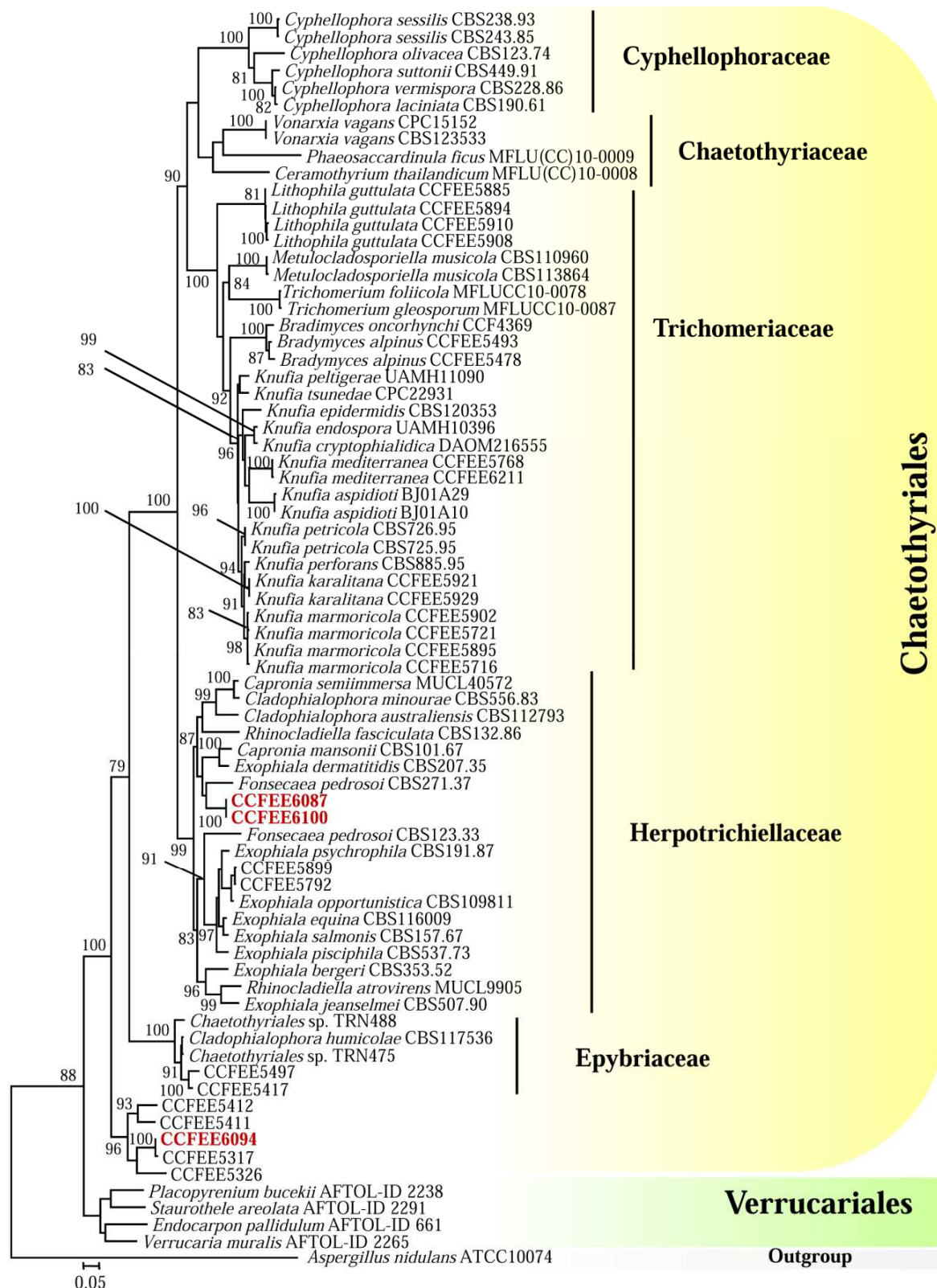


Fig.4.8. Albero multilocus ITS-LSU dell'ordine *Chaetothyriales* costruito usando il criterio Maximum Likelihood. I valori di bootstrap sono stati calcolati su 1000 pseudoreplicati e vengono mostrati i valori superiori all'80%. I funghi oggetto di studio sono riportati in grassetto di colore rosso

Analisi filogenetiche relative alla classe Arthoniomycetes basate sull'allineamento dei geni ITS-SSU-LSU

Le analisi sono state basate sullo studio delle sequenze ITS, SSU e LSU. La Figura 4.9 mostra l'albero multilocus generato usando il modello evolutivo GTR+G, calcolato in base al criterio Maximum Likelihood. La frequenza delle basi stimata da Treefinder è stata la seguente: T=0.2437714; C=0.224697; A=0.2530445; G=0.278487. L'albero è stato costruito sulla base di una selezione di 78 organismi e 3886 posizioni, inclusi i gaps necessari all'allineamento, le cui sequenze potevano essere confidentemente allineate con quelle dei funghi oggetto di studio. Gli organismi di tale selezione appartenevano alle classi Dothideomycetes, Lecanoromycetes, Eurotiomycetes e Arthoniomycetes. Considerando la distanza filogenetica delle classi inserite nell'analisi, l'albero è stato radicato con la specie *Taphrina deformans*, classe Taphrinomycetes (Subphylum Taphrinomycotina).

Ben 12 ceppi ricadevano nella classe Arthoniomycetes che è rappresentata da un unico ordine (*Arthoniales*). Come risulta dall'albero multilocus ITS-SSU-LSU in Figura 4.8 i ceppi CCFEE 6076, 6093, 6101, 6108, 6102, 6112, 6161, 6163, 6165 e 6294 risultavano appartenere con il 100% di bootstrap ad un gruppo di funghi neri delle rocce non ancora identificati e depositati nella CCFEE, costituito esclusivamente da funghi neri delle rocce antartici inclusi nella classe Arthoniomycetes (Ruibal et al., 2009). Data la variabilità intraspecifica del 3.85% riscontrata all'interno del gruppo, si può affermare che questi ceppi rappresentano una nuova specie e un nuovo genere.

La classe Arthoniomycetes è costituita per la gran parte da funghi lichenizzati ed è la seconda più ampia, dopo quella Lecanoromycetes, costituita invece esclusivamente da funghi lichenizzati (Honegger, 2012); pertanto, non può essere esclusa una analoga ecologia per organismi inclusi in questo gruppo filogenetico. Questa considerazione sembrerebbe essere confermata dal fatto che, pur potendo essere isolati in coltura pura, questi funghi invariabilmente perdono dopo pochi mesi la loro vitalità; questo potrebbe far supporre che tali organismi potrebbero non essere in grado di condurre vita completamente autonoma ma necessitare della presenza di un partner fotosintetico. Quest'ultima considerazione rimane una supposizione ed andrebbe comunque confortata da ulteriori indagini. Di certo è il fatto che questi funghi presentano una distribuzione abbastanza ampia, essendo stati isolati da diversi tipi di substrato roccioso (conglomerati di arenaria, granito e quarzo) e da campioni con una altitudine che va da 0 a oltre 2700 m s.l.m. e con una distanza dal mare da 0 a 74Km.

I ceppi CCFEE 6084 e 6293, che raggruppavano insieme con il 100% di bootstrap, ricadevano in un ramo esterno al clade formato dal gruppo sopra citato e dalle specie

dell'ordine *Arthoniales*. Le sequenze ITS di tali ceppi hanno mostrato una differenza da 6.73% che potrebbe indicarle come specie sister in un nuovo genere all'interno della classe *Arthoniomycetes*. Questa ipotesi va confermata con analisi basate su una selezione di OTU più rappresentativa della Classe.

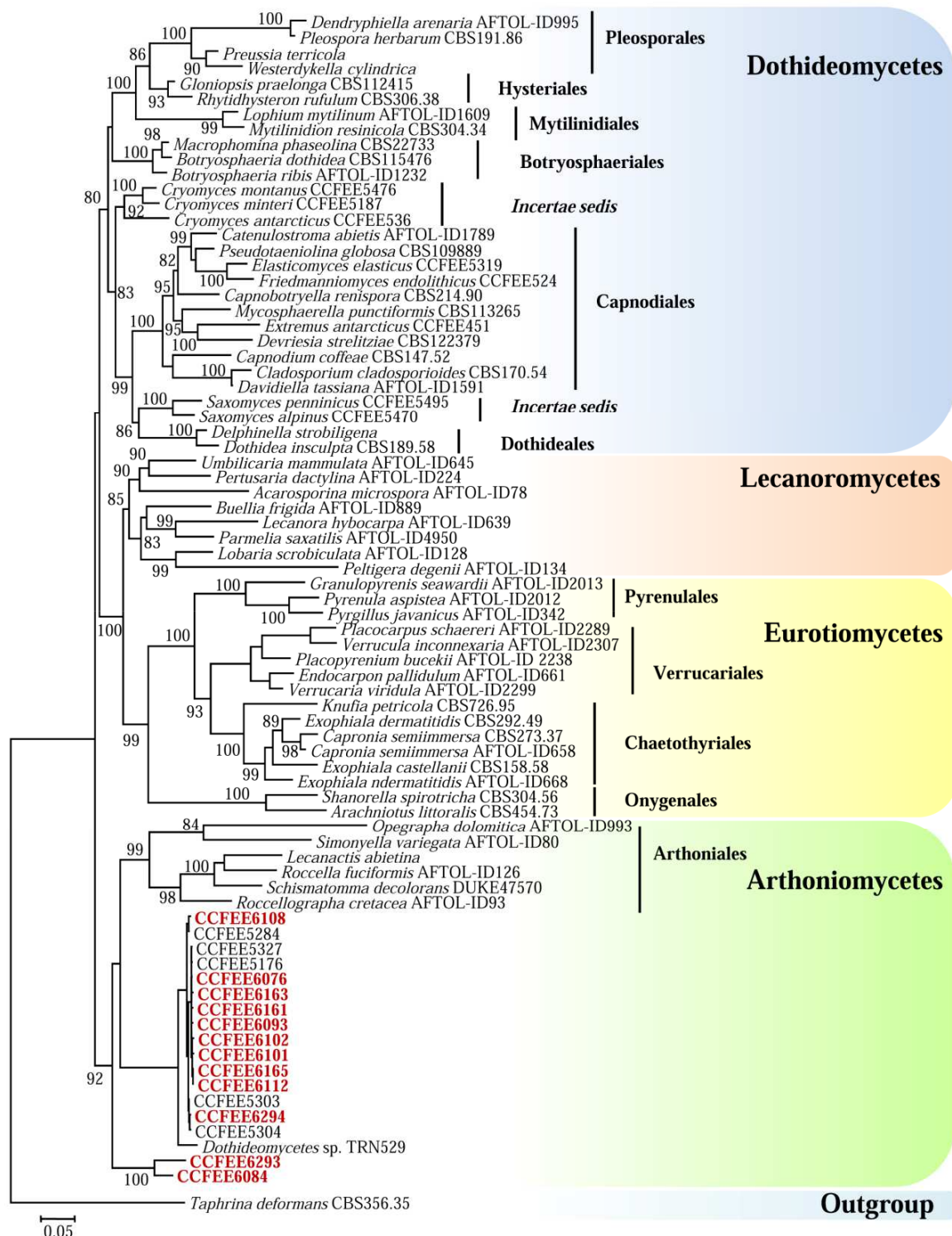


Fig.4.9. Albero multilocus ITS-SSU-LSU della classe *Arthoniomycetes* costruito usando il criterio Maximum Likelihood. I valori di bootstrap sono stati calcolati su 1000 pseudoreplicati e vengono mostrati i valori superiori all'80%. I funghi oggetto di studio sono riportati in grassetto di colore rosso

4.4.ANALISI DELLE COMUNITÀ FUNGINE ENDOLITICHE MEDIANTE DGGE

La comprensione della diversità microbica è essenziale per capire la relazione tra i parametri ambientali e la funzione degli ecosistemi.

Tecniche di fingerprinting genetici forniscono un semplice approccio per ottenere profili di comunità microbiche che possono essere utilizzati per identificare differenze spaziali e temporali nella struttura delle comunità o per monitorare variazioni nella struttura che occorrono in risposta a perturbazioni ambientali.

In questo lavoro, l'analisi della biodiversità fungina delle comunità endolitiche antartiche presenti nella Terra Vittoria è stata condotta mediante l'applicazione della tecnica DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*).

Dall'analisi DGGE è stato possibile ottenere il profilo della comunità fungina relativa a 72 campioni di roccia provenienti da 45 località (Tabella 4.6).

Cinque campioni avevano mostrato un profilo negativo. I restanti profili variavano molto sia relativamente alla distribuzione che al numero di bande.

Tab.4.6. Campioni di roccia analizzati.

Numero DGGE	Campione	Altitudine m s.l.m.	Distanza dal mare km	Coordinate	Roccia	Porosità	Colonizzazione
1	Campo Icaro campione 1	60	0,1	74°42'57"S 164°06'41"E	G	l	BC
2	Vegetation Island campione 4	200	0	74°47'03"S 163°39'35"E	G	l	BC
3	Pudding Butte sito 2	1.600	58,6	75°52'02"S 159°58'58"E	CS	m	CD
4	Harrow Peak	1230	6,5	74°04'33"S 164°48'32"E	G	m	BC
5	Ambalada Peak campione 3	1800	105,5	75°57'05"S 158°24'25"E	CS	h	A
6	Mt Howard sito 2 campione 1	1352	33,8	75°40'50"S 161°16'15"E	CS	m	D
7	Mt Larsen campione 2	935	10	74°53'03"S 162°09'54"E	G	m	C
8	Random Hills campione 2	1700	13	74°06'11"S 164°22'53"E	G	l	BC
9	Timber Peak sito 1 campione 3	2800	49,5	74°10'13"S 162°25'31"E	CS	m	D
10	Mt New Zealand campione 4	2888	47	74°10'46"S 162°31'01"E	S	m	BC
11	Thern Promontory	1500	29	74°33'S 162°04'E	S	m	A
12	Mt Howard sito 2 campione 2	1352	33,8	75°40'50"S 161°16'15"E	CS	m	D
13	Prior Island campione 1	50	0	75°41'31"S 162°52'49"E	G	l	BC
14	Mt McGee sito 2	2725	19	73°44'26"S 162°40'32"E	G	l	BC
15	Mt Billing campione 2	1300	44	75°42'12"S 160°54'28"E	CS	m	D
16	Bobby Rocks campione 1	1680	91	75°48'35"S 159°11'15"E	S	h	A
17	Mt Bowen campione 1	1874	39,5	75°45'24"S 161°03'46"E	S	h	CD
18	Mt Dickason sito 1 campione 5	1840	21	74°23'58"S 164°00'21"E	G	l	C
19	Ford Peak campione 3	1190	57	75°41'29"S 160°25'57"E	CS	m	C
20	Timber Peak sito 2 campione 4	2800	50	74°10'11"S 162°25'34"E	CS	m	D
21	Trio Nunatak sito 4 campione 3	1400	84,5	75°28'59"S 159°35'21"E	S	m	CD
22	Ricker Hills sito 3 campione 2	1820	91,5	75°43'25"S 159°10'55"E	S	l	C
23	Archambault Ridge sito 1 campione 4	3200	90	73°41'06"S 162°25'50"E	CS	hm	BC
24	Anderson Ridge campione 2	500	4,7	74°42'51"S 162°37'04"E	G	m	C

Numero DGGE	Campione	Altitudine m s.l.m.	Distanza dal mare km	Coordinate	Roccia	Porosità	Colonizzazione
25	Shafer Peak sito 1	3100	59	74°02'19"S 162°37'16"E	CS	m	A
26	Battleship Promontory campione 9	1000	33,5	76°54'36"S 160°56'05"E	S	lm	CD
27	Mt Burrows	2000	26,6	74°18'S 163°39' E	G	l	C
28	Mt Nansen sito 1 campione 4	2240	12,5	74°37'43"S 162°35'38"E	G	l	C
29	Sterr Nunatak campione 2	1420	3,2	75°53'56"S 162°35'38"E	G	l	BC
30	McLea Nunatak	2100	75,6	75°59'47"S 159°30'05"E	S	lm	CD
31	McLea Nunatak	2100	75,6	75°59'47"S 159°30'05"E	LD	l	C
32	Trio Nunatak sito 3 campione 5	1000	82	75°30'02"S 159°40'28"E	S	lm	CD
33	Inexpressible Island campione 9	0	0	74°53'21"S 163°44'43"E	Q	l	BC
34	Olson nunatak campione 3	200	2	74°55'55"S 162°24'08"E	S	mh	BD
35	Archambault Ridge sito 3 campione 1	3400	87	73°40'09"S 162°35'37"E	CS	m	BC
36	Kay Island campione 1	80	0	74°04'13"S 165°18'57"E	Q	m	BC
37	Mt Nansen sito 2 campione 1	2349	20	74°32'11"S 162°33'55"E	S	h	CD
38	Inexpressible Island campione 3	0	0	74°53'21"S 163°44'43"E	G	l	C
39	Richard Nunatak sito 3 campione 2	2000	70,2	75°56'00"S 159°47'38"E	CS	lm	CD
40	Pudding Butte sito 3 campione 1	1600	64	75°52'51"S 160°08'56"E	S	m	CD
41	Mt Keinath	385	5,2	74°33'03"S 164°03'92"E	G	l	BC
42	Archambault Ridge sito 2 campione 3	2725	80	73°44'26"S 162°40'32"E	G	l	C
43	Mt Howard sito 1 campione 8	1200	33,8	75°40'22"S 161°17'01"E	CS	m	D
44	Richard Nunatak sito 3 campione 1	2000	70,2	75°56'00"S 159°47'38"E	CS	lm	CD
45	Stewart Heights campione 3	2670	74	73°29'26"S 163°54'44"E	CS	m	C
46	Mt Adamson	3600	60	73°55'59"S 162°58'43"E	S	l	A
47	Stewart Heights campione 4	2670	74	73°29'26"S 163°54'44"E	G	m	C
48	Ricker Hills sito 1 campione1	1115	96	75°38'39"S 159°01'42"E	S	m	CD
49	Mt Nansen sito 3	1200	23,2	74°34'44"S 162°14'37"E	CS	l	A

Numero DGGE	Campione	Altitudine m s.l.m.	Distanza dal mare km	Coordinate	Roccia	Porosità	Colonizzazione
50	Chisholm Hills sito 1 campione 2	2500	81	73°26'46"S 163°18'50"E	S	m	A
51	Chisholm Hills sito 1 campione 1	2500	81	73°26'46"S 163°18'50"E	D	m	A
52	Pinkard Table	1550	13,5	74°04'30"S 164°03'05"E	G	m	A
53	Bier Point	1460	8	74°08'11"S 164°08'00"E	G	l	BC
54	Mt Meister	1632	41	74°12'38"S 162°44'53"E	G	l	C
55	Eskimo Point	1816	37	74°16'14"S 162°36'33"E	Q	l	BC
56	Wishbone Ridge	1396	17	74°26'24"S 163°58'01"E	G	m	BC
57	Campo Icaro	60	0,1	74°42'57"S 164°06'41"E	Q	l	BC
58	Reed Nunatak	1133	0	74°49'19"S 161°58'31"E	G	l	B
59	Olson nunatak campione 4	200	2	74°55'55"S 162°24'08"E	G	l	BC
60	Mt Howard sito 1	1200	33,8	75°40'22"S 161°17'01"E	D	l	C
61	Mt Howard sito 1	1200	33,8	75°40'22"S 161°17'01"E	Q	l	C
62	Prior Island	50	0	75°41'31"S 162°52'49"E	Q	m	BC
63	Mt Stephen	532	20,3	75°41'49"S 161°45'12"E	LD	l	B
64	Mt Billing	1300	44	75°42'12"S 160°54'28"E	D	l	C
65	Bobby Rocks	1680	91	75°48'35"S 159°11'15"E	D	l	BC
66	Unnamed Site	2700	40,5	74°15'13"S 162°30'52"E	S	l	A
67	Tinker Glacier	600	27	73°56'08"S 164°24'09"E	LD	l	B
68	Mt McGee sito 3 camp 1	230	13	74°01'42"S 164°44'45"E	G	l	BC
69	Shafer Peak sito 2	3300	48	74°02'38"S 162°36'46"E	G	l	A
70	Mt Dickason sito2	1586	21,5	74°23'29"S 164°01'13"E	G	m	C
71	Battleship Promontory campione 8	1000	33,5	76°54'36"S 160°56'05"E	S	lm	CD
72	Vegetation Island campione 1	200	0	74°47'03"S 163°39'35"E	G	l	BC

Tipo di roccia: CS:conglomerato di arenaria; D: dolerite; G: granito; S:arenaria; Q:quarzo; LD: lava-dike.

Porosità della roccia: l: bassa; m: media; h:alta.

Tipo di crescita litica:A: assente; B: epilitica; C: chasmoendolitica; D: criptoendolitica; BC: epi/chasmoendolitica; BD: epi/criptoendolitica; CD: chasmo/ criptoendolitica.

4.4.1. CLUSTER ANALYSIS DEI PROFILI DGGE

I profili generati dalla separazione della regione ITS delle comunità fungine nel gel DGGE sono stati sottoposti ad analisi di immagine con il software Phoretix 1D Pro (TotalLab Ltd, Newcastle, UK) per essere confrontati tra loro e analizzare la struttura delle comunità.

Per effettuare un'analisi di clustering è stato calcolato l'indice di correlazione di DICE mediante il software Phoretix 1D. Il coefficiente di DICE è stato calcolato in base alla presenza/assenza di ogni banda nel profilo. Il dendrogramma relativo al coefficiente di DICE è rappresentato in Figura 4.11.

Per testare la riproducibilità dei pattern elettroforetici, sono state fatte correre reazioni PCR dello stesso campione in duplicato. Il confronto di tre campioni (43, 62, 70) in duplicato è visualizzato nella Figura 4.10 A, che mostra che la variabilità intrinseca nel metodo è abbastanza buona, essendo inferiore al 20%.

Come già detto, 5 campioni su un totale di 72 avevano mostrato un profilo negativo. Attraverso l'analisi non si erano evidenziati cluster ben definiti in relazione al sito di campionamento o alle caratteristiche del substrato. I profili 36 e 39, corrispondenti rispettivamente al campione di quarzo di Kay Island e al campione di arenaria di Richard Nunatak risultavano i profili con il maggior numero di bande, in particolare il profilo 36 con 14 bande ed il profilo 39 con 15 bande; per il resto la quantità e la distribuzione delle bande variava notevolmente da profilo a profilo indipendentemente dai parametri ambientali considerati di altitudine e distanza dal mare. Da questi dati, pertanto, è emerso come non ci sia una correlazione fra il sito di campionamento e la quantità di bande ritrovate poiché il profilo con il maggior numero di bande risultava essere un sito a 2000 m di altitudine e a 70,2 Km dal mare. Dal clustering ottenuto mediante coefficiente di DICE, inoltre, risulta evidente come non ci sia una relazione lineare fra la biodiversità, i siti di campionamento e i parametri ambientali, poiché la biodiversità risultava variare notevolmente da campioni provenienti dalla stessa località ma anche tra due stessi campioni di roccia di una stessa località e stesso sito, come nel caso dei due campioni di conglomerato raccolti entrambi dal sito 2 della località Mt Howard. I due campioni, corrispondenti ai profili 6 e 12 del gel di DGGE, mostravano dei profili assai diversi, con una variabilità del 38% (Fig. 4.10B).

Anche in siti vicini alle coste, dove le condizioni ambientali si presentano meno difficili, la variazione della biodiversità è risultata drammatica in siti di campionamento poco distanti, come nel caso dei siti Inexpressible Island e Kay Island a 0 Km dal mare; o nel caso di Starr Nunatak a 3,2 Km dal mare e del sito Harrow Peak a 6,5 Km dal mare.

I dati ottenuti, quindi, evidenziano che la biodiversità che non è correlata unicamente ad altitudine, latitudine e distanza dal mare ma potrebbe dipendere da molteplici altri fattori, come disponibilità d'acqua, temperatura della roccia ed esposizione al sole ad esempio e che dovranno essere presi in considerazione nelle indagini future.

Evidentemente, in ambienti limite come quello antartico, tutti questi fattori incidono fortemente sulle condizioni micro e nanoclimatiche ed ogni minima variazione, dovuta anche semplicemente alla topologia della roccia che consente un minore o maggiore accumulo di umidità, è determinante per la sopravvivenza dei microorganismi delle comunità criptoendolitiche. Questo studio di comunità ha permesso, comunque, di effettuare un primo screening sulla biodiversità fungina in Antartide mettendone in risalto l'enorme variabilità.

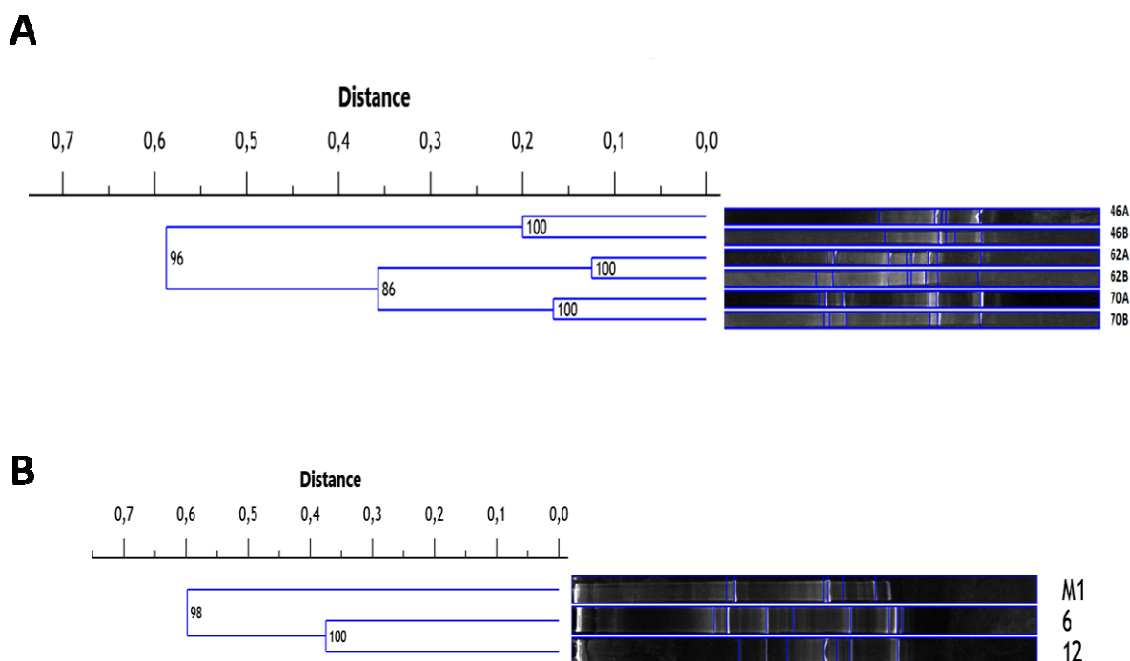


Fig.4.10. Analisi dei profili DGGE basata sul coefficiente di DICE. A: riproducibilità del metodo: la variabilità è inferiore al 20%. 46A e 46B= duplicato PCR del campione 46; 62A e 62B = duplicato PCR del campione 62; 70A e 70B = duplicato PCR del campione 70. B: Confronto dei profili relativi ai campioni 6=Mt Howard, sito 2 campione 2 conglomerato e 12= Mt Howard, sito 2 campione 1 conglomerato generati mediante DGGE (M=marker)

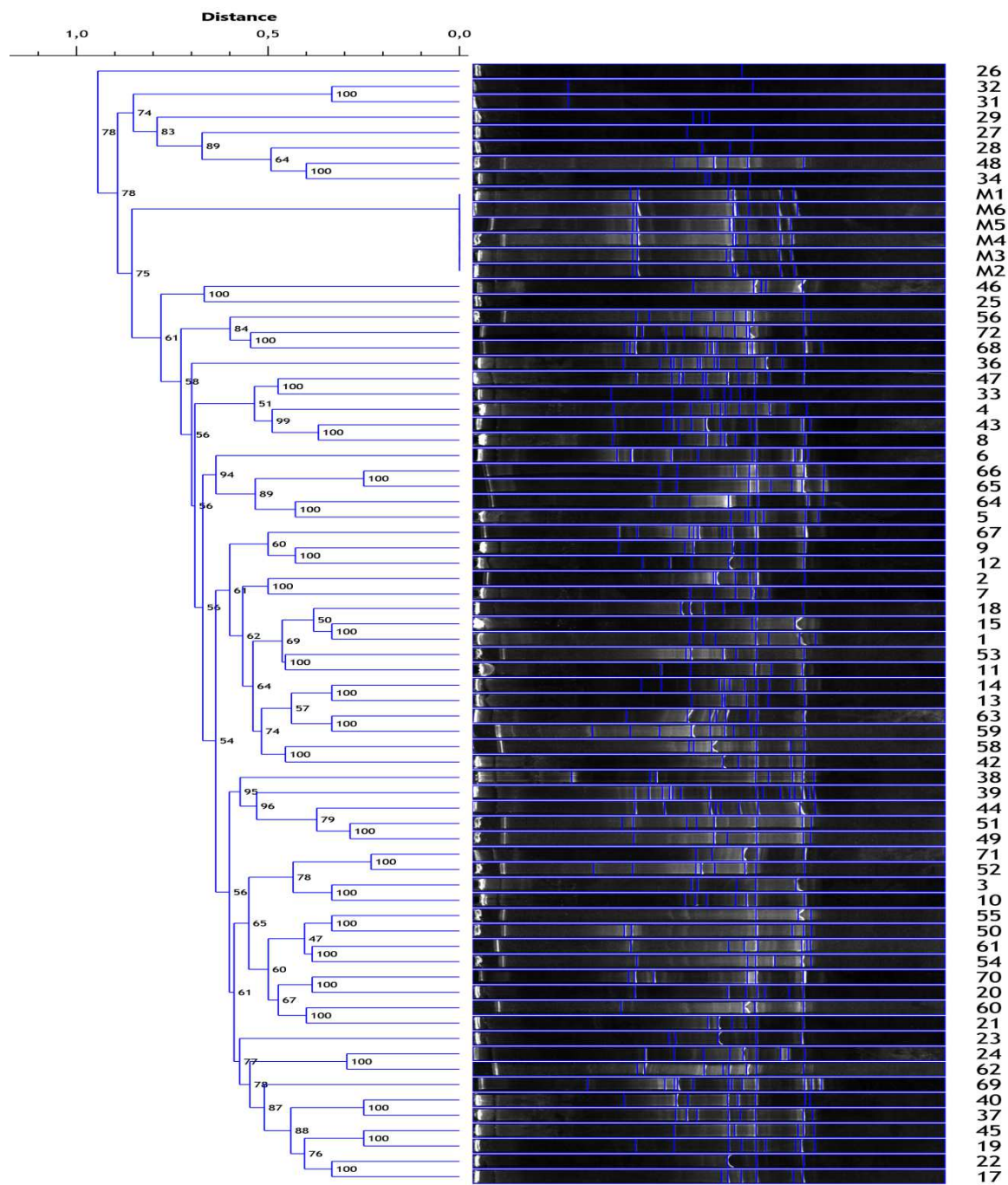


Fig.4.11. Analisi dei profili DGGE basata sul coefficiente di DICE. Confronto dei profili generati mediante DGGE (M=marker)

4.4.2.AFFILIAZIONE TASSONOMICA DELLE BANDE PRINCIPALI

Per ottenere una panoramica dettagliata relativa alle specie fungine predominanti nelle comunità endolitiche, dal gel sono state ritagliate 39 bande che, dopo una re-amplificazione attraverso il protocollo di Nested-PCR descritto nel paragrafo 3.4.2, sono state sottoposte a sequenziamento. La scelta delle bande da ritagliare è stata effettuata con il criterio secondo cui le bande che si posizionano alla stessa altezza rappresentano la stessa specie. Sono state, pertanto, considerate bande rappresentative della biodiversità trovata includendo una sola di quelle presenti in più profili. Per 8 bande il sequenziamento non ha prodotto cromatogrammi leggibili; nella Figura 4.12 è mostrato il gel DGGE in cui sono state numerate le bande ritagliate e sequenziate con successo. Nella tabella 4.7 sono riportati i risultati del confronto in banca dati delle sequenze ITS1, numerate con la stessa corrispondenza ritrovata nella Figura. 4.12.

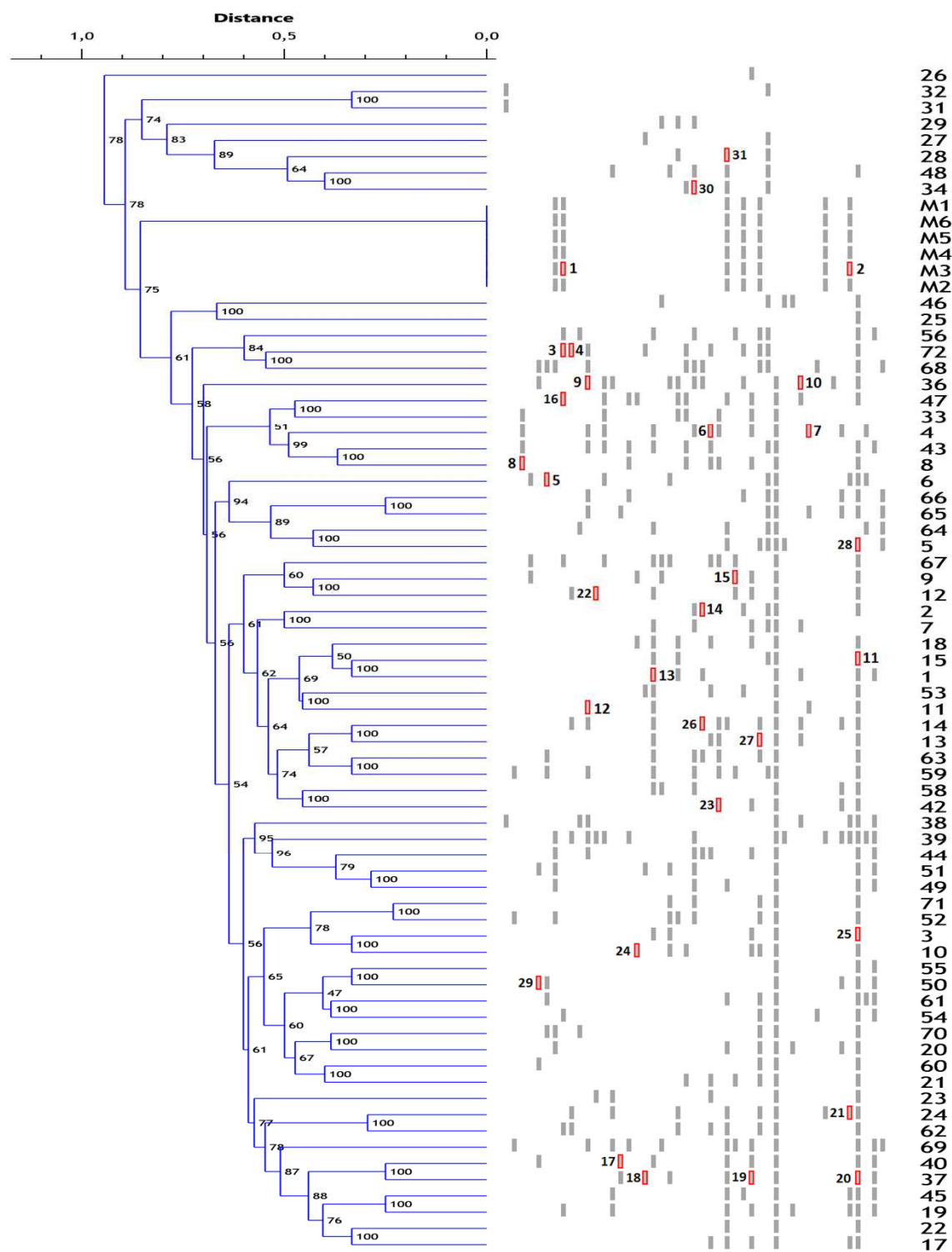


Fig. 4.12. Analisi basata sul coefficiente DICE con la matrice della presenza/assenza delle bande rilevata attraverso il Phoretix 1D. I rettangoli evidenziati in rosso rappresentano le bande escisse e ri-amplificate

Tab. 4.7. Percentuali di similarità più elevate ottenute dal confronto delle sequenze ITS1 delle bande ritagliate dal gel di DGGE con le sequenze depositate in Banca Dati NCBI Genbank (*National Center for Biotechnology Information*).

Bande DGGE	Identificazione	Query cover	Max identità	Numero di accesso
1	<i>Cryptococcus vishniacii</i>	83%	98%	JN400816.1
2	<i>Friedmanniomyces endolithicus</i>	94%	99%	JN885561.1
3	<i>Buellia</i> sp.	80%	94%	JX036043.1
4	<i>Cladophialophora minutissima</i>	84%	90%	EF016384.1
5	Uncultured fungus	100%	97%	JN905231.1
6	<i>Lecanora fuscobrunnea</i>	73%	100%	JN873875.2
7	<i>Rhizoplaca aspidophora</i>	100%	99%	DQ534484.2
8	<i>Buellia</i> sp.	90%	94%	JX036043.1
9	Lecanoromycetidae sp.	100%	89%	FJ554156.1
10	<i>Candelariella antennaria</i>	100%	82%	EF535158.1
11	<i>Rhizoplaca macleanii</i>	64%	94%	JX036136.1
12	Uncultured fungus	99%	96%	JN905231.1
13	<i>Rhizoplaca macleanii</i>	62%	94%	JX036136.1
14	<i>Buellia frigida</i>	97%	99%	AF276066.1
15	<i>Lecidea cancriformis</i>	100%	98%	JX036044.1
16	<i>Umbilicaria</i> sp.	58%	91%	-
	<i>Exophiala</i> sp.	58%	91%	-
	<i>Pleopsidium flavum</i>	58%	91%	-
17	<i>Parmelina tiliacea</i>	83%	91%	JX466470.1
18	<i>Parmeliaceae</i> sp.	53%	92%	GU183188.1
19	<i>Tremellales</i> sp.	94%	84%	EF060918.1
20	<i>Rhizoplaca macleanii</i>	69%	94%	JX036136.1
21	<i>Friedmanniomyces endolithicus</i>	94%	99%	JN885561.1
22	Uncultured fungus	100%	99%	KM877211.1
23	<i>Lecidea cancriformis</i>	99%	99%	JX036044.1
24	<i>Umbilicaria</i> sp.	43%	95%	-
	<i>Tremella</i> sp.	37%	99%	-
25	<i>Rhizoplaca macleanii</i>	67%	94%	JX036136.1
26	<i>Acarospora</i> sp.	94%	95%	DQ525528.1
27	<i>Lecidea cancriformis</i>	96%	100%	GU170841.1
28	<i>Rhizoplaca macleanii</i>	65%	94%	JX036136.1
29	<i>Cryptococcus friedmannii</i>	83%	100%	JX092260.1
30	<i>Buellia</i> sp.	80%	93%	JX036043.1
31	<i>Lecidea cancriformis</i>	99%	99%	JX036044.1

Attraverso un'analisi comparata tra il gel di DGGE e i risultati del BLAST è stato possibile delineare per ogni profilo i generi predominanti. La similarità tra le sequenze analizzate e quelle depositate in banca dati è risultata molto bassa in quasi tutti i casi, non permettendo una identificazione a livello specifico. Inoltre le bande 5, 12 e 22 davano dei match in banca dati con funghi non identificati. Questi dati suggeriscono la possibile presenza di funghi ancora sconosciuti.

La banda 4 ha ottenuto una bassa similarità (90%) con la specie *Cladophialophora minutissima*, appartenente alla famiglia Herpotrichiellaceae; questa specie è stata ritrovata nel campione di Vegetation Island che si trova sulla costa.

La banda 21 scissa dal profilo 24, corrispondente al sito Anderson Ridge, ha mostrato una similarità del 99% con la specie *Friedmanniomyces endolithicus*; in effetti questa specie è stata isolata in coltura pura dal campione di granito raccolto in questa località. La banda 29 ha mostrato una similarità del 100% con il lievito *Cryptococcus friedmannii*; questa banda è stata ritagliata dal profilo corrispondente al campione di arenaria di Chisholm Hills dal quale è stato possibile isolare in coltura pura solo la specie *Cryomyces antarcticus*. Il lievito psicrofilo *Cryptococcus friedmannii* è stato isolato per la prima volta da rocce antartiche (Vishniac, 1985) ed in seguito anche da differenti substrati in altri luoghi caratterizzati da climi freddi, come legno in decomposizione in Antartide (Arenz et al., 2006), permafrost Artico (Faizutdinova et al., 2005), campioni di suolo di Islanda, Alaska, Russia, e Stati Uniti d'America (Vishniac, 2006a), detriti e acque di scioglimento di ghiacciai alpini (Turchetti et al., 2013). La capacità di produrre una capsula polisaccaridica extracellulare tipica nel genere *Cryptococcus* (Vishniac 2006a; Selbmann et al., 2014b), che lo protegge dal disseccamento e la sua superiore abilità di assimilare fonti di carbonio e di azoto (Connel et al., 2008) sono tra le caratteristiche che permettono a questo lievito di colonizzare ecosistemi estremi.

Dal confronto in banca dati risulta, inoltre, che le sequenze ottenute appartenevano quasi esclusivamente a specie di funghi lichenizzati, anche se i bassi valori di identità riscontrati con le sequenze depositate in Banca Dati non hanno consentito di arrivare in nessun caso ad una identificazione certa a livello specifico. La maggior parte delle sequenze ottenute mostravano identità con i generi lichenizzati *Rhizoplaca* (Zopf), *Lecidea* (Ach.) e *Buellia* (De Not.), che sono molto diffusi in Antartide.

Il ritrovamento di specie non identificate riconducibili ai generi *Candelariella* (Müll.) Arg. e *Parmelina* (Hale) e alla famiglia *Parmeliaceae*, che presentano un caratteristico tallo folioso, è risultato più frequente nei campioni di roccia raccolti lungo le coste, anche se la sua presenza è stata riscontrata in alcuni casi ad altitudini elevate. Il primo è stato ritrovato nel profilo 36,

corrispondente al campione di quarzo proveniente da Kay Island (0 Km dal mare), e nei profili 1, 13, 7, 38 e 14 corrispondenti a campioni di granito provenienti rispettivamente dalle località Campo Icaro (0,1 Km dal mare), Mt Larsen (10 Km dal mare), Prior Island e Inexpressible Island (0 Km dal mare) e Mt McGee (19 Km dal mare); tuttavia è stato anche ritrovato ad una distanza dal mare di 74 Km. Il genere *Parmelina* è stato ritrovato in campioni a distanze dal mare maggiori, in particolare nel profilo 40, corrispondente al campione di arenaria proveniente da Pudding Butte (64 Km dal mare), nei profili 37, corrispondente al campione di arenaria proveniente da Mt Nansen (20 Km dal mare) e 65, corrispondente al campione di arenaria proveniente da Bobby Rocks 91Km.

Le specie riconducibili alla famiglia *Parmeliaceae* sono state ritrovate nei profili 37, 53, 72, 27 corrispondenti a campioni di roccia raccolti in località vicine alla costa, rispettivamente Mt Nansen (20 Km dal mare), Bier Point (8 Km dal mare), Vegetation Island (0 Km dal mare) e Mt Burrows (26.6 Km dal mare), ma anche nel profilo 51 corrispondente a Chisholm Hills a 81 Km dal mare.

Questi generi sono più tipici di climi più temperati e questo può giustificare la loro rara presenza nei campioni studiati ed il fatto che siano state ritrovate quasi esclusivamente su rocce raccolte in località prossime al mare (Fig. 4.13 D).

Viceversa, i generi *Buellia*, *Lecidea* e *Rhizoplaca* sono risultati più uniformemente distribuiti e sono stati ritrovati tanto in campioni raccolti ad altitudini elevate e/o distanti dal mare quanto vicino alle coste (Fig. 4.13 A, B, C).

Questi dati sono congruenti con l'ecologia di questi organismi che, pur essendo tutti notevolmente resistenti a fattori ambientali critici come basse temperature, scarsa disponibilità di acqua e forti venti (Øvstedal & Lewis Smith, 2001), quelli che presentano un tallo folioso, risultano comunque più esposti e quindi più sensibili rispetto a quelli che presentano un tallo crostoso e ben adeso alla roccia, come nei generi *Buellia*, *Lecidea* e *Rhizoplaca*.

Dal confronto incrociato tra dati DGGE ed analisi Blast, non è risultata alcuna correlazione tra generi lichenici ritrovati e substrato roccioso, pertanto uno stesso genere lo ritroviamo indifferentemente su qualunque roccia analizzata. Nella Fig. 4.14 sono riportati alcuni generi rappresentativi di talli lichenici antartici.

I risultati tassonomici ottenuti per le comunità endolitiche attraverso la DGGE sono stati completamente differenti da quelli ottenuti tramite metodi di coltivazione in termini di generi e specie rilevate nei vari campioni. Il rapporto tra licheni e funghi rilevato con i due metodi di indagine è risultato praticamente invertito in quanto, se da una parte è stato possibile isolare in

coltura pura 8 micobionti su 90 ceppi fungini ottenuti, dall'altra le sequenze ottenute dal sequenziamento delle bande appartenevano per la maggior parte a specie di funghi lichenizzati. Questo può essere spiegato da vari fattori. Innanzi tutto bisogna considerare i limiti della tecnica DGGE. È noto, infatti, che questa metodologia non è in grado di rilevare la presenza di un organismo se questa è al di sotto dell'1% della comunità totale, a causa di *bias* nell'amplificazione tramite PCR, che possono portare ad una sottostima della diversità totale a causa dell'amplificazione preferenziale di un DNA rispetto ad un altro (von Wintzingerode et al., 1997). Evidentemente i funghi lichenizzati sono fortemente predominanti sugli altri in queste comunità e, pertanto, la presente analisi è da considerarsi sulla biodiversità lichenica. Inoltre, è stato ben documentato che, nella migliore delle ipotesi, forse solo il 5% dei funghi ambientali può essere coltivato (Hawksworth, 2001). Infine, le specie presenti in minoranza potrebbero prevalere in relazione alle condizioni utilizzate per l'isolamento in culture pure.

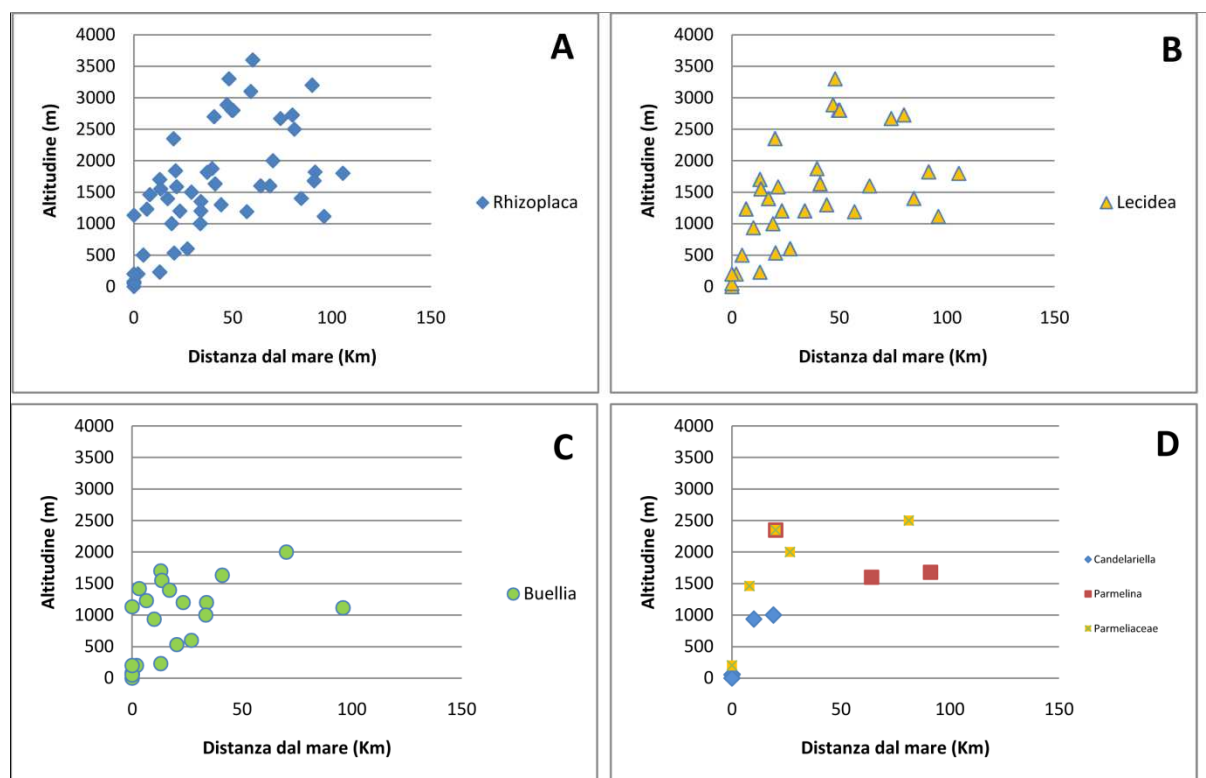


Fig. 4.13. Distribuzione delle specie licheniche ritrovate. A: *Rhizoplaca*. B: *Lecidea*. C: *Buellia*. D: *Candelariella*, *Parmelina* e *Parmelinaceae*.

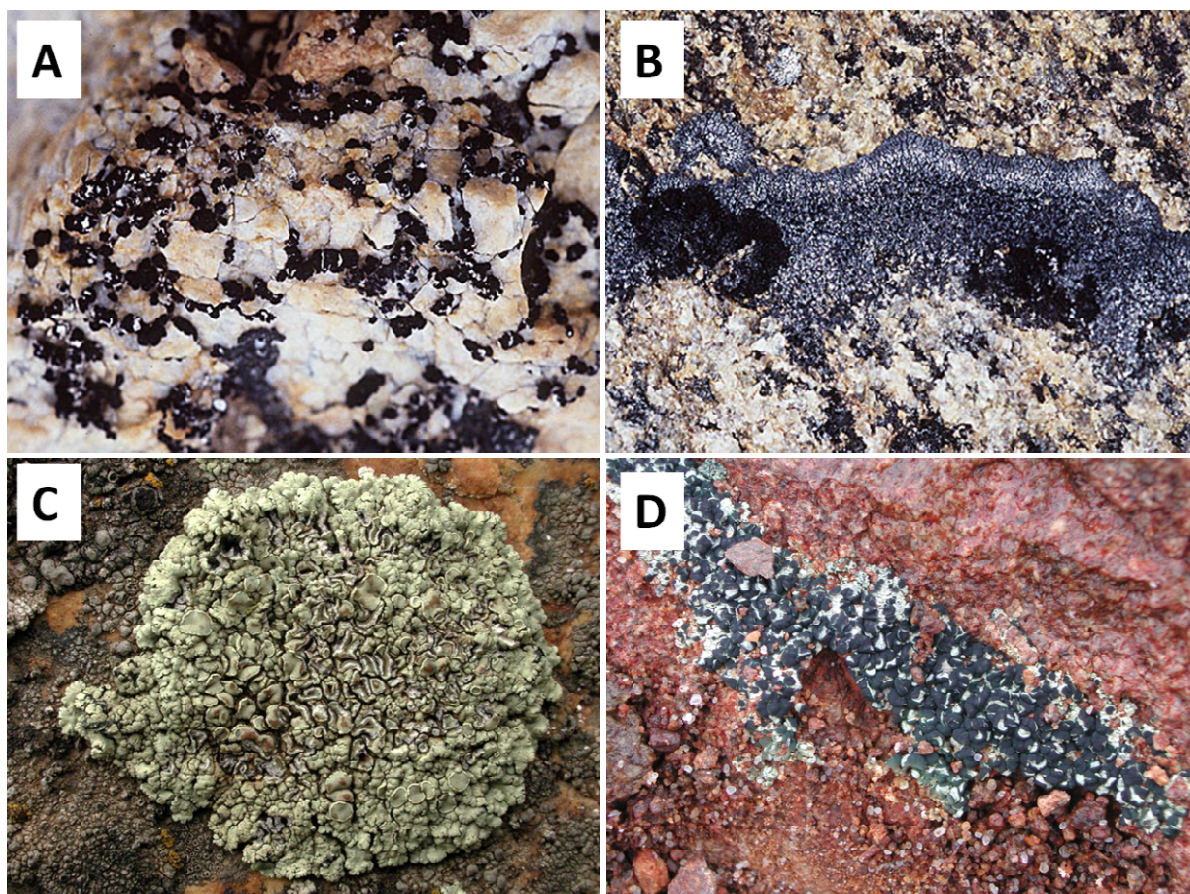


Fig. 4.14. Immagini rappresentative di alcune specie di licheni appartenenti a generi ritrovati nel presente studio. A: *Lecidea cancriformis* Dodge & Baker; B: *Buellia frigida* Darb.; C: *Rhizoplaca melanophthalma* (DC.) Leuckert; D: *Lecanora fuscobrunnea* Dodge & Baker

4.4.3. NUMERO DI BANDE E INDICI DI DIVERSITÀ NEI PROFILI DGGE

Con la DGGE si ottiene un profilo elettroforetico formato da una serie di bande in cui, in prima approssimazione, il numero di bande è proporzionale al numero di specie presenti e la posizione di ogni banda è diversa per ogni specie.

L'analisi delle immagini ha rilevato un totale di 47 diverse posizioni di banda (classi di banda, Figura 4.12). Quindi 47 diversi filotipi sono presenti nella totalità dei campioni come rivelato dal metodo di sensibilità. Per ogni lane, il programma calcola l'intensità relativa di ogni banda, fornendo informazioni sulla relativa abbondanza delle specie.

Nella Tabella 4.8 sono riportati il numero di bande e gli indici di biodiversità stimati per ogni campione trattato. Il numero medio di bande rilevato è 7.3 ± 2.7 , con un minimo di 1 per i campioni 25, 26 e 31 (Shafer Peak, Battleship Promontory e McLea Nunatak) e un massimo di 15 per il campione 39 (Richard Nunatak). La più bassa diversità è stata rilevata nei campioni 32, 27 ($H' = 0.51-0.61$; $1-D = 0.33-0.41$), mentre la più alta nei campioni 68 e 39 ($H' = 2.24-2.45$; $1-D = 0.87-0.90$).

La ricchezza è un parametro che misura il numero di specie in una particolare area (comunità): il numero di individui di ogni specie però non è considerato. Quindi, la ricchezza da sola non è sufficiente a descrivere la biodiversità di una comunità che dipende anche dall'uniformità. L'uniformità confronta la somiglianza della dimensione della popolazione per ogni specie (numero di individui) misurando quindi la relativa abbondanza di specie diverse che contribuiscono alla ricchezza della comunità. Una comunità dominata da poche specie abbondanti è considerata meno diversificata rispetto a quella rappresentata da specie diverse, anche se meno abbondanti.

Gli indici di diversità di Shannon-Weaver, di Simpson e di Pielou sono una misura della diversità che tiene in considerazione sia la ricchezza che l'uniformità. Nel nostro caso, come mostrato dal grafico in Figura 4.16, tutti i campioni hanno mostrato livelli di diversità molto diversi tra loro. Tuttavia, la diversità non è risultata né legata al sito di campionamento né alle caratteristiche del substrato.

Tab.4.8. Indici di biodiversità stimati: Richness (S); Shannon-Weaver (H'); Simpson (1-D) e Pielou (J)'.

N. DGGE	S	H'	1-D	J'
1	7	1,64	0,76	0,84
2	6	1,47	0,74	0,82
3	5	1,40	0,74	0,87
4	12	2,11	0,85	0,85
5	7	1,69	0,78	0,87
6	9	2,02	0,85	0,92
7	6	1,44	0,69	0,80
8	8	1,75	0,79	0,84
9	7	1,26	0,75	0,75
10	7	1,69	0,77	0,87
11	5	1,23	0,66	0,77
12	7	1,53	0,78	0,78
13	7	1,58	0,75	0,81
14	11	2,17	0,87	0,91
15	5	1,14	0,62	0,71
17	6	1,66	0,80	0,93
18	7	1,67	0,78	0,86
19	9	1,88	0,78	0,85
20	7	1,73	0,81	0,89
21	6	1,62	0,78	0,90
22	3	0,97	0,58	0,89
23	5	1,36	0,69	0,84
24	9	1,87	0,81	0,85
27	2	0,61	0,41	0,87
28	3	1,02	0,62	0,93
29	3	1,09	0,66	0,99
32	2	0,51	0,33	0,74
33	8	1,92	0,83	0,92
34	4	1,27	0,69	0,92
36	14	2,17	0,85	0,82
37	8	1,78	0,80	0,86
38	8	1,90	0,83	0,91
39	15	2,45	0,90	0,90
40	8	1,63	0,76	0,78
42	5	1,42	0,72	0,88
43	11	1,98	0,81	0,83
44	9	1,94	0,83	0,88
45	7	1,91	0,85	0,98
46	5	1,18	0,63	0,73
47	11	2,17	0,86	0,90
48	6	1,38	0,71	0,77
49	6	1,47	0,73	0,82

50	6	1,59	0,77	0,89
51	8	1,71	0,78	0,82
52	8	1,82	0,80	0,88
53	6	1,61	0,77	0,90
54	6	1,56	0,75	0,87
55	3	1,04	0,63	0,94
56	9	1,79	0,79	0,82
58	6	1,55	0,77	0,86
59	10	1,93	0,81	0,84
60	4	1,24	0,67	0,90
61	7	1,70	0,79	0,88
62	8	1,91	0,83	0,92
63	8	1,81	0,81	0,87
64	7	1,68	0,77	0,87
65	8	1,57	0,74	0,75
66	8	1,50	0,72	0,72
67	11	2,13	0,86	0,89
68	12	2,24	0,87	0,90
69	12	2,15	0,86	0,91
70	6	1,58	0,77	0,88
71	5	1,28	0,69	0,80
72	10	2,11	0,87	0,92

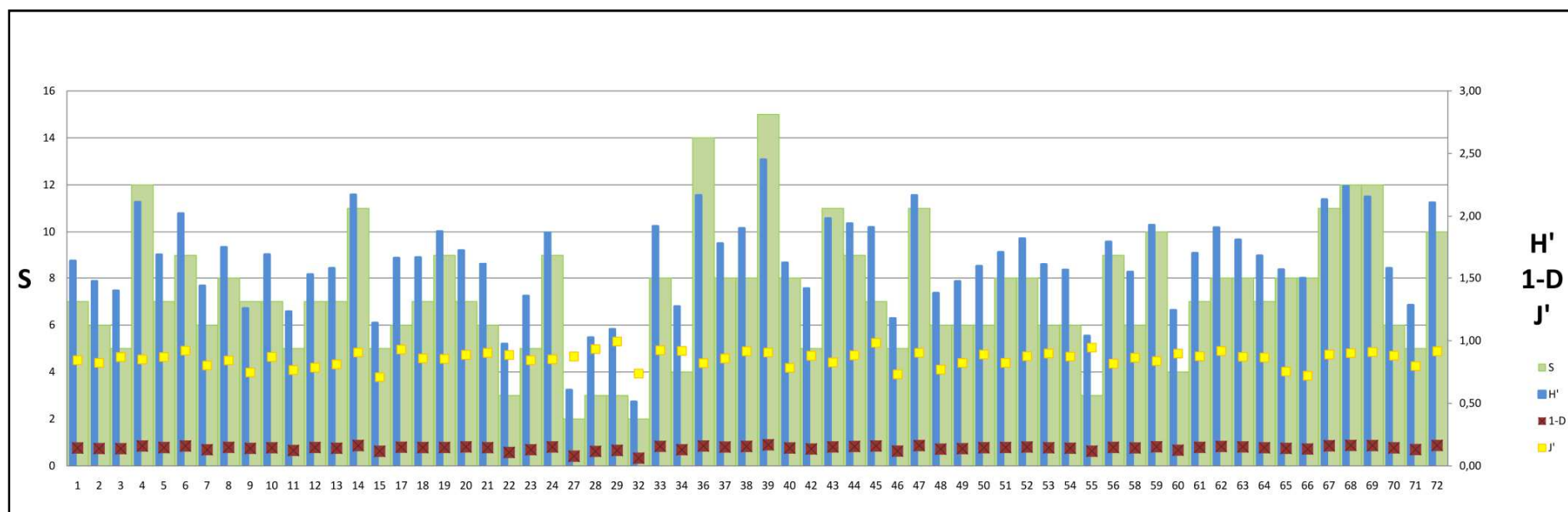


Fig.4.16. Indici di biodiversità stimati: Richness (S); Shannon-Weaver (H'); Simpson (1-D) e Pielou (J')

Un'analisi globale dei profili di comunità è stata effettuata per valutare le similarità tra i campioni in termini di biodiversità e la correlazione tra la diversità delle comunità e i parametri ambientali.

La relazione tra gli indici di diversità ottenuti dai singoli profili delle comunità fungine è stata analizzata attraverso una Non metric MultiDimensional Scaling (n-MDS; PAST v 1.34) che organizza i dati spazialmente e aiuta a individuare somiglianze e differenze tra i set di dati. Il software calcola un punteggio della bontà dell'adattamento per i punti di dati, chiamato stress. Quando il valore dello stress è inferiore a 0,2 la rappresentazione delle relazioni tra i campioni in due dimensioni è accettabile. Un valore di stress maggiore di 0,2 indica che la rappresentazione grafica è dovuta al caso, mentre un valore inferiore a 0,1 corrisponde a un ordinamento ideale, senza una reale probabilità di una errata interpretazione (Clarke 1993).

L'analisi n-MDS è stata effettuata utilizzando l'indice di similarità di Bray-Curtis.

Nella figura 4.17 è riportata la mappa n-MDS in cui sono stati inseriti anche i parametri ambientali quali distanza dal mare, altitudine, porosità, tipo di roccia e tipo di colonizzazione. L'ordinamento MDS dei campioni in base alla biodiversità mostrava dei cluster ben definiti e le differenze tra i diversi gruppi ottenuti sono risultate altamente significative (1-way NPMANOVA, $p < 0.0001$).

È stato possibile individuare un gradiente altitudinale e latitudinale prendendo in considerazione i valori medi relativi ad ogni gruppo. Infatti i campioni con bassi valori di biodiversità (gruppo D) presentano valori medi di altitudine e distanza dal mare più elevati rispetto ai campioni che presentano una diversità medio-alta. Questa tendenza è rilevabile anche nei confronti della porosità della roccia i cui valori medi sono più alti nel cluster che presenta una diversità medio-alta (gruppo B). Come già osservato, la porosità della roccia sembra, quindi, influenzare positivamente la ricchezza della biodiversità, e in una certa misura la giusta porosità permette la colonizzazione spostandosi ad alta quota e a distanza dal mare. L'altitudine e la distanza dal mare determinano invece valori di diversità più bassi, soprattutto quando gli spazi aerei della roccia si riducono. Questi dati sono congruenti con quanto riportato in un recente lavoro; la colonizzazione di tipo criptoendolitico, ospitata per la loro porosità preferenzialmente dalle rocce arenarie, si ritrova ad altitudini più elevate ed ad una maggiore distanza dal mare rispetto ad altri tipi di colonizzazioni endolitiche. Questo lascia supporre che la forma criptoendolitica sia particolarmente protettiva per gli endoliti e che le rocce arenarie siano cruciali per la sopravvivenza degli endoliti in condizioni più proibitive (Zucconi et al., 2014).

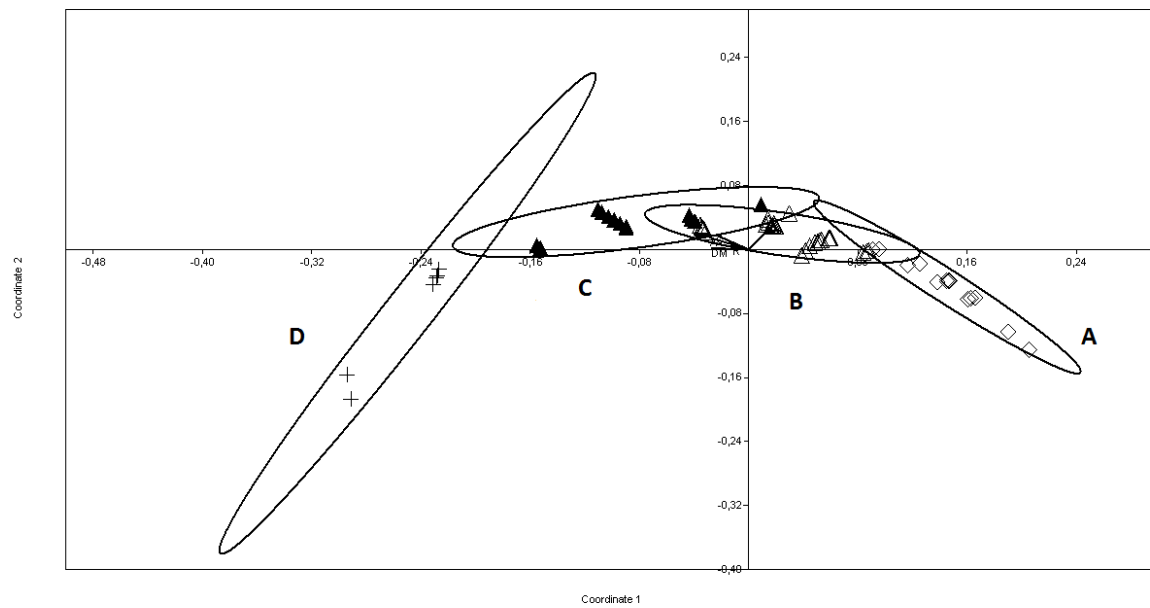


Fig.4.17. Mappa Non metric MultiDimensional Scaling (n-MDS) (stress value = 0.03). DM: distanza dal mare; A:altitudine; P:porosità; R:tipo di roccia; C:tipo di colonizzazione; +=diversità bassa; ▲=diversità medio-bassa; Δ=diversità medio-alta ◊=diversità alta

Organizzazione funzionale Fo

L'organizzazione funzionale (funzionalità) di una comunità microbica è il risultato dell'azione dei microrganismi più adattati alle interazioni ambientali/microbiologiche in corso, che, per questo motivo, tendono a diventare dominanti nella struttura della comunità (Marzorati et al., 2008).

Stabilità funzionale e stabilità strutturale di una comunità microbica non sempre coincidono. Infatti, la flessibilità strutturale (cioè, l'instabilità) può essere necessaria per la stabilità funzionale in condizioni di stress (Fernandez et al., 2000) e l'uniformità di una comunità può essere un indicatore della flessibilità strutturale della struttura della comunità microbica (Wittebolle et al., 2009). È stato suggerito che la conservazione di una data funzionalità è garantita dalla flessibilità di una comunità microbica in cui i membri minoritari possono diventare dominanti in un breve periodo dopo una perturbazione significativa. Questa condizione assicura un veloce recupero da una condizione di stress dovuto la presenza della ridondanza funzionale e di metodi alternativi per utilizzare il flusso di energia (Fernandez et al., 2000). Quindi, è possibile definire la Fo come la capacità della comunità di avere un'adeguata distribuzione tra i microrganismi dominanti e quelli resilienti, condizione che dovrebbe garantire la capacità di contrastare l'effetto di una improvvisa esposizione allo stress (Marzorati et al., 2008).

La funzionalità (Fo) della comunità può essere rappresentata graficamente attraverso le curve di Pareto-Lorenz, a partire dal numero cumulativo di bande e dall'intensità rilevati sui profili DGGE (Mertens et al., 2005; Wittebolle et al., 2008). L'interpretazione di tali curve si basa sul presupposto che la distribuzione delle specie all'interno di una comunità microbica è collegata alla capacità di ottimizzare e conservare la funzionalità anche in condizioni perturbate. L'uniformità perfetta teorica, rappresentata dalla diagonale a 45°, significa che tutte le specie di comunità hanno lo stesso numero di individui. Così, più la curva di PL è vicino alla diagonale, più alta è la *evenness*. Valori bassi di Fo (ad es. 25%) stanno a significare che il numero di individui di ogni specie è molto simile e la comunità risulta scarsamente specializzata funzionalmente. Una tale comunità può derivare da una mancanza di pressione selettiva e può non presentare una struttura interna ben definita in termini di specie dominanti. Dal momento che nessuna specie è presente in concentrazioni più elevate, potrebbe essere necessaria una relativamente lunga fase di latenza dopo un'esposizione a stress improvvisi.

Al contrario, un valore medio di Fo (ossia 45%) è tipico di una comunità con poche specie che sono dominanti e più adatte alle condizioni ambientali. Tutte le altre specie sono

numericamente inferiori. Tuttavia, a causa della elevata concentrazione di alcune specie e la disponibilità di molte altre, la comunità può potenzialmente affrontare mutevoli condizioni ambientali e preservarne la funzionalità. Infine, elevati valori di F_o (cioè 80%) rappresentano una comunità molto specializzata in cui una piccola quantità di specie è dominante e tutti gli altri sono presenti in numero ridotto, con una grande differenza tra i due gruppi. Questa comunità può avere una alta organizzazione funzionale; tuttavia, è vulnerabile ai cambiamenti esterni, e potrebbero essere necessari lunghi tempi di recupero dopo intensi eventi perturbanti (Marzorati et al., 2008).

Per quanto riguarda le comunità fungine endolitiche della Terra Vittoria qui studiate, la Figura 4.19 riporta i valori F_o calcolati per i diversi tipi di substrato roccioso (Granito, Arenaria, Conglomerato, Quarzo e Dolerite+Lava Dike) che hanno raggiunto, in media, valori medio alti (66%). La struttura delle comunità mostrava la presenza di alcune specie dominanti specializzate e altre presenti in concentrazione più bassa. Questo risultato era in accordo con i risultati ottenuti dal sequenziamento delle bande escisse dal gel DGGE, in cui è risultata dominante la componente lichenica rispetto ai funghi non lichenizzati.

In generale la struttura di questa comunità presentava una buona funzionalità, ma potrebbe risultare vulnerabile a perturbazioni esterne, come ad esempio l'introduzione di microrganismi non autoctoni che potrebbero alterare la struttura e la funzione della comunità indigena.

Le comunità criptoendolitiche antartiche sono ben organizzate, con una precisa distribuzione dei ruoli tra i componenti, che risultano fondamentali per la sopravvivenza degli altri membri della comunità; così, mentre le alghe ed i cianobatteri sono i produttori primari, i micobionti sono i consumatori e infine, i batteri incolori e i funghi saprotrofi sono i decompositori. Inoltre, sia i micobionti che gli altri funghi producono sostanze biologicamente attive, che inibiscono alcuni membri fotosintetici della comunità, e che sembrano responsabili della zonazione degli organismi nella comunità.

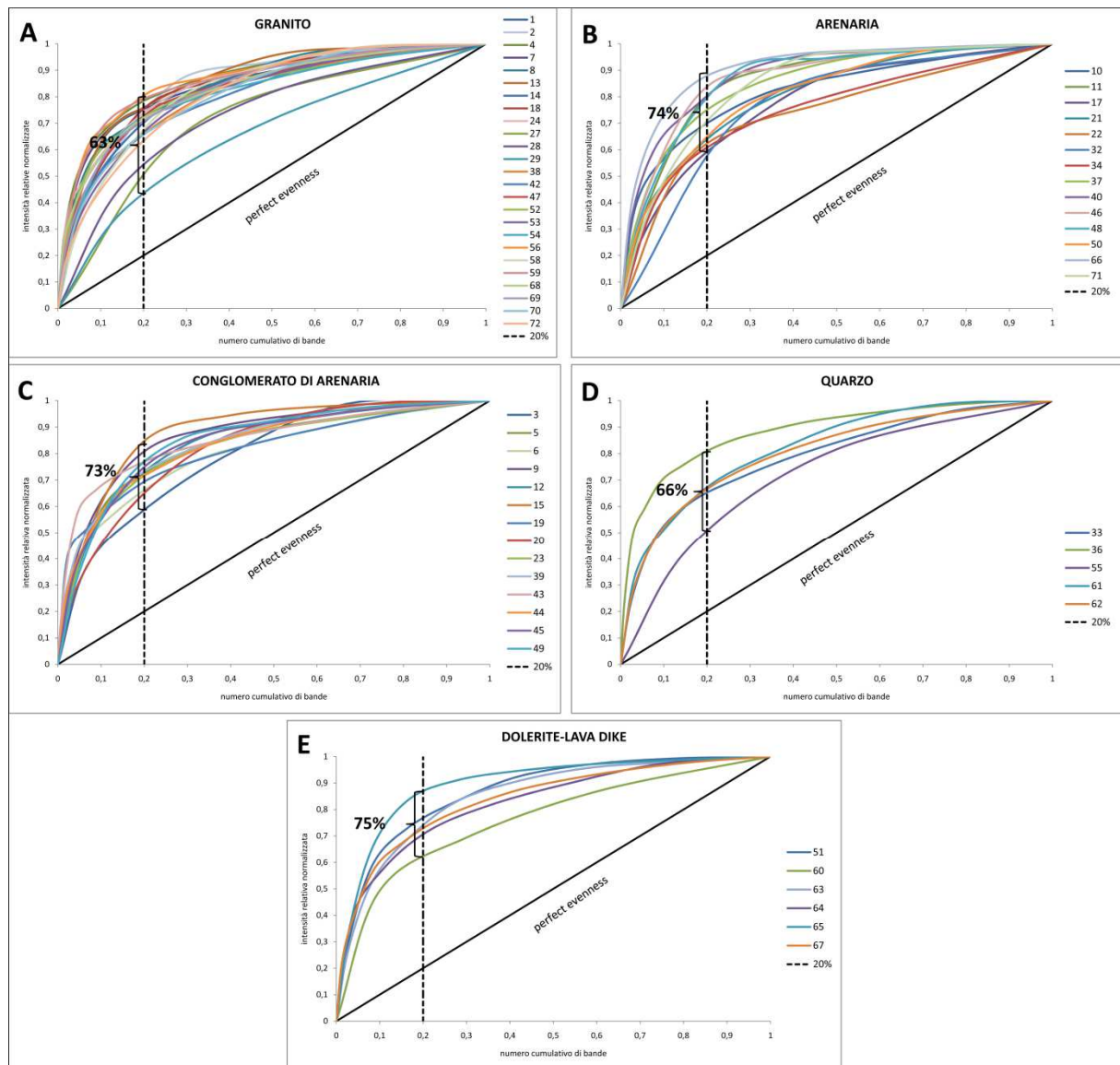


Fig.4.19. Curve di distribuzione Pareto-Lorenz derivate dai profili DGGE delle comunità fungine raggruppate per tipologia di substrato: granito (A), arenaria (B), conglomerato (C), quarzo (D), dolerite e lava-dike (E). La linea verticale tratteggiata al livello 0,2 dell'asse delle x viene tracciata per valutare l'intervallo dei valori di Pareto-Lorenz. La parentesi indica i valori medi Pareto-Lorenz. I valori percentuali si riferiscono ai livelli di organizzazione funzionale, mentre la diagonale a 45° rappresenta la perfetta evenness di una comunità

5. CONCLUSIONI

L'endolitismo è uno degli adattamenti più spettacolari dei microrganismi alla pressione ambientale ed è la forma di vita predominante nelle zone interne del continente antartico. Le comunità endolitiche, vivono al limite del loro potenziale biologico e sono tra i più resistenti oggi conosciuti.

Da queste comunità sono stati isolati funghi neri in oltre 20 anni di spedizioni nell'ambito del PNRA e conservati nella Culture Collection of Fungi From Extreme Environments (CCFEE), Sezione di Micologia del Museo Nazionale dell'Antartide (DEB, Università della Tuscia). Tali organismi si sono evoluti in condizioni di stretto isolamento geografico e genetico e sotto pressioni ambientali uniche: diversi nuovi generi e specie, con genotipi estremamente devianti, sono stati descritti da queste comunità. Questi organismi hanno un enorme valore scientifico per comprendere i possibili limiti per la vita: si sono rivelati ottimi modelli per indagini sui processi evolutivi in condizioni estreme, i meccanismi di adattamento e resistenza, e perfino per studi di astrobiologia. Grazie alla loro eccezionale resistenza allo stress e alla capacità di crescere all'interno della roccia, i funghi neri antartici, e in particolare *Cryomyces antarcticus*, sono stati proposti come modelli eucariotici per le indagini sulla teoria litopanspermia (trasferimento della vita da un pianeta all'altro attraverso meteoriti colonizzati) e l'esplorazione biologica di Marte (Onofri et al., 2009, 2012).

Per quanto molto resistenti, le specie microbiche che compongono queste comunità sono fortemente minacciate dal cambiamento climatico in atto. Lo stabilirsi di condizioni più permissive, infatti, potrebbe portare all'insediamento di specie alloctone più competitive, con conseguente possibile estinzione delle specie autoctone, fortemente adattate (Selbmann et al., 2012). Bisogna tenere in considerazione che gli ambienti limite sono più suscettibili ai cambiamenti climatici. Nel corso degli ultimi 50 anni, in alcune aree antartiche e sub-antartiche si è assistito ad uno degli aumenti della temperatura media dell'aria più drammatici del pianeta (Steig et al., 2009).

Pertanto questi delicati ecosistemi possono rappresentare un importante strumento per monitorare e predire l'effetto di qualunque potenziale variazione futura. Tuttavia, ad oggi, scarsi sono i dati sulla loro biodiversità e nulla si sa di come essa vari in funzione delle condizioni nano-ambientali.

A fronte di queste considerazioni, è oggi di primaria importanza approfondire le conoscenze sulle comunità endolitiche antartiche prima che qualunque cambiamento ulteriore ne alteri il naturale equilibrio.

Lo scopo di questa tesi di Dottorato è stato quello di ampliare le conoscenze sulla diversità microbica delle comunità endolitiche della Terra Vittoria, Antartide Continentale, per lo più ancora sconosciute, e di investigare come queste rispondano alle pressioni ambientali in termini di variazione della biodiversità.

Questo lavoro è stato incentrato sull'isolamento e caratterizzazione su base molecolare di funghi da comunità endolitiche di rocce provenienti dall'Antartide continentale; inoltre, è stata condotta un'indagine per una caratterizzazione preliminare della biodiversità fungina di tali comunità attraverso metodi colturali e metodi di coltura indipendenti.

Il livello di caratterizzazione delle comunità endolitiche della Terra Vittoria, ottenuto in questo lavoro, ha delineato alcune importanti caratteristiche riguardo questi peculiari organismi.

L'analisi filogenetica multilocus ha confermato che i funghi neri meristemati che compongono le comunità endolitiche antartiche sono distribuiti principalmente nella classe Dothideomycetes, in particolare nell'ordine *Capnodiales*, mentre solo una minima parte degli isolati ricade nella classe Eurotiomycetes. Funghi neri appartenenti a quest'ultima classe sono conosciuti per le loro abilità nel metabolizzare composti aromatici (Prenafeta-Boldù et al., 2006), questo spiega l'alta presenza di questa classe di funghi neri in siti fortemente inquinati e fortemente influenzati dall'attività dell'uomo. Viceversa, la classe Dothideomycetes mostra una significativa tendenza all'estremofilia. La ragione per cui i funghi neri antartici sono maggiormente distribuiti nella classe Dothideomycetes può essere ritrovata nella storia evolutiva di questo gruppo di funghi. È stato recentemente dimostrato che la classe Dothideomycetes è evoluta molto precocemente rispetto alla classe Eurotiomycetes (Gueidan et al., 2011). Il periodo di diversificazione della classe Dothideomycetes, infatti, è stato stimato essere circa 430 milioni di anni fa quando le temperature erano molto più basse rispetto ad oggi. Di contro, l'origine della classe Eurotiomycetes è stata stimata circa 250 milioni di anni fa quando le temperature globali erano molto più alte. Sebbene le due linee filetiche si siano diversificate in tempi differenti, condividono presumibilmente un comune organismo ancestrale, presente in ambiente oligotrofico sulla superficie della roccia (Selbmann et al., 2014b). Un cospicuo numero di ceppi ricade nella classe Arthoniomycetes; questa è una classe costituita per la gran parte da funghi lichenizzati ed è la seconda più ampia, dopo quella Lecanoromycetes, costituita invece esclusivamente da funghi lichenizzati (Honegger, 2012); considerando che la forma di vita in associazione con un fotobionte è predominante nella classe, non può essere esclusa una analoga ecologia per organismi nel gruppo filogenetico individuato dal presente studio. Questa considerazione sembrerebbe

essere confermata dal fatto che, pur potendo essere isolati in coltura pura, questi funghi invariabilmente perdono, dopo pochi mesi, la loro vitalità; questo potrebbe far supporre che tali organismi potrebbero non essere in grado di condurre vita completamente autonoma ma necessitare della presenza di un partner fotosintetico. Quest'ultima considerazione rimane una supposizione ed andrebbe comunque confortata da ulteriori indagini.

Da un punto di vista tassonomico, il contributo di questo lavoro è stato molto importante; sebbene l'identificazione a livello di specie è stata possibile per più del 50% dei ceppi isolati, confermando come la specie *Friedmanniomyces endolithicus* sia quella più largamente diffusa nelle comunità endolitiche antartiche, sono stati individuati alcuni nuovi gruppi di funghi filogeneticamente ben supportati che verranno descritti come 3 nuovi generi e 7 nuove specie. In particolare è stato possibile individuare all'interno dell'ordine *Capnodiales* una nuova specie appartenente al genere *Oleoguttula*, probabilmente endemico per l'Antartide e una nuova specie appartenente al genere *Constantinomyces*. Nell'ordine *Chaetothyriales* è stata individuata una nuova specie di *Exophiala*, un patogeno opportunisto, e un nuovo genere costituito esclusivamente da funghi neri delle rocce antartici. E ancora due nuovi generi e specie all'interno della classe *Arthoniomycetes*.

Infine, è da sottolineare il ritrovamento della specie *Cryomyces antarcticus*, finora considerata endemica delle McMurdo Dry Valleys, in due diverse località della Terra Vittoria del Nord.

Questi risultati hanno ancora una volta evidenziato quanto la forte pressione ambientale e l'isolamento genetico e geografico siano determinanti nella selezione di genotipi peculiari, che continuamente vengono ritrovati in indagini di questo tipo. Risulta, pertanto, chiaro di quanto la conoscenza della biodiversità di questi organismi sia ancora limitata e di quanto sia importante continuare questo tipo di indagini al fine di conoscere e conservare una risorsa genetica così peculiare e potenzialmente a rischio.

Attraverso il sequenziamento delle bande escisse dai gel di DGGE è emerso che le sequenze ottenute appartengono quasi esclusivamente a specie di funghi lichenizzati. I generi di licheni crostosi ritrovati sono distribuiti uniformemente sia sulle coste che verso l'interno del Continente, mentre i licheni con tallo folioso, in accordo con Øvstedal & Lewis Smith (2001), sono stati ritrovati in maniera preponderante vicino alle coste. Il successo dei licheni in Antartide può essere spiegato principalmente considerando le capacità fisiologiche di questi organismi, in particolare la loro elevata tolleranza alle basse temperature e nei confronti dello stress idrico e luminoso. Molto importante è proprio la capacità che essi hanno di continuare ad essere fotosinteticamente attivi anche a temperature inferiori a 0°C (Kappen, 2000).

Attraverso l'analisi statistica e di immagine dei gel di DGGE, che ha condotto sia alla stima della biodiversità attraverso indici teorici che alla costruzione di un dendrogramma, è risultata una forte variabilità tra i profili, che mette in luce la mancanza di correlazione lineare tra i singoli parametri ambientali quali altitudine e distanza dal mare. Evidentemente, in condizioni limite per la vita, anche minime variazioni a livello micro ambientale possono incidere in maniera drammatica sulla possibilità di sopravvivenza di questi organismi. Dai dati ottenuti risulta comunque, come già sottolineato, che la natura del substrato, ed in particolare la porosità, è una componente fondamentale nel determinare la possibilità di colonizzazione.

Queste peculiari comunità sono, inoltre, risultate fortemente specializzate ma proprio per questo più vulnerabili. I microrganismi endolitici, vivendo al limite del loro potenziale biologico, sono altamente adattati al loro ambiente e quindi sensibili ai cambiamenti climatici; possono, quindi, rischiare l'estinzione ad ogni minima variazione: sia che le condizioni si facciano ancora più proibitive ed incompatibili con la vita sia che si facciano più mitigate e compatibili con l'invasione di specie alloctone più competitive.

Questo lavoro rappresenta la prima caratterizzazione della colonizzazione litica su una vasta area di studio dell'Antartide, quale la Terra Vittoria. Nonostante la complessità dei dati di partenza, dovuta all'ampiezza del campionamento e all'enorme variabilità dei campioni, i risultati ottenuti hanno consentito di cominciare a comprendere il ruolo di diversi parametri ambientali, tra cui altitudine, distanza dal mare e substrato roccioso sulla colonizzazione delle rocce da parte dei microrganismi endolitici. Tuttavia è emersa l'importanza di altri parametri, quali l'esposizione N/S, e delle condizioni micro ambientali che possono incidere in maniera molto significativa sulla biodiversità delle comunità.

Questo studio ha evidenziato, quindi, la necessità prendere in considerazione parametri ambientali addizionali quali la temperatura della roccia, la disponibilità di acqua e i tempi di esposizione della roccia fuori dal ghiaccio, monitorati *in situ*, per ottenere un quadro più chiaro della vita sulle e nelle rocce, comprese le variazioni nella biodiversità dovute da fattori abiotici.

Questi risultati, che rappresentano il primo studio su larga scala della biodiversità delle comunità endolitiche antartiche in relazione ai parametri ambientali, hanno fornito una base di conoscenze che ha permesso di pianificare in maniera mirata le attività di campionamento e monitoraggio per la campagna antartica che si svolgerà a Dicembre 2015-Gennaio 2016. Nello specifico, verrà allestito un sistema di monitoraggio, attraverso dei sensori (minidatalogger), delle condizioni nanoclimatiche su lungo termine per avere un quadro chiaro delle condizioni a cui le comunità microbiche sono normalmente esposte.

Sulla base dei risultati ottenuti, sono stati selezionati i siti di campionamento il più omogenei possibile dal punto di vista del substrato, ma esposti a diverse condizioni di altitudine, distanza dal mare, esposizione e caratteristiche micro-morfologiche. È stata, quindi, individuata l'arenaria, che permette una più efficiente colonizzazione, come modello semplificato per lo studio, in modo da azzerare la variabilità del substrato roccioso.

I dati integrati consentiranno di approfondire le conoscenze sull'adattamento ed evoluzione in condizioni limite fornendo uno strumento di predittività sull'effetto di eventuali cambiamenti climatici.

6. BIBLIOGRAFIA

Adams BJ, Bardgett RD, Ayres E, Wall DH, Aislabie J, Bamforth S, Bargagli R, Cary G, Cavacini P, Connel L, Covey P, Fell JW, Frati F, Hogg ID, Newsham KK, O'donnel A, Russel N, Seppelt RD, Stevens MI (2006). Diversity and distribution of Victoria Land biota. *Soil Biology & Biochemistry* 38: 3003-3018

Arenz BE, Held BW, Jurgens JA, Farrell RL, Blanchette RA (2006) Fungal diversity in soils and historic wood from the Ross Sea Region of Antarctica. *Soil Biology and Biochemistry* 38: 3057-3064

Awise JC, Wollenberg K, (1997) Phylogenetics and the origin of species. PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 94: 7748-7755

Baker G, Ah Tow L, Cowan DA (2003). PCR-based detection of non-indigenous microorganisms in 'pristine' environments. *Journal of Microbiological Methods* 53: 157-164.

Bano N, Hollibaugh JT, (2002) Phylogenetic composition of bacterioplankton assemblages from the Arctic Ocean. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 505-518

Bargagli R (2005) Antarctic Ecosystems: Environmental Contamination, Climate Change, and Human Impact. Berlin: Springer-Verlag

Bargagli R (2008) Environmental contamination in Antarctic ecosystems *Science of The Total Environment* 400: 212-226

Baxeavanis AD, Oullette BFF (2005) Bioinformatics. A practical guide to the analysis of genes and proteins. Wiley-Interscience John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, New Jersey USA, pp 540

Begerow, D, Stoll, M, Bauer, R (2007) A phylogenetic hypothesis of Ustilaginomycotina based on multiple gene analyses and morphological data. *Mycologia* 98: pp. 906-916

Blackhurst RL, Jarvis K, Grady MM (2003) Biologically induced elemental variations in Antarctic sandstone: a potential test for Martian microorganism. *International Journal of Astrobiology* 3 (2): 97-106

Blackwell M, Hibbett DS, Taylor JW, Spatafora JW (2006) Research Coordination Networks: a phylogeny for kingdom Fungi (Deep Hypha). *Mycologia* 98(6): 829-37

Burton JP, Cadieux PA, Reid G (2003) Improved understanding of the bacterial vaginal microbiota of women before and after probiotic instillation. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 97-101

Buzzini P, Branda E, Goretti M, Turchetti B (2012) Psychrophilic yeasts from worldwide glacial habitats: diversity, adaptation strategies and biotechnological potential. *FEMS Microbiology Ecology* 82: 217-241

- Cane MA, Clement AC, Kaplan A, Kushnir Y, Pozdnyakov D, Seager R, Zebiak SE, Murtugudde R (1997) Twentieth century sea surface temperature trends. *Science* 275: 957-960
- Cary SC, McDonald IR, Barrett JE, Cowan DA (2010) On the rocks: the microbiology of Antarctic Dry Valley soils. *Nature Reviews* 8: 129-138
- Castello M (2003) Lichens of the Terra Nova Bay area, Northern Victoria Land. (Continental Antarctica). *Studia Geobotanica* 22: 3-54
- Chomnunti P, Bhat D, Jones EG, Chukeatirote E, Bahkali AH, Hyde KD (2012) Trichomeriaceae, a new sooty mould family of Chaetothyriales. *Fungal Diversity* 56: 63-76
- Claridge GGC, Cambell IB, Powell HKJ, Amin ZH, Balks MR (1995) Heavy metal contamination in some soils of the McMurdo Sound region, Antarctica. *Antarctic Science* 7(1): 9-14
- Clarke KR (1993) Non-parametric multivariate analysis of changes in community structure. *Australian Journal of Ecology* 18: 117-143
- Connel LB, Redman R, Craig S, Scorzetti G, Iszard M, Rodriguez R (2008) Diversity of soil yeasts isolated from South Victoria Land, Antarctica. *Microbial Ecology* 56: 448-459
- Convey P (2010) Terrestrial biodiversity in Antarctica—recent advances and future challenges. *Polar Science* 4: 135-147
- Convey P (2011) Antarctic terrestrial biodiversity in a changing world. *Polar Biology* 34: 1629-1641.
- Cooke RC, Whipps JM (1993) *Ecophysiology of fungi*. Oxford, UK: Blackwell Scientific.
- Cowan D, Chown SL, Convey P, Tuffin IM, Hughes K, Pointing S, Vincent WF (2011) Non-indigenous microorganisms in the Antarctic: assessing the risks. *Trends in Microbiology* 19: 540-548
- Crowe JH, Crowe LM, Chapman D (1984) Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. *Science* 223: 701-703
- De Hoog GS, Hermanides-Nijhof EJ (1977) The black yeasts and allied hyphomycetes. *Studies in Mycology* 151-222
- De Leo F, Urzì C, De Hoog GS (2003) A new meristematic fungus, *Pseudotaeniolina globosa*. *Antonie van Leeuwenhoek* 83(4): 351-360
- de los Ríos A, Wierzchos J, Sancho LG, Grube M, Ascaso C (2002) Microbial endolithic biofilms: a means of surviving the harsh conditions of the Antarctic. Proceedings of the Second European Workshop on Exo/Astrobiology, Graz, Austria, 16–19 September 2002 (ESA SP-518)

de los Rios A, Wierzbos J, Ascaso C (2014) The lithic microbial ecosystems of Antarctica's McMurdo Dry Valleys. *Antarct Science* 26:459-477

Decho, AW (2000) Exopolymer microdomains as a structuring agent for heterogeneity within microbial biofilms. In *Microbial Sediments*. Riding, RE, and Awramik, SM Eds. Springer Heidelberg, Germany, pp. 9-15

Dettman JR, Jacobson DJ, Taylor JW (2003) A multilocus genealogical approach to phylogenetic species recognition in the model eukaryote *Neurospora*. *Evolution* 57(12): 2703-2720

Duarte S, Cássio F, Pascoal C (2012) Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) in Microbial Ecology – Insights from Freshwaters. Centre of Molecular and Environmental Biology (CBMA), University of Minho, Braga, Portugal

Egidi E, De Hoog GS, Isola D, Onofri S, Quaedvlieg W, De Vries M, Verkley GJM, Stielow JB, Zucconi L, Selbmann L (2014). Phylogeny and taxonomy of meristematic rock-inhabiting black fungi in the Dothideomycetes based on multi-locus phylogenies. *Fungal Diversity* 65: 127-165

Ellis-Evans JC (1985) Microbial ecology in Antarctica. *Biologist* 32: 171-176

Ercolini D (2004) PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods* 56: 297-314

Faizutdinova RN, Suzina NE, Duda VI, Petrovskaya LE, Gilichinsky DA (2005) Yeasts isolated from ancient permafrost. In: Castello JD, Rogers SO (eds), *Life in Ancient Ice*. Princeton University Press, Princeton, pp. 118-126

Favero-Longo SE, Gazzano C, Girlanda M, Castelli D, Tretiach M (2011) Physical and chemical deterioration of silicate and carbonate rocks by meristematic microcolonial fungi and endolithic lichens (Chaetothyriomycetidae). *Geomicrobiology Journal* 28(8): 732-744

Feibelman TP, Cotty PJ, Doster MA, Michailides TJ (1998) A morphologically distinct strain of *Aspergillus nomius*. *Mycologia* 618-623

Felsenstein J (1985). Confidence limit on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791

Fenice M, Selbmann L, Zucconi L, Onofri S (1997) Production of extracellular enzymes by Antarctic fungal strains. *Polar Biology* 17: 275-280

Fernandez AS, Hashsham SA, Dollhopf SL, Raskin L, Glagoleva O, Dazzo FB, Hickey RF, Criddle CS, Tiedje JM (2000) Flexible community structure correlates with stable community function in methanogenic bioreactor communities perturbed by glucose. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 4058-4067

Fournier E, Giraud T, Albertini T, Brygoo Y (2005) Partition of the *Botrytis cinerea* complex in France using multiple gene genealogies. *Mycologia* 97: 1251-1267

- Frank R JR (1957) Storia dell'Antartide. Sansoni, Firenze, 268 pp
- Friedmann EI (1982) Endolithic microorganisms in the Antarctic cold desert. *Science* 215: 1045-1053
- Friedmann EI (1993) Antarctic microbiology. Friedmann EI (Ed), Wiley-Liss, New York, 634 pp
- Friedmann EI, McKay CP, Nienow JA (1987). The cryptoendolithic microbial environment in the Ross Desert of Antarctica: satellite transmitted continuous nanoclimate data, 1984 to 1986. *Polar Biology* 7: 273-287
- Friedmann EI, Weed R (1987) Microbial trace-fossil formation, biogenous and abiotic weathering in the Antarctic cold desert. *Science* 236: 703-705
- Friedmann EI, Hua M, Ocampo-Friedmann R (1988) Cryptoendolithic lichen and cyanobacterial communities of the Ross Desert, Antarctica. *Polarforschung* 58: 251-259
- Giraffa G, E Neviani (2001) DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. *The International Journal of Food Microbiology* 67(1-2): 19-34
- Gleeson D, Clipson N, Melville K, Gadd G, McDermott F (2005) Characterization of fungal community structure on a weathered pegmatitic granite. *Microbial Ecology* 50: 360-368
- Golubic S, Friedmann EI, Schneider J (1981) The lithobiontic ecological niche, with special reference to microorganisms. *Journal of Sedimentary Petrology* 51: 475-478
- Goodrich RP, Handel TM, Baldeschwieler JD (1988) Modification of lipid phase behavior with membrane-bound cryoprotectants. *Biochimica et Biophysica Acta* 938: 143-154
- Gorbushina AA (2003). Microcolonial fungi: survival potential of terrestrial vegetative structures. *Astrobiology* 3: 543-554
- Gorbushina AA (2007) Life on the rocks. *Environmental Microbiology* 9: 1613-1631
- Gorbushina AA, Beck A, Schulte A (2005) Microcolonial rock inhabiting fungi and lichen photobionts: evidence for mutualistic interactions. *Mycological Research*. 109: 1288-1296
- Gorbushina AA, Kotlova ER, Sherstneva OA (2008). Cellular responses of microcolonial rock fungi to long-term desiccation and subsequent rehydration. *Studies in Mycology* 61: 91-97
- Gorbushina AA, Krumbein WE (2000). Subaerial microbial mats and their effects on soil and rock. In *Microbial Sediment*, RE Riding & SM Awramik Eds, Springer –Verlag, Berlin pp. 161-170
- Gostinčar C, Muggia L, Grube M (2012) Polyextremotolerant black fungi: oligotrophism, adaptive potential, and a link to lichen symbioses. *Frontiers in Microbiology* 3: 390

- Green TGA, Schroeter B, Sancho LD (1999) Plant life in Antarctica. In: Pugnaire FI, Valladares F (eds.), *Handbook of Functional Plant Ecology*, Marcel Dekker Inc. Basel, New-York, pp: 495-543
- Grigioni P, De Silvestri L, Pellegrini A, Sarao R (1992) Some climatological aspects in the Terra Nova Bay Area, Antarctica. In: Colacino M, Giovanelli G, Stefanutti L (eds.), *Italian Research on Antarctic Atmosphere. Conference Proceedings, SIF*, 35: 97-121
- Grube M, Carinale M, Vieira De Castro J, Müller H, Berg G (2009) Species-specific structural and functional diversity of bacterial communities in lichen symbiosis. *The ISME Journal* 3: 1105-1115
- Gueidan C, Ruibal C, De Hoog GS, Schneider H (2011) Rock-inhabiting fungi originated during periods of dry climate in the late Devonian and middle Triassic. *Fungal Biology* 115(10): 987-996
- Gueidan C, Aptroot A, da Silva Cáceres ME, Badali H, Stenroos S (2014) A reappraisal of orders and families within the subclass Chaetothyriomycetidae (Eurotiomycetes, Ascomycota). *Mycological Progress* 13: 1027-1039
- Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* 52: 696-704
- Hale ME (1987) Epilithic lichens in the Beacon sandstone formation, Victoria Land, Antarctica. *Lichenologist* 19: 269-287
- Hammer, Ø, Harper, Dat, Ryan, Pd (2001) PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9 pp
- Harris CM (1998) Science and environmental management in the McMurdo Dry Valleys Southern Victoria Land, Antarctica. In: Priscu J (ed.), *Ecosystem Processes in a Polar Desert: the McMurdo Dry Valleys, Antarctica*. Antarctic Research Series, American Geophysical Union, Washington 72: 337-350
- Harutyunyan S, Muggia L, Grube M (2008) Black fungi in lichens from seasonally arid habitats. *Studies in Mycology* 61: 83-90
- Hawksworth DL (2001) The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research* 105: 1422-32
- Head IM, Saunders JR, Pickup RW (1998) Microbial evolution, diversity and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microbial Ecology* 35:1-21
- Heuer H, Hartung K, Wieland G, Kramer I, Smalla K (1999) Polynucleotide probes that target a hypervariable region of 16S rRNA genes to identify bacterial isolates corresponding to bands of community fingerprints. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1045-1049

Hibbett D, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, Huhndorf S, James T, Kirk PM, Lücking R, Thorsten Lumbsch H, Lutzoni F, Matheny PB, McLaughlin DJ, Powell MJ, Redhead S, Schoch CL, Spatafora JW, Stalpers JA, Vilgalys R, Aime MC, Aptroot A, Bauer R, Begerow D, Benny GL, Castlebury LA, Crous PW, Dai YC, Gams W, Geiser DM, Griffith GW, Gueidan C, Hawksworth DL, Hestmark G, Hosaka K, Humber RA, Hyde KD, Ironside JE, Kõljalg U, Kurtzman CP, Larsson KH, Lichtwardt R, Longcore J, Miadlikowska J, Miller A, Moncalvo JM, Mozley-Standridge S, Oberwinkler F, Parmasto E, Reeb V, Rogers JD, Roux C, Ryvarden L, Sampaio JP, Schüssler A, Sugiyama J, Thorn RG, Tibell L, Untereiner WA, Walker C, Wang Z, Weir A, Weiss M, White MM, Winka K, Yao YJ, Zhang N (2007) A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research* 111: 509-547

Hibbett D, Ohmana A, Glotzera D, Nuhna M, Kirkb P, Nilssonc RH (2011) Progress in molecular and morphological taxon discovery in Fungi and options for formal classification of environmental sequences. *Fungal Biology Reviews* 25(1): 38-47

Hogg ID, Wall DH (2011) Global change and Antarctic terrestrial biodiversity. *Polar Biology* 34:1625-1627

Holdgate MV (1977) Terrestrial ecosystems in the Antarctic. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological Science* 279: 5-25

Honegger R (2012) The symbiotic phenotype of lichen-forming ascomycetes and their endo- and epibionts. The Mycota – A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental System for Basic and Applied Research. *Fungal Association IX*, (Esser K, ed), pp. 288-339. Springer, Heilderberg, Germany

Hubka V, Réblová M, Řehulka J, Selbmann L, Isola D, De Hoog GS, Kolařík M (2014) *Bradomyces* gen. nov. (Chaetothyriales, Trichomeriaceae), a new ascomycete genus accommodating poorly differentiated melanized fungi. *Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology* 106: 979-992

Hughes KA, Cowan DA and Wilmotte A (2015) Protection of Antarctic microbial communities – ‘out of sight, out of mind’. *Frontiers in Microbiology* 6: 151

Hughes KW, Petersen RH, Lickey EB (2009) Using heterozygosity to estimate a percentage DNA sequence similarity for environmental species’ delimitation across basidiomycete fungi. *New Phytologist* 182(4): 795-798

Isola D, Selbmann L, De Hoog GS, Fenice M, Onofri S, Prenafeta-Boldú FX, Zucconi L, 2013. Isolation and Screening of Black Fungi as degraders of Volatile Aromatic Hydrocarbons. *Mycopathologia*, 175: 369-379

Jacobson ES (2000) Pathogenic roles for fungal melanins. *Clinical Microbiology Reviews* 13(4):708-717

- James SA, Collins MD, Roberts I (1996) Use of an rRNA internal transcribed spacer region to distinguish phylogenetically closely related species of the genera *Zygosaccharomyces* and *Torulaspora*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46: 189-194
- Jobb GA, von Haeseler A, Strimmer K (2004) Treefinder: a powerful graphical analysis environment for molecular phylogenetics. *BMC Evolutionary Biology* 4: 18
- Kappen L (1974) Response to extreme environments. In: Ahmadjian V, Hale EM (eds.), *The lichens*, Academic Press, New York, pp: 311-380
- Kappen L (1993) Lichens in the Antarctic region. In: Friedmann EI (ed.), *Antarctic Microbiology*. Wiley-Liss, New York: 433-490
- Kappen L (2000) Some aspects of the great succes of lichens in Antarctica. *Antarctic Science*, 12: 314-324
- Kemmling A, Kämper M, Flies C, Schieweck O, Hoppert M (2004) Biofilms and extracellular matrices on geomaterials. *Environmental Geology*. 46 (3-4): 429-435
- Koufopanou V, Burt A, Szaro T, Taylor JW (2001) Gene genealogies, cryptic species, and molecular evolution in the human pathogen *Coccidioides immitis* and relatives (Ascomycota, Onygenales). *Molecular Biology and Evolution* 18(7):1246-1258
- Kurtz DD, Bromwich DH (1985) A recurring, atmospherically-forced polynya in Terra Nova Bay. *Antarctic Research Series, Oceanology of the Antarctic Continental Shelf*, 43, edited by Jacobs SS, A.G.U., Washington, D. C., pp. 177 201
- Kurtzman CP, Robnett CJ, 2003. Phylogenetic relationships among yeasts of the “*Saccharomyces* complex” determined from multigene sequence analyses. *FEMS Yeast Research* 3: 417-432
- Le Gac M, Hood ME, Fournier E, Giraud T (2007) Phylogenetic evidence of host-specific cryptic species in the anther smut fungus. *Evolution* 61(1): 15-26
- Liu XC, Zhang Y, Yang M, Wang ZY, LV WZ (2007) Analysis of bacterial community structures in two sewage treatment plants with different sludge properties and treatment performance by nested PCR-DGGE method. *Journal of Environmental Sciences* 19: 60-66
- Liu YJ, Whelen S, Hall BD (1999) Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. *Molecular Biology and Evolution* 16: 1799-1808
- Lumbsch HT, Huhndorf SM (2007) Whatever happened to the pyrenomycetes and loculoascomycetes? *Mycological Research*. 111(9): 1064-74
- Lutzoni F, Kauff F, Cox JC, Mclaughlin D, Celio G, Dentinger B, Padamsee M, Hibbett D, James TY, Baloch E, Grube M, Reeb V, Hofstetter V, Schoch C, Arnold AE, Miadlikowska J, Spatafora J, Johnson D, Hambleton S, Crockett M, Shoemaker R, Sung G-H, Lucking R, Lumbsch T, O'Donnell K, Binder M, Diederich P, Ertz D, Gueidan C, Hansen K, Harris RC, Hosaka K, Lim Y-W, Matheny B, Ishida H, Pfister D, Rogers J, Rossman A, Schmitt I,

- Sipman H, Stone J, Sugiyama J, Yahr R, Vilgalys R (2004) Assembling the fungal tree of life: Progress, classification, and evolution of subcellular traits. *American Journal of Botany* 91: 1446-1480
- Maggi O, Persiani AM, Fabbria A, De Luca C, Lunghini D, Quadraccia L, Fanelli C (1991) Differenze nella composizione fosfolipidica di diversi taxa fungini. *Giornale Botanico Italiano* 125(3): 259.
- Manzoni M (2001) *La natura dell'Antartide*, Springer-Verlag Italia, 346 pp
- Marshall MN, Cocolin L, Mills DA, Vanderghenst JS (2003) Evaluation of PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of fungal communities in compost. *Journal of Applied Microbiology* 95: 934-948
- Marzorati M, Wittebolle L, Boon N, Daffonchio D, Verstraete W (2008) How to get more out of molecular fingerprints: practical tools for microbial ecology. *Environmental Microbiology* 10: 1571-1581
- McKay CP, Friedmann EI (1985) The cryptoendolithic microbial environment in the Ross Desert: temperature variations in nature. *Polar Biology* 4: 19-25
- Mertens B, Boon N, Verstraete W. (2005) Stereospecific effect of hexachlorocyclohexane on activity and structure of soil methanotrophic communities. *Environmental Microbiology* 7: 660-669.
- Meyer GH, Morrow MB, Wyss O (1962) Viable micro-organisms in a fifty year- old yeast preparation in Antarctica. *Nature* 196: 598
- Michaelsen A, Pinzari F, Ripka K, Lubitz W, Piñar G (2006) Application of molecular techniques for identification of fungal communities colonising paper material. *International Biodeterioration and Biodegradation* 58, pp. 133-141
- Möhlenhoff P, Müller L, Gorbushina AA, Petersen K (2001) Molecular approach to the characterisation of fungal communities: methods for DNA extraction, PCR amplification and DGGE analysis of painted art objects. *FEMS Microbiology Letters* 195: 169-173
- Moncalvo JM, Lutzoni FM, Rehner SA, Johnson J, Vilgalys R (2000) Phylogenetic relationships of agaric fungi based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Systematic biology* 49(2): 278-305
- Moore D, Novak Frazer LA (2002) *Essential Fungal genetics*. Springer- Verlag. Inc. New York p 357
- Moses V, Holm-Hansen O, Calvin M (1959) Non photosynthetic fixation of carbon dioxide by three microorganisms, *Journal of Bacteriology* 77: 70-78
- Mullis K, Faloona F, Scharf S (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51 (1): 263-273

- Muyzer G, De Waal EC, Uitterlinden AG (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S ribosomal RNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 695-700
- Muyzer G, Brinkhoff T, Nübel U, Santegoeds C, Schäfer H, Wawer C (1997) Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. In: *Molecular Microbial Ecology Manual*. 3.4.4: pp. 1-27. (Eds) Akkermans ADL, van Elsas JD, de Bruijn FJ (Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands)
- Neu TR (1996) Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiological Reviews* 60(1): 151-166
- Nienow JA, Friedmann EI (1993) Terrestrial lithophytic (rock) communities. In: Friedmann EI (ed.), *Antarctic Microbiology*. Wiley-Liss, New-York: 343-412
- Nikolcheva LG, Bärlocher F (2005) Seasonal and substrate preferences of fungi colonizing leaves in streams: traditional *versus* molecular evidence. *Environmental Microbiology* 7(2): 270-280
- Nilsson RH, Kristiansson E, Ryberg M, Hallenberg N, Larsson KH (2008) Intraspecific ITS variability in the kingdom Fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. *Evolutionary bioinformatics* online 4: 193
- Nilsson RH, Ryberg M, Abarenkov K, Sjökvist E, Kristiansson E (2009) The ITS region as a target for characterization of fungal communities using emerging sequencing technologies. *FEMS Microbiology Letters* 296(1): 97-101
- Nocker, A, Burr M, Camper K (2007) Genotypic microbial community proling: a critical technical review. *Microbial Ecology* 54: 276-289
- Norris TB, Wraith JM, Castenholz RW, Mcdermott TR (2002) Soil microbial community structure across a thermal gradient following a geothermal heating event. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 6300-6309
- Nylander JAA (2004) Mr Aic.pl. Programme distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University
- Olsen GJ, Woese C (1993) Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *FASEB Journal*, 7: 113-123
- Omelson, C, Pollard W, Ferris F (2006) Chemical and ultrastructural characterization of high arctic cryptoendolithic habitats. *Geomicrobiology Journal*. 23(3-4): 189-200
- Onofri S (1999). Antarctic microfungi. In: Seckbach J. (Ed.), *Enigmatic microorganisms and life in extreme environments*. Kluwer Academic Publishers, 325-336
- Onofri S, Tosi S (1992) *Arthrotrrys ferox* sp. nov. a springtail-capturing hyphomycete from Continental Antarctica. *Mycotaxon* 44: 445-451

- Onofri S, Friedmann EI (1998) Cryptoendolithic microorganisms in sandstone and pegmatite in the Northern Victoria Land. In: M Tamburini, R d'Avino, editors. *News Ital Biol Res Antarctica*. Camerino: Camerino University Press, 2: 45-51
- Onofri S, Pagano S, Zucconi L, Tosi S (1999) *Friedmanniomyces endolithicus* (Fungi, Hyphomycetes), anam. -gen. and sp.nov., from Continental Antarctica. *Nova Hedwigia*, 68: 175-181
- Onofri S, Fenice M, Cicalini AR, Tosi S, Magrino A, Pagano S, Selbmann L, Zucconi L, Vishniac HS, Ocampo-Friedmann R, Friedmann EI (2000) Ecology and biology of microfungi from Antarctic rocks and soil. *Italian Journal of Zoology* 67(suppl.1): 163-168
- Onofri S, Selbmann L, Zucconi L, Tosi S, Fenice M, Barreca D, Ruisi S (2005a) Studies on Antarctic fungi. *Polarnet Technical Reports* 1: 49-52
- Onofri S, Selbmann L, Zucconi L, Tosi S, De Hoog GS (2005b) The Mycota of Continental Antarctica. *Terra Antarctica Reports* 11: 37-42
- Onofri S, Zucconi L, Selbmann L, De Hoog GS, De Los Rios A, Ruisi S, Grube M (2007a) Fungal associations at the cold edge of life. In: Seckbach J.(ed.), *Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments*, Series: Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology. Springer-Verlag, Berlin, 450 pp
- Onofri S, Zucconi L, Tosi S (2007b) *Continental Antarctic Fungi*. IHW-Verlag, Eching bei München, 247 pp
- Onofri S, Selbmann L, Barreca D, Isola D, Zucconi L (2009) Do fungi survive under actual space conditions? Searching for evidence in favour of lithopanspermia. *Plant Biosystems* 143: S85-S87
- Onofri S, de la Torre R, de Vera JP, Ott S, Zucconi L, Selbmann L, Scalzi G, Venkateswaran K, Rabbow E, Horneck G (2012) Survival of rock-colonizing organisms after 1.5 years in outer space. *Astrobiology* 12: 508-516
- Orombelli G (1986) La prima spedizione del Programma Nazionale di Ricerche in Antartide. Osservazioni geomorfologiche. *Rivista Geografica Italiana* 93: 129-169
- Øvstedal DO, Lewis Smith RI (2001) Lichens of Antarctica and South Georgia. In: Øvstedal DO & Lewis Smith RI (eds.), *A guide to their identification and ecology*. *Studies in Polar Research*, University of Cambridge, pp: 4-5
- Page RDM (1996) Treeview: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 357-358
- Palmer RJ, Friedman EI (1988) Incorporation of inorganic carbon by Antarctic cryptoendolithic fungi. *Polarforschung* 58: 189-191
- Pamilo P, Nei M (1988) Relationships between gene trees and species trees. *Molecular Biology and Evolution* 5: 568-583

Parmesan C, Yohe G (2003) A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems *Nature* 421 pp. 37-42

Pielou E (1966) The measurement of diversity in different types of biological collections. *The Journal of Theoretical Biology*. 13: 131-144

Pimm SL (2008) Biodiversity: climate change or habitat loss – which will kill more species? *Current Biology* 18: 117-9

Pinna D, Salvadori O (1999) Biological growth on Italian monuments restored with organic or carbonatic compounds. Atti del Convegno “Of microbes and art”, Firenze 16-19 giugno 1999, pp. 149-154

Plummer C, Mcgeary D (1996) Physical geology: With interactive plate tectonics. Seventh Edition ISBN 13: 9780697266767

Potts M (1999) Mechanisms of desiccation tolerance in cyanobacteria. *European Journal of Phycology* 34: 319-328

Prenafeta-Boldú FX, Summerbell R, De Hoog GS (2006) Fungi growing on aromatic hydrocarbons: biotechnology’s unexpected encounter with biohazard? *FEMS Microbiology Reviews* 30: 109-130.

Pringle A, Baker DM, Platt JL, Ware JP, Latge JP, Taylor JW (2005) Cryptic speciation in the cosmopolitan and clonal human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *Evolution* 59(9): 1886-1899

Quaedvlieg W, Kema GHJ, Groenewald JZ, Verkley GJM, Seifbarghi S, Razavi M, Mirzadi Gohari A, Mehrabi R, Crous PW (2011) *Zymoseptoria* gen. nov.: a new genus to accommodate septoria-like species occurring on graminicolous hosts. *Persoonia* 26: 57-69

Quaedvlieg W, Binder M, Groenewald JZ, Summerell BA, Carnegie AJ, Burgess TI, Crous PW (2014) Introducing the Consolidated Species Concept to resolve species in the *Teratosphaeriaceae*. *Persoonia* 33: 1-40

Réblová M, Untereiner WA, Réblová K (2013) Novel evolutionary lineages revealed in the Chaetothyriales (Fungi) based on multigene phylogenetic analyses and comparison of ITS secondary structure. *PLoS ONE* 8:e63547

Riemann L, Winding A (2001) Community dynamics of free-living and particle-associated bacterial assemblages during a freshwater phytoplankton bloom. *Microbial Ecology* 42: 274-285

Rodrigues MG, Fonseca A (2003) Molecular systematic of the dimorphic ascomycete genus *Taphrina*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53: 607-616

Root TL, Price JT, Hall KR, Schneider SH, Rosenzweig C, Pounds JA (2003) Fingerprints of global warming on wild animals and plants. *Nature* 421: 57-60

Rosenberg NA (2002) The probability of topological concordance of gene trees and species trees. *Theoretical Population Biology* 61: 225-247

Ruibal C, Platas G, Bills GF (2005) Isolation and characterization of melanized fungi from limestone formation in Mallorca. *Mycological Progress* 4(1): 23-38

Ruibal C, Platas G, Bills GF (2008) High diversity and morphological convergence among melanised fungi from rock formations in the Central Mountain System of Spain. *Persoonia* 21: 93-110

Ruibal C, Gueidan C, Selbmann L, Gorbushina.A, Crous PW, Groenewald JZ, Muggia L, Grube M, Isola D, Schoch CL, Lutzoni F, De Hoog GS (2009) Phylogeny of rock inhabiting fungi related to Dothideomycetes. *Studies in Mycology* 64: 123-133

Ruisi S, Barreca D, Selbmann L, Zucconi L, Onofri S (2007) Fungi in Antarctica. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 6: 127-141

Russell NJ (1990) Cold adaption of microorganisms. *Philosophical Transactions of the Royal Society London B* 326: 595-611

Salemi M, Vandamme AM (2003) The phylogenetic handbook. A practical approach to DNA and protein phylogeny. Cambridge University Press, Cambridge, pp 430

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 74: 5463-5467

Schoch CL, Crous PW, Groenewald JZ, Boehm EWA, Burgess TI, De Gruyter J, de Hoog GS, Dixon LJ, Grube M, Gueidan C, Harada Y, Hatakeyama S, Hirayama K, Hosoya T, Huhndorf SM, Hyde KD, Jones EBG, Kohmeyer J, Kruys A, Li YM, Lücking R, Lumbush HT, Marvanová L, Mbatchou JS, McVay AH, Miller AN, Mugambi GK, Muggia L, Nelsen MP, Nelson P, Owensby CA, Phillips AJL, Phongpaichit S, Pointing SB, Pujade-Renaud V, Raja HA, Rivas Plata E, Robbertse B, Ruibal C, Sakayaroj J, Sano T, Selbmann L, Shearer CA, Shirouzu T, Slippers B, Suetrong S, Tanaka K, Volkmann- Kohlmeyer B, Wingfield MJ, Wood AR, Woudenberg JHC, Yonezawa H, Zhang Y, Spatafora JW (2009) A class-wide phylogenetic assessment of Dothideomycetes. *Studies in Mycology* 64: 1-15

Selbmann L, Onofri S, Fenice M, Federici F, Petruccioli M (2002) Production and structural characterization of the exopolysaccharide of the Antarctic fungus *Phoma herbarum* CCFEE 5080. *Research in Microbiology* 153: 582-592

Selbmann L, De Hoog GS, Mazzaglia A, Friedmann EI, Onofri S (2005) Fungi at the edge of life: cryptoendolithic black fungi from Antarctic Deserts. *Studies in Mycology* 51: 1-32

Selbmann L, De Hoog GS, Gerrits Van De Ende AHG, Ruibal C, De Leo F, Zucconi L, Isola D, Ruisi S, Onofri S (2008) Drought meets acid: three new genera in a Dothidealean clade of extremotolerant fungi. *Studies in Mycology* 61: 1-20

Selbmann L, Zucconi L, Ruisi S, Grube M, Cardinale M, Onofri S (2010) Culturable bacteria associated with Antarctic lichens: affiliation and psychrotolerance, *Polar Biology* 33: 71-83

- Selbmann L, Isola D, Fenice M, Zucconi L, Sterflinger K, Onofri S (2012) Potential extinction of Antarctic endemic fungal species as a consequence of global warming. *Science of the Total Environment* 438: 127-134
- Selbmann L, Grube M, Onofri S, Isola D, Zucconi L (2013) Antarctic Epilithic Lichens as Niches for Black Meristematic Fungi. *Biology* 2: 784-797.
- Selbmann L, Zucconi L, Onofri S, Cecchini C, Isola D, Turchetti B, Buzzini P (2014a) Taxonomic and phenotypic characterization of yeasts isolated from worldwide cold rock-associated habitats. *Fungal Biology* 118(1) :61-71
- Selbmann L, de Hoog GS, Zucconi L, Isola D, Onofri S (2014b) Black Yeasts From Cold Habitats. In: Buzzini P, Margesin R (eds) *Yeasts From Cold Habitats*. Springer-Verlag, Berlin, pp 173-189
- Selbmann L, Zucconi L, Isola D, Onofri S (2014c) Rock black fungi: excellence in the extremes, from the Antarctic to space. *Current Genetics* DOI 10.1007/s00294-014-0457-7
- Selbmann L, Turchetti B, Yurkov A, Cecchini C, Zucconi L, Isola D, Buzzini P, Onofri S, (2014d) Description of *Taphrina antarctica* f.a. sp. nov., a new anamorphic ascomycetous yeast species associated with Antarctic endolithic microbial communities and transfer of four *Lalaria* species in the genus *Taphrina*. *Extremophiles* 18(4): 707-21
- Selbmann L, Isola D, Egidi E, Zucconi L, Gueidan C, de Hoog GS, Onofri S (2014e) Mountain tips as reservoirs for new rock-fungal entities: *Saxomyces* gen. nov. and four new species from the Alps. *Fungal Diversity* 65: 167-182
- Sert HB, Sümbül H, Sterflinger K (2007a) Microcolonial fungi from antique marbles in Perge/Side/Termessos (Antalya/Turkey). *Antonie van Leeuwenhoek* 91 (3): 217-227
- Sert HB, Sümbül H, Sterflinger K (2007b) *Sarcinomyces sideticae*, a new black yeast from historical marble monuments in Side (Antalya, Turkey). *Botanical Journal of the Linnean Society* 154: 373-380
- Sert HB, Sümbül H, Sterflinger K, (2007c) A new species of *Capnobotryella* from monument surfaces. *Mycological Research* 111:1235-1241
- Shannon CE, Weaver W (1963) *The Mathematical Theory of Communication*. University of Illinois Press, Urbana, IL
- Shoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W, Fungal Barcoding Consortium (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *PNAS* 109: 6241-6246
- Simpson EH (1949) Measurement of Diversity. *Nature* 163: 688-688
- Smith RIL (2000) Plants of extreme habitats in Antarctica. In: Schroeter B, Schlensog M, Green TGA (eds.), *New Aspects in Cryptogamic Research: contributions in Honour of Ludger Kappen*. J. Cramer, Stuttgart, Berlin, pp: 405-419

Sneath PHA (1992) International code of nomenclature of bacteria: bacteriological code, 1990 revision. ASM Press, Washington, D.C.

Sokal RR, Rohlf FJ (1962) The comparison of dendrograms by objective methods. *Taxon* 11: 33-40

Staley TJ, Palmer F, Adams JB (1982) Microcolonial Fungi: Common Inhabitants on Desert Rocks?. *Science* 215: 1093-1095

Steig EJ, Schneider DP, Rutherford SD, Mann ME, Comiso JC, Shindell DT (2009) Warming of the Antarctic ice-sheet surface since the 1957 International Geophysical Year. *Nature* 457: 459-463

Sterflinger K (2006) Black Yeast and Meristematic Fungi: Ecology, Diversity and Identification. In: Yeast Handbook: Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts (Rosa C., Gabor P. eds). Springer, New York, 505-518

Sterflinger K, De Baere R, De Hoog GS, De Wachter R, Krumbein WE, Haase G (1997) *Coniosporium perforans* and *C.apollinis*, two new rockinhabiting fungi isolated from marble in the Sanctuary of Deloa (Cyclades, Greece). *Antoine van Leeuwenhoek* 72: 349-363

Sterflinger K, De Hoog GS, Haase G (1999) Phylogeny and ecology of meristematic ascomycetes. *Studies in Mycology* 43: 5-22

Sterflinger K, Prillinger H (2001) Molecular taxonomy and biodiversity of rock fungal communities in an urban environment (Vienna, Austria). *Antoine van Leeuwenhoek* 80: 275-286

Sterflinger K, Tesei D, Zakharova K (2012) Fungi in hot and cold deserts with particular reference to microcolonial fungi. *Fungal Ecology* 5: 453-462

Storrie-Lombardi MC, Williamson SJ (2010) Possible role of bacteriophage-mediated horizontal gene transfer on microbial adaptation to environmental stressors in polar ecosystems, in: *Polar Microbiology – The Ecology, Biodiversity and Bioremediation Potential of Microorganisms in Extremely Cold Environments*, eds A.K. Bej, J. Aislabie, and R.M. Atlas (Boca Raton, FL: CRC Press), 179-199

Takahata N (1989) Gene genealogy in three related populations: consistency probability between gene and population trees. *Genetics* 122: 957-966

Taylor JW, Jacobson DJ, Kroken S, Kasuga T, Geiser DM, Hibbett DS, Fisher MC (2000) Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal genetics and biology* 31(1): 21-32

Terauds A, Chown SL, Morgan F, Peat HJ, Watts DJ, Keys H, Convey P, Bergstrom DM (2012) Conservation biogeography of the Antarctic. *Diversity and Distributions* 18 726-741

Tesei D, Marzban G, Selbmann L, Isola D, Sterflinger K (2012) Monitoring of stress-related protein patterns in black fungi from hot and cold environments. *Fungal Biology* 116: 932-940

- Thomas CD, Cameron A, Green RE, Bakkenes M, Beaumont LJ, Williams SE (2004) Extinction risk from climate change. *Nature* 427: 145-8
- Tosi S, Begoña C, Gerdol R, Caretta G (2002) Fungi isolated from Antarctic mosses. *Polar Biology* 25: 262-268
- Tsuneda A, Hambleton S, Curraha RS (2011) The anamorph genus *Knufia* and its phylogenetically allied species in *Coniosporium*, *Sarcinomyces*, and *Phaeococcomyces*. *Botany* 89(8): 523-536
- Turchetti B, Goretti M, Branda E, Diolaiuti G, D'Agata C, Smiraglia C, Onofri A, Buzzini P (2013) Influence of abiotic variables on culturable yeast diversity in two distinct Alpine glaciers. *FEMS Microbial Ecology* 86: 327-340
- Turner J, Colwell SR, Marshall GJ, Lachlan-cope TA, Carleton AM, Jones PD, Lagun V, Reid PA, Iagovkina S (2005) Antarctic climate change during the last 50 years. *International Journal of Climatology* 25: 279-294
- Urzì C, Wollenzien U, Criseo G, Krumbein WE (1995) Biodiversity of the rock inhabiting microbiota with special reference to black fungi e black yeasts. In *Microbial Div. and Ecosystem Function* (Allsopp D., Colwell R.R., Hawksworth D.L. Eds.), CAB International, pp. 289-302
- Valášková V, Baldrian P (2009) Denaturing gradient gel electrophoresis as a fingerprinting method for the analysis of soil microbial communities. *Plant Soil Environment* 55 (10): 413-423
- Van Elsas JD, Duarte GF, Keijzer-Wolters A, Smit E (2000) Analysis of the dynamics of fungal communities in soil via fungal-specific PCR of soil DNA followed by denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods* 43: 133-151
- Vilgalys R, Hester M (1990) Rapid genetic identification e mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology* 172(8): 4238-4246
- Vincent W (2000) Evolutionary origins of Antarctic mycobiota: invasion, selection and endemism. *Antarctic Science* 12: 374-385
- Vishniac HS (1985) *Cryptococcus friedmannii*, a new species of yeast from the Antarctic. *Mycologia* 77: 149-153
- Vishniac HS (2006a) Yeasts biodiversity in the Antarctic. In: Rosa CA, Peter G (eds) *Biodiversity and ecophysiology of yeasts*. Springer, Berlin, pp 420-440
- Vishniac HS (2006b) A multivariate analysis of soil yeasts isolated from a latitudinal gradient. *Microbial Ecology* 52: 90-103.

von Wintzingerode F, Gobel UB, Stackebrandt E (1997) Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews* 21: 213-229

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, New York, pp. 315-322

Wimpenny J (2000) An overview of biofilms as functional communities. In *Community structure and co-operation in biofilms*. Allison DG, Gilbert P, Lappin-Scott HM, and Wilson M. Eds., Cambridge University Press, Cambridge, UK pp. 1-24

Wittebolle L, Vervaeren H, Verstraete W, Boon N (2008) Quantifying community dynamics of nitrifiers in functionally stable reactors. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 286-293

Wollenzien U, De Hoog GS, Krumbein WE, Urzı C (1995) On the isolation of microcolonial fungi occurring on and in marble and other calcareous rocks. *Science of the Total Environment* 167: 287-294

Zalar P, De Hoog GS, Gunde-Cimerman N (1999) *Trimmatostroma salinum*, a new species from hypersaline water. *Studies in Mycology* 43: 57-62

Zucconi L, Onofri S, Cecchini C, Isola D, Fenice M, Madonna S, Reboleiro-Rivas P, Selbmann L (2014) Mapping the lithic colonization at the boundaries of life in Northern Victoria Land, Antarctica. *Polar Biology* DOI 10.1007/s00300-014-1624-5

7. ODOGRAFIA

www.mna.it

<http://www.botany.duke.edu/fungi/mycolab>

<http://www.macrogen.com>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

http://users-birc.au.dk/biopv/php/fabox/alignment_joiner.php

<http://www.dbvpg.unipg.it>