

ABSTRACT

Nella presente ricerca sono stati analizzati campioni di licheni antartici provenienti da aree diverse della Terra Vittoria del Nord e del Sud (Antartide continentale), al fine di ottenere in coltura gli organismi ad essi associati. Altri campioni, raccolti in Antartide e in differenti località dell'Austria, appartenenti al complesso e discusso gruppo della *Lecanora polytropa*, che comprende anche la specie antartica endemica *L. fuscobrunnea*, sono stati analizzati allo scopo di delimitare il gruppo stesso. Per trattare al meglio questi due aspetti il lavoro è stato diviso in due parti: la prima relativa agli studi morfologici, fisiologici e molecolari condotti sulla parte coltivabile dei microrganismi associati ai licheni antartici, la seconda relativa all'analisi molecolare nell'ambito del gruppo *Lecanora polytropa*.

PARTE I

I licheni sono associazioni simbiotiche costituite da funghi (micobionti) e alghe verdi e/o cianobatteri (fotobionti). Grazie alla loro capacità di crescere molto lentamente e sopravvivere a lungo, anche in condizioni estreme, essi possono costituire una nicchia ecologica stabile per altri microrganismi. A differenza dei componenti simbiotici, studiati e caratterizzati in modo approfondito, studi specifici sugli altri componenti di tali comunità sono ad oggi piuttosto scarsi. Nel presente lavoro è stata effettuata un'analisi morfologica, fisiologica e molecolare della frazione coltivabile delle popolazioni fungine e batteriche isolate da licheni provenienti da differenti località dell'Antartide continentale. I risultati mettono in evidenza che i licheni rappresentano una nicchia estremamente ricca in grado di ospitare una grande diversità di microrganismi. L'analisi filogenetica condotta su isolati fungini e batterici ha evidenziato la presenza di nuovi taxa che verranno descritti in un prossimo futuro. Dai dati ottenuti emerge che la simbiosi lichenica dovrebbe essere più correttamente considerata una comunità che ospita un'ampia diversità di microrganismi.

PARTE II

Il genere *Lecanora*, incluso nell'ordine più grande tra i funghi lichenizzati (*Lecanorales*), è un esempio di un genere di licheni crostosi ampio ed eterogeneo. Nel presente lavoro è stata effettuato uno studio molecolare del gruppo *Lecanora polytropa*, basato sull'analisi delle sequenze ITS e RPB1 del micobionte. Lo studio include campioni epilitici

provenienti da più località montuose dell'Austria e dalle Valli Secche della Terra Vittoria del Sud, Antartide, da cui proviene la specie endemica *Lecanora fuscobrunnea*. L'analisi filogenetica mostra la presenza di clusters distinti e ben separati e supportati, suggerendo la natura polifiletica del gruppo *Lecanora polytropa*, nonostante le specie analizzate non siano morfologicamente distinguibili.

ABSTRACT

Antarctic lichen samples collected in different localities from Northern and Southern Victoria Land (continental Antarctica), were analyzed to isolate the culturable diversity of associated microorganisms. Different lichen samples, collected from Antarctica and different localities of Austrian mountains, belonging to the discussed *Lecanora polytropa* group, which include the antarctic endemic species *Lecanora fuscobrunnea*, were studied to define the group. The morphological, physiological and molecular analysis of the culturable fungal and bacterial populations and the molecular analysis of the *Lecanora polytropa* group are presented.

PART I

Lichens are symbiotic associations of fungi (mycobionts), green algae and/or cyanobacteria (photobionts). Since most lichens are long-living and slow growing organisms in diverse and sometimes extreme ecological conditions, they may provide a stable ecological niche for further microorganisms. Whereas the symbiotic components have been extensively described, the associated microorganisms inhabiting this niche has not been well characterized. A morphological, physiological and molecular analysis of the culturable fungal and bacterial populations isolated from lichens collected in different cold areas from continental Antarctica is presented. Results demonstrate that lichens represent an extremely rich “niche” hosting a wide diversity of microorganisms. The phylogenetic analysis of fungal and bacterial isolates shows the presence of new taxa which will be discussed in the next future. The lichen symbiosis might be thought as a community hosting a wide diversity of microorganisms.

PART II

The genus *Lecanora*, representing the largest order of lichenized fungi, *Lecanorales*, is an example of a large and heterogeneous crustose genus. A molecular phylogeny, based on ITS and RPB1 mycobiont sequences analyses, of the *Lecanora polytropa* group is presented. The study includes saxicolous members of the group collected from different locations of Austrian mountains; a further collection was made from the Dry Valleys (Southern Victoria Land, Antarctica) and include samples of the endemic species *Lecanora fuscobrunnea*. The phylogenetic analysis show the presence of distinct and well supported

clusters, suggesting the polyphyletic behaviour of the species belonging to the *Lecanora polytropha* group, although the species analyzed are not strongly morphologically different.



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA
Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e
Naturali

Dipartimento di Scienze Ambientali

Dottorato di Ricerca in Evoluzione Biologica e Biochimica
XIX CICLO

*Studi molecolari su licheni antartici
e microrganismi associati*

Settore scientifico-disciplinare: BIO/02

Coordinatore: Prof.ssa Lucia Mastrolia

Firma

Tutori: Prof.ssa Laura Zucconi

Dott.ssa Laura Selbmann

Firma

Firma

Dottoranda Dott.ssa Serena Ruisi

Firma

INDICE

1. INTRODUZIONE	
1.1 IL CONTINENTE ANTARTIDE	pag. 1
1.1.1 Antartide, clima e vegetazione	pag. 4
1.2 LA TERRA VITTORIA	pag. 10
1.2.1 La Terra Vittoria del Nord	pag. 10
1.2.2 Terra Vittoria del Sud: le Valli Secche di McMurdo	pag. 11
1.3 IL SUBSTRATO ROCCIOSO	pag. 14
1.3.1 Comunità microbiche	pag. 15
1.4 NATURA DELLA SIMBIOSI LICHENICA	pag. 17
1.4.1 La simbiosi lichenica in Antartide	pag. 22
1.4.1.1 Il successo dei licheni in Antartide	pag. 26
1.4.1.2 Colonizzazione endolitica dei licheni in Antartide	pag. 28
1.5 EVOLUZIONE DELLA SIMBIOSI LICHENICA	pag. 35
1.6 LICHENI: NICCHIA ECOLOGICA PER ALTRI ORGANISMI?	
UN APPROCCIO MULTILATERALE PER LO STUDIO DELLA SIMBIOSI	pag. 37
1.7 SISTEMATICA MOLECOLARE: METODI DI INDAGINE E PRINCIPI	pag. 42
1.7.1 Amplificazione dei geni di interesse	pag. 43
1.7.2 Sequenziamento	pag. 47
1.7.3 I geni ribosomali	pag. 49
1.7.4 Ricerca in Banca Dati	pag. 51
1.7.5 Allineamento delle sequenze	pag. 51
1.7.6 Ricostruzione della filogenesi	pag. 52
2. SCOPO DEL LAVORO	pag. 55
ANALISI MOLECOLARE DEI MICRORGANISMI ASSOCIATI AI LICHENI ANTARTICI	pag. 55
ANALISI MOLECOLARE NELL' AMBITO DEL GRUPPO <i>LECANORA POLYTROPA</i>	pag. 56
3. MATERIALI E METODI	pag. 57
3.1 SITI DI CAMPIONAMENTO E SPECIE LICHENICHE ANTARTICHE	pag. 57
ESAMINATE PER L' ISOLAMENTO DI MICRORGANISMI ASSOCIATI	

3.2 SPECIE LICHENICHE ESAMINATE NELL' AMBITO DEL GRUPPO	pag. 59
<i>LECANORA POLYTROPA</i>	
3.3 ISOLAMENTO DEI MICRORGANISMI ASSOCIATI AI LICHENI ANTARTICI	pag. 60
3.4 CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA DEGLI ISOLATI	pag. 63
3.5 PREFERENZE TERMICHE E COLTURALI	pag. 64
3.6 COMPOSIZIONE DEI SUBSTRATI UTILIZZATI	pag. 65
3.7 ESTRAZIONE DEL DNA DEGLI ISOLATI ANTARTICI	pag. 66
3.8 ESTRAZIONE DEL DNA DAI CAMPIONI APPARTENENTI AL GRUPPO <i>LECANORA POLYTROPA</i>	pag. 67
3.9 PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION)	pag. 69
3.10 ELETTROFORESI SU GEL D' AGAROSIO	pag. 74
3.11 PURIFICAZIONE DEI PRODOTTI DI PCR	pag. 76
3.12 SEQUENZIAMENTO DEL DNA	pag. 76
3.13 RICOSTRUZIONE DELLE SEQUENZE	pag. 77
3.14 CONFRONTO CON LE SEQUENZE NELLE BANCHE DATI	pag. 77
3.15 ALLINEAMENTO DELLE SEQUENZE	pag. 78
3.16 COSTRUZIONE DEGLI ALBERI FILOGENETICI	pag. 79
4. RISULTATI	pag. 80
4.1 TAXA ISOLATI DALLE SPECIE LICHENICHE ESAMINATE	pag. 80
4.2 CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA E FISIOLOGICA DEI FUNGHI NERI OTTENUTI IN COLTURA	pag. 83
4.2.1 Osservazioni morfologiche e preferenze colturali	pag. 83
4.2.2 Preferenze termiche	pag. 89
4.3 CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA E FISIOLOGICA DEI BATTERI OTTENUTI IN COLTURA	pag. 90
4.3.1 Osservazioni morfologiche	pag. 90
4.3.2 Preferenze termiche	pag. 92
4.4 ANALISI MOLECOLARE	pag. 94
4.4.1 Porzioni genomiche amplificate ottenute dai funghi neri	pag. 94
4.4.2 Porzioni genomiche amplificate ottenute dai batteri	pag. 96
4.4.3 Porzioni genomiche amplificate ottenute dai licheni del gruppo <i>L. polytropa</i>	pag. 97

4.5 RICERCA IN BANCA DATI	pag 100
4.5.1 Confronto in Banca Dati delle sequenze ottenute dai funghi neri	pag 100
4.5.2 Confronto in Banca Dati delle sequenze ottenute dai batteri	pag 103
4.5.3 Confronto in Banca Dati delle sequenze ottenute dai fotobionti	pag 103
4.6 ANALISI FILOGENTICA	pag 105
4.6.1 Filogenesi dei funghi neri studiati sulla base delle sequenze SSU	pag 105
4.6.2 Filogenesi dei funghi neri studiati sulla base delle sequenze ITS	pag 108
4.6.3 Filogenesi dei batteri studiati sulla base delle sequenze SSU	pag 108
4.6.4 Filogenesi dei fotobionti studiati sulla base delle sequenze ITS	pag 110
4.6.5 Filogenesi dei licheni del gruppo <i>Lecanora polytropa</i> studiati sulla base delle sequenze ITS e RPB1 del micobionte	pag 110
5. DISCUSSIONE	pag 120
ANALISI MOLECOLARE DEI MICRORGANISMI ASSOCIATI AI LICHENI ANTARTICI	pag 120
ANALISI MOLECOLARE NELL' AMBITO DEL GRUPPO <i>LECANORA POLYTROPA</i>	pag 128
6. CONCLUSIONI	pag. 131
ANALISI MOLECOLARE DEI MICRORGANISMI ASSOCIATI AI LICHENI ANTARTICI	pag. 131
Funghi neri associati ai licheni antartici	pag. 131
Batteri associati ai licheni antartici	pag. 132
ANALISI MOLECOLARE NELL' AMBITO DEL GRUPPO <i>LECANORA POLYTROPA</i>	pag. 135
BIBLIOGRAFIA	pag. 137

1 INTRODUZIONE

1.1 IL CONTINENTE ANTARTIDE

Già gli eruditi dell'antica Grecia, che avevano molte cognizioni circa le terre oltre i confini della loro patria mediterranea, sapevano che lontanissimo nel nord esisteva una vastissima, sterile e gelida regione, scarsamente popolata, che chiamavano *Arktos*, dalla costellazione di forma somigliante a un orso che splende nel cielo del settentrione. I Greci avevano familiarizzato con *Arktos*, la zona glaciale, principalmente attraverso le narrazioni dei viaggiatori, che per spirito d'avventura o per necessità di traffici, avevano visitato quelle lontane regioni. Poiché nel nord esisteva una massa di terra, i filosofi greci stabilirono che doveva esserle una anche all'estremo opposto. Questa supposta terra meridionale fu da loro detta *Antarktos* perché opposta all'orso settentrionale (*Arktos*). Oggi noi la conosciamo come "Antartide" (figura 1.1) (Frank, 1957).



Fig. 1.1 – Il continente Antartide.

L'Antartide, da sempre territorio misterioso e sconosciuto, è diventata solo negli ultimi due secoli parte del patrimonio culturale comune, grazie anche all'impegno rivolto alla ricerca nei campi più vari delle scienze naturali, cominciato con le esplorazioni scientifiche dei primi decenni del '900. A partire dal secondo conflitto mondiale infatti, il

continente antartico è stato oggetto di crescente interesse; il primo vero programma di attività scientifiche su scala continentale è iniziato nell'ultimo trentennio con la campagna antartica svolta coordinatamente da diverse nazioni e promossa dall'Anno Geofisico Internazionale (1957-58). Successivamente, grazie alla firma del *Trattato Antartico* (appuntamento storico avvenuto a Washington il 1° dicembre 1959), entrato in vigore nel 1961, l'Antartide è stata rivestita di un importantissimo ruolo che l'ha vista diventare un grande laboratorio dove poter svolgere diverse attività di ricerca scientifica. 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, e vedono addirittura nei ghiacci una "sfera di cristallo" in cui leggere il passato ed il futuro del pianeta. Ciò è principalmente dovuto alla posizione geografica del Continente e al suo grado di isolamento e di lontananza da ogni forma di inquinamento antropico.

Questo grande continente che si estende intorno al Polo Sud, quasi completamente situato oltre il 60° parallelo, ha raggiunto la sua attuale posizione polare circa 30 milioni di anni fa, dopo la frammentazione del supercontinente australe, chiamato Gondwana, di cui costituiva il settore centrale (figura 1.2).

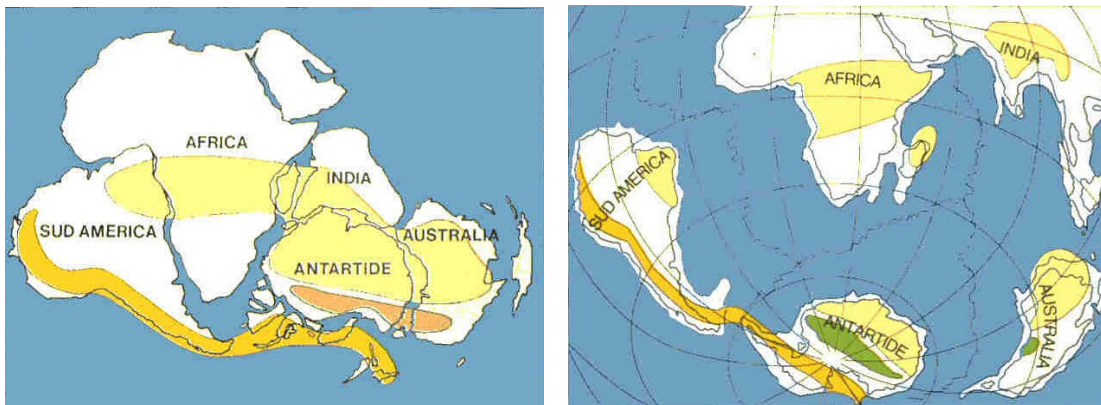


Fig. 1.2 – Frammentazione del continente australe e posizione attuale del continente Antartide.

Ad esso sono stati riconosciuti alcuni primati per molti versi identificabili come i caratteri specifici del Continente: il più freddo, il più secco, il più elevato (se si considerano i ghiacci) e il più depresso (se si considerano gli affioramenti rocciosi), il più disabitato e sicuramente il più nascosto e incontaminato grande frammento di litosfera

continentale del nostro pianeta. E' anche il più isolato dei continenti; le sue coste si trovano a 950 km dal Sudamerica, 2300 km dalla Tasmania, 2200 dalla Nuova Zelanda, 3600 km dall'Africa; è circondato dall'Oceano Australe, un anello ininterrotto che isola completamente l'Antartide. Il confine settentrionale delle masse d'acqua dell'oceano Australe è costituito da un limite netto, chiamato convergenza antartica o fronte polare; si tratta di una fascia marina subcircolare, situata fra le latitudini 52°-55° S, che si sposta stagionalmente per un centinaio di km circa. La superficie dell'oceano Australe si estende nella fascia subantartica, dove convergono gli oceani Atlantico, Indiano e Pacifico.

La superficie del Continente è di circa 14 milioni di km² (più o meno quanto l'Australia e l'Europa messe insieme), pari al 9% di tutte le terre emerse. Il contorno generale dell'Antartide è subcircolare, ma la proiezione verso nord della Penisola Antartica e le due grandi rientranze formate dai mari di Weddel e di Ross, rendono la forma meno regolare. Questi ultimi provengono da lati opposti, uno dal settore atlantico e il secondo dal settore pacifico, e delimitano un largo corridoio il cui fondo è in gran parte depresso sotto il livello del mare. Lungo il fianco del corridoio si innalza un imponente sistema montuoso, con cime elevate fino a 4500 m, che attraversa il continente per quasi 4000 km: è la catena Transantartica, la struttura montuosa più imponente dell'Antartide. Questa catena divide l'Antartide in due subcontinenti: l'Antartide Orientale, più grande e culminante a oltre 4000 m, e l'Antartide Occidentale, meno elevata e assai più piccola; mentre la prima poggia su substrati rocciosi in prevalenza ubicati al di sopra del livello del mare, la seconda poggia prevalentemente su fondali sottomarini.

L'Antartide è ricoperta da un immenso ghiacciaio, la calotta glaciale, il più vasto altopiano della Terra, che occupa il 98% della superficie del Continente. La sua formazione risale a circa 20 milioni di anni fa. Il suo spessore medio è di 2200 m, ma in più luoghi supera 4000 m, e culmina a 4700 m al centro del continente. Al di sotto della coltre di ghiaccio e di neve che copre quindi quasi ogni km quadrato del Continente, il terreno è formato da roccia. Vaste parti della calotta oltrepassano le coste e vanno a coprire i mari periferici e interni galleggiandovi sopra: sono le piattaforme glaciali fluttuanti. Anche il paesaggio marino quindi è dominato dai ghiacci. Moltissimi iceberg si formano per distacco dalle piattaforme fluttuanti, dal bordo della calotta e dai ghiacciai terrestri. Al contrario degli iceberg che galleggiano nelle acque dell'Artico, che sono simili a montagne ed hanno la parte superiore fatta più o meno a punta, quelli che si formano in Antartide (i più grandi al mondo) sono di strane forme ed hanno l'estremità superiore perfettamente piana (iceberg tabulari). Ma l'elemento più caratteristico di queste aree è

rappresentato dalla banchisa o *pack-ice*, una corona di ghiacci marini stagionali che si forma per il congelamento della superficie del mare e che subisce continue ed enormi variazioni di superficie dovute rispettivamente alla stagione invernale ed estiva. Ogni superficie ghiacciata subisce comunque grandi variazioni stagionali e questo ha enorme importanza ai fini del bilancio energetico della regione (il mare assorbe quasi completamente la radiazione solare mentre il ghiaccio la riflette in gran parte); la realtà fisica dominante e caratterizzante l'Antartide, costituita proprio dai ghiacci, condiziona infatti l'albedo della superficie terrestre e di conseguenza il bilancio termico globale. In termini di volume la quantità di ghiaccio presente in Antartide è stata stimata pari a circa 30 milioni di km³; questa enorme massa non soltanto determina le caratteristiche del tutto particolari di questo Continente, ma influenza profondamente gli oceani circostanti, il clima dell'emisfero meridionale e in termini ancora più generali, gli equilibri ambientali e climatici del nostro pianeta: una sua totale fusione, ad esempio, restituirebbe agli oceani uno strato di acqua dello spessore di 70 m circa.

I territori liberi dai ghiacci costituiscono delle eccezioni del paesaggio antartico e corrispondono a circa il 2% della superficie complessiva del Continente. Molti tratti costieri sono liberi dai ghiacci, mentre l'interno del Continente rimane scoperto solo per una piccolissima parte del territorio pari a meno dell'1% (Manzoni, 2001). Queste eccezioni vengono a volte indicate con il termine "oasi", o, se si trovano tra le montagne, "valli secche" (Pickard, 1986), e sono distribuite, come sopra accennato, lungo la costa e sulla catena montuosa Transantartica (Claridge & Campbell, 1985); le rocce nude presenti, modellate dal ghiaccio, assorbono stagionalmente un po' di calore solare, ma all'occhio umano queste aree appaiono come dei deserti rocciosi, i più freddi della terra. Un esempio è rappresentato dalle Valli Secche di McMurdo (Terra Vittoria del Sud): situate nel cuore della catena Transantartica fra 77° e 79° Lat. S, costituiscono il più vasto territorio libero dai ghiacci del Continente.

1.1.1 Antartide, clima e vegetazione

L'Antartide è il continente più freddo del nostro pianeta, il più ventoso, arido ed elevato, caratteristica quest'ultima che contribuisce all'instaurarsi delle basse temperature tipiche del continente. Molti fattori rendono le condizioni climatiche dell'Antartide così estreme, molto di più di quanto non si verifichi nell'Artide. Uno di questi fattori è costituito dalla formazione di depressioni atmosferiche che sotto la spinta di forti venti occidentali si

spostano verso est con elevata velocità. I flussi di aria fredda, provenienti dalle regioni interne, generano allora venti catabatici che si muovono rapidamente verso nord abbattendosi violentemente soprattutto sulle coste dell'Antartide Orientale, mentre all'interno si formano tormente di neve, che possono raggiungere 300 km orari, note con il nome di "blizzard". Inoltre, l'elevata altitudine media del continente, e le basse temperature riducono drasticamente l'umidità dell'aria.

Le temperature in particolare sono molto basse: nel luglio del 1983 nella base sovietica di Vostok, 78°28'S 106°48'E, in pieno altopiano centrale (3488 m di quota), la temperatura ha raggiunto circa -89° C. In generale il clima in Antartide è molto secco, per cui le precipitazioni nevose sono scarse; aumentano dall'interno verso la costa, passando da quantità trascurabili al centro del continente fino a 20-80 cm nelle zone costiere. Nel complesso esse producono un accumulo annuo di 140 mm di acqua (perfino inferiore a quello del deserto del Sahara). Freddo intenso e scarsità delle precipitazioni sono quindi gli elementi principali che caratterizzano il clima di questo continente, che viene spesso considerato un "deserto polare".

Per questi motivi l'Antartide viene definita come il Continente estremo o il Continente degli estremi, rappresentati appunto da temperatura, vento, acqua e, inoltre, luce. L'andamento di questi fattori ambientali e il paesaggio che caratterizza l'Antartide infatti, sono strettamente legati alla posizione di questo continente, posizione che determina un particolare andamento dell'illuminazione, caratterizzata nell'arco dell'anno da due periodi, uno prevalentemente diurno (estate australe, da ottobre/novembre a febbraio) ed uno prevalentemente notturno (Manzoni, 2001). Le basse temperature sono quindi dovute, oltre che all'elevata altitudine media e alla posizione geografica, al fatto che questo continente conosce ininterrottamente la notte per sei mesi all'anno. Vi è un altro motivo responsabile delle basse temperature ed è rappresentato dalla scarsità di radiazione solare assorbita dal Continente. Infatti, come già sopra accennato, circa l'80% della radiazione incidente sulla superficie ricoperta da ghiacci e neve viene rinviata indietro.

Vista l'enorme estensione di questo Continente, gli elementi climatici (radiazione solare, temperatura, umidità, venti, precipitazioni) mostrano una altrettanto enorme variabilità, sia fra le latitudini, sia fra le terre emerse e l'oceano. Per questi motivi in Antartide si possono distinguere differenti regioni climatiche (Holdgate, 1977; Onofri, 1999; Øvstedal & Lewis Smith, 2001), riconducibili principalmente a tre regioni: una regione di tipo subantartico, una di tipo marittimo (Antartide marittima), definita anche

zona fredda polare da Longton (1988a, 1988b) e una di tipo continentale (Antartide continentale) o Antartide glaciale (Longton, 1988a, 1988b).

La fascia subantartica comprende la maggior parte delle isole antartiche a nord del 60° parallelo: le isole South Georgia, Marion e Prince Edward, l'isola Crozet, e le isole Kerguelen, Heard, McDonald e Macquarie; è caratterizzata da un clima oceanico freddo, con temperature medie mensili superiori a quelle di congelamento per almeno 6 mesi all'anno e precipitazioni medie annuali che possono superare 1000 mm.

L'Antartide marittima comprende le isole South Sandwich, South Orkney, South Shetland, l'arcipelago Palmer e le coste a ovest e a nord-est della Penisola Antartica; il clima è di tipo marittimo freddo, prevalentemente umido nell'area più a nord e arido nell'area più a sud (Lewis Smith, 1984). In questa parte del continente infatti, Øvstedal & Lewis Smith (2001) distinguono due regioni situate una a nord e una a sud: le temperature medie mensili sono superiori a 10°C nel periodo più caldo (che varia da 1-3 a 3-4 mesi all'anno, spostandosi da sud a nord) e durante il periodo invernale raramente raggiungono valori inferiori a -15°C nella parte più a sud, o inferiori a -10/-12°C nella parte più a nord. Le precipitazioni annuali oscillano tra meno di 350 e più di 500 mm (Lewis Smith, 1984; Øvstedal & Lewis Smith, 2001). In questa fascia l'influenza del mare permette la presenza della maggior parte delle specie endemiche, in particolare di due piante vascolari, *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. (*Caryophyllaceae*) e la graminacea *Deschampsia antarctica* Desv. (*Poaceae*) (Onofri, 1999) (figura 1.3), e di un ampio numero di briofite e licheni (figura 1.4). Aptroot & van der Knaap (1993) hanno individuato circa 70 specie licheniche raccolte nell'isola Deception (isole South Shetland); tra queste 32 specie sembrano essere ristrette alla regione antartica e zone limitrofe mentre 29 specie si rinvencono sia in Antartide che nelle regioni temperate e Artiche. Le piante vascolari sopra accennate sono presenti nella Penisola Antartica e nelle isole South Shetland e South Orkney, dove le condizioni ambientali sono meno severe anche se, nelle isole South Orkney, con clima meno favorevole, entrambe le specie completano il loro ciclo riproduttivo in modo irregolare; nelle isole South Sandwich, addirittura, caratterizzate da peggiori condizioni ambientali, è presente soltanto la specie *D. antarctica* (Holdgate, 1977).



Fig. 1.3 – *Deschampsia antarctica* Desv. (*Poaceae*) (sinistra) e *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. (destra, barra = 10 cm). Foto Prof. Silvano Onofri, 2002.

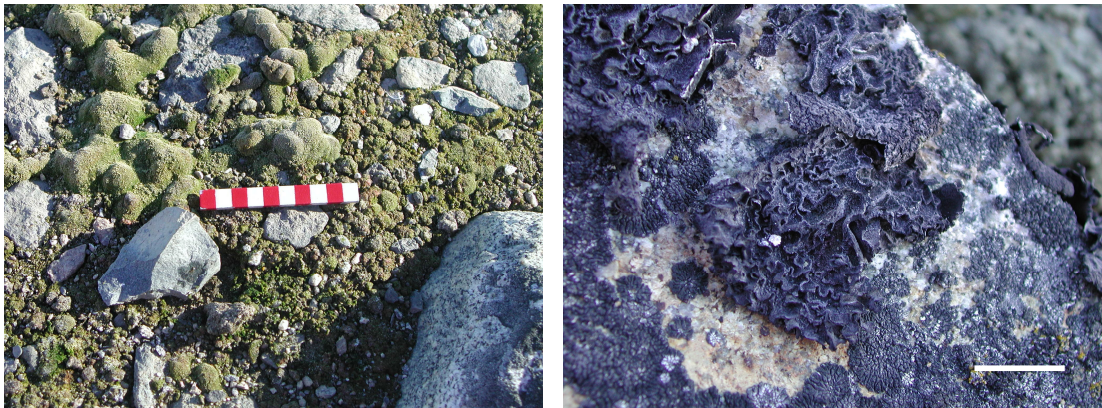


Fig. 1.4 – Diffusa copertura di muschio (sinistra, barra = 10 cm) (Onofri *et al.*, 2007a). Colonizzazione lichenica (destra, barra = 5 cm). Foto Prof. Laura Zucconi, 2004.

L'Antartide continentale infine, è la zona più estesa, costituita da gran parte del Continente Antartico, comprese le zone montuose ed i ghiacciai dell'entroterra e della costa, i nunataks dell'altopiano di ghiaccio (aree di roccia scoperta), e le Valli Secche, ed è interamente inclusa nel circolo polare (67° Lat. S). Negli altipiani interni di questa fascia le escursioni termiche annuali sono massime, possono superare 40°C. Sono estremi anche freddo e aridità, al punto che manca completamente acqua allo stato liquido; le precipitazioni sono limitate a poche decine di mm nell'arco di un anno. Questo è il più estremo dei climi terrestri. La vegetazione è essenzialmente costituita da licheni e muschi confinati nelle zone libere dai ghiacci (Pickard, 1986), se sono presenti umidità, calore e

possibilità di proteggersi dai venti. Nella maggior parte dei casi però i muschi presenti non sono in grado di completare il proprio ciclo vitale, e la riproduzione avviene prevalentemente in modo asessuale. I licheni invece sono in grado di sopravvivere anche alle condizioni estremamente aride e fredde di queste aree dell'Antartide e costituiscono quindi la parte prevalente della flora Antartica. Durante la stagione invernale il loro metabolismo è ridotto o addirittura completamente disattivato; in questo modo essi possono sopravvivere in uno stato disidratato e non appena le condizioni ambientali migliorano, con aumento della temperatura e conseguente disponibilità di acqua, i licheni possono idratarsi di nuovo e riprendere l'attività metabolica.

In Antartide, quindi, le condizioni prevalenti di bassa temperatura, scarsa disponibilità di acqua, scarse precipitazioni, forti venti, accompagnati da frequenti cicli di congelamento-scongelo, fenomeni di elevate sublimazione (a causa dei bassi valori di umidità) ed evaporazione, e alta incidenza di radiazione solare, soprattutto di radiazione ultravioletta, costituiscono nel loro insieme dei fattori limitanti per la flora e la fauna. Evidente è la differenza fra la "povertà" degli ecosistemi terrestri e la "fertilità di vita" dell'ambiente marino. In nessun'altra parte del pianeta vi è un maggiore contrasto tra questi due ecosistemi; anche se bisogna considerare che in Antartide il mare occupa più del doppio dell'area occupata dalle terre, che inoltre sono quasi completamente coperte da ghiacci permanenti. Nell'ambiente marino comunque le correnti portano in superficie una grande quantità di sali minerali e sostanze nutritive, mentre le basse temperature aumentano la solubilità dei gas. Queste condizioni generano un ambiente ricchissimo di fitoplancton, con conseguente abbondanza di zooplancton e di minuscoli crostacei, principalmente del genere *Euphausia*, e soprattutto della specie *E. superba* Dana, il gamberetto antartico (crostacei lunghi 5-7 cm che costituiscono il krill), nutrimento privilegiato dei grossi cetacei, come la megattera (*Megaptera novaeangliae* Borowski) e la balenottera azzurra (*Balaenoptera musculus*). Quest'ultima è il più grande animale esistente, lunga 20-30 metri e pesante 120-150 tonnellate. La ricca base alimentare costituita dal plancton permette l'esistenza di un'enorme quantità di pesci, che a loro volta nutrono orche e foche di cui la più diffusa è la foca Weddel (*Leptonychotes weddelli* Lesson), mentre la più grande è la foca elefante (*Mirounga angustirostris* Gill); quest'ultima può raggiungere 6,5 metri di lunghezza e pesare fino a 35 quintali. Queste condizioni determinano inoltre la presenza di alcune forme animali: tra gli uccelli marini si annoverano albatros e procellarie, gabbiani, e molte specie di pinguini. Di questi la specie "Imperatore" (*Aptenodytes forsteri* Gray) raggiunge il metro di altezza; abbandonate le

acque all'inizio dell'autunno, in marzo si dirige all'interno per nidificare, concentrandosi in colonie che possono contare anche 50.000 individui.

Sul continente invece, specialmente nelle zone interne, le condizioni sono molto ostili a causa della povertà del suolo e della scarsa disponibilità di acqua allo stato liquido. Per questi motivi, le comunità che popolano gli ambienti terrestri sono dominate essenzialmente da microrganismi (Friedmann, 1993) che hanno “conquistato” diverse forme di adattamento grazie alle quali riescono a “tollerare” le condizioni estreme in cui vivono. La loro distribuzione riflette ovviamente i caratteri ambientali e climatici delle varie zone geografiche del Continente, ma in ogni caso, le strategie di sopravvivenza sviluppate non sono state ancora definite del tutto (Ruisi *et al.*, 2007), e in alcune aree l'esistenza di qualche organismo addirittura stupisce. Le comunità che riescono a sopravvivere nelle zone più estreme sono disperse in tanti piccoli habitat che il ghiaccio ha mantenuto separati per tempi anche molto lunghi; questa sorta di segregazione è una caratteristica delle comunità terrestri di questo continente. La colonizzazione dei microrganismi infatti, è concentrata prevalentemente nelle zone prive di ghiaccio e le rocce costituiscono in questo senso un substrato molto importante.

In generale, si assiste ad una spiccata diminuzione della biodiversità all'aumentare della latitudine, in particolar modo nel passaggio dalla zona marittima a quella continentale e in quest'ultima all'aumentare dell'altitudine e della latitudine (Pickard & Seppelt, 1984; Kappen, 1993; Broady, 1996), a causa della sempre maggiore austerità delle condizioni ambientali ma anche dell'isolamento da possibili fonti di propaguli biologici quali Sud America e Australasia; briofite e licheni, ad esempio, mostrano una diminuzione dell'80% nel numero di specie tra la Penisola Antartica e l'Antartide continentale (Lindsey, 1940; Kappen, 1985a, 1985b). La diminuzione maggiore in termini di biodiversità è quella che si riscontra nelle Valli Secche di McMurdo, Terra Vittoria del Sud (Schwarz *et al.*, 1992; Green *et al.*, 1992).

L'Antartide quindi, costituisce per le ricerche ecologiche di base un modello di studio incomparabile. Infatti, essa fornisce molti ecosistemi microbici di complessità ben inferiore rispetto a quelli presenti altrove a più alte latitudini, a causa del numero ridotto dei componenti e dell'assenza di interazioni con piante ed animali. Questi ecosistemi semplificati offrono l'opportunità di elaborare e verificare modelli realistici per lo studio dei processi microbici, quali le interazioni tra le specie ed i flussi di energia in un sistema naturale e di ricavarne principi generali, utili per comprendere altrove ecosistemi più complessi. Inoltre, l'isolamento quasi assoluto che caratterizza alcune zone dell'Antartide,

quali le zone desertiche della Terra Vittoria o i sedimenti dei laghi perennemente ghiacciati, ha consentito agli organismi ivi presenti di evolvere senza scambi con il resto del pool genico globale; questo fattore assieme alla forte pressione selettiva e la conseguente radiazione adattativa, rendono molto elevata la possibilità dello stabilirsi in tali zone dell'Antartide di endemismi microbici (Vincent, 2000).

1.2 LA TERRA VITTORIA

La Terra Vittoria (Victoria Land) 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 compresa tra 72°4'S e 164°8'E; 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), che corrispondono anche ad una separazione biogeografica tra gli organismi che occupano questo territorio. L'area della Terra Vittoria del Nord è situata tra 71° e 76°S, e abbraccia siti come Terra Nova Bay, Edmonson Point, Kay Island, Inexpressible Island, mentre l'area di Terra Vittoria del Sud si trova tra 76° e 78°S e comprende le caratteristiche Valli Secche di McMurdo.

1.2.1 La Terra Vittoria del Nord

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°C/-30°C durante il mese più freddo (agosto), con medie annuali comprese tra -17°C/-19°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). All'interno della Terra Vittoria del Nord si trova il territorio di Baia Terra Nova (dove è situato il campo di ricerca italiano); a causa della presenza di molti ghiacciai che mettono in comunicazione il plateau interno con la costa, Baia Terra Nova 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). Baia Terra Nova e la Terra Vittoria del

Nord in generale, costituiscono in ogni caso una zona favorevole per le esplorazioni dei ricercatori poiché presentano ampie superfici libere dai ghiacci e una grande varietà di substrati per la colonizzazione da parte dei microrganismi (differenti tipi di granito, rocce vulcaniche, basalti ecc.) (Orombelli, 1986) (figura 1.5). Molto più severe sono le condizioni climatiche che caratterizzano la Terra Vittoria del Sud e in particolare le Valli Secche di McMurdo.

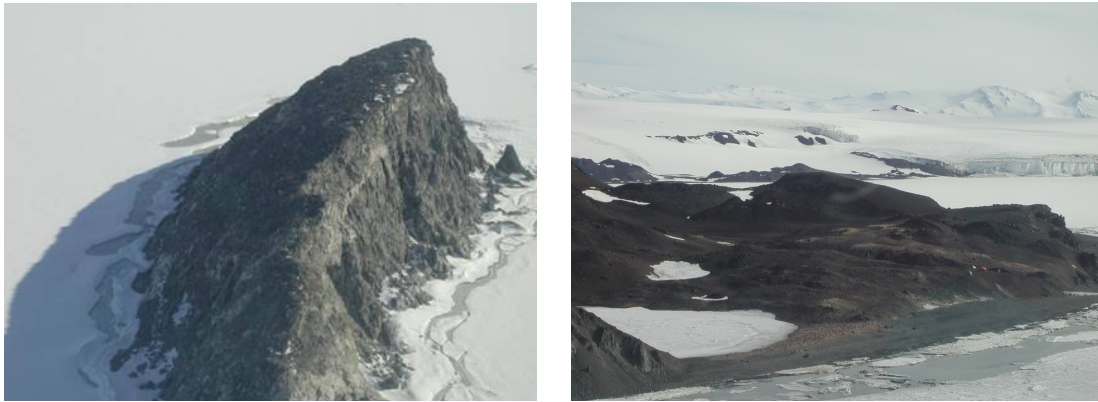


Fig. 1.5 – Kay Island (sinistra) e Edmonson Point (destra), Terra Vittoria del Nord, Antartide continentale (Onofri *et al.*, 2007a).

1.2.2 Terra Vittoria del Sud: le Valli Secche di McMurdo

Le Valli Secche di McMurdo, 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 rocciose e valli glaciali, o "valli secche" (Ferrar, 1905; Shackleton, 1909), 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, con 4800 km² di superficie, 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. All'interno sono presenti

laghi (perennemente coperti di ghiaccio) e corsi d'acqua come il fiume Onyx, il più lungo dell'Antartide (figura 1.6).



Fig. 1.6 – Formazioni del Beacon Supergroup e Battleship Promontory (sinistra), Alatna Valley, Convoy Range (destra); Terra Vittoria del Sud, Antartide continentale.

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. In entrambi i casi la maggior parte della neve accumulata sublima (a causa dei bassi valori di umidità) o viene

allontanata dai venti, ma se la temperatura della superficie delle rocce supera 0°C, una parte della neve si scioglie e penetra all'interno (Friedmann, 1978; Nienow *et al.*, 1988), diventando quindi disponibile per gli organismi che si sviluppano nel substrato.

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. In effetti a una superficiale osservazione certi aspetti di questa regione rimandano più a immagini di altri pianeti che non a paesaggi terrestri. E in ciò vi è qualcosa di vero perché le condizioni ambientali e molti dei fenomeni naturali che vi si osservano, non hanno l'eguale altrove sul nostro pianeta.

Nonostante il paesaggio che caratterizza questa regione sia per certi aspetti "drammatico", esso dà luogo ad una vista unica, con un alto valore estetico. Con l'arrivo della primavera antartica, ancor prima che il sole si levi alto sull'orizzonte per rischiarare l'estate con la luce di un giorno lungo tre mesi, giungono in queste valli molti ricercatori. Le attrattive per la scienza non mancano: animali microscopici al vertice della catena alimentare; organismi che sono sopravvissuti alla crioessiccazione; imponenti lastre di roccia che altrove sarebbero ricoperte dalla vegetazione; testimonianze dell'andamento climatico del passato celate nella cenere di antichi vulcani. A unire però gli esperti di tante discipline è un interesse comune: questi luoghi austeri, rimasti quasi immutati in milioni di anni, permettono di esaminare non solo un angolo insolito della terra, ma anche di esplorare i meandri remoti del tempo. Una quantità delle specie presenti in queste aree fu scoperta a metà degli anni 70 da una coppia di microbiologi (Imre Friedmann e la moglie Roseli-Ocampo). Su una dorsale che incombe sulla Victoria Valley, essi trovarono a sorpresa una comunità di alghe, funghi e batteri microscopici che vivono all'interno delle rocce, precisamente fra i granelli di arenaria, circa 1 mm e mezzo sotto la superficie, dove riescono a prendere un po' di luce e di umidità e a trarre nutrimento dal minerale che li racchiude. Quei minuscoli frammenti di vita hanno talvolta migliaia di anni, un'età superiore a quella degli alberi più maestosi delle più antiche foreste.

Negli ultimi anni le conoscenze sugli organismi che occupano questa regione dell'Antartide sono notevolmente aumentate (Broady, 1987a, 1987b; Friedmann *et al.*, 1988; Broady, 1989a, 1989b; Onofri & Tosi, 1992; Broady, 1993; Castello & Nimis, 1995a; Inoue, 1995; Seppelt *et al.*, 1995, 1996; Broady, 1996, 1998; 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; Adams *et al.*,

2006), e sono ancora oggi in un entusiasmante stato di crescita. 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.

1.3 IL SUBSTRATO ROCCIOSO

Caratteristica peculiare della biologia del continente Antartico è il ruolo svolto dalle rocce come substrato per la vita terrestre. Nell'Antartide marittima, caratterizzata da un clima relativamente mite, la superficie rocciosa è colonizzata prevalentemente da licheni epilitici, che si sviluppano sulla superficie. Procedendo invece verso l'interno del Continente, dove le condizioni ambientali sono decisamente meno favorevoli, la superficie delle rocce risulta essere quasi ovunque priva di "vita" e gli organismi presenti si sviluppano all'interno di microscopiche nicchie al di sotto della superficie rocciosa. Queste particolari forme di vita, dette endolitiche (che vivono all'interno delle rocce), si sono adattate alle condizioni ambientali estremamente sfavorevoli sopra discusse.

I microrganismi endolitici più studiati sono quelli che vivono nel Deserto di Ross, all'interno delle rocce di arenaria del *Beacon Supergroup*. I grani che costituiscono questa formazione rocciosa sono composti essenzialmente di quarzo (SiO_2) (Friedmann, 1982), ma sono presenti anche ossidi ed idrossidi di ferro, da cui dipende la colorazione delle rocce, colorazione che va dal giallo al marrone (Weed & Ackert, 1986; Friedmann & Weed, 1987). Il tipo e la quantità di depositi di ferro sembrano influenzare la colonizzazione da parte dei microrganismi, poiché in grado di assorbire luce e quindi calore; per questo motivo rocce troppo chiare risulterebbero eccessivamente fredde. La superficie delle rocce infine, è coperta da una crosta silicea dello spessore di 1 mm circa, che si forma per l'accumularsi di polvere portata dal vento; probabilmente questa crosta facilita la colonizzazione stabilizzando la superficie stessa e limitando l'erosione ad opera del vento.

La temperatura nelle rocce, e quindi il nanoclima risultante, dipendono 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 (Friedmann *et al.*, 1987), mentre in estate, quando le condizioni climatiche sono ottimali per i processi

biologici, la temperatura è più che altro funzione dell'orientamento della roccia; sulla superficie esposta a nord infatti, la temperatura può essere addirittura 20°C superiore alla temperatura dell'aria, sulla superficie esposta a sud invece la differenza è di circa 8°C e sulla superficie orizzontale di 12°C (Kappen *et al.*, 1981; Nienow *et al.*, 1988). Queste condizioni limitano la colonizzazione microbica alle superfici per così dire “calde”, cioè quelle esposte a nord e quelle orizzontali, mentre quelle esposte a sud e quelle verticali risultano per lo più sterili, prive di forme di vita.

Nel substrato roccioso che i microrganismi riescono a colonizzare, sono presenti i nutrienti inorganici necessari per la loro sopravvivenza. I composti dell'azoto sotto forma di nitrati e ammonio si trovano generalmente nei pochi mm dello strato roccioso superiore (Friedmann & Kibler, 1980), si depositano sulle rocce come precipitazioni umide e secche e vengono probabilmente fissati in modo abiotico dall'atmosfera.

1.3.1 Comunità microbiche

In realtà, gli habitat offerti dalle rocce per la crescita dei microrganismi sono diversi (Friedmann & Ocampo-Friedmann, 1984) (figure 1.7 e 1.8). Il primo partendo dalla superficie è l'habitat **epilitico**, ed è 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** (figura 1.8) colonizzano spaccature e fessure già esistenti di rocce che hanno subito una qualche forma di erosione. I **criptoendolitici** (vedi figura 1.12 pag. 30) infine, vivono negli interstizi di rocce porose (compresi i tunnel lasciati dagli organismi euendolitici), completamente al di sotto della superficie rocciosa (Golubic *et al.*, 1981). Poiché le comunità microbiche endolitiche dipendono per la loro sopravvivenza dal processo di fotosintesi, soltanto rocce traslucide costituiscono un substrato possibile per la colonizzazione, e limitatamente a pochi mm al di sotto della superficie.

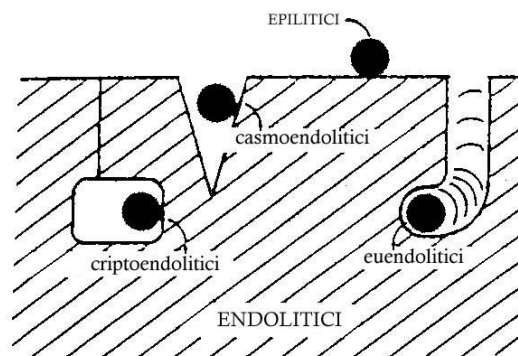


Fig. 1.7 – Schema di classificazione della vita nelle rocce (Golubic *et al.*, 1981).

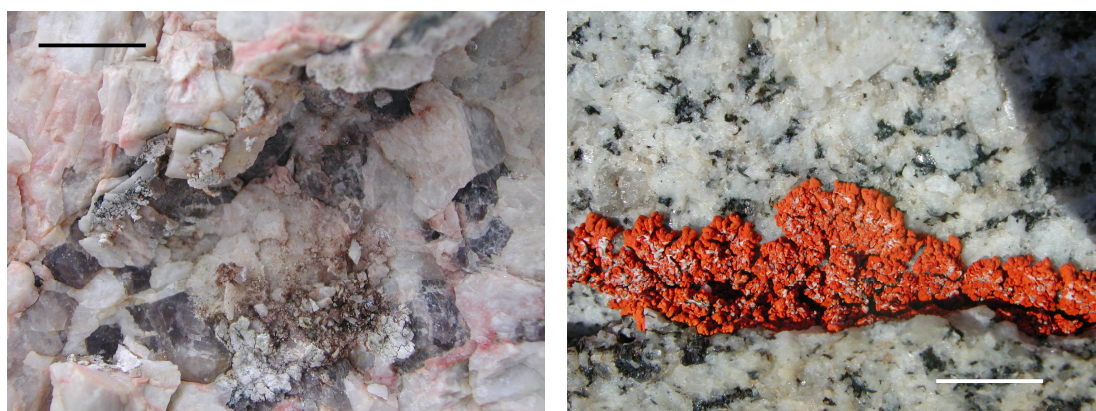


Fig. 1.8 – Esempio di lichene casmoendolitico (sinistra) cresciuto in una spaccatura verticale su granito e tallo di *Xanthoria elegans* (Link) Th. Fr. (destra) cresciuto in una fessura su granito (barre = 5 mm) (Onofri *et al.*, 2007a).

Per quanto riguarda la biologia del Deserto di Ross in particolare, essa è quella tipica dei deserti estremi; qui si raggiunge, infatti, il limite estremo per le forme di vita (Nienow & Friedmann, 1993), e le comunità di microrganismi formano prevalentemente quel particolare ecotipo, detto criptoendolitico o casmoendolitico, mediante la colonizzazione di interstizi all'interno di rocce porose (prevalentemente arenaria) (Golubic *et al.*, 1981; Nienow & Friedmann, 1993; de los Ríos *et al.*, 2002, 2004, 2005). Quindi, mentre la vita sulla superficie delle rocce è costituita da pochi licheni che si accrescono in nicchie protette, la forma di vita dominante è rappresentata da microrganismi endolitici (Friedmann & Ocampo, 1976; Friedmann, 1982; Friedmann *et al.*, 1988; Friedmann & Koriem, 1989; Kappen, 1993; Nienow & Friedmann, 1993; Wierzchos & Ascaso, 2002).

L'interno delle rocce costituisce per questi microrganismi una nicchia "privilegiata" all'interno della quale si crea un *nanoclima* (clima di spazi dell'ordine del millimetro) che permette l'esistenza di comunità microbiche (Nienow & Friedmann, 1993) quando le condizioni ambientali si fanno estreme.

Lo studio del substrato roccioso ha portato alla descrizione di cinque tipi di comunità criptoendolitiche, la prima dominata da alghe eucariote e funghi (**Comunità dominata da licheni**), la seconda solo da alghe cloroficee (**Comunità di *Hemichloris***) e le restanti da cianobatteri (**Comunità Rossa di *Gloeocapsa***, **Comunità di *Hormathonema***, ***Gloeocapsa*** e **Comunità di *Chroococcidiopsis***).

1.4 NATURA DELLA SIMBIOSI LICHENICA

Quando si parla di licheni ci si riferisce al fenotipo simbiotico di funghi specializzati che per la loro sopravvivenza acquisiscono carboidrati da una popolazione di microalghe o cianobatteri mediante una simbiosi mutualistica obbligata (Hawksworth & Honegger, 1994; Honegger, 1998). Essi possono essere interpretati come dei mini-ecosistemi (Farrar, 1976) costituiti dall'intima unione tra due diversi organismi viventi: un fungo (micobionte) ed un'alga (fotobionte o ficobionte). Delle circa 80000 specie fungine accettate nel Dictionary of the Fungi, 13.500 sono lichenizzate, pari a poco meno del 20% di tutti i funghi ad oggi conosciuti (Hawksworth *et al.*, 1995). I funghi che formano la simbiosi lichenica (detti lichenizzati) rappresentano un gruppo piuttosto variegato; alcuni appartengono a gruppi in cui tutti i membri sono lichenizzati, mentre altri appartengono a gruppi che contengono anche funghi non lichenizzati. Il 98% dei funghi lichenizzati è rappresentato da **Ascomiceti**, ossia da quei funghi che si riproducono mediante la produzione di spore contenute in cellule a forma di sacco (aschi), più raramente da **Basidiomiceti** (0,4%), o forme anamorfe (1,6%) costituite in parte da celomiceti e ifomiceti (Honegger, 1996a). I fotobionti sono in genere alghe verdi unicellulari (*Chlorophyceae*, 85%) appartenenti al genere *Trebouxia*, o, meno frequentemente, pluricellulari filamentose (*Trentepohlia*). In alcune specie licheniche (10%), il fotobionte abituale è un cianobatterio (generi *Peltigera*, *Collema*, *Leptogium*).

Il nome delle diverse specie di licheni fa sempre riferimento alla componente fungina, secondo quanto stabilito dall'International Code of Botanical Nomenclature

(Greuter *et al.*, 2000), poiché ogni specie può essere formata soltanto da un determinato fungo, che inoltre è il solo partner che mantiene la capacità di riprodursi sessualmente. Alghe e cianobatteri invece mantengono i rispettivi nomi in quanto la maggior parte di essi è in grado di unirsi in simbiosi con specie fungine diverse. Alcuni esperimenti di isolamento della componente fungina hanno dimostrato come la maggior parte dei funghi in grado di formare una simbiosi lichenica sia moderatamente specifica nei confronti del fotobionte e quindi possa accettare più specie algali (Wang-Yang & Ahmadjian, 1972; Friedl, 1987; Tschermak-Woess, 1988; Ahmadjian, 1993; Beck, 2002) o altamente specifici, accettando un'unica specie algale (Friedl, 1989; Ihda *et al.*, 1993; Honegger, 1996b).

La simbiosi non va però considerata come un semplice “mix” tra organismi diversi, bensì essa porta alla formazione di un “corpo lichenico” (tallo) che è completamente differente dai due partners isolati. Il tallo lichenico può assumere diversa morfologia, ed è in base a questa che si possono distinguere tre forme di crescita principali (figura 1.8):

licheni foliosi: il tallo, che si stacca almeno parzialmente dal substrato, è costituito da strutture a forma di lobo, più o meno parallele al substrato su cui si sviluppano e al quale aderiscono tramite speciali strutture chiamate rizine (figura 1.9, sinistra);

licheni crostosi: il tallo è strettamente appiattito sul substrato (roccia, cemento, corteccia, ecc.), con l'aspetto di una crosta laminare a contorno grossolanamente e irregolarmente circolare (figura 1.9, centro);

licheni fruticosi: il tallo aderisce al substrato con la base mentre la parte rimanente, ascendente o pendula, si sviluppa perpendicolarmente al substrato, si presenta spesso a forma di piccolo cespuglio ed è più o meno ramificata (figura 1.9, destra).



**Fig. 1.9 – *Umbilicaria decussata* (Vill.) Zahlbr. (sinistra);
Lecanora fuscobrunnea Dodge & Baker (centro); *Usnea antarctica* Du Rietz (destra).
Foto Prof. Laura Zucconi, 2004).**

Funghi e alghe (e/o cianobatteri) possono unirsi in simbiosi in modi diversi: possono semplicemente coesistere (come in alcune forme crostose) o, come nella maggior parte dei casi, formare una struttura altamente organizzata (tipica di licheni foliosi e fruticosi e di alcuni licheni crostosi) che senza un'attenta analisi appare come una singola entità. In realtà in questa struttura si può individuare una precisa stratificazione: si distingue, partendo dall'esterno, uno strato corticale (**cortex superiore**) composto da ife molto appressate tra loro, la cui funzione principale consiste nel garantire la protezione della componente algale sottostante; questo strato può assumere una colorazione varia e più o meno intensa con la funzione di schermo a difesa dei pigmenti fotosintetici del fotobionte. E' una zona inoltre coinvolta nell'assorbimento passivo di acqua e nutrienti presenti in atmosfera, che vengono poi trasmessi alle cellule del fotobionte attraverso la parete cellulare delle ife fungine; infine, conferisce al tallo resistenza meccanica (caratteristica utile in ambienti come quelli dell'Antartide vista la presenza di forti venti). Inferiormente al cortex è presente lo **strato algale** (strato gonidiale), formato da cellule algali intrecciate ad ife a parete sottile. Questo strato permette gli scambi gassosi della popolazione algale ed è qui che interagiscono maggiormente i due simbionti. Al di sotto, si estende la **medulla**, uno spesso strato di ife gelatinizzate ed incolori, lassamente intrecciate, che probabilmente costituisce una zona di riserva ricca di gocce di grasso. Infine, un ultimo strato corticale delimita la pagina inferiore del tallo; questo strato, chiamato **cortex inferiore**, ha una struttura del tutto simile a quella dello strato corticale superiore, ma è più sottile, ha una colorazione quasi sempre diversa ed è ricoperto di esili prolungamenti (**rizine**), per mezzo dei quali il lichene aderisce al substrato su cui si accresce (figura 1.10).

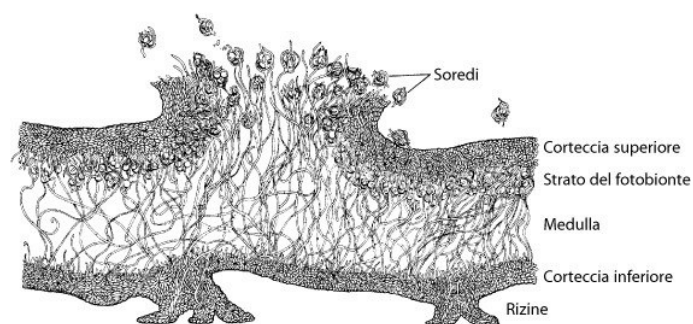


Fig. 1.10 – Sezione di un tallo lichenico.

La morfologia tipica del lichene non appartiene, quindi, ai due componenti presi singolarmente ma è il risultato di uno sviluppo che non mostra continuità con i partners da cui la simbiosi si origina. Una volta che i due microrganismi simbiotici si *sommano*, infatti, il tallo risultante presenta proprietà emergenti che implicano un livello di organizzazione secondaria superiore a quello dei singoli organismi (micobionte e fotobionte) e ricorda dal punto di vista morfologico ed anatomico la struttura delle piante. Anche se considerare i licheni come piante è del tutto scorretto perché costituiti da due organismi di cui quello predominante è, in realtà, un fungo, bisognerebbe non sottovalutare il fatto che tutte le piante si sono evolute da organismi simbiotici dove il simbionte fotosintetizzante si è evoluto fino a diventare un organello cellulare (Sanders, 2006).

Per quanto riguarda l'adattamento al substrato, le forme descritte (licheni crostosi, foliosi, fruticosi), sono proprie dei licheni che vivono all'esterno del substrato, che può essere costituito da roccia (licheni epilittici), corteccia (licheni epifiti), muschi (licheni muscicoli), suolo (licheni terricoli) o, più raramente, da foglie (licheni epifilli), cemento, asfalto, ecc. Come già accennato vi sono però alcune specie licheniche che vivono all'interno del substrato (costituito in questo caso da rocce); ad esse ci si riferisce con il termine di comunità criptoendolitiche dominate da licheni.

Per quanto riguarda la riproduzione, i licheni possono riprodursi per via **sessuale** o **vegetativa**; quest'ultima comprende anche la riproduzione **per frammentazione**.

La riproduzione sessuale interessa unicamente il micobionte e consiste nella produzione di corpi fruttiferi (**ascocarpi**), all'interno dei quali si formano le spore; una volta disperse esse devono entrare in contatto con alghe allo stato libero per dare origine ad un nuovo lichene.

La riproduzione vegetativa può avvenire o per semplice frammentazione e conseguente propagazione del tallo, oppure per formazione di particolari strutture (propaguli), più o meno specializzate, i **soredi** e gli **isidi**. Allo stato secco molti licheni sono alquanto fragili e un uomo o altri animali, possono inconsapevolmente provocare, al solo passaggio, il distacco di centinaia di frammenti di tallo, ognuno dei quali, contenendo entrambi i simbionti, può dare origine a un nuovo tallo. Nel caso invece della produzione di propaguli, la massima specializzazione si riscontra nei soredi; essendo costituiti da ife fungine organizzate in gomitoli che imprigionano cellule algali che fuoriescono da fessurazioni del cortex superiore, i soredi sono in grado di disperdere simultaneamente micobionte e fotobionte. Gli isidi sono invece delle estroflessioni del cortex superiore, che contengono ife fungine ed alghe, ma, a differenza dei soredi, restano racchiusi all'interno

dello strato protettivo del cortex; possono essere considerati come dei licheni in miniatura. Queste strutture, oltre a permettere la propagazione del tallo per distacco dal cortex, hanno l'importante funzione di aumentare la superficie fotosintetizzante del lichene. Sotto ogni aspetto, la riproduzione sessuale attraverso la produzione di spore fungine è per il lichene una forma di moltiplicazione poco vantaggiosa. Le spore del fungo devono trovare, già al momento della loro germinazione, le alghe che loro convengono per poter formare un nuovo tallo. D'altro canto però, rispetto alla riproduzione sessuale, la riproduzione asessuata mediante la produzione di un gran numero di propaguli comprendenti i due simbionti, rende assai efficace e rapida la propagazione del lichene, ma il tutto avviene a spese delle sue potenzialità evolutive (Bartoli, 1996).

Una domanda che sovente ci si pone in riferimento ai licheni riguarda il beneficio che i due simbionti effettivamente traggono dalla simbiosi che li lega. In realtà, i benefici per il fungo sono piuttosto evidenti in quanto la presenza del fotobionte garantisce la produzione di carboidrati. Nei licheni infatti il ruolo di produttore è svolto esclusivamente dal fotobionte con la fotosintesi; per il fungo (il consumatore) quindi, la simbiosi è sopravvivenza ed il partner fotosintetico è fonte sicura di sostanza organica. Quando il partner algale è un cianobatterio, in grado di fissare azoto atmosferico, allora il fungo ottiene anche composti azotati. Non vi sono però prove circa la possibilità che il fungo fornisca all'alga dei nutrienti, bensì esso provoca modificazioni del partner fotosintetico. Il fotobionte, infatti, con la simbiosi, perde la capacità di riprodursi sessualmente. Inoltre, quando è stato possibile separare sperimentalmente i simbionti, si è potuto notare che mentre l'alga (verde o azzurra) cresce nella maggior parte dei casi abbastanza bene in coltura pura, recuperando la propria identità e la capacità di riprodursi o moltiplicarsi, il fungo cresce con estrema difficoltà e, anche scegliendo mezzi di coltura ottimali, con grande lentezza. Per questi motivi, al contrario di quanto affermato per la prima volta da Schwendener nel 1869, che considerava i licheni un'associazione simbiotica in cui fungo e alga vivono insieme, Ahmadjian (Ahmadjian & Henriksson, 1959; Ahmadjian, 1995) ha successivamente rinominato l'associazione con il termine "parassitismo controllato" in cui il fotobionte è una vittima piuttosto che un partner. L'idea che il fungo "schiavizzi" l'alga in una "prigione dorata" dove questa, ben protetta dalle ife, è rifornita dell'acqua e dei sali minerali che le sono necessari, può inoltre costituire una base interpretativa per il ruolo degli acidi lichenici, metaboliti secondari sintetizzati dal fungo esclusivamente in presenza dello specifico fotobionte. Alcuni autori ritengono, infatti, che questi possano essere sintetizzati dal micobionte allo scopo di inibire la eccessiva moltiplicazione del fotobionte

(Bartoli, 1996). In pratica il micobionte sfrutta le capacità fotosintetiche del fotobionte evitando tuttavia di danneggiarlo irreparabilmente (van Haluwyn & Lerond, 1993; Cocchietto *et al.*, 2002). Il vantaggio che il fungo trae dalla simbiosi è quindi ovvio e legato a necessità trofiche primarie; quello del fotobionte è meno evidente, ma forse addirittura più importante poiché riguarda non tanto la sopravvivenza del singolo individuo (garantita dall'apporto di acqua e sali minerali), ma la possibilità per la specie di colonizzare ambienti che allo stato libero le sarebbero preclusi, cosa vera tra l'altro anche per la componente fungina: il micobionte, infatti, grazie alla simbiosi riesce a sopravvivere in ambienti privi di nutrienti e, alghe e cianobatteri, che normalmente vivono in ambienti acquatici o comunque caratterizzati da presenza di umidità elevata, riescono a colonizzare ambienti aridi, o con elevata intensità luminosa (grazie alla protezione offerta dal cortex superiore costituito dal fungo) (Purvis, 2000). Quindi, sia che ci si riferisca ai licheni come ad una simbiosi mutualistica o ad una forma di parassitismo, si tratta comunque di un'associazione piuttosto stabile, in grado di auto-supportarsi e di auto-riprodursi.

Si può concludere allora dicendo che questa simbiosi è sicuramente una strategia di nutrimento vincente e con ogni probabilità molto antica; ha portato nella maggioranza dei casi alla realizzazione di consorzi estremamente specifici, costantemente presenti anche in habitat estremi, laddove le condizioni ambientali non permettono la sopravvivenza della maggior parte delle piante (Bartoli, 1996).

1.4.1 La simbiosi lichenica in Antartide

Come più volte affermato nei precedenti paragrafi, la forma di vita predominante in molti ecosistemi antartici è rappresentata dai licheni, anche se in termini di biodiversità la loro presenza è inferiore rispetto a quella che si registra negli ambienti di climi temperati e tropicali.

La distribuzione dei licheni in Antartide è stata recentemente discussa in Øvstedal & Lewis Smith (2001), successivamente modificata e revisionata da Kappen (2004). Circa 430 specie appartenenti a gruppi filogenetici diversi sono state rinvenute in Antartide e South Georgia. Di queste, 88 specie in particolare sono presenti in Antartide continentale e mostrano, in parte, un'ampia distribuzione geografica (Øvstedal & Lewis Smith, 2001; Romeike *et al.*, 2002). Tuttavia, circa il 50% delle specie rinvenute viene considerato costituito da specie endemiche dell'Antartide continentale. Questo dato piuttosto elevato,

va interpretato facendo molta attenzione. I licheni, infatti, mostrano in Antartide particolari adattamenti morfologici in risposta all'ostilità tipica degli ambienti di questo Continente (dovuta all'azione del vento, ai cicli di congelamento-scongelo, alle variazioni di temperatura); bisogna inoltre tenere in considerazione il fatto che le relazioni genetiche esistenti tra specie antartiche e non, devono ancora essere chiarite (Ott *et al.*, 2004).

Alcune specie foliose e fruticose appartenenti ai generi *Umbilicaria* e *Usnea* (ad esempio *Umbilicaria decussata* (Vill.) Zahlbr. e *Usnea sphacelata* R.Br.) sono ben distribuite lungo le coste dell'Antartide continentale, e addirittura all'interno del continente, ad altitudini elevate; spesso in associazione con molte specie crostose (*Buellia*, *Lecidea*, *Rhizoplaca*, *Acarospora*), esse sono notevolmente resistenti a fattori ambientali critici come basse temperature, scarsa disponibilità di acqua e forti venti (Øvstedal & Lewis Smith, 2001).

Per quanto riguarda la flora lichenica della Terra Vittoria in particolare (Antartide continentale), da cui provengono molti dei campioni utilizzati nella presente ricerca, da un'osservazione generale si può affermare che la flora lichenica aumenta lungo un gradiente latitudinale passando dalla Terra Vittoria del Sud alla Terra Vittoria del Nord (Barret *et al.*, 2006), anche se sembra che le differenze maggiori siano dovute alle condizioni geologiche e climatiche, a dir poco particolari, delle Valli Secche.

Maggiore è la biodiversità lichenica nell'Antartide marittima; qui, grazie alle migliori condizioni ambientali, è possibile osservare comunità dominate da specie fruticose e foliose, rappresentate in particolar modo da più specie del genere *Usnea* e *Umbilicaria* (*Usnea antarctica* Du Rietz, *U. aurantiaco-atra* (Jacq.) Bory, *U. sphacelata* R.Br., *Umbilicaria antarctica* Frey & I. M. Lamb, *U. decussata* (Vill.) Zahlbr.).

Purtroppo però in Antartide le conoscenze sulla vegetazione lichenica sono limitate a causa della confusione che esiste a livello tassonomico (Hertel, 1988; Nimis, 1990; Castello & Nimis, 1994a, 1994b), problema questo che costituisce un serio ostacolo per l'identificazione di molti campioni a livello di specie. Inoltre, molti degli studi pubblicati, sono basati su un numero di rilievi piuttosto limitato e che comprende soltanto i campioni più evidenti o solo le specie dominanti. Il più importante lavoro relativo alla flora lichenica esistente in Antartide, effettuato solo su base morfologica, è quello di Dodge (1973), i cui criteri tassonomici però sono stati più volte criticati da molti lichenologi (Almborn, 1974; Lindsay, 1974; Hertel, 1984, 1987, 1988; Nimis, 1990). Molte delle determinazioni effettuate originariamente da Dodge sono state riviste e modificate (Castello & Nimis, 1994a, 1994b, 1994c; Castello, 1995; Seppelt *et al.*, 1998; Alstrup, 2002). Castello &

Nimis (1995) hanno inoltre ridotto il numero di specie indicate come endemiche per l'Antartide mentre le specie con distribuzione bipolare, o subcosmopolita, sono notevolmente aumentate.

L'immagine fitogeografica dell'Antartide, precedentemente individuata come un rifugio per le specie che anticamente occupavano la terra di Gondwana (Dodge, 1964, 1973), è stata anch'essa rivista. Sulla base di quanto affermato da Castello & Nimis (1997, 2000), la flora lichenica dell'Antartide continentale sembra in realtà essere molto più giovane; essa si sarebbe principalmente originata durante il Quaternario mediante dispersione su lunga distanza (vedi anche Galloway, 1991). Ciò sembra essere confermato anche dal fatto che in Antartide il numero dei generi presenti è piuttosto alto rispetto a quello delle specie; questo carattere, tipico per la flora derivante da fenomeni di dispersione su lunga distanza, appare comune a molte aree dell'Antartide (Engelskjøn & Jørgensen, 1986).

Grazie alle ricerche degli ultimi decenni comunque si è almeno in grado di affermare che molti *taxa* in Antartide non sono stati ancora identificati a livello di specie, e molti dei generi ad ampia distribuzione, come *Buellia*, *Rinodina*, *Lecanora*, necessitano urgenti revisioni. Altri *taxa* ritenuti endemici ricadrebbero in realtà in gruppi ad ampia distribuzione e caratterizzati da forte polimorfismo; la loro posizione tassonomica potrà essere stabilita con maggiore precisione soltanto dopo dettagliate revisioni. Rientra tra questi la specie *Lecanora fuscobrunnea* Dodge & Baker, il cui studio è parte della presente tesi di dottorato; si tratta di una specie indicata come endemica per l'Antartide e appartenente al difficile gruppo della *L. polytropa*. Inoltre, la recente segnalazione della specie *Acarospora gwynnii* Dodge & Rudolph nelle Ande centrali evidenzia la necessità di indagini floristiche dettagliate nell'emisfero meridionale e nel Sud America in particolare, in modo da poter chiarire al meglio le affinità fitogeografiche della flora lichenica antartica (Sancho *et al.*, 1999). Con l'avvento delle tecniche molecolari, comunque, la comprensione della diversità degli organismi presenti, così come la loro filogenesi e la loro evoluzione, diventeranno argomenti sempre meno sconosciuti.

Quello che più colpisce in Antartide è che anche dove le condizioni ambientali si fanno più ostili, molte specie di licheni continuano a dare vita alle nuove generazioni mediante la riproduzione sessuale. Ciò è decisamente sorprendente poiché sembra essere in realtà la "soluzione" meno logica a causa degli elevati costi metabolici connessi a questa forma di riproduzione; molti degli ambienti antartici sono inoltre soggetti ad una bassa

pressione selettiva che dovrebbe favorire la riproduzione vegetativa o asessuata. Quest'ultima, infatti, rappresenta un mezzo rapido per la diffusione di genotipi particolarmente adattati ad un determinato ambiente, mentre la riproduzione sessuata svolge un'altra funzione, che è quella di disperdere nell'ambiente nuovi potenziali genotipi mediante la formazione di ascospore da parte della componente fungina. La riproduzione sessuale inoltre "incontra" un problema piuttosto comune in Antartide, dato dal fatto che i fotobionti principali (*Trebouxia* e *Pseudotrebouxia*) si trovano molto raramente come "free-living", anche in habitat liberi dai ghiacci.

L'elevata presenza di specie che si riproducono in modo sessuato potrebbe essere dovuta al fatto che le spore prodotte, essendo più piccole dei propaguli prodotti nel caso della riproduzione asessuata (isidi e soredi), possono essere disperse su distanze maggiori. Anche in questo caso però bisogna tenere presente che la dispersione delle spore su lunga distanza è possibile prevalentemente per ascospore di piccole dimensioni (per la maggior parte inferiore a 25µm di diametro). E' anche vero che le ascospore sono più resistenti nei confronti di condizioni ambientali sfavorevoli e possono essere conservate all'interno degli aschi fino a quando le condizioni diventano opportune per la dispersione e la successiva germinazione (Dyer *et al.*, 1992). Inoltre, a fronte di un elevato costo metabolico iniziale, le strutture deputate alla produzione di spore persistono per molti anni, durante i quali riescono a disperdere un elevato numero di spore. La difficoltà di incontrare il partner algale potrebbe essere superata attraverso soluzioni particolari. In alcuni casi si assiste ad una particolare forma di lichenizzazione tra spore e siti già colonizzati; in questi casi, una nuova simbiosi si instaura in aree strettamente vicine ad altri talli, che fungono da "risorse" di fotobionti (Jahns, 1987). Ott (1987) ha descritto la capacità di alcuni micobionti di utilizzare alghe del genere *Trebouxia* di altri licheni per instaurare nuove associazioni; in assenza di un lichene già esistente, un micobionte può associarsi con una specie algale diversa da quella abituale e il fotobionte finale può essere catturato in un secondo momento, quando il fungo ha già formato il micelio. Infine, i licheni sono spesso soggetti, anche in Antartide, all'attacco di "parassiti" specializzati (Honegger, 2001), tra cui ad esempio i funghi lichenicoli. La produzione di ascospore, da parte del solo micobionte, offre in questo senso ai licheni un mezzo per sfuggire ai parassiti (Seymour *et al.*, 2005).

Quando le condizioni si fanno veramente proibitive, come nelle Valli Secche di McMurdo, anche i licheni perdono la capacità di riprodursi sessualmente. Infatti, essi abbandonano la tipica morfologia dei talli epilittici e si sviluppano all'interno delle rocce perdendo così la possibilità di produrre strutture sessuali epilittiche e di conseguenza la

formazione di ascospore. La semplificazione dei processi riproduttivi risponde alle proibitive condizioni ambientali di questi ambienti. Situazioni simili sono state recentemente dimostrate da Kis-Papo *et al.* (2003) per funghi che colonizzano ambienti dove la condizione estrema è rappresentata da elevate concentrazioni saline. Nel lavoro essi discutono la presenza di una conseguenza diretta tra stress ecologico, diversità genomica e riproduzione sessuale, assumendo che anche se una elevata diversità genomica costituisce normalmente una potenziale maggiore capacità di adattamento, quando le condizioni ambientali sfiorano i limiti per la sopravvivenza, la diversità genomica subisce una diminuzione, e si assiste ad una prevalenza di organismi rappresentati da cloni omozigoti altamente adattati.

1.4.1.1 Il successo dei licheni in Antartide

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 l'elevata resistenza nei confronti dello stress idrico e luminoso (Kappen, 2000). Molto importante è proprio la capacità che essi hanno di continuare ad essere fotosinteticamente attivi anche a temperature inferiori a 0°C. Ciò è vero in particolare per i licheni che hanno come fotobionte un'alga verde; essi sono in grado di riattivare e di mantenere il processo fotosintetico attraverso l'assorbimento del vapore acqueo presente in atmosfera. Quei licheni invece in cui la simbiosi coinvolge un cianobatterio non sono in grado di svolgere la fotosintesi a temperature inferiori a 0°C (Lange *et al.*, 1986; Green *et al.*, 1999; Kappen, 2000); la loro quasi totale assenza dal continente Antartico è quindi un ulteriore indicatore della scarsissima disponibilità di acqua allo stato liquido. In ogni caso, cianobatteri allo stato libero non sono rari in Antartide, ma sono comunque legati ad habitat con elevata umidità. Pochissimi sono i "cianolicheni" che si rinvergono in Antartide e comunque essi si sviluppano soltanto dove sono presenti precipitazioni o acqua derivante dallo scioglimento dei ghiacci (Kappen, 1993; Green *et al.*, 1999). Ciò dimostra ancora come le proprietà fisiologiche degli organismi siano decisive nel determinare la distribuzione delle specie, soprattutto in ambienti come quelli antartici.

Queste capacità sono spiegabili in quanto i licheni rientrano tra quegli organismi che tendono ad essere in equilibrio con l'umidità dell'aria circostante o del substrato al quale aderiscono; per questi motivi è molto importante per la loro sopravvivenza la presenza di acqua in atmosfera (Blum, 1974). L'organizzazione anatomica dei talli

lichenici, infatti, non facilita l'assorbimento di acqua dal suolo così come non ne previene la perdita dal tallo stesso. Essi però, per le loro proprietà, possiedono dei meccanismi di tolleranza nei confronti della disidratazione, meccanismi molto utili in ambienti desertici come quelli dell'Antartide. Tranne qualche eccezione, i licheni sono in grado di sopravvivere ad una perdita di acqua anche superiore al 95% e a lunghi periodi di siccità. La perdita di acqua determina l'inattivazione completa del tallo; in questo modo i licheni entrano in una fase di inattività metabolica e si proteggono da tutti i fattori ambientali ostili (Lange, 1953; Kappen *et al.*, 1996). Questa forma passiva di sopravvivenza, combinata con la capacità di riattivare velocemente il metabolismo con il re-instaurarsi di condizioni favorevoli, rende i licheni particolarmente adattati a vivere in ambienti caratterizzati da variazioni di disponibilità idrica e temperature estreme. Anche nel caso dello stress indotto dalle basse temperature essi risultano essere particolarmente resistenti. Molte specie testate ad esempio hanno mostrato la capacità di saper sopravvivere alla temperatura dell'azoto liquido, ma anche a temperature inferiori in uno stato disidratato (Kappen, 1974). Talli umidi di alcune specie antartiche invece (*Xanthoria candelaria* (L.) Th.Fr. e *Rhizoplaca melanophthalma* (Ramond) Leuckert & Poelt) tollerano completamente temperature pari a -196°C sia che queste vengano raggiunte gradualmente che rapidamente. Anche in questo caso i licheni sono in grado di riattivare il processo fotosintetico. Per esempio, dopo un graduale raffreddamento, seguito da una esposizione a -196°C per 6 ore ed un graduale riscaldamento, *Xanthoria candelaria* (L.) Th.Fr., *Buellia frigida* Darb. e *Umbilicaria decussata* (Vill.) Zahlbr. recuperano la normale attività fotosintetica in pochissime ore, durante le quali la temperatura è riportata a 10°C (Lange & Kappen, 1972). Ciò sta a dimostrare che i pigmenti fotosintetici del fotobionte vengono, almeno in parte, protetti. Una forma di protezione per il fotobionte nei confronti dell'intensa radiazione solare che caratterizza la stagione estiva è probabilmente costituita dalla forte pigmentazione tipica di molte specie antartiche (Ahmadjian, 1970); tale pigmentazione favorisce inoltre l'assorbimento di calore (Lange, 1954; Kershaw, 1983), caratteristica particolarmente utile in un ambiente così freddo come quello antartico.

Per i motivi sopra descritti si può affermare che la simbiosi lichenica costituisce già di per sé una forma di adattamento anche perché in questo modo i simbionti sono completamente indipendenti dalle condizioni trofiche dell'habitat occupato. Sicuramente però, la più evidente forma di adattamento adottata dai licheni è quella che si rinviene negli ambienti più estremi, come quelli del Deserto di Ross; è una forma di adattamento morfologico ed è rappresentata dalla crescita criptoendolitica. In questo caso il lichene

abbandona la sua consueta morfologia tallina e penetra negli spazi presenti all'interno della roccia, alla ricerca di protezione dalle condizioni climatiche ostili esterne. I licheni mantengono comunque la capacità di formare un tallo ed infatti, laddove possibile per la presenza di migliori condizioni climatiche, si possono osservare strutture epilittiche che, per quanto rare nel Deserto di Ross, sono invece comuni in località con clima mite, dove si possono rinvenire forme di crescita intermedie tra quella criptoendolitica ed epilittica (Hale, 1987).

1.4.1.2 Colonizzazione endolitica dei licheni in Antartide

In alcune aree dell'Antartide (ad esempio nelle Valli Secche di McMurdo) gli organismi predominanti che colonizzano le rocce (prevalentemente arenaria) sono costituiti proprio da licheni criptoendolitici (Friedmann, 1982). Quando si è in presenza di forme criptoendolitiche l'assenza di organismi dalla superficie delle rocce contrasta con l'abbondanza di microrganismi che colonizzano i primi mm di spessore al di sotto della superficie di rocce apparentemente sterili. I fattori climatici responsabili di questa sorta di "fuga" dei microrganismi sono prevalentemente riconducibili a temperatura e disponibilità di acqua, anche se, recentemente, è stata avanzata l'ipotesi secondo la quale la colonizzazione criptoendolitica sarebbe determinata, non solo dalle avversità dell'ambiente esterno, ma anche dalla natura della matrice rocciosa. Infatti, nella Terra Vittoria del Nord, caratterizzata principalmente dalla presenza di rocce vulcaniche compatte, le comunità criptoendolitiche sono meno strutturate e la colonizzazione non presenta la tipica stratificazione ben ordinata (Onofri & Friedmann, 1998), mentre nella Terra Vittoria del Sud, dove sono molto diffuse rocce porose di tipo sedimentario gli organismi criptoendolitici formano comunità perfettamente stratificate colonizzando facilmente gli spazi interstiziali tra i cristalli (Adams *et al.*, 2006).

Nel deserto freddo delle Valli Secche (Dry Valleys), i fattori critici sono sicuramente rappresentati da temperatura e disponibilità di acqua. La fonte principale di acqua in particolare è rappresentata dallo scioglimento delle nevi; essa viene rapidamente assorbita dalle rocce porose, che si comportano come fonti di riserva. Probabilmente l'elemento che indica la disponibilità di acqua è rappresentato dall'umidità relativa presente negli interspazi all'interno delle rocce. È stato dimostrato che i licheni in genere, e soprattutto i licheni antartici, possono assorbire vapore acqueo dall'aria, e ciò sembra probabile anche per le forme criptoendolitiche. In ogni caso sembra improbabile che

soltanto l'aridità causi l'assenza di licheni dalla superficie delle rocce; nei deserti caldi, le superfici rocciose sono probabilmente più aride ma sono comunque colonizzate da licheni crostosi. Anche la temperatura non può essere considerata un fattore limitante per le specie che crescono in superficie; i licheni, infatti, sono riconosciuti come organismi in grado di tollerare freddi estremi.

Probabilmente, il fattore più importante responsabile della superficie rocciosa abiotica è la rapida fluttuazione della temperatura dovuta ai forti venti. Nel range prevalente delle temperature estive, queste fluttuazioni oscillano spesso intorno a 0°C, risultando in una sequenza di rapidi congelamenti e scongelamenti sulle superfici delle rocce. Le condizioni estreme delle superfici rocciose creano apparentemente una barriera alla colonizzazione che non può essere superata solo mediante adattamenti fisiologici. La nicchia criptoendolitica, invece, fornisce un ambiente relativamente mite, ma esso è accessibile solo agli organismi in grado di penetrare nello stretto sistema di interspazi delle rocce porose. Organismi unicellulari come i batteri sono in grado di farlo, ma licheni con una struttura plectenchimatica devono subire dei cambiamenti fondamentali nel loro modello di crescita per riuscire a colonizzare questo tipo di substrato. Il vero successo adattativo dei licheni antartici criptoendolitici è rappresentato allora proprio dall'abilità del micobionte di cambiare la sua forma da plectenchimatica a filamentosa pur mantenendo un'organizzazione tallina con strati definiti, e di tornare alla forma plectenchimatica non appena le condizioni lo permettano (Friedmann, 1982).

Le forme di crescita tipiche delle colonizzazioni criptoendolitiche mostrano una stratificazione costituita da una zona superiore nera dello spessore di 1 mm circa, seguita da una zona bianca con spessore che va da 2 a 4 mm e al di sotto una zona verde il cui limite inferiore è spesso indistinto (figure 1.11 e 1.12). Questa stratificazione ricorda gli strati che si osservano nelle sezioni di molti licheni eteromeri e le differenziazioni indicano che le varie zone rispondono ad un tallo organizzato. I licheni criptoendolitici, in realtà, sono degli organismi con differente organizzazione e morfologia. Nei tipici talli lichenici, infatti, i filamenti del fungo (micobionte) formano un pseudo-tessuto coerente chiamato plectenchima. Nei licheni criptoendolitici, in contrasto, filamenti liberi e gruppi di cellule si accrescono tra e intorno ai cristalli del substrato, così che il lichene è immerso nella matrice rocciosa, coperto dalla crosta superficiale della roccia stessa.

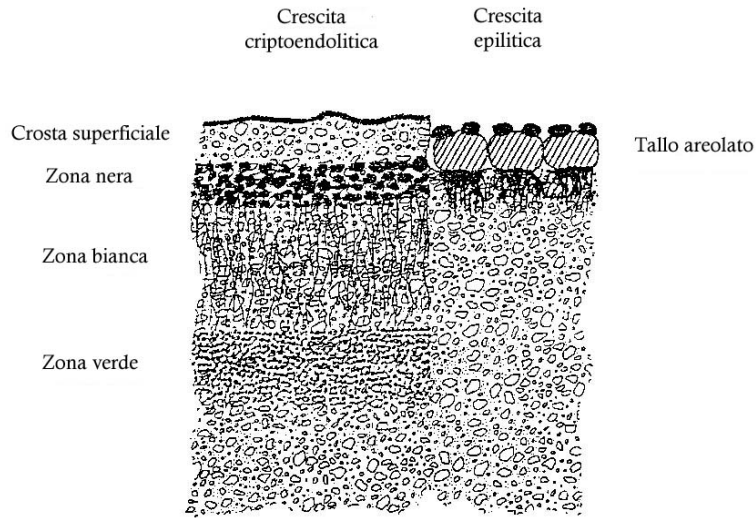


Fig. 1.11 – Struttura della crescita criptoendolitica in relazione alla forma di crescita areolata epilitica (Friedmann, 1982).

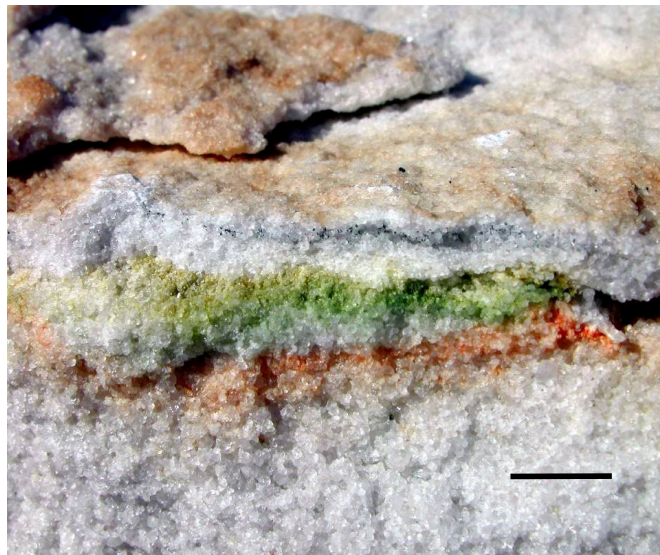


Fig. 1.12 – Roccia di arenaria fratturata con evidente colonizzazione criptoendolitica. Battleship Promontory, area di Convoy Range, Valli Secche di McMurdo (barra = 5 mm) (Onofri *et al.*, 2006).

Nei licheni criptoendolitici la zona superiore di colore nero è formata da masse delle ife del fungo di colore scuro, marrone, verdastro o grigiastro, le quali racchiudono gruppi di cellule algali. Nella zona bianca invece, i filamenti incolori del micobionte formano una trama libera, attorno ai cristalli del substrato roccioso. La componente algale,

che in associazione con il micobionte della zona superiore forma il lichene, è costituita da alghe cloroficee (*Trebouxia* spp. e *Pseudotrebouxia* spp.), ed è presente in bassa concentrazione. Probabilmente i funghi ialini della zona bianca e parte di quelli pigmentati della zona nera non sono altro che morfotipi diversi della stessa specie; il pigmento scuro del fungo nella parte superficiale potrebbe essere un adattamento all'esposizione ai raggi solari, con lo scopo di fornire protezione contro i raggi UV. Nella zona nera sono inoltre presenti funghi neri meristemoidi, che in esperimenti di risintesi non si sono mostrati in grado di formare associazioni licheniche.

Nella zona verde, le cellule algali sono abbondanti e sono costituite da alghe verdi (*Hemichloris antarctica* Tscherm.-Woess & Friedmann, cloroficee, *Heterococcus endolithicus* R.B. Darling & E.I. Friedmann, xantoficee, entrambe endemiche, e *Stichococcus* sp., cloroficee, e da cianobatteri (*Gloeocapsa* sp. e *Chroococcidiopsis* sp.). I funghi ialini presenti in questa zona non formano associazioni simbiotiche con le alghe. Da un punto di vista "funzionale" questa zona assomiglia allo strato algale dei licheni eteromeri, nonostante si trovi nella parte inferiore (lontano dalla luce); normalmente, infatti, nei licheni plectenchimatici, questo strato si trova vicino alla superficie. Inferiormente alla "zona" verde, le ife incolori del fungo penetrano il substrato roccioso per molti mm.

A livello cellulare, le relazioni tra i due componenti (alga e fungo) seguono il tipico modello di un'associazione lichenica. Le ife del micobionte stabiliscono un contatto con le cellule del fotobionte formando appressori (le ife circondano il fotobionte) o austori (le ife penetrano nelle cellule algali). Nei licheni criptoendolitici, l'associazione sembra però essere meno stabile rispetto a quella dei licheni plectenchimatici. In alcuni casi sono state osservate alghe che crescono al di fuori dell'associazione lichenica formando masse non lichenizzate; meno frequentemente invece sono state osservate ife senza nessuna apparente connessione con le alghe. C'è anche una variabilità per quel che riguarda la morfologia: nonostante la sequenza verticale tipica delle zone nera, bianca e verde sia generalmente costante, una o due di queste zone possono mancare. Alcuni elementi indicano che, almeno in parte, questa variabilità è controllata dall'ambiente e in particolar modo dall'intensità luminosa. Quindi, in aree con bassa intensità luminosa, come nella superficie inferiore di rocce sospese, la crescita dei licheni criptoendolitici può essere costituita dalla sola zona verde; in aree altamente irraggiate, invece, può esistere soltanto la zona nera. Le diverse esigenze di luce tra *Hemichloris antarctica*, che può essere danneggiata da elevata intensità luminosa, e le alghe lichenizzate, che necessitano invece di una maggiore quantità di

illuminazione, tendono comunque a mantenere la stratificazione appena descritta. Inoltre, sia i micobionti che gli altri funghi producono sostanze antibiotiche attive contro batteri eterotrofi e contro le alghe; perciò la zonazione sembra essere causata sia da fenomeni fisiologici che competitivi. Sembra siano anche queste sostanze a spingere le alghe clorofitiche come *Hemichloris antarctica*, ed i cianobatteri come *Chroococciopsis* sp. negli strati più profondi (Friedmann, 1982).

L'ecosistema del Deserto di Ross, come sopra accennato, è semplice: cianobatteri e fotobionti rappresentano i produttori primari; i consumatori sono costituiti dai micobionti, mentre i batteri incolore, che si trovano spesso associati a queste comunità, ed i funghi saprotrofi svolgono il ruolo di decompositori. Consumatori secondari e predatori sono assenti. È importante sottolineare come questa semplicità non sia indice di primitività ma, al contrario, rappresenti un adattamento alle condizioni di vita estreme.

La vita dei licheni criptoendolitici è influenzata da una forma peculiare di disgregazione esfoliativa del substrato roccioso, che lascia inconfondibili segni sulle rocce sotto forma di un tipico mosaico (Friedmann, 1982; Nienow & Friedmann, 1993). Il processo di disgregazione della sostanza cementante presente tra i granelli della roccia è dovuto ai licheni stessi, alla loro crescita, al loro rigonfiarsi in modo intermittente durante le fasi di idratazione ed espansione da congelamento e alla loro mobilitazione del materiale della matrice (Friedmann & Weed, 1987). Quest'ultimo processo inoltre, determina la diversa colorazione della zona colonizzata. I licheni criptoendolitici, infatti, producono acido ossalico ed altri acidi organici che mobilizzano i composti del ferro presenti nella matrice rocciosa. I composti mobilizzati dai licheni vengono poi trasportati dall'acqua in due direzioni: verso il basso quando la neve si scioglie sulla superficie e percola internamente e verso l'alto quando l'acqua risale per capillarità verso la superficie come risultato dell'evaporazione. La roccia, quindi, subisce lisciviazione dei minerali del ferro nella zona bianca, mentre la sottile crosta sopra il lichene ed il substrato roccioso pochi mm al di sotto di esso, appaiono più scuri a causa delle deposizioni di ferro che si verificano a questi livelli.

La disgregazione che interessa le rocce colonizzate e quindi la perdita da parte della roccia dello strato protettivo comporta la conseguente esposizione dei licheni criptoendolitici, che subiscono quindi l'azione abrasiva del vento; con il tempo, la roccia riacquisterà la tipica colorazione arancione sulla superficie man mano che nuova polvere portata dal vento vi si depositerà sopra e la tipica stratificazione della comunità viene

ristabilita perchè gli organismi crescono più in profondità nella roccia. Tuttavia, in alcune circostanze, quando le condizioni microclimatiche creano un ambiente mite e favorevole, il lichene criptoendolitico esposto continua a crescere sulla superficie della roccia. Si tratta comunque di una crescita limitata ad aree molto piccole. Questa eventuale forma di crescita epilitica è accompagnata da cambiamenti della morfologia del lichene, il quale, invece di essere composto da filamenti liberi, caratteristici dei licheni criptoendolitici, forma il tipico tallo plectenchimatico con una morfologia esterna ben definita, come sopra accennato. Esso appare allora come un lichene crostoso con una struttura areolata (composto di numerose piccole unità, le areole). L'alternarsi di questi processi di sfaldamento ed incrostazione porta alla formazione di un mosaico di colori bianco-arancio-marrone, con molti rilievi di diverse profondità (figure 1.13 e 1.14). Osservazioni in campo mostrano che la presenza di una crosta leggermente silicea costituisce una condizione favorevole alla colonizzazione microbica; la crosta stabilizza la superficie rocciosa prevenendo la disgregazione granello dopo granello e inoltre, contribuisce al trattenimento di acqua. Queste croste vengono continuamente rinnovate durante i cicli di esfoliazione.

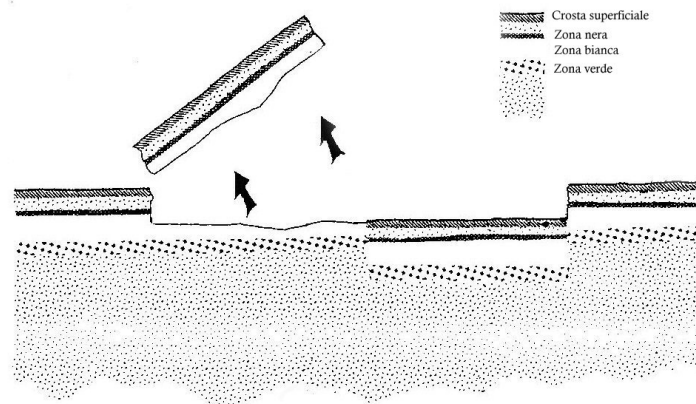


Fig. 1.13 – Erosione della roccia per esfoliazione (Friedmann, 1982).



Fig. 1.14 – Esempio di arenaria esfoliata (barra=10 cm), area di Convoy Range, Valli Secche di McMurdo (Onofri *et al.*, 2007a).

Il mantenimento di questo equilibrio tra i processi conservativi (formazione della crosta) e i processi distruttivi (perdita periodica della crosta protettiva) dipende da un sufficiente irraggiamento solare della superficie rocciosa, in quanto esso provoca il riscaldamento delle rocce fino a quelle temperature che rendono possibile lo svolgimento dell'attività metabolica e lo scioglimento della neve e, inoltre, dall'orientamento e dalla pendenza della roccia stessa. In ogni caso, anche nei punti migliori, le temperature non raggiungono mai il range ottimale per lo svolgimento dei processi fotosintetici e i microrganismi criptoendolitici del Deserto di Ross vivono al limite della loro tolleranza (Friedmann & Weed, 1987). Questo apparente paradosso è ben evidente nell'ecologia dei licheni antartici. Infatti, il loro optimum di temperatura per lo svolgimento dei processi fotosintetici è di circa 0°C ed è molto inferiore rispetto all'optimum dei due costituenti della simbiosi, alga e fungo (circa 20 °C). Per spiegare questo paradosso Friedmann & Sun (2005) e Sun & Friedmann (2005), considerano i licheni come delle comunità microbiche e propongono l'ipotesi della "Community Adaptation", secondo cui in ogni regime di temperatura esiste un equilibrio tra il produttore primario fotosintetico (fotobionte) e il consumatore (micobionte e funghi associati o parasimbionti). Questo equilibrio, espresso come il rapporto tra produttore e consumatore ($R_{p/c}$), massimizza la fitness della comunità:

all'aumentare dei processi respiratori da parte del consumatore, come conseguenza dell'aumento della temperatura, ancora più rapidamente si verifica un aumento del processo di fotosintesi e il rapporto $R_{p/c}$ cambia, risultando in un aumento dell'optimum di temperatura per la comunità (il lichene). Ciò conferisce ai licheni una flessibilità adattativa che permette loro di svolgere la propria attività metabolica ad ogni regime di temperatura, purché esso rispetti i limiti di tolleranza dei singoli organismi che formano la simbiosi (micobionte, fotobionte, ecc.). La comunità quindi, sembra essere in grado di *aggiustare* il proprio optimum di temperatura cambiando ogni volta il rapporto tra produttore e consumatore.

1.5 EVOLUZIONE DELLA SIMBIOSI LICHENICA

L'associazione mutualistica che caratterizza i licheni coinvolge gruppi specifici di funghi e, come sopra detto, comporta la modificazione di almeno uno dei due simbionti. In questi termini si può pensare alla simbiosi mutualistica come a un fattore che gioca un ruolo importante nell'evoluzione dei funghi (Pirozynski & Malloch, 1975; Malloch *et al.*, 1980; Law & Lewis, 1983; Hawksworth, 1988; Simon *et al.*, 1993).

L'appartenenza dei funghi lichenizzati sia alla classe degli Ascomiceti che a quella dei Basidiomiceti (seppur in misura minore) (Tehler, 1988) sta già di per sé ad indicare che i funghi in grado di contrarre la simbiosi lichenica hanno subito molti processi evolutivi (Gargas *et al.*, 1995; Lutzoni *et al.*, 2001; Liu & Hall, 2004), in modo ciclico e indipendente, con continue conquiste e perdite della simbiosi stessa, che hanno dato luogo ad una eccezionale biodiversità.

Per molto tempo si è ritenuto che molti dei funghi in grado di formare simbiosi lichenica si sarebbero a loro volta originati a partire da funghi non lichenizzati, caratterizzati da "stili di vita" diversi: funghi saprotrofi, che si nutrono di materia organica in decomposizione, funghi micorrizogeni, che vivono in associazione con le radici delle piante e funghi patogeni che causano malattie a piante e animali (Gargas *et al.*, 1995). Tuttavia, indagini molecolari più recenti mostrano come il raggiungimento della simbiosi sia stato in realtà piuttosto infrequente durante l'evoluzione degli Ascomiceti, e come sia stato invece molte volte seguito dalla perdita della forma simbiotica; pertanto oggi si ipotizza che la maggior parte dei funghi non lichenizzati appartenenti agli Ascomiceti derivi, in realtà, da organismi che conducevano uno stile di vita lichenizzato (Lutzoni *et*

al., 2001). In quest'ottica, è stato suggerito che anche i funghi lichenicoli (funghi caratterizzati dall'abitudine di colonizzare le associazioni licheniche, come verrà spiegato più avanti nel testo) derivino evolutivamente da funghi lichenizzati. Abbandonando la forma lichenizzata (perdendo cioè lo stato simbiotico) e colonizzando i licheni, i funghi lichenicoli continuerebbero ad ottenere direttamente, o indirettamente dai licheni, i carboidrati prodotti dal fotobionte, senza la necessità di trovare ad ogni nuova generazione lo specifico partner per dar vita alla simbiosi (Rambold & Triebel, 1992). Esiste addirittura un caso, il primo osservato ad oggi, in cui individui della stessa specie possono svilupparsi come licheni o come funghi saprotrofi (Wedin *et al.*, 2004), una forma di "lichenizzazione opzionale" che apre nuove prospettive sulla discussione del ruolo della simbiosi lichenica nell'evoluzione dei funghi e nella colonizzazione terrestre (Taylor & Osborn, 1996). Infatti, anche se i percorsi dell'evoluzione della simbiosi lichenica sono diventati più chiari solo negli ultimi anni, la forma della simbiosi mutualistica è stata in realtà più volte considerata come una possibile "via" per la colonizzazione della terra da parte degli organismi nel corso dell'evoluzione (Heckman *et al.*, 2001; Selosse, 2002). L'alta percentuale di perdita della lichenizzazione nei funghi appartenenti alla Classe degli Ascomiceti individuata da Lutzoni *et al.* (2001) avvalorava infine l'ipotesi secondo la quale la forma mutualistica non è necessariamente lo step terminale di un'evoluzione unidirezionale che porta fino al mutualismo (Hibbet *et al.*, 2000).

Questi ed altri studi (Barinaga, 1995; Lutzoni & Pagel, 1997) hanno recentemente dimostrato come la simbiosi lichenica abbia avuto origine molto tempo prima rispetto a quanto da sempre pensato e come, di conseguenza, essa abbia avuto un ruolo molto importante nell'evoluzione del regno *Ascomycota* (Gargas *et al.*, 1995). Ciò sembra essere confermato dalla recente scoperta di un probabile lichene fossile formato da ife filamentose strettamente associate a cianobatteri o alghe all'interno di una formazione marina, risalente a circa 551-635 milioni di anni fa (Yuan *et al.*, 2005); ciò porta di nuovo ad ipotizzare un percorso molto complesso e antico per la simbiosi lichenica. La tendenza evolutiva dei funghi a perdere la forma simbiotica (Lutzoni *et al.*, 2001; DePriest, 2004; Wedin *et al.*, 2004), la presenza di organismi acquatici (appartenenti al *Phylum Chytridiomycota*) nel Regno dei funghi in linee filetiche che si sono precocemente separate (Tehler *et al.*, 2003) ed il probabile ritrovamento di funghi fossili in depositi marini (Butterfield, 2005), indicano che gli step che hanno portato alla simbiosi potrebbero essere iniziati come interazioni facoltative tra funghi e alghe o cianobatteri acquatici. Il ritrovamento di un lichene fossile così antico suggerisce inoltre che questi step risalirebbero a molto tempo

prima della colonizzazione terrestre da parte delle piante vascolari e che si sarebbero verificati in un ecosistema marino poco profondo, dove erano presenti in stretta associazione cianobatteri, alghe e funghi (Yuan *et al.*, 2005).

Gli studi sulle relazioni ancestrali nell'ambito di funghi, lichenizzati e non, mediante tecniche di biologia molecolare hanno avuto un impatto considerevole sulla sistematica di questi organismi (Bruns *et al.*, 1991; Hillis & Dixon, 1991; Bowman *et al.*, 1992). Le tecniche molecolari, infatti, forniscono una sufficiente sensibilità che permette di individuare la variabilità tra organismi già a livello del cambiamento di una singola base delle sequenze nucleotidiche del DNA (Schlick *et al.*, 1994; Lanfranco *et al.*, 1995).

1.6 LICHENI: NICCHIA ECOLOGICA PER ALTRI MICRORGANISMI?

UN APPROCCIO MULTILATERALE PER LO STUDIO DELLA SIMBIOSI

Le associazioni simbiotiche influenzano l'evoluzione di ogni organismo vivente e tutti i livelli delle organizzazioni biologiche (Boucher *et al.*, 1982; Boucher, 1985; Ahmadjian & Paracer, 1986; Price *et al.*, 1986; Margulis & Fester, 1991; Maynard & Szathmáry, 1995). Le forme di mutualismo ad esempio, ritenute un tempo rare e quindi di limitata importanza (Boucher *et al.*, 1982; Boucher, 1985), vengono oggi riconosciute come quelle che hanno influenzato l'evoluzione delle forme di vita superiore sulla terra.

La comprensione della simbiosi mutualistica è stata fortemente rallentata perché gli studi sulle forme di interazione tra gli organismi sono sempre stati eseguiti secondo un approccio unilaterale, e quindi concentrati soltanto su uno dei due partner (Bronstein, 1994). Questo approccio però, non solo "sopravaluta" la presenza di un partner rispetto ad un altro, ma implica che il mutualismo si verifichi tra due simbionti, in isolamento da altri organismi.

Di tutte le forme di simbiosi conosciute, i licheni rappresentano decisamente un caso particolare. Nonostante i componenti simbiotici dei licheni siano stati descritti con molta cura, le conoscenze sulla diversità di comunità ad essi eventualmente associate sono piuttosto scarse. Molti licheni possono contenere più di un singolo fotobionte ed in alcuni casi dai talli lichenici sono stati isolati ceppi fungini diversi dal micobionte, ad esempio funghi cosiddetti lichenicoli. Anche gli stessi cefalodi, che ospitano colonie di batteri azotofissatori, sono esempi di una simbiosi "allargata". Lo spettro di queste interazioni è affascinante e si snoda tra molteplici forme, quali mutualismo, commensalismo (Petrini *et*

al., 1990), fino a situazioni in cui gli organismi simbiotici subiscono l'attività antagonista di un ulteriore fungo invasivo (vedi ad es. de los Ríos & Grube, 2000). Se si considera che i licheni sono organismi in grado di tollerare livelli elevati di disidratazione e che sono caratterizzati da tassi di crescita molto lenti, si riesce facilmente ad immaginarli come una nicchia ecologica stabile, anche se inusuale, per altri microrganismi, che possono includere appunto altri funghi (parassiti, epi- ed endo-“simbiotici”, Petrini *et al.*, 1990; Prillinger *et al.*, 1997) e/o organismi procarioti.

La simbiosi lichenica, come già più volte affermato, rappresenta una delle forme di vita con più successo in Antartide, e molti altri organismi associati ad essa sono stati più volte individuati, anche se il loro ruolo non è ancora del tutto chiaro (Onofri *et al.*, 2007b). Alcuni studi hanno già dimostrato come nei biofilm microbici esistenti nei punti di contatto tra licheni epilitici e substrato vi sia un micro-habitat caratterizzato da una elevata diversità di interazioni microbiche (de los Rios *et al.*, 2002); nelle comunità criptoendolitiche dominate dai licheni dei freddi deserti antartici ad esempio, le associazioni microbiche endolitiche sono state ben esaminate. In particolare, analisi effettuate utilizzando approcci di tipo molecolare hanno evidenziato in questo habitat endolitico una elevata diversità microbica (de la Torre *et al.*, 2003). Un recente studio eseguito in Norvegia da Bjelland & Ekman (2005), ha dimostrato che all'interno di rocce colonizzate da licheni epilitici esiste una diversità di funghi costituita dalla stessa specie che partecipa alla simbiosi del lichene epilitico e da altri funghi non-lichenizzati. Questa dimostrazione apre le porte ad una serie di domande: ad esempio, è possibile che le comunità di licheni che colonizzano la superficie delle rocce, formando mosaici complessi e spettacolari, debbano la loro forma alla presenza di più taxa, quindi non soltanto alla competizione tra licheni appartenenti a specie diverse, ma tra funghi lichenizzati e funghi non-lichenizzati (Bjelland & Ekman, 2005). E' possibile allora, che la diversità di microrganismi presenti all'interno della roccia colonizzata, venga in qualche modo conservata cosicché la stessa diversità si rinviene anche nel lichene epilitico che risulterà costituito dai due simbiotici, ma che sarà in grado di ospitare una diversità di microrganismi differenti e non-lichenizzati.

Ad oggi esistono moltissime specie di funghi che vivono in associazione con i licheni, conosciuti con il termine di lichenicoli, e molte specie appartengono a generi esclusivi dei licheni (Lawrey & Diederich, 2003). Lavori recenti sembrano dimostrare che il numero di questi organismi potrebbe aver superato le 3000 specie (Gams *et al.*, 2004). Il primo lavoro relativo a specie lichenicole è stato pubblicato dal lichenologo Lindsay

(1869). Sulla base delle conoscenze attuali inoltre sembra anche che Lindasy sia stato il primo ad utilizzare il termine “lichenicolo” (Hawksworth, 2003). L’aumento dell’interesse nei confronti di funghi lichenicoli negli anni successivi a questa prima testimonianza è stato promosso in modo particolare dagli studi di Hawksworth (1979; 1981; 1982a; 1983). I suoi lavori sulla diversità di questi funghi hanno sicuramente stimolato la ricerca da parte di molti lichenologi. Questo processo è in continua crescita, come testimoniano le sempre più numerose pubblicazioni relative ad aspetti diversi (sistematica, distribuzione, biologia, ecologia) (Lawrey & Diederich, 2003) di questi organismi. Nonostante i funghi appartenenti agli ascomiceti costituiscano la maggior parte dei taxa lichenicoli, tra questi rientrano anche funghi basidiomiceti e funghi anamorfici (Lawrey & Diederich, 2003).

Hawksworth (1997) ha stimato che un numero pari a circa 2000 specie fungine è rappresentato da specie lichenicole obbligate, che formano associazioni diverse con i licheni. Molti attaccano licheni vitali e sono chiaramente parassiti o patogeni (anche se variano in modo considerevole nei livelli di virulenza); alcuni invadono i talli causando danni visibili nella forma di distruzione parziale o totale dei tessuti, di produzione di aree decolorate o di sviluppo di malformazioni simili a galle (Hawksworth, 1982b, 1988). Altri apparentemente non danneggiano i talli, comportandosi come commensali. Altri ancora sono saprotrofi e colonizzano soltanto tessuti morti, abitudine comune per molti funghi che non si associano esclusivamente con i licheni. La specificità nei confronti dell’ospite sembra essere piuttosto elevata tra la specie lichenicole. Circa il 95% delle specie descritte si sono specializzate per crescere soltanto su una singola specie lichenica, su specie strettamente correlate o su specie appartenenti a gruppi monofiletici (Lawrey & Diederich, 2003). In seguito al lavoro di Petrini *et al.* (1990) però, viene ormai riconosciuto il fatto che molti licheni ospitano diversi funghi opportunisti, la cui presenza non è limitata soltanto alle associazioni licheniche: questi non andrebbero quindi considerati come funghi lichenicoli *sensu-stricto*.

Da non sottovalutare è il fatto che generalmente i licheni sono dotati di mezzi chimici di difesa nei confronti di organismi patogeni; ciò suggerisce che quei micoparassiti che riescono ad attaccare i licheni (funghi lichenicoli parassiti), devono avere evidentemente sviluppato dei meccanismi che permettono loro di superare le suddette difese. Ad esempio, *Hobsonia santessonii* Lowen & D. Hawksw., parassita della specie *Peltigera scabrosa* Th. Fr., sembra essere in grado di produrre enzimi con un elevato grado di difesa nei confronti di determinati composti lichenici (Lawrey, 1997). In ogni caso, la relativa infrequenza dell’attacco di licheni da parte di funghi parassiti è stata attribuita

proprio alla produzione da parte dei licheni di una varietà di metaboliti secondari (Hawksworth, 1979), molti dei quali possiedono attività antibiotica (Vartia, 1973; Rundel, 1978; Lawrey, 1984, 1986, 1987). Studi sperimentali hanno dimostrato come i metaboliti secondari prodotti dai licheni limitino la distribuzione di determinati funghi lichenicoli ascomiceti dell'ordine *Hypocreales* (Lawrey *et al.*, 1994). Al tempo stesso però, vi sono evidenze sugli effetti positivi che alcuni metaboliti secondari avrebbero sulla crescita di funghi altamente specializzati (Lawrey, 1993).

Attualmente si assiste ad un crescente interesse sull'ecologia delle popolazioni e delle comunità parassite soprattutto in relazione ai processi che permettono di analizzare le interazioni tra parassiti-ospite-ambiente (Guegan *et al.*, 2005). Ad esempio, studi sulle comunità di piante hanno rivelato che le malattie delle piante stesse giocano un ruolo importante nella successione della comunità, influenzando i cambiamenti nella composizione delle specie (Gilbert, 2002). I microfunghi parassiti sono anch'essi importanti componenti delle comunità di licheni. Purtroppo però, solo pochi studi sono rivolti ad individuare il loro eventuale ruolo nell'alterazione della struttura della comunità (Arvidsson, 1979; Glenn *et al.*, 1997; Lücking & Bernecker-Lücking, 2000; Hedenås *et al.*, 2002) e quindi la loro funzione nei sistemi naturali è ancora ampiamente sconosciuta. È stato comunque ipotizzato che il numero di funghi lichenicoli aumenta durante la naturale successione della comunità per l'aumento della diversità di organismi ospiti; probabilmente, inoltre, le specie che occupano comunità in stadi di recente formazione tendono ad essere più specializzate ma meno aggressive (Lawrey & Diederich, 2003).

Vista la predominante presenza di licheni in Antartide (Øvstedal & Lewis Smith, 2001), ci si può facilmente aspettare la presenza di un elevato numero di funghi lichenicoli in questi ambienti; questa "nicchia ecologica" però non è ancora stata indagata in modo dettagliato (Hawksworth & Iturriaga, 2006) anche se esistono lavori relativi alla presenza di funghi lichenicoli in Antartide (vedi Øvstedal & Hawksworth, 1986; Olech, 2001; Hawksworth & Iturriaga, 2006).

I primi casi invece in cui è stata riportata la presenza di organismi procarioti (non cianobatteri) nei licheni sono piuttosto contraddittori e probabilmente dovuti a erranee interpretazioni di composti secondari cristallizzati (Uphof, 1925a, 1925b; Suessenguth, 1926). Esistono invece lavori, relativi alla presenza di batteri all'interno dei talli lichenici, eseguiti però molto prima dell'introduzione di indagini di tipo molecolare; ciò suggerisce come la nostra conoscenza della diversità tassonomica dei batteri "associati" ai licheni sia

ancora piuttosto limitata (Kolumbe, 1927; Krasil'nikov, 1949). In molti casi i batteri rinvenuti nei talli lichenici appartengono a specie in grado di fissare azoto atmosferico (*Azotobacter*), e sono stati isolati mediante tecniche colturali (Henkel & Yuzhakova, 1936; Iskina, 1938; Scott, 1956). Insieme ad *Azotobacter*, altri autori hanno individuato generi come *Bacillus* (Genkel' & Plotnikova, 1973), *Beijerinckia* (Panosyan & Nikogosyan, 1966), *Clostridium* (Iskina, 1938) e *Pseudomonas* (Genkel' & Plotnikova, 1973). Mentre in tutti questi lavori viene ipotizzato per i ceppi isolati un ruolo nella fissazione dell'azoto atmosferico, Zook (1983) suggerisce un possibile ruolo di difesa del lichene operato dai batteri nei confronti dell'attacco da parte di altri organismi. Blanco *et al.*, (2002) sembrano confermare questo ipotetico ruolo nel riportare la presenza di batteri epifiti in grado di interagire metabolicamente con la componente fungina della simbiosi nella produzione di composti fenolici. Alcuni metaboliti secondari prodotti dai talli lichenici sembrano però esercitare un'attività antimicrobica nei confronti di molti batteri (Ingólfssdóttir *et al.*, 1985); è probabile quindi che batteri presenti all'interno dei talli abbiano sviluppato dei meccanismi di resistenza agli effetti antibiotici dei composti lichenici e di conseguenza, possiedano una specificità nei confronti delle specie di licheni ospitanti.

Più recentemente la presenza di batteri nei talli lichenici è stata confermata da lavori svolti anche con approcci di tipo molecolare, anche se per ora sono state formulate soltanto ipotesi sul possibile ruolo che tali batteri potrebbero svolgere. Tra i batteri rinvenuti vi sono specie appartenenti all'ordine *Actinomycetales* (González *et al.*, 2005) o specie per le quali è stato ipotizzato un possibile ruolo ecologico collegato alle esigenze nutrizionali del lichene, come ad esempio *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas* spp., *Pantoea* sp., *Serratia marcescens* e *Acinetobacter calcoaceticus* (Liba *et al.*, 2006). Cardinale *et al.* (2006) infine, analizzando campioni lichenici provenienti da habitat temperati con l'utilizzo di tecniche colturali e molecolari, hanno individuato , 25 differenti *taxa* appartenenti a generi diversi (*Actinobacteria*, *Proteobacteria* ecc.).

Una conferma della possibile presenza di batteri in qualche modo associati ai licheni è data dallo studio delle micorrize (una delle simbiosi più comuni al mondo costituita da associazioni tra funghi e radici del 90% delle piante terrestri). Studi recenti hanno infatti rivelato che in alcuni casi la complessità di questa simbiosi è addirittura accentuata dalla presenza di un terzo organismo simbionte: un batterio che vive all'interno delle ife del fungo. Questa scoperta induce a rivedere il concetto di simbiosi e introduce una nuova visione secondo la quale la simbiosi potrebbe in realtà essere, almeno in questo caso, un'associazione tripartita (Bonfante, 2003). Secondo alcuni studiosi, durante il ciclo

vitale delle componenti fungine che partecipano alla simbiosi, l'associazione può instaurarsi con gruppi diversi di batteri; infatti, le interazioni sembrano stabilirsi sia con batteri presenti nella rizosfera durante la fase "extra-radicale", sia con batteri endosimbionti che si stabiliscono nel citoplasma di alcuni isolati fungini (Perotto & Bonfante, 1997; Bonfante *et al.*, 2001). Il significato del possibile ruolo svolto dai batteri non è ancora chiaro, ma l'analisi di queste interazioni multiple tra funghi, piante e batteri offre nuovi mezzi per la comprensione della complessità delle simbiosi.

Riguardo all'Antartide, come sopra accennato, quando si parla di comunità criptoendolitiche dominate dai licheni, ci si riferisce a comunità in cui sono presenti sia organismi eucariotici che procariotici; è possibile che lo stile di vita confinato in microhabitat particolari come l'interno delle rocce, favorisca la co-presenza di altri organismi che potrebbero essere in qualche modo coinvolti in interazioni di tipo diverso. In questi ambienti ad esempio, è stato individuato un gruppo ecologico di funghi neri estremotolleranti, non-lichenizzati, spesso con accrescimento di tipo meristemato; probabilmente questi microrganismi traggono beneficio dalla presenza di un produttore primario (il lichene), vista la particolare oligotrofia di questi ambienti.

Esplorare quindi non soltanto l'interazione bilaterale tra due partner simbiotici, ma anche le potenziali interazioni che essi hanno con altri organismi eventualmente associati, mediante un approccio di analisi multilaterale, può risultare in una più completa comprensione delle simbiosi. In questo senso, la simbiosi deve essere interpretata come una "nicchia ecologica" in grado di ospitare diverse comunità di microrganismi. Molto interessante in questo senso è proprio l'habitat offerto dalle simbiosi fungine, come l'associazione lichenica, che proprio in virtù dei risultati dei recenti studi sopra illustrati dovrebbe forse essere più giustamente considerata come un'associazione di più organismi (legati probabilmente da meccanismi ancora poco chiari), caratterizzata da una propria biodiversità.

1.7 SISTEMATICA MOLECOLARE: METODI DI INDAGINE E PRINCIPI

La Sistematica è, tradizionalmente, la scienza che implica la scoperta, la descrizione e l'interpretazione della diversità biologica nonché la sintesi delle informazioni in sistemi di classificazione. Con la formulazione delle teorie evolutive, tuttavia, uno degli scopi

fondamentali di tale scienza è diventato quello di far luce sui processi evolutivi che hanno prodotto tale diversità e, quindi, la Sistematica è legata oggi direttamente e principalmente allo studio dell'evoluzione in generale. L'approccio evolutivo ha donato a questa scienza nuove proprietà: l'approccio filogenetico, infatti, mettendo in luce la storia evolutiva degli organismi studiati, consente non soltanto di dare solidità alla classificazione basandola sulla monofilia dei gruppi, ma anche di chiarire i processi di diffusione ed adattamento oltre che consentire di fare previsioni sulle proprietà di determinati gruppi sulla base delle relazioni filogenetiche con gruppi noti.

L'applicazione dell'analisi degli acidi nucleici in campo sistematico è stato uno degli sviluppi più stimolanti degli anni recenti. I dati molecolari, rispetto a quelli morfologici, mettono a disposizione un gran numero di caratteri, la loro interpretazione è più semplice in quanto i dati sono più facilmente confrontabili e si prestano molto bene ad elaborazioni statistiche. Queste caratteristiche li rendono particolarmente adatti per generare ipotesi filogenetiche.

I dati ricavati da questo tipo di approccio hanno rivoluzionato la nostra visione delle relazioni filogenetiche tra gli organismi, ciò è particolarmente vero per il Regno *Fungi* la cui organizzazione sistematica, sulla base dei recenti studi di filogenesi molecolare, è stata profondamente rivisitata.

1.7.1 Amplificazione dei geni di interesse

Il metodo che oggi viene generalmente usato per ottenere numerose copie di un determinato gene è la "Polymerase Chain Reaction" (PCR), un processo che permette l'amplificazione anche di piccole quantità di DNA mediante primers specifici (corte sequenze nucleotidiche di DNA, ciascuno con una specifica sequenza) e che fornisce moltissime copie di sequenze del DNA di interesse (Mullis & Falloona, 1987). I primers possono essere disegnati per essere altamente specifici, in modo tale da riuscire ad amplificare con essi determinate regioni del DNA a partire da materiale anche non completamente puro (White *et al.*, 1990; Mugnier, 1994). Nel caso dei licheni esistono dei primers che possiedono una elevata specificità per sequenze di DNA fungino e quindi consentono l'amplificazione di regioni del DNA del micobionte anche in presenza di DNA algale (Gargas & Taylor, 1992; Gardes & Bruns, 1993). In questo modo i metodi basati sull'uso delle reazioni di PCR non richiedono necessariamente l'isolamento in coltura pura del partner fungino della simbiosi (Bruns *et al.*, 1990; White *et al.*, 1990; Haines &

Cooper, 1993; Taylor & Swann, 1994; Armaleo & Clerc, 1995; Grube *et al.*, 1995; Savolainen *et al.*, 1995; Cubero *et al.*, 1999; Ekman, 1999; Murthag *et al.*, 1999; Zoller *et al.*, 1999; Martín & Winka, 2000).

In una reazione di PCR, oltre alla sequenza da amplificare, sono necessari, come sopra accennato, anche altri elementi:

- **dNTPs**: nucleosidi trifosfato come ATP, CTP, GTP, TTP. Vengono incorporati nell'elica nascente di DNA sintetizzata dall'enzima DNA-polimerasi (*Taq*) sullo stampo di un'elica complementare;
- **primer**: corte sequenze di nucleotidi (oligonucleotidi), utilizzati per amplificare tratti limitati di DNA, complementari agli estremi della sequenza da amplificare. Il primer funge da innesco per l'enzima *Taq* DNA-polimerasi (descritta di seguito) fornendole l'estremità 3'-OH libera.
- **Taq**: una DNA-polimerasi in grado di non denaturarsi alle alte temperature. E' l'enzima responsabile della replicazione e della sintesi di un filamento di DNA sullo stampo di un'elica complementare. Questi enzimi sono stati scoperti ed estratti dal batterio *Thermus aquaticus* e quindi modificati per essere utilizzati in biologia molecolare. Questi batteri crescono a temperature elevate ed i loro enzimi mantengono l'attività catalitica anche oltre 50°C, temperatura alla quale un enzima normalmente perde la sua funzionalità.

La PCR avviene in 3 fasi:

1. Nella prima fase di **DENATURAZIONE** si ha la separazione del doppio filamento di DNA che deve essere copiato (i legami idrogeno della struttura si rompono e i filamenti si separano). Questa fase avviene ad elevata temperatura (94-99°C).
2. Nella seconda fase di **APPAIAMENTO** o **ANNEALING**, i primers si appaiano ai filamenti separati. La temperatura in questa fase diminuisce e dipende sostanzialmente dal primer utilizzato (30-65°C).
3. Nella terza fase di **ESTENSIONE** la *Taq* DNA-polimerasi, sfruttando l'OH libero fornito dai primers, polimerizza usando come stampo la sequenza di DNA. In questa fase la temperatura aumenta di nuovo (65-72°C) (figura 1.15).

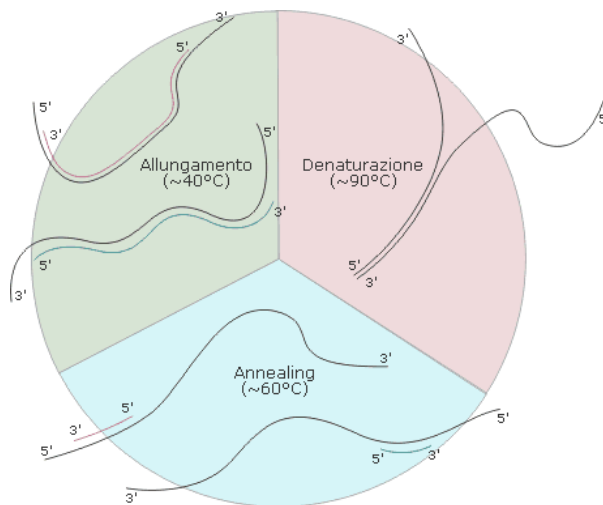


Fig. 1.15 – Rappresentazione grafica delle fasi di una Polymerase Chain Reaction.

Le fasi sopra descritte vengono ripetute generalmente per circa 20-30 volte. In genere non si superano i 50 cicli in quanto ad un certo punto la quota di DNA ottenuto raggiunge un plateau. Ciò avviene, ad esempio, per carenza degli oligonucleotidi usati come inneschi o per diminuzione dei dNTPs. Bisogna inoltre considerare che si potrebbe amplificare in maniera eccessiva anche eventuale materiale contaminante. Di solito un ciclo completo prevede anche un'estensione finale a 72°C affinché i prodotti parzialmente amplificati possano essere completati.

Una delle cause di insuccesso della PCR è l'incompleta **denaturazione** del DNA bersaglio e dei prodotti di reazione. La temperatura e la durata di questa fase dipendono dalla natura del DNA bersaglio: lunghezza, composizione percentuale in G + C. Temperature più elevate rispetto a quelle sopra indicate si rendono necessarie nel caso di bersagli particolarmente ricchi in GC; si deve però tenere presente che temperature eccessive determinano la perdita di attività della polimerasi: la **Taq DNA-polimerasi** ha infatti un'emivita che diminuisce progressivamente con l'aumentare della temperatura. La temperatura e la durata della fase di appaiamento (**annealing**) dipendono dalla concentrazione, dalla lunghezza e composizione in basi dei primers. Dal punto di vista strutturale un primer ideale deve avere una lunghezza compresa tra 18 e 28 nucleotidi ed una composizione in G + C compresa tra il 50 ed il 60%. Queste condizioni garantiscono una temperatura di fusione (T_m = "melting temperature"), da cui dipende la temperatura di

annealing, compresa tra 50 e 80°C secondo la formula semplificata di determinazione: $T_m = 4 (G+C) + 2 (A+T)$. La scelta delle condizioni operative dei cicli di PCR (durata e temperature) è comunque compito dell'operatore.

Durante il primo ed ogni successivo ciclo di reazione, l'estensione di ogni oligonucleotide (primer) sullo stampo originale produce una nuova molecola di ssDNA (single strand DNA) di lunghezza indefinita. Queste molecole si accumulano in maniera lineare, quindi la loro quantità dopo un certo numero di cicli è linearmente proporzionale allo stesso numero di cicli. I prodotti ottenuti in questo modo fungono da stampi per gli oligonucleotidi durante i cicli successivi, e la loro estensione produce molecole di lunghezza definita, corrispondenti a quella della sostanza di interesse, che fungono a loro volta come stampi producendo altre molecole. In questo modo si sviluppa una reazione detta appunto "a catena", che porta all'accumulo di uno specifico dsDNA (double strand DNA) in maniera esponenziale rispetto al numero di cicli di reazione. Il grado di amplificazione finale è dato da $2^{(n-2)}$ dato che i primi due cicli sono nulli.

I frammenti così ottenuti vengono visualizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio che permette di separare frammenti di acido nucleico in funzione del loro peso molecolare, grazie ad un campo elettrico che attraversa il gel. I frammenti migrano dal polo negativo a quello positivo, in funzione delle cariche elettriche conferite dai gruppi fosfato (figura 1.16). Con questa tecnica quindi, frammenti di DNA carichi negativamente per i residui di fosfato tendono a migrare verso il polo positivo. Più i frammenti sono grandi e pesanti e più lentamente avviene la migrazione; in questo modo i frammenti più grandi restano indietro rispetto a frammenti più piccoli, che passano invece tra le maglie più velocemente.

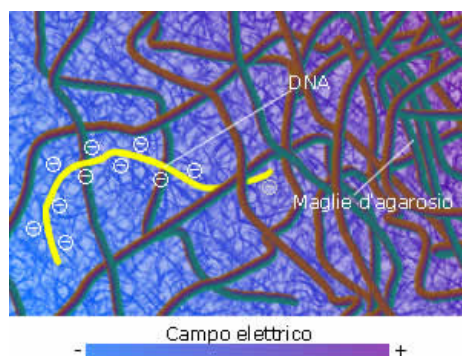


Fig. 1.16 – Rappresentazione grafica della migrazione dei frammenti di DNA su gel di agarosio.

La visualizzazione dei diversi frammenti nel gel è garantita da sostanze intercalanti, come il bromuro di etidio, che sono fluorescenti se esposte ai raggi UV. Infine, la dimensione dei frammenti può essere determinata per confronto grazie alla contemporanea migrazione di un DNA marker di peso molecolare noto.

1.7.2 Sequenziamento

E' possibile conoscere poi la sequenza dei frammenti amplificati grazie a reazioni di sequenziamento. La conoscenza delle proprietà fisico-chimiche degli acidi nucleici ha reso possibile la messa a punto di due tecniche diverse per la determinazione della sequenza di basi di un tratto di DNA che prendono il nome dai loro scopritori: A.M. Maxam e W. Gilbert per il **'metodo chimico'** e F. Sanger per quello **'enzimatico'**. Entrambi i metodi di sequenziamento hanno un principio comune; in ogni metodo viene generata una serie di frammenti di DNA a singolo filamento, ciascuno più lungo di una base rispetto al precedente. Molecole di DNA aventi la stessa sequenza ma che differiscono in lunghezza anche di una sola base, possono essere separate mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide. Le bande corrispondenti a molecole di dimensioni crescenti formano una scaletta che può essere seguita per una lunghezza in genere di circa 300-500 nucleotidi. Il metodo di "sequenziamento enzimatico" (Sanger *et al.*, 1977) in particolare, detto anche sistema dei dideozinucleotidi, è quello ormai più usato. La reazione di sequenziamento avviene tramite la sintesi di DNA usando nucleotidi marcati ed un solo primer complementare ad una porzione del frammento di DNA da sequenziare. Oltre ai normali precursori nucleotidici (dNTPs), la sintesi del DNA avviene in presenza di dideozinucleotidi base-specifici (ddNTPs) che mancano di un gruppo ossidrilico al 3' e al 2'. I ddNTPs vengono incorporati senza problemi nella catena nascente di DNA, ma ne arrestano l'ulteriore allungamento. Questo metodo richiede la suddivisione del campione, opportunamente denaturato, in quattro aliquote e si portano quindi avanti quattro reazioni diverse base-specifiche. In ognuna delle quattro aliquote è ovviamente presente un ddNTP diverso e di conseguenza in ognuna di esse la sintesi si arresta dopo una specifica base. I ddNTPs sono aggiunti in quantità limitata così che vengono inseriti con una certa frequenza e non in tutte le posizioni. La miscela di molecole di diversa lunghezza, specifiche per A per esempio, viene caricata, dopo aver effettuato una fase di amplificazione, in una corsia del gel mentre le altre tre specifiche per G, C e T, vengono

caricate nelle tre corsie adiacenti. Ognuna delle quattro miscele di reazione sarà composta, oltre che dal campione da sequenziare, anche da DNA polimerasi, primer, buffer e cloruro di magnesio, i quattro dNTPs e una piccola aliquota di uno dei quattro ddNTPs. Si producono così frammenti di DNA di lunghezza diversa poiché il nucleotide che blocca il processo, essendo anche in concentrazione minore rispetto al suo analogo dNTP, può essere legato a livello di qualsiasi posizione dell'amplicon. Ciascuna delle quattro reazioni base-specifiche genera una collezione di frammenti di lunghezze diverse, con l'estremità 5' comune, perché definita dal primer di sequenziamento, ed estremità 3' variabili (figura 1.17).

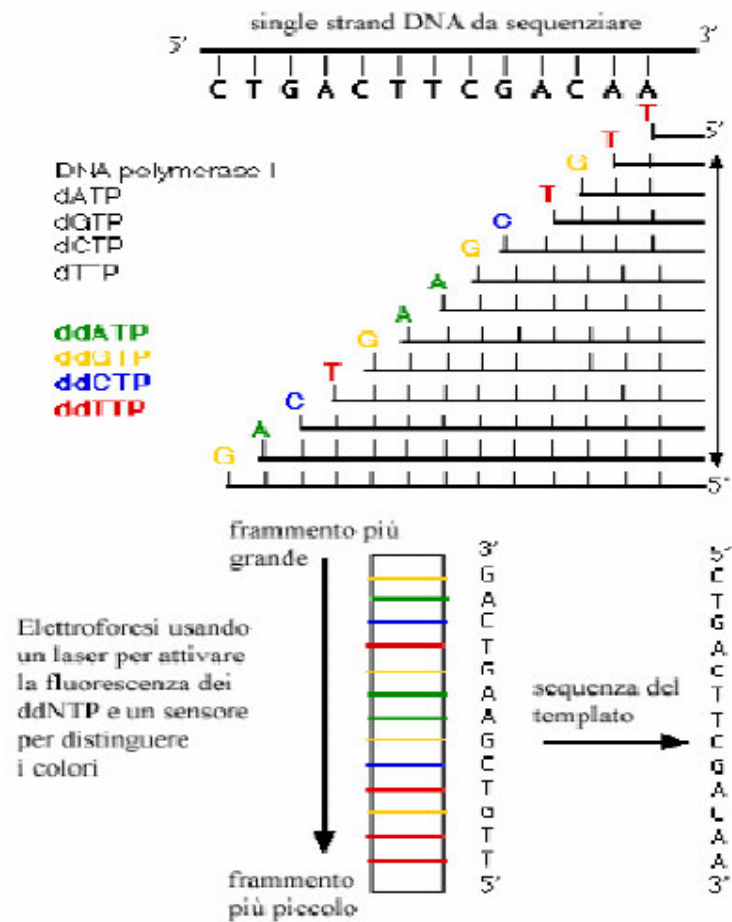


Fig. 1.17 – Rappresentazione grafica di una reazione di sequenziamento enzimatico.

I frammenti ottenuti, diversi in lunghezza anche per un singolo nucleotide, sono separabili su un gel denaturante di poliacrilammide ad alta risoluzione. Dopo l'elettroforesi e l'esposizione radiografica la sequenza può essere letta. L'accuratezza della metodica del sequenziamento può essere aumentata sequenziando indipendentemente i due filamenti di DNA e le due sequenze ottenute devono essere esattamente complementari. Il metodo di Sanger si presta all'automazione; oggi infatti esistono delle macchine automatiche (i più diffusi sono i sequenziatori capillari) in grado di determinare le sequenze di frammenti di DNA a doppio o singolo filamento di frammenti di PCR sfruttando la fluorescenza. Queste procedure usano primers (marcatura del DNA in 5') o ddNTP (marcatura del DNA in 3') legati a fluorofori diversi che emettono fluorescenza diversa. Il risultato di questa reazione produce dei frammenti di DNA nei quali le diverse basi sono identificate da quattro colori diversi perchè reagiscono alla luce emettendo una propria fluorescenza. In sostanza, durante l'elettroforesi il campione viene colpito da una sorgente luminosa (laser) ed emette una fluorescenza che viene rilevata da un sensore; il segnale elaborato da un opportuno software mostra in forma grafica a quattro colori la sequenza del DNA (elettroferogramma).

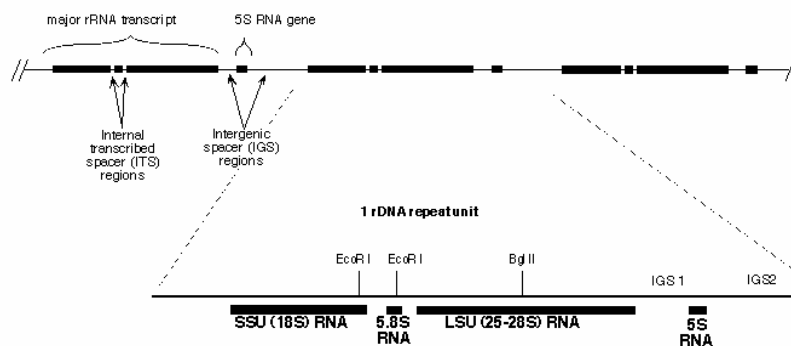
Per evitare ambiguità è sempre preferibile sequenziare il DNA in entrambe le direzioni (forward e reverse), utilizzando gli stessi primers utilizzati per la PCR; i filamenti vengono successivamente assemblati per ottenere le sequenze complete. La quantità di DNA da sequenziare viene calcolata osservando l'intensità della banda del prodotto pulito di PCR. Questa fase della preparazione del campione è molto importante in quanto reazioni eseguite con troppo DNA producono generalmente nell'elettroferogramma un segnale molto forte all'inizio, ma di lunghezza piuttosto breve; al contrario se la concentrazione di DNA è troppo bassa, il segnale risulta debole ed altrettanto corto.

1.7.3 I geni ribosomali

Gli studi filogenetici sono basati principalmente sull'analisi di alcune regioni del DNA che codificano per l'RNA ribosomiale (Bruns *et al.*, 1991), presente, con funzioni omologhe, in tutti gli organismi viventi. Questa porzione del genoma consiste in un numero di geni altamente conservati che codificano per le due subunità ribosomiali: Small SubUnit-SSU (18s) e Large SubUnit-LSU (26s) e variabili ("Internal Transcribed Spacers", ITS). Le regioni altamente conservate, come dice la parola stessa, variano molto poco sia in lunghezza, sia nell'ordine dei nucleotidi. Ciò è abbastanza intuitivo se si considera che tali

porzioni partecipano alla formazione dei ribosomi e dunque, alla sintesi delle proteine; una qualsiasi mutazione che possa influire sull'ordine della loro sequenza nucleotidica può alterare il funzionamento dei ribosomi e avere effetti negativi sulla vitalità della cellula. Eventuali mutazioni che interessino questo tratto vengono facilmente selezionate negativamente; in queste regioni quindi, i cambiamenti si accumulano molto lentamente e per questo motivo possono essere utilizzate per stimare le relazioni filogenetiche a livelli tassonomici elevati (dal Regno fino a famiglia e genere, ecc.). Le sequenze spaziatrici (ITS), al contrario, sono molto variabili; quest'ultime hanno ripercussioni meno immediate sulla funzionalità del metabolismo cellulare e possiedono una maggiore libertà evolutiva. In pratica ciò si traduce in un accumulo di modificazioni, anche di una certa consistenza, in tempi brevi su scala evolutiva, pertanto rendono possibili confronti a rank tassonomici più bassi (ad es. tra specie). Sulla base del confronto delle regioni SSU, LSU e delle regioni ITS è, quindi, possibile studiare le relazioni tra organismi separati da qualunque distanza filogenetica.

Dei quattro tipi di rRNA: 18s, 5.8s, 28s e 5s, dove "s" (Svedberg) indica il *coefficiente di sedimentazione* in gradiente di saccarosio, il gene per l'rRNA più piccolo (5s) è collocato fra i geni per i tRNA (RNA transfer). I geni per i tre rRNA più grandi (che costituiscono l'rDNA) sono localizzati a livello della costrizione secondaria di un cromosoma e sono organizzati in tandem, comprendenti da qualche centinaio a qualche migliaio di copie messe in fila, secondo la seguente sequenza: partendo dall'estremità 5' di una unità di trascrizione o cluster, si incontra una sequenza *spaziatrice trascritta esterna* (ETS), il gene 18s, una sequenza non codificante (*spaziatrice trascritta interna*, ITS), quindi il gene 5.8s ed un'altra ITS; infine il gene 28s. Una seconda ETS chiude il cluster all'estremità 3'. Ognuno di questi clusters è a sua volta separato da quelli adiacenti da regioni di dimensioni estremamente variabili chiamate *Spaziatori Inter-Genici* (IGS), si tratta di sequenze non trascritte (NTS) (vedi immagine seguente).



1.7.4 Ricerca in Banca Dati

La ricerca di similarità di sequenze in Banche Dati è diventata un'operazione importante in molti settori della biologia. I programmi che effettuano questa operazione si basano sul confronto sistematico di una sequenza di partenza (generalmente chiamata *query*) con ognuna delle sequenze del Data Base. Considerando che molti data base contengono milioni di sequenze diverse è necessario disporre di programmi informatici in grado di portare avanti le ricerche in modo automatico. Alcuni di questi programmi sono estremamente efficienti e in grado di portare a termine una ricerca di similarità in pochi secondi. L'algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), utilizzato nella presente ricerca, e il programma che lo implementa, furono sviluppati nel 1990 da Stephen Altschul, Warren Gish, David Lipman in America presso l'NCBI (Centro Nazionale per la Ricerca Biotecnologica), da Webb Miller presso l'Università di Stato della Pennsylvania, e da Gene Myers presso l'Università dell'Arizona e sono utilizzati per identificare le [similarità](#) (cioè le somiglianze) fra le nuove sequenze con struttura sconosciuta e le sequenze (archivate nelle Banche Dati) la cui struttura è nota. Questo programma si basa essenzialmente su procedure che, per ogni sequenza del data base, effettuano l'allineamento, attribuiscono ad esso un punteggio che memorizzano quando è alto, ripetono l'operazione per ogni sequenza e infine mostrano la lista dei migliori allineamenti trovati.

1.7.5 Allineamento delle sequenze

Dopo aver ottenuto le sequenze delle regioni geniche dei microrganismi si procede alla loro analisi, mediante allineamento con le sequenze più simili scaricate dalla Banca Dati, allo scopo ultimo di studiare le relazioni tra gli organismi oggetto delle analisi e determinare il loro grado di distanza filogenetica. Un allineamento di più sequenze consiste in una matrice di dati in cui le colonne rappresentano porzioni analoghe tra le sequenze. Sono molti i programmi esistenti per la creazione di allineamenti delle sequenze in modo automatico. Quando però le sequenze che costituiscono la matrice sono molto diverse tra loro, quelle regioni non perfettamente allineate vengono mantenute tali durante gli steps di allineamento eseguiti dai programmi. In questi casi le regioni vengono generalmente allineate manualmente dall'operatore anche se, in questo modo, si introduce un fattore di soggettività che viene da molti criticato, soprattutto perché l'accuratezza del passaggio

successivo a quello dell'allineamento, ossia la costruzione della filogenesi degli organismi esaminati, dipende fortemente dall'allineamento.

1.7.6 Ricostruzione della filogenesi

In accordo con la teoria evuzionistica, tutti gli organismi si sono evoluti a partire da un antecore comune e la biodiversità attualmente esistente è il risultato di differenti meccanismi che comportano l'acquisizione di variazioni. Questi meccanismi includono mutazioni, duplicazione dei geni, ricombinazione. Tra i meccanismi elencati, soltanto le mutazioni (mutazioni puntiformi, inserzioni e delezioni) vengono utilizzate per stabilire le relazioni tra i geni e quindi tra gli organismi. Sulla base del confronto delle sequenze di geni e/o proteine omologhi di diversi organismi è possibile ricostruirne la filogenesi utilizzando tecniche differenti. Le prime molecole ad essere utilizzate a tale scopo sono state le proteine; la prima proteina di cui si è ottenuta la sequenza è stata l'insulina, ma le prime ad essere utilizzate per l'inferenza filogenetica furono l'emoglobina ed il citocromo c. Nel 1977 Sanger sequenziò il primo tratto di DNA: l'intero genoma del batteriofago Φ X164. Da quel momento la filogenesi molecolare si basa essenzialmente sull'analisi delle sequenze del DNA.

Per ciò che riguarda i licheni, i dati oggi a disposizione sono il risultato di analisi effettuate soltanto negli ultimi anni, poiché i metodi molecolari possono essere utilizzati a partire da quantità significative di DNA purificato. Questa condizione ha inizialmente limitato lo studio a quegli organismi che potevano essere coltivati in coltura pura, mentre per altri non è stato possibile fino a quando non sono sorte nuove tecniche che permettessero di superare la suddetta limitazione.

La costruzione della filogenesi e degli organismi richiede calcoli complicati e viene eseguita mediante specifici programmi.

Alcuni dei programmi normalmente utilizzati a questo scopo sono disponibili online (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip/software.html>) e si avvalgono di diverse tecniche statistiche, messe a punto per inferire l'analisi filogenetica sulla base dei dati molecolari. Di seguito si riportano le due classi principali di tecniche attualmente in uso, descrivendo i principi fondamentali a cui si ispirano.

DISTANCE METHODS

Una classe di tecniche filogenetiche molecolari si avvale della matrice delle DISTANZE MOLECOLARI fra le specie: secondo questo metodo le specie meno distanti sono quelle più strettamente imparentate. Il metodo più frequentemente utilizzato in questa analisi prende il nome di **Neighbour-Joining (NJ)** ed è il metodo più veloce per l'analisi della filogenesi: si analizzano il numero di differenze esistenti tra le sequenze a confronto comparando a due a due le sequenze. Ciascun confronto viene trasformato in una misura di distanza e ad ogni step vengono uniti i sottoalberi fino ad ottenere l'albero completo.

DISCRETE METHODS

Al contrario dei distance methods, i discrete methods operano direttamente sulle sequenze piuttosto che su coppie di misure di distanza. In questo modo i discrete methods cercano di evitare la perdita di informazione che si verifica proprio quando le sequenze vengono convertite in misure di distanza.

I due metodi più conosciuti sono quelli di **Massima Parsimonia** e di **Massima Verosimiglianza**.

Massima Parsimonia (MP-Maximum Parsimony)

Quando si parla di parsimonia nel contesto dell'inferenza filogenetica, ci si riferisce al principio secondo cui la migliore stima della filogenesi reale è quella che richiede il minor numero di cambiamenti evolutivi. A giustificare il principio di parsimonia è la natura improbabile del cambiamento evolutivo. E' più probabile, infatti, che un carattere sia condiviso per discendenza comune e non per evoluzione indipendente convergente. In un qualsiasi insieme di specie, una filogenesi che richiede meno cambiamenti evolutivi è più plausibile di una che ne richiede di più.

Massima Verosimiglianza (ML-Maximum Likelihood)

Con questo metodo la procedura fondamentale consiste nel calcolare, utilizzando un modello di evoluzione delle sequenze e procedendo per tutte le possibili filogenesi, la probabilità di osservare i dati dell'allineamento ottenuti per un determinato insieme di specie. La filogenesi più plausibile è quella che ha la massima probabilità di aver prodotto le sequenze osservate.

L'analisi filogenetica eseguita con questo metodo può anche utilizzare altre informazioni: la velocità di evoluzione può variare fra specie diverse, oppure fra geni o nel

tempo. Questo metodo opera quindi da una prospettiva molto ampia ed è il metodo più corretto di valutare la significatività degli alberi, ma ha un grande limite: l'enorme mole di calcoli necessari per ottenere il risultato richiede computer molto efficienti e comunque è impossibile ottenere risultati per allineamenti multipli costituiti da più di 20-30 sequenze.

Molti biologi si servono ancora dei metodi della distanza e della parsimonia e ne diffondono l'uso. Alcuni pensano che le molecole evolvano secondo un modello fondamentalmente simile a un orologio: ciò significa che in genere i metodi della distanza potranno fornire una soluzione corretta. Tuttavia, se alcune linee filetiche evolvono più rapidamente di altre, i metodi della distanza non funzionano; in tal caso, parsimonia e massima probabilità sono associate a minore probabilità di errore.

La "robustezza" degli alberi filogenetici, che si ottengono mediante le analisi filogenetiche, viene misurata grazie all'analisi di Bootstrap. Si tratta di una analisi che permette di determinare la significatività del risultato ottenuto, supportando o meno l'albero filogenetico. Le sequenze vengono per così dire "ricampionate" in modo casuale allo scopo di ottenere più sottocampioni (bootstrap replicates) a partire dall'allineamento originale. I sottocampioni vengono quindi sottoposti ad analisi filogenetiche con i metodi sopra descritti (NJ, MP, ML). Gli alberi filogenetici risultanti dall'analisi di tutti i sottocampioni vengono utilizzati per costruire l'albero definitivo. Essendo il valore di bootstrap espresso in %, vengono proposti almeno 100 bootstrap replicates per ottenere un albero significativo; normalmente comunque l'analisi viene eseguita con più di 100 bootstrap replicates, infatti, maggiore è il numero di operazioni di bootstrapping, maggiore è l'attendibilità dei valori che si ottengono nell'albero finale. Se il 95%, o più, degli alberi ottenuti dall'analisi dei sottocampioni porta all'individuazione nell'albero finale di un gruppo di organismi, si può affermare che il gruppo è significativamente supportato.

2 SCOPO DEL LAVORO

PARTE I

ANALISI MOLECOLARE DEI MICRORGANISMI ASSOCIATI AI LICHENI ANTARTICI

In Antartide la vegetazione terrestre è dominata da muschi e da licheni, quest'ultimi formati da funghi Ascomiceti in associazione con alghe verdi (Kappen *et al.*, 1996). Il successo di questa associazione simbiotica consiste in una grande capacità adattativa, che può essere spiegata principalmente con una elevata capacità fisiologica di tollerare basse temperature, stress idrico e stress luminoso (Kappen, 2000).

Questa simbiosi rappresenta sicuramente una strategia vincente, è con ogni probabilità molto antica, ed ha portato nella maggioranza dei casi alla realizzazione di consorzi estremamente specifici, costantemente presenti anche in habitat estremi, laddove le condizioni ambientali sono tali da non consentire la sopravvivenza della maggior parte delle piante (Bartoli, 1996). In ambienti dove la colonizzazione superficiale è impedita dalle proibitive condizioni ambientali, come in molte aree deglacciate dei deserti antartici, i licheni sono ancora in grado di sopravvivere grazie ad un adattamento di tipo morfologico; essi, infatti, rinunciano a formare il tipico tallo epilitico e mantengono, invece, una organizzazione più lassa che consente loro di colonizzare le porosità delle rocce dove formano delle comunità dette criptoendolitiche (Nienow & Friedmann, 1993).

Proprio per queste caratteristiche la simbiosi lichenica potrebbe costituire in realtà una nicchia ecologica stabile anche per altri organismi. Analisi molecolari hanno già dimostrato come le comunità criptoendolitiche antartiche dominate dai licheni ospitano una grande diversità di microrganismi (de la Torre *et al.*, 2003). Ciò costituisce la base per l'esplorazione di questi habitats, dove molto probabilmente esistono interazioni microbiche, tra tutti i microrganismi presenti, piuttosto complesse. Lo spettro di queste interazioni potrebbe essere di molteplici forme quali, ad esempio, mutualismo o commensalismo. Qualsiasi sia l'effetto di queste interazioni sui singoli microrganismi, sui simbionti o sulla simbiosi, la probabilità di individuare interazioni dovrebbe essere piuttosto elevata, soprattutto in ambienti estremi come l'Antartide, dove gruppi diversi di microrganismi coesistono in spazi decisamente limitati. Pertanto uno degli scopi delle indagini relative a questo lavoro di tesi, è stato quello di studiare i microrganismi associati

ai licheni epilitici antartici mediante tecniche di isolamento in coltura, seguite da indagini molecolari di sequenze del DNA degli isolati ottenuti.

Ciò potrebbe portare a rivedere il concetto di lichene come simbiosi tra due microrganismi, allargandolo a quello di una associazione costituita da una diversità maggiore di microrganismi che interagiscono tra loro.

PARTE II

ANALISI MOLECOLARE NELL'AMBITO DEL GRUPPO *LECANORA POLYTROPA*

Il principale oggetto di studio di questa seconda parte della presente tesi di dottorato è rappresentato da una forma lichenica crostosa epilitica, rinvenuta su massi di dolerite in Antartide in testa all'Alatna Valley (area di Convoy Range, Valli Secche di McMurdo, Terra Vittoria del Sud). La specie è stata identificata come *Lecanora fuscobrunnea* Dodge & Baker (1938), e appartiene ad un gruppo complesso di licheni psicrofilo (gruppo della *L. polytropa*). Si tratta di una specie riportata come endemica per l'Antartide Continentale la cui presenza in Antartide è stata segnalata da più autori (Hale, 1987; Castello & Nimis, 1995a; Castello & Nimis, 1995b; Inoue, 1995; Seppelt *et al.*, 1995; Castello, 2003; Śliwa & Olech, 2002).

Il genere *Lecanora* è un genere molto ampio ed eterogeneo, pertanto le indagini sono state indirizzate verso uno studio molecolare e filogenetico, relativo al micobionte e al fotobionte, al fine ultimo di chiarire la delimitazione del gruppo *L. polytropa*. A questo scopo sono state incluse nello studio altre specie, *L. polytropa* (Hoffm.) Rabenh. var. *polytropa*, *L. polytropa* var. *alpigena* (Ach.) Schaer, *L. intricata* (Ach.) Ach. e *L. silvae-nigrae* V. Wirth, ritenute appartenenti allo stesso gruppo.

La tecnica utilizzata per queste analisi si basa sul confronto delle sequenze di determinate regioni di interesse filogenetico del DNA genomico.

Lo studio è stato svolto in collaborazione con il Prof. Martin Grube dell'Institute of Plant Sciences Karl-Franzens-Universität, Graz (Austria). La collaborazione ha previsto un periodo di attività svolto nei laboratori dell'Università di Graz.

3 MATERIALI E METODI

3.1 SITI DI CAMPIONAMENTO E SPECIE LICHENICHE ANTARTICHE ESAMINATE PER L'ISOLAMENTO DI MICRORGANISMI ASSOCIATI

I campioni utilizzati nella presente ricerca, riportati in tabella 3.1 insieme al luogo in cui sono stati raccolti e la data in cui è stato eseguito il campionamento, appartengono a specie diverse di licheni crostosi, foliosi e fruticosi (figura 3.1). Le specie utilizzate sono state identificate su base morfologica utilizzando la chiave dicotomica realizzata da Castello (2003). Tutti i campioni sono stati conservati, dal momento della raccolta in Antartide fino al trasferimento in laboratorio, a -20°C; sono attualmente conservati a -20°C presso il Dipartimento di Ecologia e Sviluppo Economico Sostenibile (DECOS) dell'Università della Tuscia di Viterbo. Complessivamente sono stati analizzati 17 campioni provenienti da aree diverse della Terra Vittoria (Antartide Continentale).

Tab. 3.1 – Campioni utilizzati per l'isolamento di microrganismi associati ai licheni.

Campione	Specie lichenica	Località di campionamento	Coordinate	Data di campionamento
1	<i>Acarospora</i> sp.	Ford Peak, Terra Vittoria del Nord,	75°41'26.3''S 160°26'25.3''E	28/01/2004
2	<i>Acarospora flavocordia</i> Castello & Nimis	Kay Island, Terra Vittoria del Nord,	75°04'13.7''S 165°19'02.0''E	30/01/2004
3	<i>Buellia frigida</i> Darb.	Inexpressible Island, Terra Vittoria del Nord	75°52'23.2''S 163°42'16.5''E	17/01/2004
4	<i>Lecanora fuscobrunnea</i> Dodge & Baker	Edmonson Point, Terra Vittoria del Nord	74°19'43.7''S 165°08'00.7''E	29/01/2004
5	<i>Lecanora fuscobrunnea</i> Dodge & Baker	Convoy Range, Terra Vittoria del Sud	76°54'33.0''S 160°50'00.0''E	25/01/2004
6	<i>Lecanora</i> sp.	Inexpressible Island, Terra Vittoria del Nord	75°52'23.2''S 163°42'16.5''E	17/01/2004
7	<i>Lecidea cancriformis</i> Dodge & Baker	Widowmaker Pass, Terra Vittoria del Nord	74°55'23.5''S 162°24'17.0''E	12/02/2004
8	<i>Rhyzocarpon</i> sp.	Vegetation Island, Terra Vittoria del Nord	74°47'05.2''S 163°38'40.3''E	16/01/2004
9	<i>Umbilicaria aprina</i> Nyl.	Kay Island, Terra Vittoria del Nord	75°04'13.7''S 165°19'02.0''E	30/01/2004
10	<i>Umbilicaria decussata</i> (Vill.) Zahlbr.	Kay Island, Terra Vittoria del Nord	75°04'13.7''S 165°19'02.0''E	02/02/2004
11	<i>Umbilicaria decussata</i> (Vill.) Zahlbr.	Vegetation Island, Terra Vittoria del Nord	74°47'05.2''S 163°38'40.3''E	16/01/2004
12	<i>Usnea antarctica</i> Du Rietz	Kay Island, Terra Vittoria del Nord	75°04'13.7''S 165°19'02.0''E	30/01/2004
13	<i>Usnea antarctica</i> Du Rietz	Vegetation Island, Terra Vittoria del Nord	74°47'05.2''S 163°38'40.3''E	16/01/2004
14	<i>Xanthoria elegans</i> (Link) th. Fr.	Kay Island, Terra Vittoria del Nord	75°04'13.7''S 165°19'02.0''E	30/01/2004
15	Lecidea sp.	Starr Nunatak, Terra Vittoria del Nord	75°53'55.7''S 162°35'31.3''E	15/02/2004
16	Lecidea sp.	Starr Nunatak, Terra Vittoria del Nord	75°53'55.7''S 162°35'31.3''E	15/02/2004
17	Sample 1 (non identificato)	Convoy Range, Terra Vittoria del Sud	76°54'33.0''S 160°50'00.0''E	25/01/2004

3.2 SPECIE LICHENICHE ESAMINATE NELL'AMBITO DEL GRUPPO *LECANORA POLYTROPA*

In totale sono stati esaminati 33 campioni (tabella 3.2) riconducibili al gruppo *Lecanora polytropa* e appartenenti a 5 specie diverse: *L. polytropa* (Hoffm.) Rabenh. var. *polytropa*, *L. intricata* (Ach.) Ach., *L. silvae-nigrae* V.Wirth, *L. polytropa* (Hoffm.) Rabenh. var. *alpigena* (Ach.) Schaer. e *L. fuscobrunnea* Dodge & Baker (figura 3.2a e 3.2b). I campioni di *L. fuscobrunnea* sono stati raccolti nell'area di Convoy Range, Alatna Valley, Terra Vittoria del Sud (Antartide) e Edmonson Point, Terra Vittoria del Nord. Tutti i campioni appartenenti alle altre specie incluse nello studio sono state raccolte in aree diverse ad alta quota nei pressi di Graz, Austria, (Plankogel, Handalpe e Koralpe) e sono conservati in parte nell'erbario dell'Università di Graz (GZU Herbarium) e in parte nell'erbario dell'Università di Trieste (TSB Herbarium).

Tab. 3.2 – Campioni utilizzati per le analisi nell'ambito del gruppo *L. polytropa*.

Sigla campione	Specie lichenica	Provenienza campione	Sigla campione	Specie lichenica	Provenienza campione
S1	<i>L. polytropa</i>	GZU Herbarium	S18	<i>L. polytropa</i>	GZU Herbarium
S2	<i>L. intricata</i>	GZU Herbarium	S20	<i>L. polytropa</i>	TSB Herbarium
S3	<i>L. polytropa</i>	GZU Herbarium	S31	<i>L.fuscobrunnea</i>	Convoy Range
S4	<i>L. intricata</i>	GZU Herbarium	S55	<i>L. polytropa</i>	TSB Herbarium
S5	<i>L. polytropa</i>	GZU Herbarium	S59	<i>L. polytropa</i>	TSB Herbarium
S6	<i>L. polytropa</i>	GZU Herbarium	S60	<i>L.fuscobrunnea</i>	Edmonson Point
S7	<i>L. intricata</i>	GZU Herbarium	S65	<i>L.fuscobrunnea</i>	Convoy Range
S8	<i>L. polytropa</i>	GZU Herbarium	S66	<i>L. polytropa</i>	GZU Herbarium
S9	<i>L. intricata</i>	GZU Herbarium	S67	<i>L. polytropa</i>	GZU Herbarium
S10	<i>L. intricata</i>	GZU Herbarium	S68	<i>L. polytropa</i>	GZU Herbarium
S11	<i>L. polytropa</i>	GZU Herbarium	S69	<i>L. polytropa</i>	GZU Herbarium
S12	<i>L. polytropa</i>	GZU Herbarium	S70	<i>L. polytropa</i> var. <i>alpigena</i>	GZU Herbarium
S13	<i>L. silvae-nigrae</i>	GZU Herbarium	S71	<i>L. polytropa</i> var. <i>alpigena</i>	TSB Herbarium
S14	<i>L. polytropa</i>	GZU Herbarium	S72	<i>L. polytropa</i> var. <i>alpigena</i>	TSB Herbarium
S15	<i>L. intricata</i>	GZU Herbarium	S73	<i>L. polytropa</i> var. <i>alpigena</i>	TSB Herbarium
S16	<i>L. polytropa</i>	GZU Herbarium	S74	<i>L. polytropa</i> var. <i>alpigena</i>	TSB Herbarium
S17	<i>L. intricata</i>	GZU Herbarium			

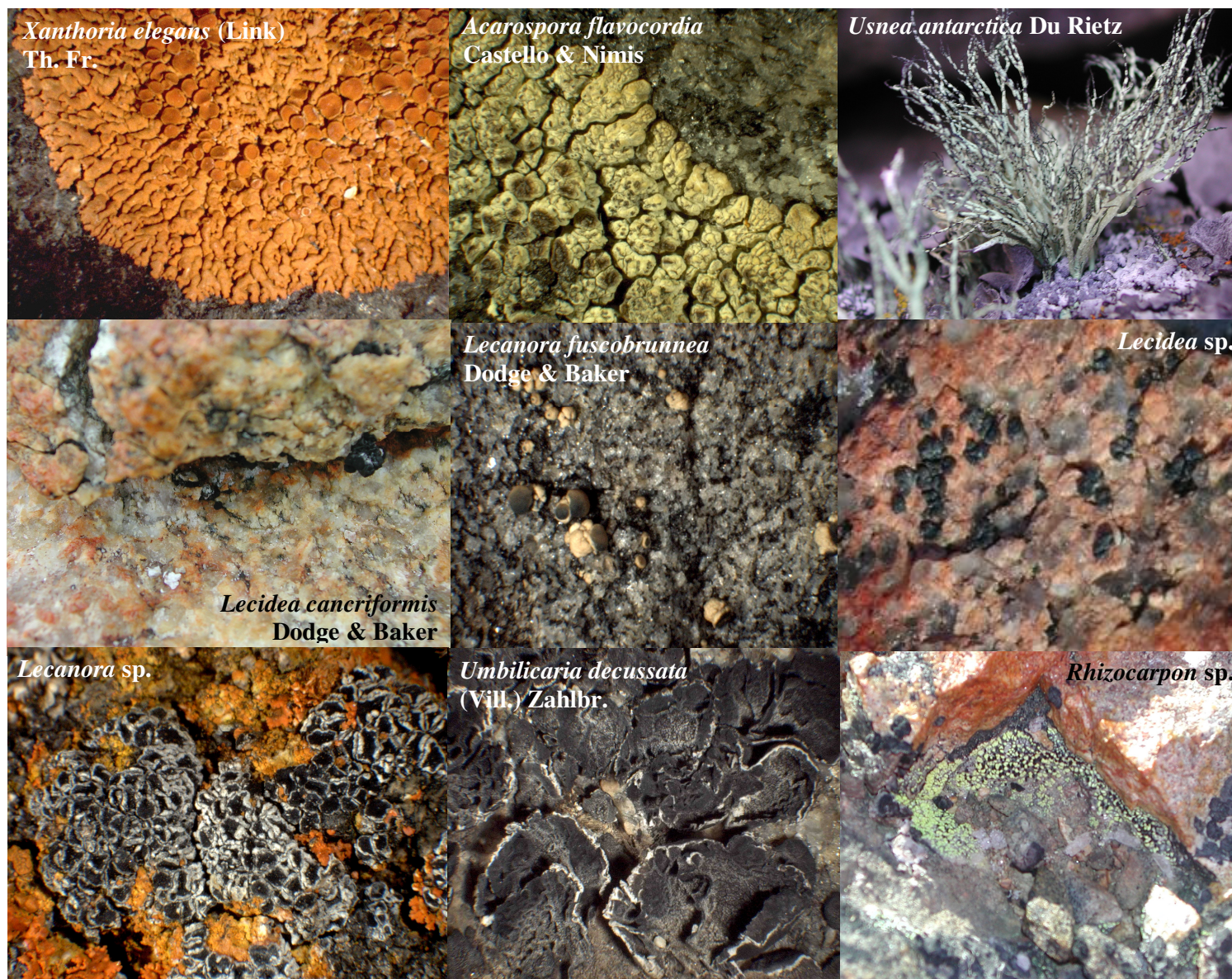


Fig. 3.1 – Immagini rappresentative di alcune specie utilizzate per l'isolamento di microrganismi associati.

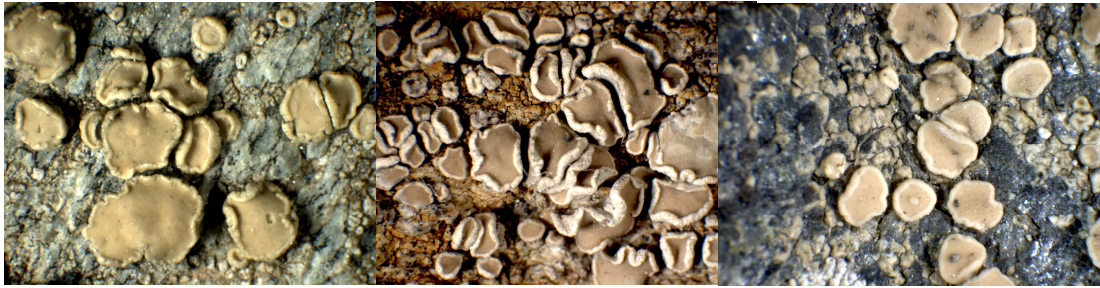


Fig. 3.2a – *L. polytropa* (Hoffm.) Rabenh. var. *alpigena* (Ach.) Schaer (sinistra); *L. silvae-nigrae* V.Wirth (centro); *L. polytropa* (Hoffm.) Rabenh. var. *polytropa* (destra).

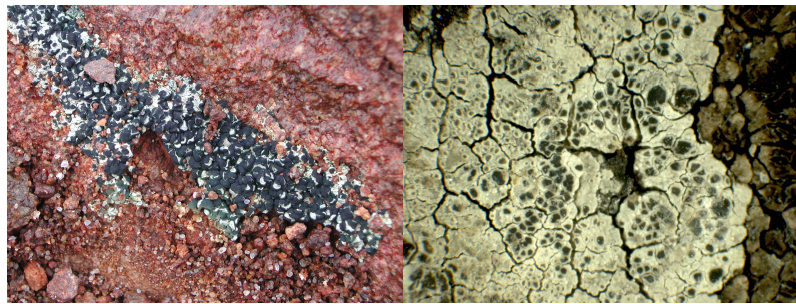


Fig. 3.2b – *L. fuscobrunnea* Dodge & Baker (sinistra); *L. intricata* (Ach.) Ach. (destra).

3.3 ISOLAMENTO DEI MICRORGANISMI ASSOCIATI AI LICHENI ANTARTICI

Per l'isolamento degli organismi associati ai campioni esaminati sono state utilizzate tecniche diverse che hanno portato all'individuazione di più organismi. L'isolamento è stato sempre eseguito in sterilità, lavorando sotto cappa a flusso verticale, utilizzando di volta in volta una tecnica per l'isolamento in coltura di organismi fungini, e una tecnica per ottenere in coltura ceppi batterici.

Per l'isolamento dei microrganismi fungini, piccoli frammenti di tallo sono stati trattati come descritto di seguito:

1. Sterilizzazione superficiale dei frammenti mediante lavaggio in H₂O₂ (8%) per 5 minuti.
2. Lavaggio in acqua deionizzata sterile per 5 minuti (per rimuovere l' H₂O₂).
3. Filtrazione della soluzione mediante setaccio sterile (maglia 500µ).
4. Distribuzione dei frammenti di tallo in piastre Petri su terreno culturale agarizzato.

L'isolamento di ceppi batterici è stato eseguito seguendo due diverse modalità.

Per gli isolati presenti sulla superficie dei talli:

- 1. Lavaggio dei frammenti su vortex in NaCl (0.8%) per 1 minuto.**
- 2. Distribuzione in piastre Petri su terreno agarizzato di 100µl della soluzione di lavaggio.**

Per gli isolati presenti all'interno dei talli:

- 1. Lavaggio dei frammenti, ottenuti dopo il primo lavaggio in NaCl, in H₂O₂ (8%) per 4 minuti.**
- 2. Lavaggio dei frammenti in NaCl (0.8%) per 4 minuti (per rimuovere l' H₂O₂).**
- 3. Frantumazione dei frammenti mediante pestello sterile in 500µl di acqua deionizzata sterile.**
- 4. Distribuzione in piastre Petri di 100µl della sospensione risultante.**

La componente esterna è stata isolata inoculando la soluzione risultante dal primo lavaggio effettuato in soluzione fisiologica (NaCl 0.8%). La componente interna è stata isolata soltanto dopo sterilizzazione con H₂O₂ (8%), allo scopo di ottenere in coltura soltanto quella porzione di batteri strettamente associati o interni al tallo.

Questa tecnica è stata impiegata anche per ottenere in coltura isolati fungini, semplicemente distribuendo parte delle soluzioni risultanti su terreni specifici per funghi.

Gli isolamenti sono stati eseguiti in duplicato su terreni diversi: per l'isolamento di organismi fungini sono stati utilizzati Malt Extract Agar, MEA (Oxoid, Ltd. Basingstoke, Hampshire, England) e Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol Agar, DRBC (Oxoid, Ltd. Basingstoke, Hampshire, England), addizionati con un antibiotico (Cloramfenicolo, IBI) alla concentrazione di 100ppm, per inibire lo sviluppo di forme batteriche; per l'isolamento di batteri è stato utilizzato Tryptone-Yeast Extract (TY), addizionato al contrario con l'antifungino Nipagina (methyl-para-hydroxy-benzoate, Sigma-Aldrich, Steinheim), alla concentrazione 0.03% w/v per inibire la crescita di funghi e alghe (1.5g di nipagina sono stati sciolti in 5 ml di etanolo e 1 ml della soluzione è stata aggiunta ad 1 l di terreno nutritivo). Antibiotico e antifungino sono stati aggiunti in sterilità, sotto cappa a flusso verticale, dopo aver sterilizzato i terreni. Per una descrizione dettagliata dei terreni vedi paragrafo 3.6.

Tutti gli isolamenti sono stati incubati in termostato a temperature diverse (5°C e 15°C per l'isolamento dei funghi; 10°C e 25°C per l'isolamento di batteri), per un mese o, qualora necessario, per tempi più lunghi e cioè fino a quando non sono comparse le prime colonie sulla superficie dell'agar nutritivo utilizzato. Le colonie (fungine e batteriche), scelte sulla base del diverso fenotipo, sono state successivamente trasferite singolarmente in coltura pura in piastre Petri contenenti MEA o Potato Dextrose Agar, PDA (Oxoid, Ltd. Basingstoke, Hampshire, England), nel caso di organismi fungini e TY per gli isolati batterici; questi ultimi sono stati strisciati su piastra come mostrato in figura 3.3.

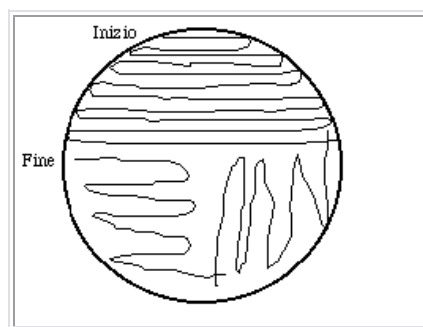


Fig. 3.3 – Striscio su piastra contenente terreno agarizzato.

Colture pure degli isolati fungini sono state, inoltre, trasferite in tubi, utilizzando quale substrato colturale MEA e PDA, per la conservazione all'interno della collezione custodita presso il Dipartimento di Ecologia e Sviluppo Economico Sostenibile (DECOS) dell'Università della Tuscia di Viterbo.

Gli isolati fungini inseriti in collezione sono indicati con la sigla CCFEE (*Culture Collection of Fungi from Extreme Environment*), accompagnata da un numero di collezione. Le colture pure dei ceppi batterici sono state numerate sulla base della loro origine (batteri superficiali o interni). Ad esempio: est 1 è un isolato ottenuto dalla superficie (est = esterno) cresciuto su TY; int 1 è invece un isolato ottenuto dall'interno del tallo.

3.4 CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA DEGLI ISOLATI

Gli isolati batterici sono stati osservati a livello macroscopico allo stereo-microscopio in relazione all'aspetto e al colore delle colture pure cresciute su TY a 10°C o 25°C. Gli isolati fungini, invece, sono stati osservati sia a livello macroscopico che microscopico.

L'osservazione macroscopica è stata effettuata allo stereo-microscopio sulle colture pure cresciute su MEA a 15°C, per un periodo che varia da ceppo a ceppo. I caratteri analizzati sono stati l'aspetto della coltura, il colore, la forma di crescita, la presenza/assenza di strutture fruttificanti, eventuali pigmenti extracellulari diffusi nell'agar.

Per una migliore osservazione delle caratteristiche morfologiche, sono state inoltre allestite delle microcolture, successivamente osservate al microscopio ottico.

Le microcolture sono state preparate in piastre Petri di vetro del diametro di 18 cm: un disco di carta assorbente bagnato con acqua deionizzata sterile è stato posizionato sul fondo all'interno della piastra per garantire ai microrganismi condizioni ottimali di umidità. Due bacchette di vetro sono state utilizzate invece per posizionare un vetrino senza che esso toccasse il disco di carta. Il materiale così preparato è stato sterilizzato in stufa a 160°C per una notte. Lavorando in sterilità sotto cappa a flusso verticale è stato posto sul vetrino un sottilissimo strato di terreno colturale (MEA) di forma quadrata, i cui lati sono stati inoculati con i ceppi isolati. L'inoculo è stato quindi coperto con un coprioggetto. Questo metodo viene utilizzato perché consente di osservare in dettaglio tutte le strutture utili per la caratterizzazione degli organismi, grazie al fatto che essi crescono a contatto sia del vetrino portaoggetti che del coprioggetto, utilizzando il terreno colturale frapposto tra i due.

Le microcolture sono state incubate a 15°C per circa 12 settimane (la temperatura e il tempo di incubazione sono stati scelti sulla base delle preferenze termiche e dei tempi di crescita degli organismi analizzati), fino ad ottenere delle colonie facilmente osservabili. Per ogni microcoltura sono stati allestiti due preparati microscopici con acido lattico, utilizzando il coprioggetto ed il portaoggetto separatamente, quest'ultimo dopo aver rimosso il terreno colturale. Si è quindi proceduto all'osservazione al microscopio in campo chiaro; le immagini visualizzate sono state fotografate utilizzando una macchina fotografica NIKON 5000 ed il Software MICROMAX ARKON (Versione 8.12.05) per l'acquisizione e la gestione delle immagini.

3.5 PREFERENZE TERMICHE E COLTURALI

Gli isolati ottenuti con i metodi precedentemente descritti (vedi paragrafo 3.3.) sono stati trasferiti, in duplicato, in piastre Petri contenenti MEA o PDA (per gli isolati fungini) e TY (per gli isolati batterici) e incubati in termostati tarati a diverse temperature. Le colonie fungine sono state trasferite mediante inoculi puntiformi, mentre gli isolati batterici sono stati trattati come precedentemente descritto (strisciati su piastra). Le temperature utilizzate per saggiare le preferenze termiche degli isolati fungini sono state 0 ± 1 , 5 ± 1 , 10 ± 1 , 15 ± 1 , 20 ± 1 e 25 ± 1 °C; quelle utilizzate per saggiare i ceppi batterici invece sono state 0 ± 1 , 5 ± 1 , 10 ± 1 , 15 ± 1 , 20 ± 1 , 25 ± 1 , 30 ± 1 , 35 ± 1 e 40 ± 1 °C. Il tasso di crescita degli isolati fungini è stato rilevato misurando il loro accrescimento diametrico in mm ad intervalli mensili. La misura del diametro delle colonie è stata ottenuta tracciando due rette perpendicolari tra loro sul fondo delle capsule in corrispondenza delle colonie. Per ogni coppia di misura è stata calcolata la media e la deviazione standard.

Per i ceppi batterici invece ci si è limitati a registrare l'avvenuta crescita o meno delle colonie (viste le dimensioni sempre minime tipiche dei batteri) assegnando valori diversi a seconda delle loro dimensioni (+ per una crescita minima; ++ per una crescita superiore; +++ per la crescita massima visualizzata). L'osservazione è stata eseguita dopo circa 3/4 giorni dalla data dell'inoculo.

Per alcuni degli isolati fungini sono state, inoltre, saggiate le preferenze colturali con il fine ultimo di individuare differenze nella morfologia di accrescimento in risposta a diversi terreni nutritivi. A questo scopo le colonie sono state trasferite su terreni diversi e incubate a 10°C (allo scopo di rallentare la crescita di eventuali contaminanti): un terreno sintetico, Czapek-Dox-Broth, CZA (Oxoid, Ltd. Basingstoke, Hampshire, England), e terreni grezzi quali MEA, Oatmeal Agar, OA e PDA.

3.6 COMPOSIZIONE DEI SUBSTRATI UTILIZZATI

MEA (<i>Malt Extract Agar</i>)	g/l
Estratto di malto	30.0
Peptone micologico	5.0
Agar	15.0

PDA (<i>Potato Dextrose Agar</i>)	g/l
Estratto di patate	4.0
Glucosio	20.0
Agar	15.0

CZA (<i>Czapek-Dox-Broth</i>)	g/l
Sodio nitrato	2.0
Potassio cloruro	0.5
Magnesio glicerofosfato	0.5
Ferroso solfato	0.01
Potassio solfato	0.35
Saccarosio	30.0
Agar	15.0

OA (<i>Oatmeal Agar</i>)	g/l
Estratto di avena	30.0
Agar (Applichem, Darmstadt)	15.0

Per preparare il terreno OA è necessario sciogliere 30 g di farina di avena in 1 l di acqua distillata e portare ad ebollizione; lasciare in ebollizione per 2 h; filtrare e utilizzare l'estratto ottenuto.

DRBC (<i>Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol Agar</i>)	g/l
Peptone	5.0
Glucosio	10.0
KH ₂ PO ₄	1.0
MgSO ₄ * 7H ₂ O	0.5
Dichloran	0.002
Rose-Bengal	0.025
Agar	15.0

TY (<i>Tryptone-Yeast Extract</i>)	g/l
Tryptone (BD, USA)	5.0
Estratto di lievito (Oxoid)	3.0
CaCl ₂ anidro (Sigma-Aldrich, Steinheim)	0.4
Agar (Applichem, Darmstadt)	17.0

I terreni sopra descritti sono stati preparati sciogliendo in acqua distillata sterile all'interno di beute i componenti, secondo quanto indicato nelle formule, grazie all'utilizzo di una piastra riscaldante. I preparati sono stati quindi sterilizzati a 121°C per 20 minuti in autoclave.

3.7 ESTRAZIONE DEL DNA DEGLI ISOLATI ANTARTICI

L'estrazione del DNA degli isolati ottenuti è stata eseguita mediante l'utilizzo di kit specifici, diversi per ceppi fungini e batterici. L'estrazione è stata fatta sulla base delle istruzioni della casa produttrice.

Di seguito vengono indicati i kit utilizzati:

1. KIT NUCLEOSPIN PLANT MACHEREY-NAGEL GMBH & CO. KG, per l'estrazione di DNA da funghi;

2. GENOMIC PURIFICATION KIT - PURE EXTREME™, FERMENTAS LIFE SCIENCES (MADE IN EU), per l'estrazione di DNA da batteri.

Quando per i batteri l'esito dell'estrazione con kit non ha dato buoni risultati è stato utilizzato un metodo diverso (più veloce) basato su shock termico che provoca la rottura della parete cellulare degli organismi. Di seguito si riportano i passaggi previsti da questa tecnica:

1. Trasferire una singola colonia batterica (~ 2 mm) da una coltura overnight a 37°C in una eppendorf (0.5 ml) contenente 14µl di acqua distillata sterile, utilizzando un puntale da micropipetta (20-200 µl). Fare attenzione a non includere agar.
2. Risospendere la coltura batterica in acqua e centrifugare brevemente evitando la formazione di pellet.
3. **Trattare la sospensione in un thermal cycler a 100°C per 5 minuti e raffreddare immediatamente in ghiaccio.**
4. **Centrifugare a ~ 6000 rpm (4000 x g) per 2-3 minuti.**
5. **Utilizzare 12 µl o tutto il surnatante per la reazione di PCR, facendo attenzione a non prelevare il pellet (se parte del pellet viene prelevato, ripetere lo step 4).**

(Quando il DNA ottenuto con questo protocollo non viene utilizzato subito per la reazione di amplificazione, può essere conservato per un giorno in congelatore a -20°C).

3.8 ESTRAZIONE DEL DNA DAI CAMPIONI APPARTENENTI AL GRUPPO *LECANORA POLYTROPA*

Considerazioni particolari vanno fatte per lavori di tipo molecolare su organismi come la simbiosi lichenica. Quando i simbionti non vengono separati in coltura, il DNA estratto appartiene ad entrambi gli organismi; in questo caso è possibile usare nelle successive reazioni di amplificazione primers specifici per il DNA del micobionte o del fotobionte. In ogni caso, anche utilizzando piccole quantità di tallo come materiale di partenza per l'estrazione, è possibile ottenere l'amplificazione di materiale "contaminante": funghi lichenicoli, batteri. Per questi motivi è importante controllare sempre con molta attenzione le condizioni dei talli al microscopio prima di iniziare le operazioni di estrazione.

In questa parte del lavoro il DNA è stato estratto utilizzando dei metodi diversi rispetto a quelli descritti per gli isolati antartici. Quando possibile è stato applicato un protocollo basato su una serie di passaggi che richiedono circa due giorni per la loro realizzazione (Cubero *et al.*, 1999). Con alcuni campioni però, il risultato ottenuto non è stato soddisfacente; in questi casi l'estrazione è stata realizzata utilizzando un kit (*DNeasy Plant Mini Kit, Quiagen, Vienna*), seguendo le istruzioni indicate dalla casa produttrice. Con entrambi i metodi comunque i talli sono stati sottoposti al trattamento descritto nel primo step del protocollo di seguito riportato, mentre tutti i passaggi successivi (2-18) sono relativi soltanto al protocollo Cubero *et al.* (1999).

- 1. Inserire circa 1.5 g del campione in eppendorf (1.5 ml) immerse in azoto liquido e frantumare l'aliquota con pestello (i pestelli vengono precedentemente trattati con acido acetico (10%) e lavati in acqua distillata sterile).**
- 2. Aggiungere 500 µl del buffer di lisi e incubare per 1 h a 65°C (mescolando la soluzione ogni 15 minuti).**
- 3. Centrifugare per 3 minuti a 12000 rpm; prelevare molto delicatamente la fase liquida superiore e trasferirla in una nuova eppendorf (1.5 ml).**
- 4. Aggiungere 500 µl di CI (Chloroform/Isoamylalcohol: 24/1) sotto cappa, passare al vortex per qualche secondo e centrifugare per 5 minuti a 12000 rpm.**
- 5. Prelevare la fase superiore (con DNA) e trasferirla delicatamente in una nuova eppendorf.**
- 6. Aggiungere 1 ml del buffer di precipitazione, mescolare delicatamente, e lasciare a riposo per 1 h a temperatura ambiente.**
- 7. Centrifugare per 15 minuti a 12000 rpm.**

8. Eliminare il surnatante e risospendere il pellet in 350 µl di NaCl 1.2 M, passare al vortex per pochi secondi.
9. Aggiungere 500 µl di CI, passare al vortex e centrifugare per 5 minuti a 12000 rpm.
10. Trasferire la fase superiore in una nuova eppendorf.
11. Aggiungere 210 µl di isopropanolo, conservato a -20°C e mescolare delicatamente, quindi incubare a -20°C per un tempo che va da almeno 15 minuti ad una notte intera.
12. Centrifugare per 20 minuti a 4°C a 12000 rpm.
13. Eliminare il surnatante (in questa fase del protocollo il pellet generalmente non è visibile).
14. Aggiungere 200 µl di EtOH (80 %) e centrifugare per 2 minuti a 12000 rpm.
15. Eliminare il surnatante.
16. Lasciare asciugare il pellet in stufa a 45°C per almeno 20 minuti.
17. Risospendere il pellet disidratato in 25 µl di acqua distillata sterile.
18. Preparare diluizioni del DNA per usi ripetuti in reazioni di PCR.

Il DNA così ottenuto è stato diluito (diluizione 5:100) e quindi utilizzato per le reazioni di amplificazione.

Buffers utilizzati con il protocollo sopra descritto per l'estrazione di DNA da licheni:

Preparazione del buffer di lisi (lysis-buffer)

Il primo buffer che viene usato nell'estrazione è quello di lisi: ha potere denaturante e solubilizzante con la funzione di disgregare la parete e le membrane cellulari delle ife del micobionte e delle cellule del fotobionte. Il buffer è composto da:

- CTAB (= N-cetyl-N,N,N,- trimethylammonium bromide) 1,4%;
- NaCl (p.m = 58,44g/mol) 1M;
- Tris (= tris-hydroxymethyl-amminometha, p.m = 121,1g/mol) 7 mM;
- EDTA (= Ethylendiamine-tetraacetic acid 2Na₂H₂O, p.m = 372,24g/mol) 30 mM.

Le polveri vengono miscelate contemporaneamente in un matraccio tarato e fatte sciogliere nell'acqua sull'agitatore magnetico fino all'ottenimento di una soluzione trasparente; si porta poi al volume desiderato con acqua bi-distillata sterile.

Preparazione del buffer di precipitazione (precipitation-buffer)

Il precipitation-buffer ha la funzione di far precipitare il DNA in soluzione: il CTAB, che ne è il componente base, forma un sale insolubile con il DNA, che quindi precipita, mentre i polisaccaridi neutri rimangono solubili. Il buffer è composto da:

- CTAB 0,5%;
- NaCl 40 mM.

Le polveri vengono sciolte in un matraccio tarato e si porta a volume con acqua bi-distillata sterile.

Preparazione della soluzione cloroformio/ isoamilalcohol 24:1

La soluzione di cloroformio/isoamilalcohol ha la funzione di separare proteine, composti organici ed alcuni polisaccaridi dalla fase in cui si trova il DNA. Essendo la soluzione di cloroformio/isoamilalcohol insolubile in acqua, dopo centrifugazione si formano due fasi distinte ed evidenti: la fase soprastante è quella acquosa contenente DNA, quella sottostante è cloroformio/isoamilalcohol in cui precipitano polisaccaridi e composti polifenolici, le proteine invece si accumulano nell'interfaccia tra le due fasi.

Per preparare 50 ml di cloroformio/isoamilalcohol 24:1 si mescolano 48 ml di cloroformio e 2 ml di isoamilalcohol lavorando in sterilità sotto cappa; la quantità di soluzione preparata varia dalle necessità di utilizzo.

Preparazione della soluzione 1.2M di NaCl.

Dopo la fase di precipitazione con C-TAB il DNA deve essere risospeso in una soluzione 1.2 M di NaCl (cloruro di sodio). Per preparare 100 ml di soluzione NaCl 1.2 M si pesano 7 g di NaCl e si porta a volume con acqua bi-distillata sterile in un matraccio tarato.

3.9 PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION)

Il DNA estratto dagli organismi studiati è stato utilizzato nelle reazioni di PCR per l'amplificazione di diverse regioni dell'rDNA: ITS, compreso il gene 5.8S, ed SSU per gli isolati fungini non lichenizzati, 16s per i batteri e ITS per i micobionti e i fotobionti. Per

permettere una visione più completa delle relazioni evolutive tra gli organismi, nel caso dei micobionti si è ritenuto opportuno, oltre alle porzioni ITS, estendere lo studio ad altre porzioni genomiche. Infatti, a causa di vari fenomeni biologici, come la duplicazione dei geni, le ipotesi filogenetiche basate solo su un gene potrebbero non riflettere l'evoluzione degli organismi studiati (Doyle, 1992). In questo senso, i geni che codificano per le proteine giocano un ruolo molto importante nello studio degli eucarioti e sembrano essere molto utili grazie al loro contenuto di informazioni di carattere funzionale (Liu *et al.*, 1999). Tra questi, le sequenze dei geni che codificano per le due subunità di ogni RNA-polimerasi nucleare sono molto utili, grazie alla loro lunghezza e alla facilità con cui possono essere studiate mediante PCR (James *et al.*, 1991; Stiller & Hall, 1997; Denton *et al.*, 1998). In particolare, l'analisi della subunità maggiore (RPB1) dell' RNA-polimerasi II (l'enzima responsabile della trascrizione in pre-mRNA dei geni che codificano per proteine), rappresenta un valido strumento per valutare affinità genetiche in range tassonomici molto vicini all'interno di uno stesso genere.

Ciascuna reazione di PCR (sia per funghi non lichenizzati che per batteri) è stata eseguita su una soluzione di 25 µl così costituita: 10 µl di miscela MasterMix (BioMix, BioLine Ltd. London: BioTaq DNA Polymerase, 32 mM (NH₄)₂SO₄, 125 mM Tris-HCl (pH 8.8 a 25°C), 0.02% Tween 20, 2 mM dNTPs), 1 µl di ciascun primer (alla concentrazione 5 pmol/µl), 1 µl (20 ng) di DNA, acqua deionizzata sterile in quantità tale da portare il volume della soluzione a 25 µl (12 µl). In alcuni casi, quando la reazione di PCR non ha dato esito positivo, la composizione della soluzione è stata modificata variando di volta in volta la quantità di DNA o di primer e di conseguenza la quantità di acqua, in modo tale da lavorare sempre con una soluzione finale di 25 µl.

Le miscele di PCR per micobionti e fotobionti sono state preparate come di seguito: 7.05 µl di acqua distillata sterile, 3 µl di 10x Taq polymerase reaction buffer (10 mM Tris pH 8.3), 1.8 µl di MgCl₂ (25 mM), 3 µl di dNTPs (2.5 mM), 0.15 µl Taq DNA polymerase, 1.5 µl di ogni primer (10 µM); a questa soluzione sono stati aggiunti 12 µl di DNA precedentemente diluito al 5% ad ottenere un volume finale di reazione di 30 µl.

Di seguito sono indicati i primers utilizzati per l'amplificazione del DNA ribosomiale (rDNA) dei ceppi fungini (Elwood *et al.*, 1985; Larena *et al.*, 1999; White *et al.*, 1990) e batterici (Weisburg *et al.*, 1991). Con alcuni isolati fungini le coppie di primers utilizzati non hanno dato buoni risultati; in questi casi è stato necessario utilizzare nuove

coppie con diverse posizioni di annealing ma che permettono l'amplificazione dello stesso frammento di interesse.

I primers, specifici per il DNA fungino algale e batterico, utilizzati per le reazioni di amplificazione delle regioni sopra descritte sono riportati di seguito:

Primer ITS e RPB1 micobionte	Sequenze primer (5' → 3')
ITS1-F (Gardes & Bruns, 1993)	CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A
ITS4 (White <i>et al.</i> , 1990)	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC
gRPB1 (Stiller & Hall, 1997)	GAK TGT CCK GGW CAT TTT GG
fRPB1 (Matheny <i>et al.</i> , 2002)	CNG CDA TNT CRT TRT CCA TRT A

Primer ITS fotobionte	Sequenze primer (5' → 3')
ITS1T (Kroken & Taylor, 2000)	GGA AGG ATC ATT GAA TCT ATC GT
ITS4T (Kroken & Taylor, 2000)	GGT TCG CTC GCC GCT ACT A

Primer SSU funghi	Sequenze primer (5' → 3')
NS1 (White <i>et al.</i> , 1990)	GTA GTC ATA TGC TTG TCT C
NS2 (White <i>et al.</i> , 1990)	GGC TGC TGG CAC CAG ACT TGC
NS3 (White <i>et al.</i> , 1990)	GCA AGT CTG GTG CCA GCA GCC
NS4 (White <i>et al.</i> , 1990)	CTT CCG TCA ATT CCT TTA AG
NS5 (White <i>et al.</i> , 1990)	AAC TTA AAG GAA TTG ACG GAA G
NS8 (White <i>et al.</i> , 1990)	TCC GCA GGT TCA CCT ACG GA
SR2 (Elwood <i>et al.</i> , 1985)	CGG CCA TGC ACC ACC
Oli9 (Hendriks <i>et al.</i> 1989)	CGA GGT AAT TCC AGC TCC A
SR10R Vilgalys unpublished (http://www.botany.duke.edu/fungi/mycolab)	TTT GAC TCA ACA CGG G
SR6 Vilgalys unpublished (http://www.botany.duke.edu/fungi/mycolab)	TGT TAC GAC TTT TAC TT

Primer ITS funghi	Sequenze primer (5' → 3')
ITS1 (White <i>et al.</i> , 1990)	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G
ITS4 (White <i>et al.</i> , 1990)	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC
ITS5 (White <i>et al.</i> , 1990)	GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G
ITS4A (Larena <i>et al.</i> , 1990)	GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G

Primer SSU batteri	Sequenze primer (5' → 3')
fD1 (Weisburg <i>et al.</i> , 1990)	CCG AAT TCG TCG ACA ACA GAG TTT GAT CCT GGC TCA G
rD1 (Weisburg <i>et al.</i> , 1990)	CCC GGG ATC CAA GCT TAA GGA GGT GAT CCA GCC

Le reazioni di amplificazione sono state effettuate in un thermal cycler (MiniCycler™ MJ^{research} Genenco) con coperchio riscaldante. Le reazioni sono state impostate in modo diverso per l'amplificazione di DNA fungino e DNA batterico.

Per i funghi il ciclo di amplificazione ha lavorato con il seguente schema:

1. **denaturazione** a 95°C per 2 minuti;
 2. **denaturazione** a 95°C per 30 secondi;
 3. **annealing** dei primers a 55°C per 30 secondi;
 4. **estensione** della catena a 72°C per 30 secondi;
- } **Questi step vengono
ripetuti 35 volte.**
5. **estensione** a 72°C per 5 minuti

Per i batteri invece il ciclo di amplificazione ha lavorato con il seguente schema:

1. **denaturazione** a 95°C per 5 minuti;
 2. **denaturazione** a 95°C per 45 secondi;
 3. **annealing** dei primers a 55°C per 1 minuto;
 4. **estensione** della catena a 72°C per 90 secondi;
- } **Questi step vengono
ripetuti 30 volte.**
5. **estensione** a 72°C per 7 minuti

L' amplificazione delle regioni ITS del micobionte sono state eseguite con il seguente schema:

1. **denaturazione** a 94°C per 2 minuti;
 2. **denaturazione** a 94°C per 1 minuto;
 3. **annealing** dei primers a 53°C per 1 minuto;
 4. **estensione** della catena a 72°C per 2 minuti;
- } **Questi step vengono
ripetuti 30 volte.**
5. **estensione** a 72°C per 7 minuti.

L' amplificazione delle regioni ITS del fotobionte sono state eseguite con il seguente schema:

1. **denaturazione** a 94°C per 2 minuti;
 2. **denaturazione** a 94°C per 1 minuto;
 3. **annealing** dei primers a 50°C per 1 minuto;
 4. **estensione** della catena a 72°C per 2 minuti;
 5. **estensione** a 72°C per 7 minuti.
- } **Questi step vengono
ripetuti 30 volte.**

L' amplificazione della regione RPB1 invece è stata eseguita con uno schema diverso, che prende il nome di Touch-down PCR. Si tratta di una reazione di PCR mediante la quale è possibile evitare di amplificare sequenze non specifiche. La temperatura alla quale i primers si appaiano (temperatura di annealing) durante un ciclo di PCR determina la specificità dell'appaiamento stesso. La temperatura di melting dei primers individua il limite superiore della temperatura di annealing. A temperature subito al di sotto di questa temperatura avviene soltanto un appaiamento altamente specifico tra i primers e il DNA templato. I primi steps di un ciclo di PCR Touch-down vengono eseguiti ad elevate temperature. Per ogni ciclo successivo, la temperatura di annealing viene diminuita di un grado Celsius. L'appaiamento del primer avviene alla temperatura più alta (e quindi meno permissiva nei confronti di appaiamenti non-specifici). In questo modo, la prima sequenza amplificata è compresa tra le regioni con cui il primer ha maggiore specificità; con tutta probabilità la sequenza è proprio quella di interesse. Il frammento originato verrà successivamente amplificato durante i successivi steps (a temperature inferiori), scartando le sequenze non specifiche a cui il primer si appaierebbe a causa delle temperature inferiori.

Di seguito si riportano le condizioni utilizzate nella reazione di amplificazione:

1. **denaturazione** a 94°C per 4 minuti;
 2. **denaturazione** a 94°C per 1 minuto;
 2. **annealing** dei primers a temperature comprese tra 58 e 50°C per 90 secondi;
 3. **estensione** della catena a 72°C per 2 minuti;
 5. **estensione** a 72°C per 10 minuti.
- } **Questi step vengono ripetuti 34 volte.**

3.10 ELETTROFORESI SU GEL DI AGAROSIO

L'elettroforesi degli amplificati ottenuti dagli isolati antartici è stata effettuata su gel di agarosio all'1,5%, preparato sciogliendo 0,75 g di agarosio in 50 ml di soluzione tampone TAE1X (40 mM Tris-acetato, 1mM EDTA, pH 8,0). Al gel sono stati aggiunti 3 µl di bromuro di etidio (alla concentrazione di 10 mg/ml) per permettere la visualizzazione dei frammenti di DNA amplificato e stabilire la loro dimensione. La miscela ottenuta è stata colata in un apposito vassoio per elettroforesi orizzontale contenente un pettine con denti che divide il gel in una fila di pozzetti, e lasciata polimerizzare a temperatura ambiente per 10-15 minuti. In ogni pozzetto i campioni sono stati caricati nel modo seguente: 5 µl di DNA amplificato sono stati miscelati con 1 µl di Loading Buffer (tampone di caricamento al 25% di blu di bromofenolo e 40% w/v di saccarosio in acqua) che serve da indicatore della corsa elettroforetica, e versati ognuno in un pozzetto. Un pozzetto invece è stato utilizzato per caricare il Ladder standard di peso molecolare noto da utilizzare come confronto per la determinazione della dimensione dei frammenti di DNA. Quando l'amplificazione è stata eseguita su DNA fungino è stato utilizzato il Ladder GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas). Per la corsa elettroforetica di DNA batterico è stato utilizzato il Ladder GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas) (figura 3.4).

Il supporto contenente il gel solidificato viene immerso nel tampone di corsa della cella elettroforetica e applicando una differenza di potenziale compresa tra i 60 e i 120 volts ha inizio la migrazione degli amplicons che si protrae per un tempo variabile a seconda del tipo di separazione desiderata. Le molecole lineari di DNA migrano verso

l'anodo con velocità elettroforetiche inversamente proporzionali al logaritmo del loro peso molecolare, ovvero in base alla lunghezza in paia basi.

Per valutare la dimensione e la quantità di DNA amplificato, il gel è stato successivamente esposto a luce ultravioletta con lunghezza d'onda di 260 nm su un transilluminatore Spectroline (modello TM-312 A); la quantità di DNA è infatti direttamente proporzionale all'intensità della fluorescenza delle bande che rappresentano il frammento amplificato.

Gli amplificati ottenuti per i licheni sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel d'agarosio 1% (0.3 g di agarosio sono stati sciolti in 30 ml di soluzione tampone TBE 5X) con 1 µl di bromuro di etidio. Per verificare l'esito della reazione di amplificazione sul gel sono stati caricati 2 µl di DNA amplificato miscelato con 1 µl di Loading Buffer.



Fig. 3.4 – Caricamento dei campioni nei pozzetti su gel di agarosio.

Preparazione del tampone di corsa (running buffer) TBE 5X

La soluzione di tampone TBE 5X (Tris- borato- EDTA) viene preparata cinque volte più concentrata della soluzione di lavoro. Per preparare 1 L di running buffer si pesano le seguenti polveri e si porta a volume con acqua bi-distillata pura controllando il pH a circa 8.3 unità:

- Tris (Tris-hydroxymethyl-aminomethan): 53.9 g;
- Acido borico: 27.5 g;
- EDTA (Ethylendiamine – tetraacetic acid $2\text{Na}_2\text{H}_2\text{O}$): 4.1 g.

Preparazione del Loading buffer (tampone di caricamento)

È stata preparata una soluzione al 30% di glicerina con acqua bi-distillata pura in cui sono stati sciolti 0.250 g di BBF (polvere blu), conservata in frigorifero. Aggiungendo 0.250 g di xylencianolo è stato possibile conservare la soluzione a temperatura ambiente (RT).

3.11 PURIFICAZIONE DEI PRODOTTI DI PCR

Prima del sequenziamento dei prodotti di PCR si è provveduto alla loro purificazione, allo scopo di rimuovere dalla miscela di reazione residui dei primers, sali, oligonucleotidi di polimerizzazione ancora presenti. La purificazione degli isolati antartici è stata eseguita con il kit *Nucleospin Extract Macherey-Nagel, GmbH & Co. KG*, secondo quanto stabilito dalle istruzioni incluse. I prodotti di PCR ottenuti dai licheni sono stati invece sottoposti a un passaggio di purificazione con il kit della ditta Qiagen “*Dneasy Purification kit*” .

Questi kit di purificazione sfruttano la capacità di adesione selettiva del DNA su membrane di silica-gel appositamente progettate: il DNA resta su tali membrane mentre i contaminanti vengono eliminati con opportune soluzioni di lavaggio. Le membrane sono già pronte per l'uso in apposite colonnine usa-e-getta. I prodotti di PCR purificati, ossia il DNA amplificato e purificato, sono stati utilizzati per le reazioni di sequenziamento.

3.12 SEQUENZIAMENTO DEL DNA

Per la presente ricerca il sequenziamento è stato eseguito presso la Ditta MACROGEN, Pathfinder in Genomics Research, 1001 World Meridian Center, Seoul, Korea (<http://www.macrogen.com>). I campioni sono stati preparati per le reazioni di sequenziamento in un Thermal Cycler (MJ Research PTC-225 Peltier) utilizzando il kit ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing e una AmpliTaq DNA polimerasi (FS enzyme) (Applied Biosystems), sulla base delle istruzioni fornite dalla casa produttrice. Le reazioni sono state effettuate con entrambi i primers (forward e reverse) da noi forniti alla ditta (alla concentrazione 10 pmol/μl). I campioni sono stati purificati seguendo un protocollo di precipitazione con etanolo e risospesi in acqua distillata per essere infine sottoposti a sequenziamento effettuato in un sequenziatore capillare ABI 3730xl sequencer (Applied Biosystems).

3.13 RICOSTRUZIONE DELLE SEQUENZE

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 (figura 3.5). A partire dai due cromatogrammi corrispondenti agli amplificati ottenuti con i due primers, le sequenze sono state ricostruite completamente in un unico senso di lettura (3'→5'). In questo modo è stato possibile correggere manualmente gli errori dovuti a letture inesatte delle sequenze durante il sequenziamento, che si manifestano come picchi incerti, poco definiti, a volte anche sovrapposti.

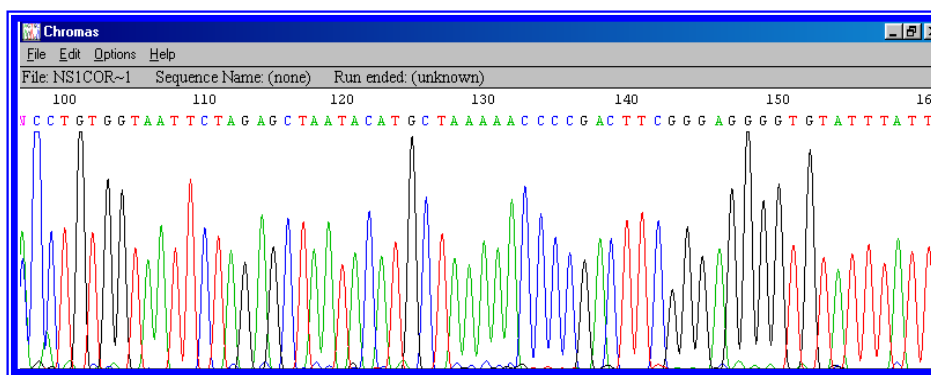


Fig. 3.5 – Esempio di cromatogramma ottenuto dal sequenziamento dell'rDNA.

3.14 CONFRONTO CON LE SEQUENZE NELLE BANCHE DATI

Una volta ricostruite, le sequenze sono state confrontate con quelle depositate presso Banche Dati internazionali (figura 3.6), disponibili on-line, al fine di individuare le specie con cui le nostre sequenze mostravano il grado di omologia più elevato (vedi paragrafo 1.7.4).

Esistono diverse Banche Dati ad accesso libero e con esse è possibile raggiungere scopi diversi, ad esempio ottenere sequenze simili da aggiungere in studi filogenetici o disegnare nuovi primers. La Banca Dati utilizzata nella presente ricerca è la NCBI Genbank (National Center for Biotechnology Information) ed è disponibile on-line all'indirizzo web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Le sequenze simili disponibili in questa

Banca Dati sono state ottenute utilizzando l’algoritmo di ricerca BLAST (Altschul *et al.*, 1997, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E-value	Max ident	Links
DQ528272.1	Friedmanniomyces endolithicus strain CCREE 522 18S ribosomal RNA gene, pa	755	765	80%	0.0	97%	
AY241855.1	Uncultured fungus 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 2	651	691	100%	0.0	90%	
DQ528271.1	Friedmanniomyces simplex strain CBS 114775 18S ribosomal RNA gene, parti	662	662	80%	0.0	97%	
D3271456.1	Capnobotryella sp. MA 4642 partial 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene and	665	645	91%	0.0	90%	
D3272045.1	Ascomycete sp. G50-Q 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal tr	545	634	92%	1e-132	99%	
D3272853.1	Mycocotium sp. MA 4790 18S rRNA gene, 5.8S rRNA gene, ITS1 and ITS2; int	612	612	83%	5e-172	91%	
D3273193.1	Mycocotium victoriae 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal tra	603	603	84%	3e-169	91%	
D3281422.1	Mycocotium victoriae 5.8S rRNA gene, ITS1 and ITS2; rRNA RH 7.7	522	599	87%	4e-168	90%	
D3281423.1	Fungal sp. TRN435 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, an	552	597	84%	1e-167	90%	
D3281922.1	Mycosphaerella salweena 203 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; inte	523	593	100%	2e-166	87%	
D3285503.1	Mycosphaerella albertani strain CBS 120935 18S ribosomal RNA gene, partial s	523	593	100%	2e-166	87%	
D3285504.1	Mycosphaerella salweena strain CBS 436182 18S ribosomal RNA gene, partial i	523	593	100%	2e-166	87%	
D3285582.1	Mycosphaerella parva strain CBS 110503 18S ribosomal RNA gene, partial seq	523	593	89%	2e-166	89%	
D3285107.1	Fungal sp. TRN202 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, an	584	584	86%	1e-163	90%	
D3285292.1	Colletotrichopsis condensatae strain CBS 120087 18S ribosomal RNA gene, p	582	582	80%	4e-163	91%	
D3285293.1	Trichostroma signiensis STE-U 1958 18S ribosomal RNA gene, partial sequ	582	582	80%	4e-163	91%	
D3285294.1	Mycosphaerella rubrae isolate G21/011 18S ribosomal RNA gene, partial seq	580	580	86%	1e-162	90%	
D3285295.1	Dothidea sp. LM486 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	523	579	100%	5e-162	86%	
D3285296.1	Dothidea sp. LM204 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	523	579	100%	5e-162	86%	
D3285297.1	Uncultured ascomycete clone G12 18S ribosomal RNA gene, partial sequence;	523	579	86%	5e-162	89%	
D3285298.1	Fungal sp. TRN204 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, an	523	579	86%	5e-162	89%	
D3285299.1	Fungal sp. TRN205 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, an	523	579	86%	5e-162	89%	
D3285300.1	Fungal sp. TRN245 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, an	522	577	82%	2e-161	90%	
D3285301.1	Mycosphaerella cryptica strain ET4445 18S ribosomal RNA gene, partial sequ	525	575	100%	6e-161	86%	
D3285302.1	Fungal sp. TRN440 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, an	525	575	79%	6e-161	91%	
D3285303.1	Neomeris juniperi isolate ssp09 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; i	523	573	80%	2e-160	91%	
D3285304.1	Uncultured ascomycete isolate dms0712_054 18S ribosomal RNA gene, parti	523	573	90%	2e-160	91%	
D3285305.1	Malanzized limestone ascomycete CR-2004 strain TRN76 internal transcribed sp	523	573	79%	2e-160	91%	
D3285306.1	Mycocotium victoriae isolate CBS 109862 internal transcribed spacer 1, parti	523	573	80%	2e-160	91%	
D3285307.1	Mycocotium victoriae isolate CBS 109863 internal transcribed spacer 1, parti	523	573	80%	2e-160	91%	
D3285308.1	Fungal sp. TRN202 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, an	523	573	79%	2e-160	91%	
D3285309.1	Mycosphaerella cryptica isolate AA23/9/10 18S ribosomal RNA gene, partial se	521	571	100%	8e-160	86%	
D3285310.1	Malanzized limestone ascomycete CR-2004 strain TRN132 internal transcribed s	562	569	79%	3e-159	91%	

Fig. 3.6 – Esempio di confronto in Banca Dati mediante l’algoritmo Blast.

3.15 ALLINEAMENTO DELLE SEQUENZE

Le sequenze degli isolati ottenuti in coltura sono state confrontate mediante allineamento (figura 3.7) con le sequenze disponibili in Banca Dati degli organismi filogeneticamente più vicini, come precedentemente spiegato (paragrafo 1.7.5). Nell’allineamento sono state incluse anche sequenze non disponibili in Banca Dati. Alcune di queste fanno parte del Data Base del laboratorio di Botanica Sistemtica e Micologia, DECOS, Università degli Studi della Tuscia, e sono state ottenute da funghi neri meristemati, isolati da comunità criptoendolitiche antartiche, per i quali la ricerca nelle Banche Dati aveva dato risultati simili, in modo da verificare le relazioni filogenetiche tra funghi neri associati a licheni epi- ed endolitici. Altre sequenze sono state ottenute dal Data Base personale del Prof. G.S. de Hoog, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, NL, dove sono presenti molte sequenze di funghi meristemati neri isolati da diversi ambienti estremi. Nella presente ricerca gli allineamenti delle sequenze amplificate (SSU e ITS) sono stati effettuati utilizzando il programma CLUSTALX (versione 1.8.1, Thompson *et al.*, 1997); i parametri scelti sono quelli impostati di default nel programma. Gli allineamenti sono stati poi ottimizzati manualmente utilizzando il programma MEGA 3.1 (Kumar, Tamura, Nei 2004).

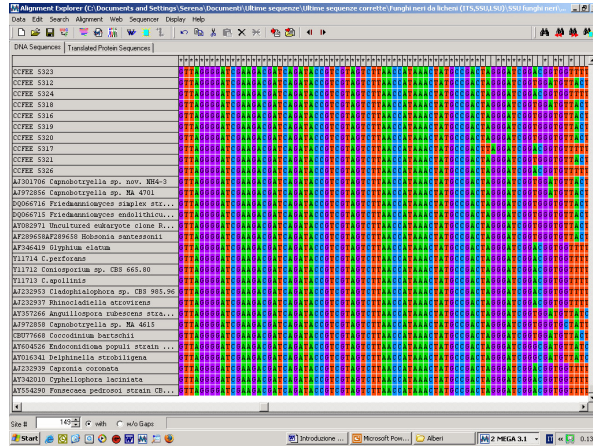


Fig. 3.7 – Allineamento delle sequenze oggetto della presente ricerca con le sequenze disponibili in Banca Dati.

3.16 COSTRUZIONE DEGLI ALBERI FILOGENETICI

Dopo aver preparato la matrice di dati costituita dalle sequenze allineate, i risultati ottenuti sono stati analizzati mediante programmi di analisi filogenetica di sequenze molecolari. Nella presente ricerca gli alberi filogenetici sono stati inizialmente costruiti utilizzando l'opzione NJ (Neighbour Joining) del programma ClustalX. Tali alberi sono stati poi confrontati con quelli ottenuti utilizzando la stessa opzione nel programma MEGA 3.1 (Kumar, Tamura, Nei 2004) per verificare la consistenza dei raggruppamenti filogenetici. L'allineamento è stato poi analizzato con il programma MrAIC.pl 1.4.3 (Johan A.A Nylander, School of Computational Science, Florida State University) che consente di scegliere il miglior modello evolutivo tra 56 possibili sulla base delle caratteristiche delle sequenze analizzate e degli allineamenti. Sulla base del modello suggerito dal programma sono state effettuate le analisi filogenetiche con il metodo NJ e la consistenza degli alberi è stata verificata mediante l'analisi di bootstrap. La topologia degli alberi ottenuti è stata anche verificata effettuando analisi filogenetiche MP (Maximum Parsimony), basate su metodi discreti e non solo su metodi di distanza, utilizzando l'opzione Parsimony in MEGA3.1.

4 RISULTATI

4.1 TAXA ISOLATI DALLE SPECIE LICHENICHE ESAMINATE

Le tecniche di isolamento utilizzate nella presente ricerca hanno portato all'individuazione di una microflora costituita da funghi, batteri e 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, mentre i primi isolati batterici sono stati osservati dopo circa 15 giorni dalla data dell'inoculo.

Nella tabella 4.1 vengono indicati gli isolati ottenuti da ogni campione di lichene, di cui viene riportata la provenienza.

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).

Dai campioni 1, 3 e 13 l'isolamento eseguito con le tecniche descritte in materiali e metodi (paragrafo 3.3.) non ha permesso di ottenere isolati in coltura.

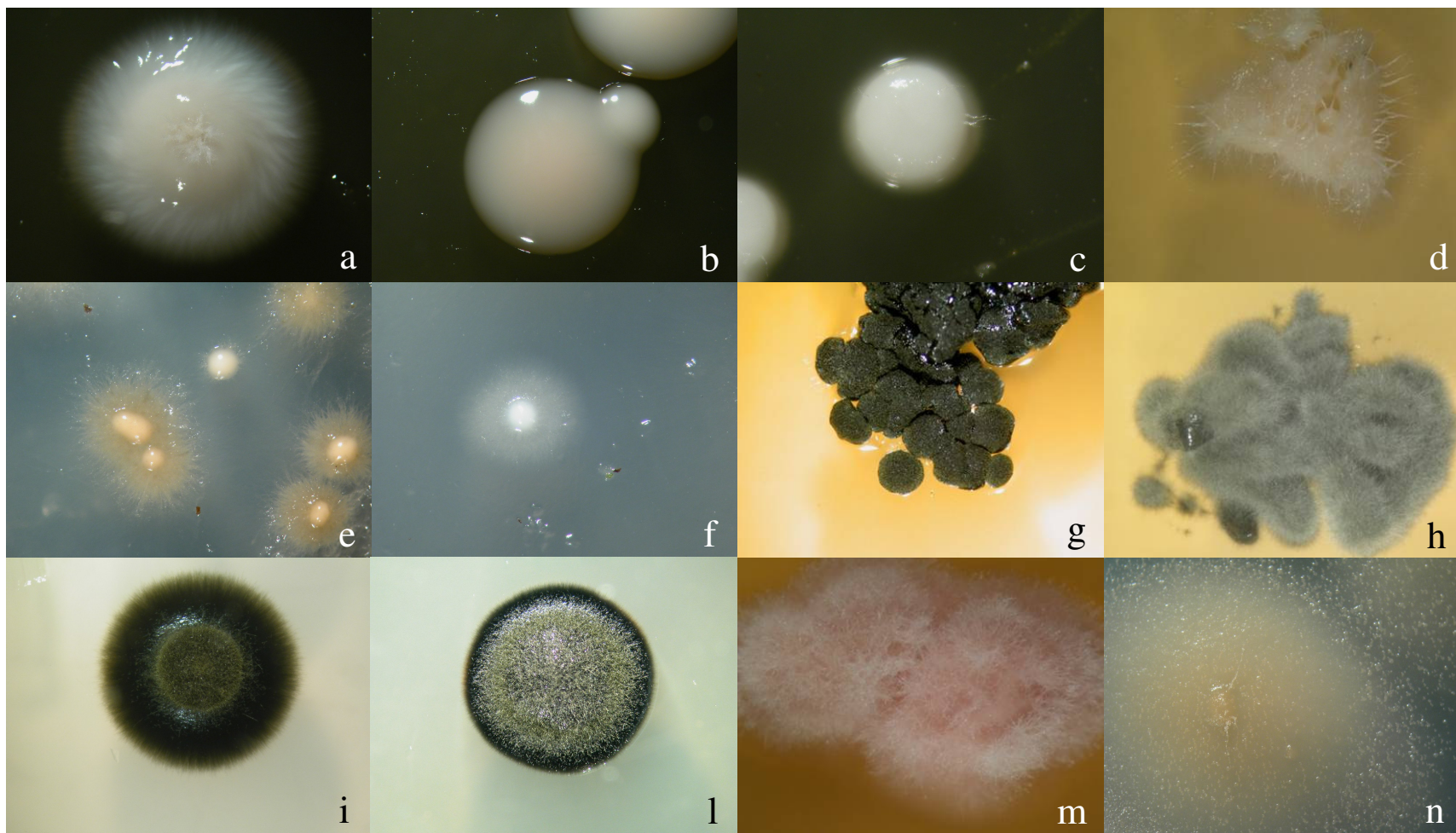


Fig. 4.1 – Immagine rappresentativa della biodiversità di microrganismi isolati da licheni antartici: a-f) lieviti; g-l) funghi neri; m) probabile micobionte; n) fungo ialino.

Tab. 4.1 – Isolati ottenuti dai campioni esaminati.

Campione	Specie lichenica	Provenienza	N° Isolati	Funghi	Batteri	Lieviti
1	<i>Acarospora</i> sp.	TVN	-	-	-	-
2	<i>Acarospora flavocordia</i> Castello & Nimis	TVN	2	1	-	1
3	<i>Buellia frigida</i> Darb.	TVN	-	-	-	-
4	<i>Lecanora fuscobrunnea</i> Dodge & Baker	TVN	6	2	-	4
5	<i>Lecanora fuscobrunnea</i> Dodge & Baker	TVS	6	1	4	1
					Est 4	
					Int 0	
6	<i>Lecanora</i> sp.	TVN	3	3	-	-
7	<i>Lecidea cancriformis</i> Dodge & Baker	TVN	1	1	-	-
8	<i>Rhyzocarpon</i> sp.	TVN	1	1	-	-
9	<i>Umbilicaria aprina</i> Nyl.	TVN	1	-	-	1
10	<i>Umbilicaria decussata</i> (Vill.) Zahlbr.	TVN	22	5	1	5
					2	
					Est 8	
					Int 4	
11	<i>Umbilicaria decussata</i> (Vill.) Zahlbr.	TVN	2	1	1	0
					Est 0	
					Int 1	
12	<i>Usnea antarctica</i> Du Rietz	TVN	16	4	6	6
					Est 5	
					Int 1	
13	<i>Usnea antarctica</i> Du Rietz	TVN	-	-	-	-
14	<i>Xanthoria elegans</i> (Link) th. Fr.	TVN	10	2	7	1
					Est 3	
					Int 4	
15	<i>Lecidea</i> sp.	TVN	1	1	-	-
16	<i>Lecidea</i> sp.	TVN	1	1	-	-
17	Sample 1 (non identificato)	TVS	1	1	-	-
				24	30	19

TVN = Terra Vittoria del Nord; TVS = Terra Vittoria del Sud.

Est = batteri isolati dall'esterno del tallo; Int = batteri isolati dall'interno del tallo.

Per le successive analisi i microrganismi fungini isolati (esclusi i lieviti) sono stati suddivisi in due gruppi: funghi ialini e funghi neri; questi ultimi a loro volta sono stati distinti in funghi ad accrescimento filamentoso e funghi ad accrescimento meristemato. Con il termine “funghi meristemati” ci si riferisce ad un gruppo di funghi che si accrescono molto lentamente dando luogo a colonie con morfologia che ricorda un cavolfiore, caratterizzati da una riproduzione di tipo isodiametrico (accrescimento delle cellule accompagnato da successiva suddivisione mediante la formazione di setti orientati in senso trasversale e longitudinale) (figura 4.2). La maggior parte dei funghi meristemati possiede pareti cellulari melanizzate. I propaguli vengono liberati dalle ife per disarticolazione (conidiogenesi tallica) o per rottura (conidiogenesi enteroblastica) senza la formazione di strutture complesse (Sterflinger *et al.*, 1999). Su substrati naturali le colonie mostrano una crescita molto lenta, tanto che questi funghi sono stati chiamati funghi microcoloniali (MCF; Staley *et al.*, 1982).

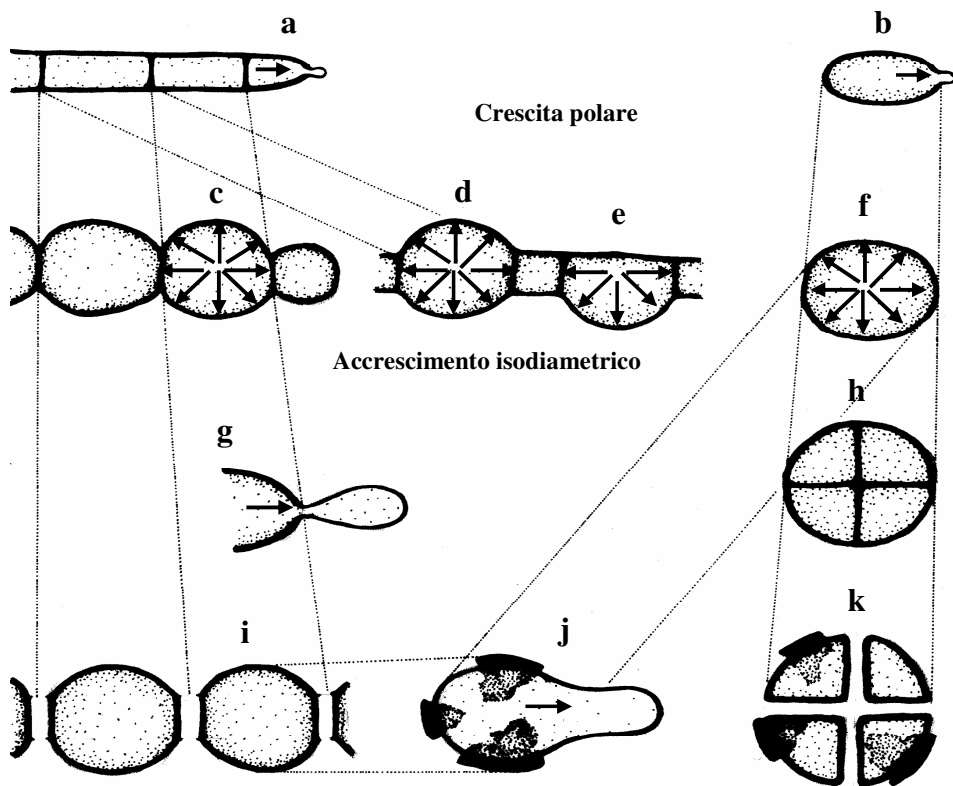


Fig. 4.2 – Diagramma riassuntivo delle principali fasi di sviluppo osservate nei funghi neri meristemati: a, b) crescita polare, ifale (a) o lievitoforme (b); c, d, e, f) accrescimento isodiametrico delle cellule, ifale (c, d, e) o lievitoforme (f); g) accrescimento enteroblastico; h) accrescimento meristemoide; i, j, k) secessione artrica (Selbmann *et al.*, 2005).

Sul totale di 24 dei microrganismi fungini (esclusi i lieviti) isolati , 10 isolati sono costituiti da funghi ialini non riconducibili a taxa specifici perché sottoposti soltanto ad una semplice osservazione al microscopio ottico. Il resto degli isolati invece è costituito da funghi neri che sono stati sottoposti ad analisi approfondite mediante le quali è stato possibile individuare 13 taxa distinti, come verrà descritto nei successivi paragrafi.

Va precisato, infatti, che, in relazione ai funghi, tutte le analisi di seguito descritte sono state eseguite soltanto per i funghi neri. La preferenza nei confronti di questi microrganismi è dovuta al fatto che le loro conoscenze sono ancora piuttosto scarse, sebbene negli ultimi anni siano stati fatti molti progressi grazie all'introduzione delle tecniche molecolari (Selbmann *et al.*, 2005). Una seconda motivazione è data dal fatto che già una prima osservazione ha permesso di individuare, tra questi funghi, delle colonie appartenenti a microrganismi molto probabilmente ancora sconosciuti, come confermato successivamente dalle analisi molecolari effettuate (vedi paragrafo 4.7).

4.2 CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA E FISIOLÓGICA DEI FUNGHI NERI OTTENUTI IN COLTURA

Di seguito si riportano le caratteristiche dei funghi neri studiati sulla base delle osservazioni morfologiche e delle preferenze termiche e colturali.

4.2.1 Osservazioni morfologiche e preferenze colturali

La prima semplice osservazione delle colture allo stereo-microscopio ha permesso di valutare le caratteristiche macro-morfologiche delle colonie, quali il colore e la forma di accrescimento.

Per i funghi neri, coltivati su MEA, il colore delle colonie è sempre risultato scuro, mentre per i funghi ialini il colore delle colonie varia dal bianco al rosa con casi tendenti a colori misti rosa-marrone. Le morfologie variano da funghi con accrescimento filamentoso a funghi con accrescimento meristemático (riscontrato soltanto nei funghi neri). Talvolta, le colonie si presentano parzialmente immerse nel terreno di coltura agarizzato.

Anche per i lieviti, coltivati su MEA e PDA, si possono osservare colonie traslucide e di colore diverso, dal bianco, al rosa, al rosso-rosa intenso; in alcuni casi sono presenti ife (vedi figura 4.1).

L'osservazione micro-morfologica, eseguita per i funghi neri coltivati su MEA a 15°C, ha messo in evidenza le seguenti caratteristiche comuni a diversi isolati o, in qualche caso, tipiche di pochi ceppi. Essenzialmente nella maggior parte degli isolati prevale un'organizzazione di tipo filamentoso anche se, in alcuni casi, le ife si presentano con cellule che restano concatenate a formare ife di tipo toruloide con accrescimento enteroblastico. In alcuni casi si osservano entrambe le forme ifali, filamentosa e toruloide. Nella maggior parte dei casi le cellule sono fortemente melanizzate e con pareti ispessite. Di seguito si riportano descrizioni e immagini rappresentative (Tavole 1- 12) dei singoli ceppi indicati con il relativo numero di collezione. I dati riportati sono il risultato delle osservazioni macro-morfologiche delle colture cresciute su MEA a 15°C, delle osservazioni delle microcolture (incubate a 15°C) e delle preferenze culturali (saggiate alla temperatura di 10°C per un periodo di 4 mesi):

CCFEE 5313: *isolato da Usnea antartica (TVN) presenta colonie immerse in agar al margine, di forma irregolare, colore scuro accompagnato da una colorazione superficiale verde tendente al giallo per lo più evidente nelle colonie cresciute su MEA e PDA; aspetto vellutato per la presenza sulla superficie di corte ife. Rispetto ad altri funghi neri isolati in precedenza, l'accrescimento è piuttosto rapido e nel periodo sopra indicato le colonie raggiungono 23,8 mm di diametro su MEA, e 25,5 mm su PDA, dove mantengono le stesse caratteristiche macromorfologiche descritte per le colture cresciute su MEA. La colorazione invece è più scura per le colonie cresciute su OA e CZA dove i diametri, nello stesso arco di tempo, raggiungono rispettivamente 27 e 16,5 mm.*

Dall'osservazione delle microcolture si distingue un micelio sparso, formato da ife cilindriche sia di tipo filamentoso che toruloide di diametro variabile tra 6 e 7 µm, settate, con accrescimento enteroblastico apicale ed intercalare; le ife sono pigmentate e con pareti ispessite(tavola 1).

CCFEE 5319: *isolato da Lecanora sp. (TVN) ha caratteristiche analoghe a quelle descritte per il ceppo 5313. Le dimensioni raggiunte dai diametri dalle colonie dopo 4 mesi in coltura su MEA, PDA, OA e CZA sono rispettivamente 26,5 mm, 24 mm, 31 mm e 15,8 mm. Le ife hanno diametro variabile tra 7 e 8 µm. Sono presenti conidi prodotti per secessione artrica, di dimensioni comprese tra 9 e 12 µm (tavola 2).*

CCFEE 5320: *isolato da Lecanora fuscobrunnea (TVN) ha caratteristiche analoghe ai due ceppi precedenti. Le misure dei diametri delle colonie sono 21,8 mm su MEA, 24,5 mm su PDA, 26,5 mm su OA e, infine, 13,5 mm su CZA. Ife di diametro variabile tra 4 e 7 μm (tavola 3).*

CCFEE 5312: *isolato da Rhizocarpon sp. (TVN) si accresce formando colonie di colore scuro sulla superficie inferiore, che sulla superficie superiore assumono un aspetto vellutato e una colorazione biancastra per la presenza di ife ben evidenti anche a occhio nudo. Margine irregolare e immerso nel terreno agarizzato. Le colonie raggiungono dimensioni di 17,3 mm su MEA, 22,5 mm su PDA, 20,3 mm su OA dove il margine è più regolare e 6,8 mm su CZA, dove il margine risulta essere molto pronunciato.*

Micelio filamentoso formato da ife cilindriche, con frequenti anastomosi, formate da cellule a parete sottile di colore piuttosto chiaro di diametro compreso tra 2 e 3 μm . Occasionalmente si osservano cellule terminali di forma più o meno sferica di circa 5 μm di diametro che, a volte, presentano un setto (tavola 4).

CCFEE 5318: *isolato da Lecidea sp. (campione 15, TVN) possiede colonie di colore scuro con margine irregolare e aspetto lucido anche se con una leggera colorazione tendente al giallo-verde per la presenza di corte ife su parte della superficie. Le colonie raggiungono mediamente dimensioni di 11,4 mm su MEA, 13,5 mm su PDA, 7 mm su OA, mentre su CZA è stata riscontrata una crescita minima tale da non poter essere misurata.*

L'osservazione micro-morfologica evidenzia la presenza di ife fortemente pigmentate, di diametro variabile tra 7 e 9 μm , formate da cellule che possiedono in genere un setto trasversale, spesso sono presenti anche setti longitudinali. Talvolta la formazione di setti sembra seguire diverse direzioni tanto che le cellule risultano divise anche in quattro sezioni con pareti fortemente ispessite (tavola 5).

CCFEE 5321: *isolato da Lecidea cancriformis (TVN) presenta colonie scure, con margine irregolare, aspetto cerebriforme. La crescita delle colonie è stata osservata su tutti i terreni saggati, con una leggera preferenza per il terreno OA, ma non è mai stata apprezzabile tanto da essere misurata in mm; spesso si osservano piccolissime colonie puntiformi sparse sul terreno di coltura, che mostrano le stesse caratteristiche della colonia osservata su MEA cresciuta a 15°C.*

Il micelio è formato da ife toruloidi caratterizzate da accrescimento enteroblastico apicale, con cellule a pareti ispessite, cilindriche e melanizzate, di diametro variabile tra 4 e 7 µm. Sono presenti conidi bicellulari prodotti per secessione artrica, le cui dimensioni sono di circa 4 µm (tavola 6).

CCFEE 5314: *isolato da Xanthoria elegans (TVN) presenta colonie di colore scuro, leggero aspetto cerebriforme, con margine irregolare. Le colonie raggiungono diametri di 9,8 mm su MEA, 11,5 mm su PDA, 10 mm su OA e 9 mm su CZA, dove si osserva una minor penetrazione del margine all'interno dell'agar e un accrescimento superficiale e strettamente aderente al substrato agarizzato. Su PDA e OA, invece, parte della superficie ha un aspetto leggermente vellutato per la presenza di ife.*

L'osservazione delle microcolture evidenzia un micelio composto da ife moniloidi con cellule tondeggianti o romboidali; le ife, di diametro variabile tra 4 e 9 µm, sono pigmentate e a pareti ispessite, anche se queste caratteristiche non sono evidenti tanto quanto come nei ceppi CCFEE 5313, CCFEE 5319 e CCFEE 5320 (tavola 7).

CCFEE 5303: *isolato da Lecanora fuscobrunnea (TVS) si presenta con colonie di colore scuro ed aspetto lucido, di consistenza molle, con margine irregolare. Le dimensioni medie raggiunte dalle colonie sono di 12 mm su MEA, 8,3 mm su PDA, 5,3 mm su OA e 6,5 mm su CZA.*

A causa della scarsa disponibilità di materiale sui vetrini allestiti per le microcolture non è stato possibile osservare le principali caratteristiche morfologiche del micelio. L'osservazione al microscopio ottico della coltura cresciuta in piastra e la successiva analisi filogenetica (vedi figura 4.3) hanno comunque messo in evidenza che si tratta di un fungo identico, sia dal punto di vista morfologico che molecolare, ad un ceppo isolato precedentemente da comunità criptoendolitiche (CCFEE 5176, Selbmann et al., 2005) (tavola 8).

CCFEE 5323: *isolato da Lecanora sp. (TVN) si accresce formando colonie di colore scuro con aspetto leggermente vellutato per la presenza di ife sulla superficie che conferiscono una leggera sfumatura biancastra. Margine con ife molto evidenti che penetrano nel terreno agarizzato. I diametri raggiunti dalle colonie dopo 4 mesi dalla data dell'inoculo sono di 14 mm su MEA, 14,5 mm su PDA, 14,8 mm su OA e 13,8 mm su CZA, dove il margine assume una forma leggermente irregolare.*

Micelio simile ai due ceppi precedenti (CCFEE 5314 e CCFEE 5324) ma caratterizzato dalla contemporanea presenza di ife di tipo filamentoso e monilioide, di diametro variabile tra 4 e 11 μm . La componente monilioide del micelio è costituita da cellule cilindriche e tondeggianti o romboidali che in alcuni casi possiedono un setto trasversale. La parte apicale delle ife, come per il ceppo precedente, possiede a volte cellule ingrossate e tondeggianti che richiamano la forma di clamidospore, con dimensioni variabili tra 7 e 9 μm , e che talvolta possono presentare setti longitudinali e trasversali. Pigmentazione e ispessimento delle pareti cellulari come per i ceppi precedenti (tavola 9).

CCFEE 5324: *isolato da Acarospora flavocordia (TVN) presenta colonie di colore scuro, leggero aspetto cerebriforme, margine irregolare. Su OA la superficie ha un aspetto vellutato per la presenza di ife che conferiscono una colorazione biancastra. Le dimensioni raggiunte dai diametri delle colonie su MEA, PDA, e OA sono rispettivamente di 8 mm, 11,5 mm, 7,3 mm; nessuna crescita è stata riscontrata su CZA.*

Micelio composto da ife ramificate e non ramificate con cellule cilindriche, ma più frequentemente tondeggianti o romboidali, di diametro variabile tra 4 e 7 μm , che possiedono a volte un setto trasversale. Cellule rigonfie possono essere presenti in posizione intercalare o terminale, le cui dimensioni variano tra 7 e 9 μm . La pigmentazione e l'ispessimento delle pareti delle ife si presentano come già descritto per il ceppo 5314 (tavola 10).

CCFEE 5326: *isolato da Lecidea sp. (campione 16, TVN) presenta colonie scure, opache, ad accrescimento cerebriforme, margine irregolare. Le preferenze colturali saggiate su MEA, PDA, OA e CZA evidenziano la capacità di crescere su tutti i terreni, con una leggera preferenza per il terreno OA, ma non tanto da poter rilevare i diametri in mm.*

L'osservazione delle microcolture evidenzia un micelio spesso di tipo meristemato generato da cellule ad accrescimento isodiametrico che si settano sia in senso longitudinale che trasversale, oppure costituito da corte ife settate, poco ramificate, fortemente pigmentate e con pareti molto ispessite che fratturandosi scoprono una parete interna più elastica e ialina. Il diametro delle ife varia tra 4 e 9 μm . Sono presenti conidi, con dimensioni comprese tra 7 e 9 μm (tavola 11).

CCFEE 5322: *isolato da Xanthoria elegans (TVN) presenta colonie di colore scuro, aspetto cerebriforme, margine irregolare. I diametri raggiunti dalle colonie sono di 21,3 mm su MEA, 18,5 mm su PDA, 18 mm su OA e 7,5 mm su CZA, dove le ife al margine sono molto evidenti.*

Il micelio di questo ceppo ricorda quello sopra descritto dei ceppi CCFEE 5314, CCFEE 5323 e CCFEE 5324, la pigmentazione delle cellule è però molto più forte e le pareti sono fortemente ispessite. Inoltre, le ife sono solo di tipo toruloide e sono costituite da cellule spesso settate trasversalmente e talvolta anche longitudinalmente che generano un accrescimento di tipo isodiametrico. Il diametro delle ife varia tra 9 e 11 μm . Talvolta si è evidenziata la presenza di conidi prodotti, probabilmente, per secessione artrica, una forma di conidiogenesi tallica mediante la quale i conidi derivano da segmenti ifali già formati. Le dimensioni dei conidi variano da 7 a 9 μm (tavola 12).

CCFEE 5317: *isolato da Umbilicaria decussata (campione 11, TVN) la colonia si presenta con colorazione scura, non lucida e cerebriforme, con margine irregolare. I diametri delle colonie cresciute su MEA, PDA, OA e CZA raggiungono dimensioni di 10,3 mm, 9,3 mm, 7 mm rispettivamente, mentre su CZA la colonia non raggiunge dimensioni sufficienti per essere misurate.*

A causa della scarsa disponibilità di materiale sui vetrini allestiti per le microcolture non è stato possibile osservare le principali caratteristiche morfologiche del micelio.

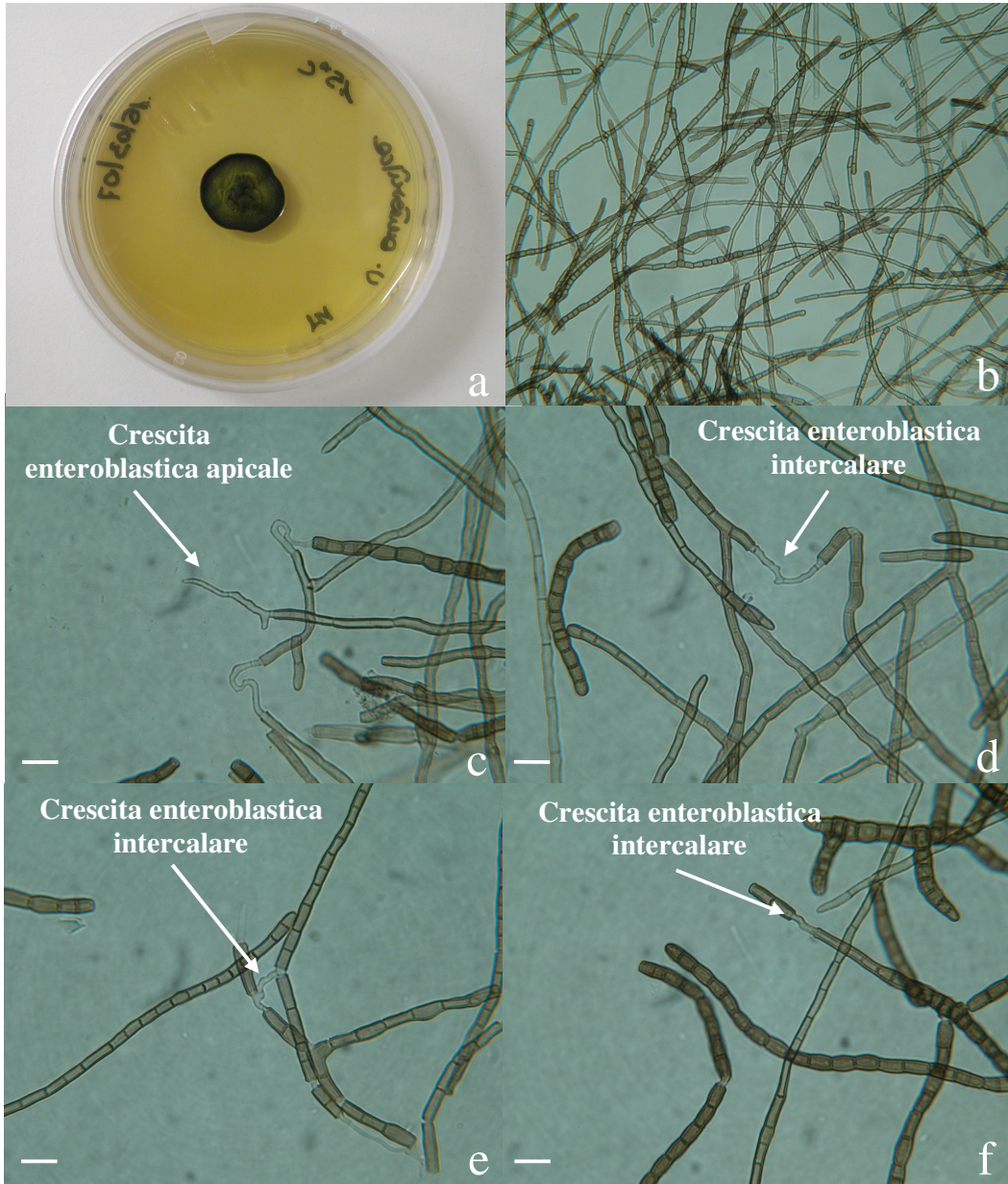


Tavola 1 – CCFEE 5313 colonia su MEA (a); visione generale della microcoltura (b); crescita enteroblastica apicale (c); crescita enteroblastica intercalare (d-f). Barre = 20 μ m.

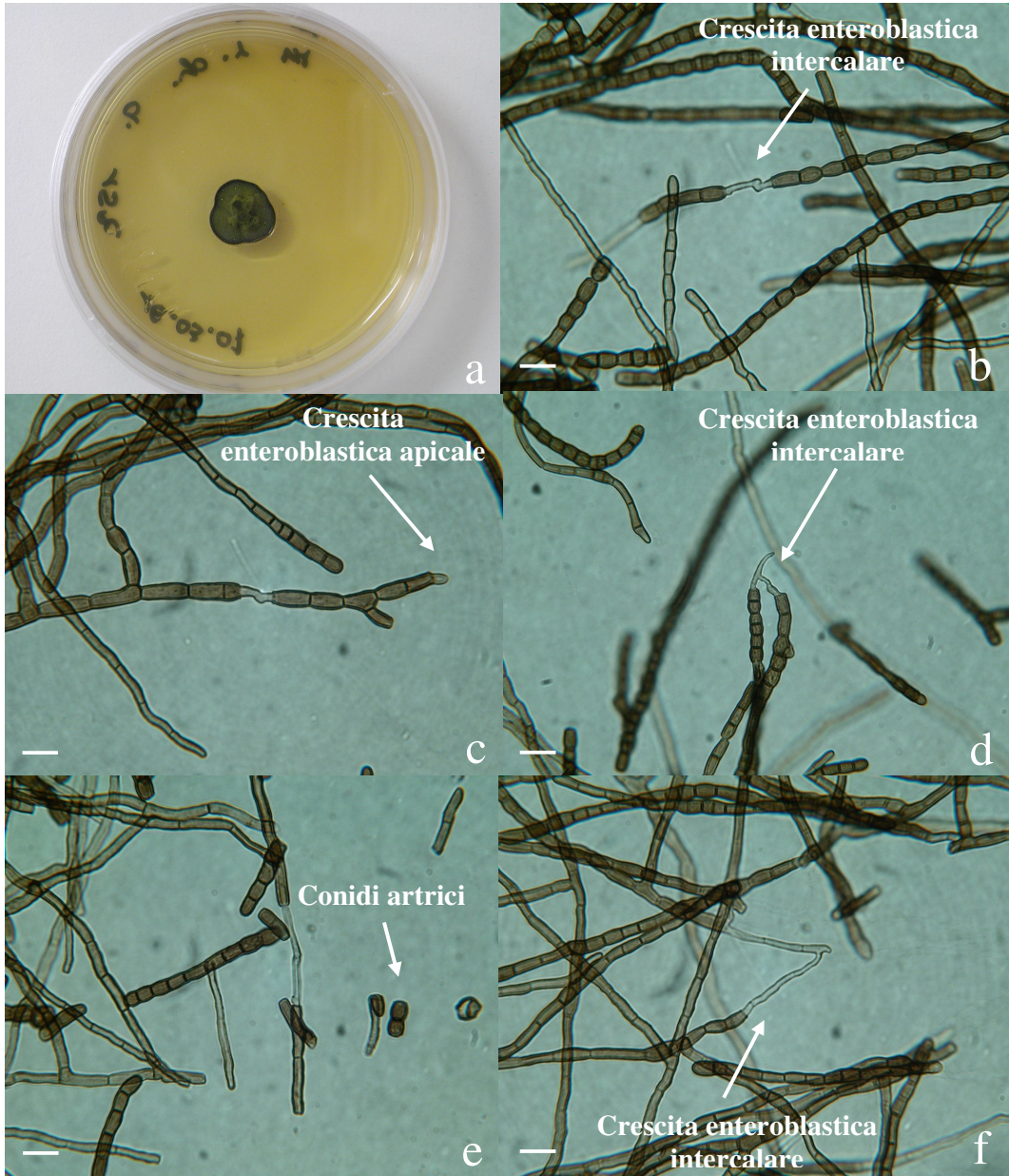
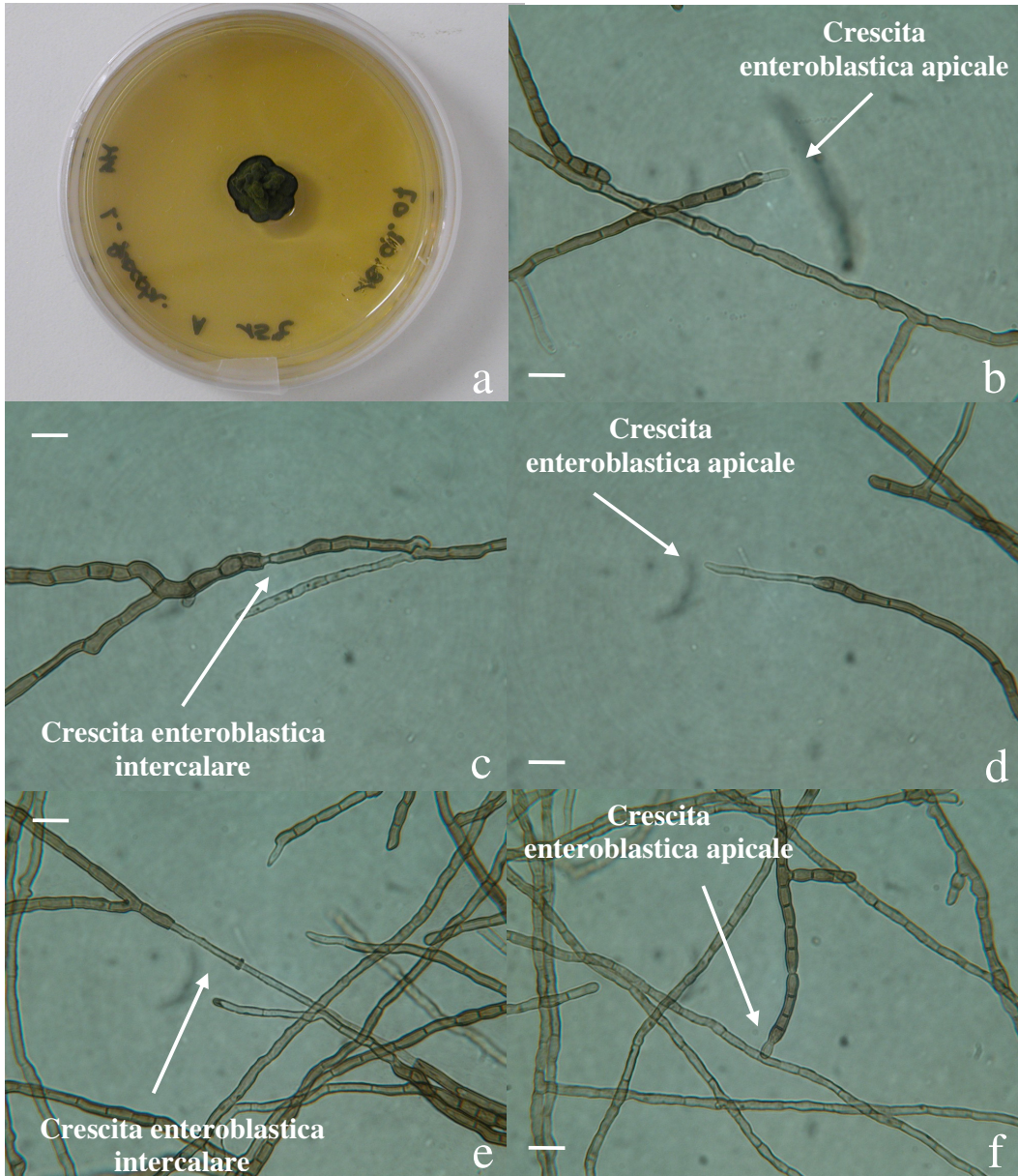


Tavola 2 – CCFEE 5319 colonia su MEA (a); crescita enteroblastica apicale e intercalare (b-f); conidi artrici bicellulari (e). Barre = 20 μ m.



**Tavola 3 – CCFEE 5320 colonia su MEA (a); crescita enteroblastica apicale e intercalare (b-f).
Barre = 10 µm.**

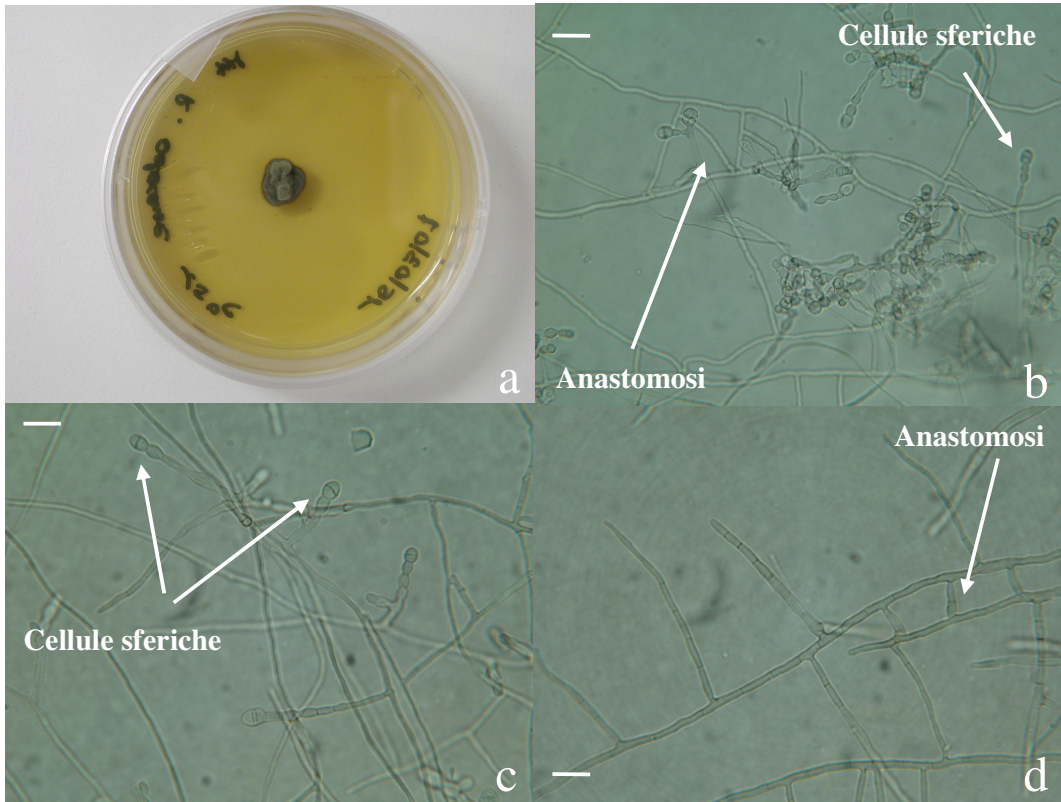


Tavola 4 – CCFEE 5312 colonia su MEA (a); anastomosi (b, d); cellule sferiche terminali con un setto (b, c). Barre = 10 μ m.

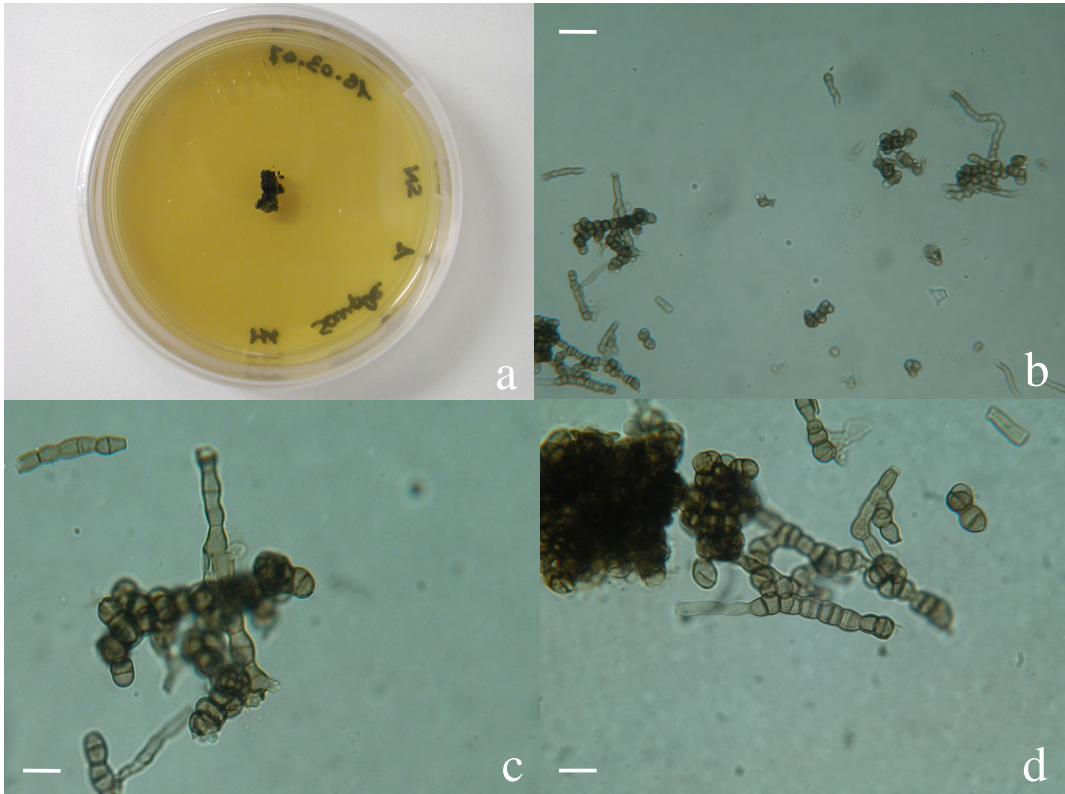


Tavola 5 – CCFEE 5318 colonia su MEA (a); cellule con setti trasversali e longitudinali, presenza di cellule divise in quattro sezioni con entrambi i setti (b-d). Barre = 20 μ m.

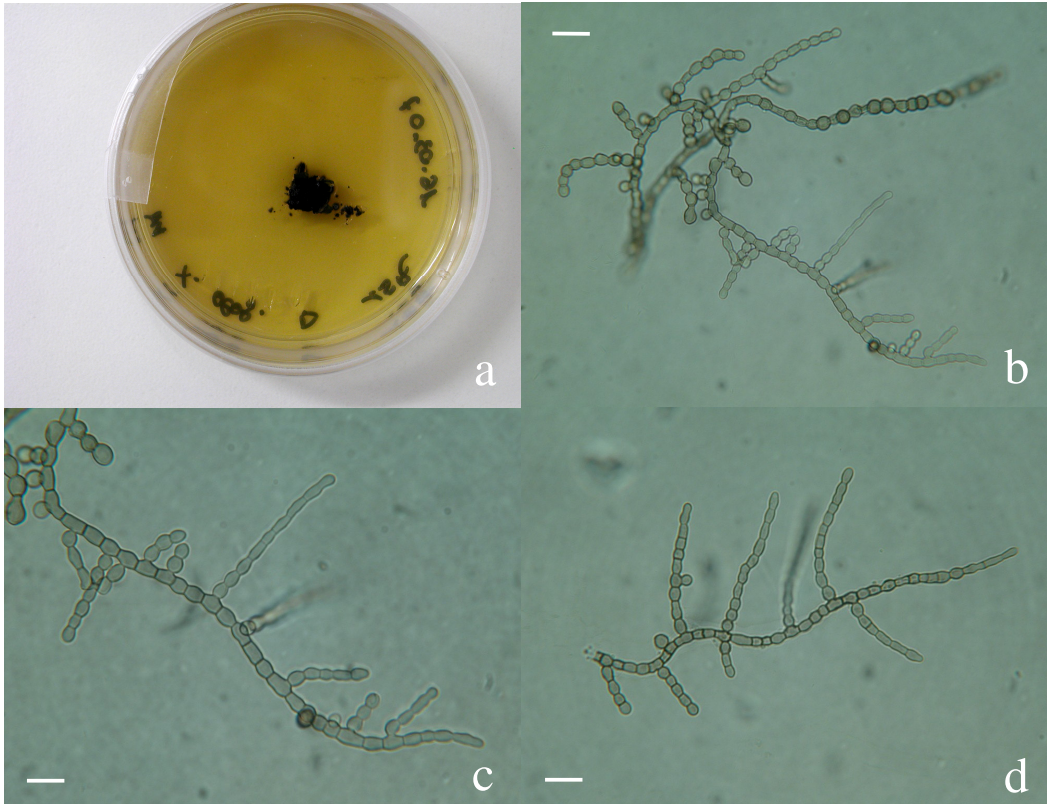


Tavola 7 - CCFEE 5314 colonia su MEA (a); ife moniliodi con cellule tondeggianti e romboidali (b-d). Barre = 20 μ m.

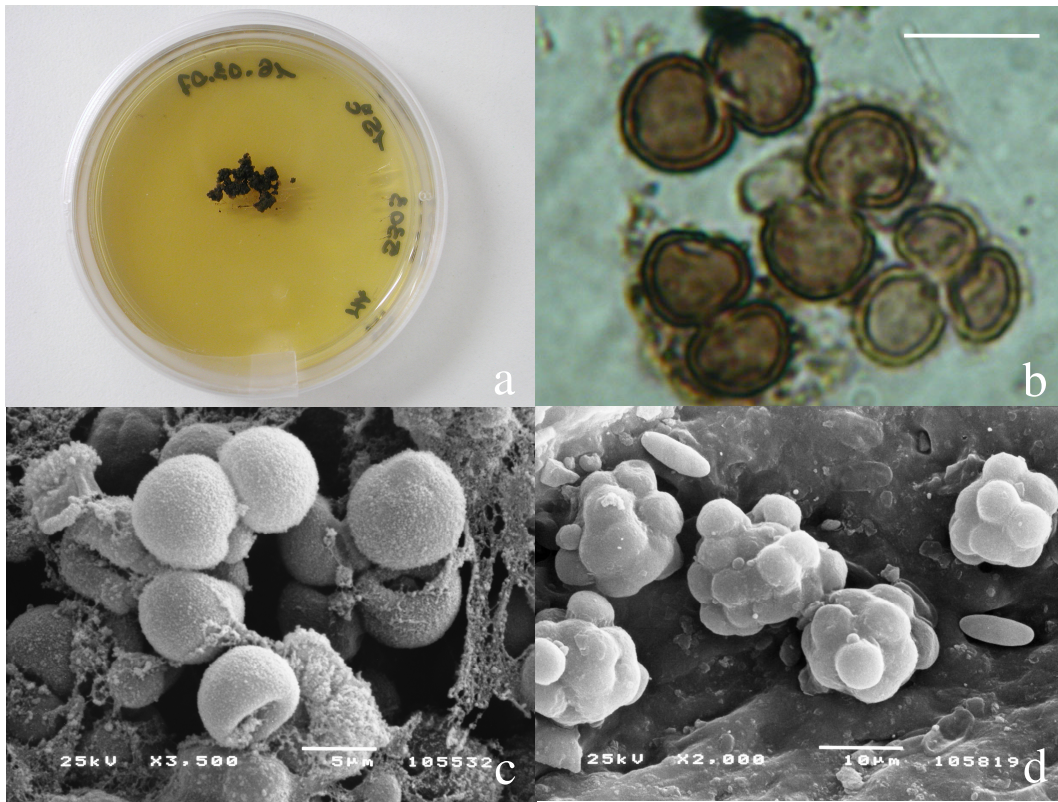


Tavola 8 – CCFEE 5303 colonia su MEA (a); CCFEE 5176 organizzazione di tipo lievitifforme, pareti melanizzate e fortemente ispessite (b); CCFEE 5176 fotografia al SEM (Microscopio Elettronico a Scansione, Selbmann *et al.*, 2005) (c); fotografia al SEM di sezione di tallo di *L. fuscobrunnea*, all'interno sono visibili cellule di un organismo attribuibile allo stesso fungo (Onofri *et al.*, 2007b) (d). Barra = 10 μ m.

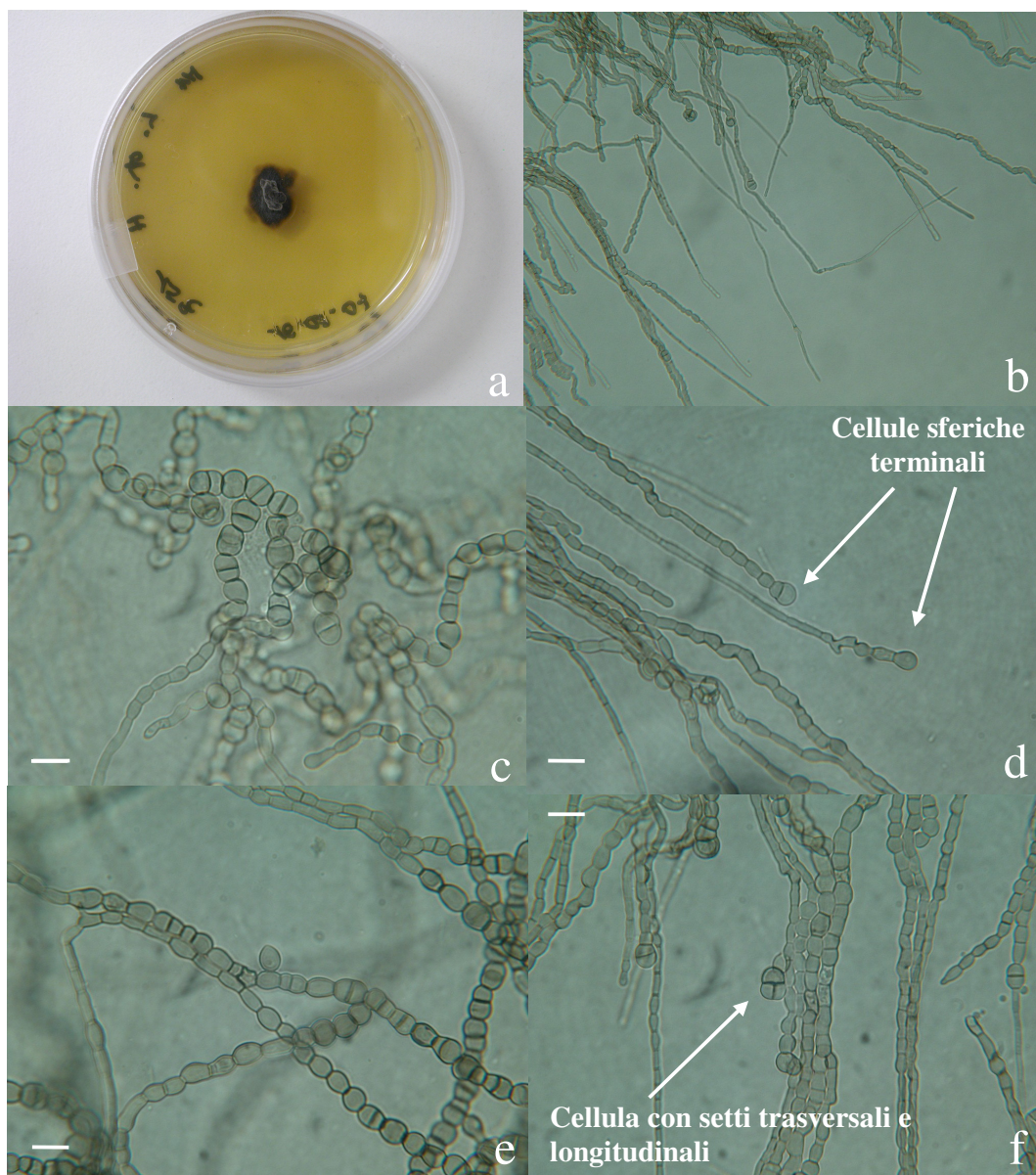


Tavola 9 – CCFEE 5323 colonia su MEA (a); visione generale della microcoltura con evidente presenza di ife di tipo filamentoso e monilioide (b); ife moniliodi con cellule tondeggianti e romboidali dotate di setti trasversali (c, e); ife con cellule tondeggianti terminali dotate di setto trasversale (d); cellula terminale con setti trasversale e longitudinale (f). Barre = 15 μ m.

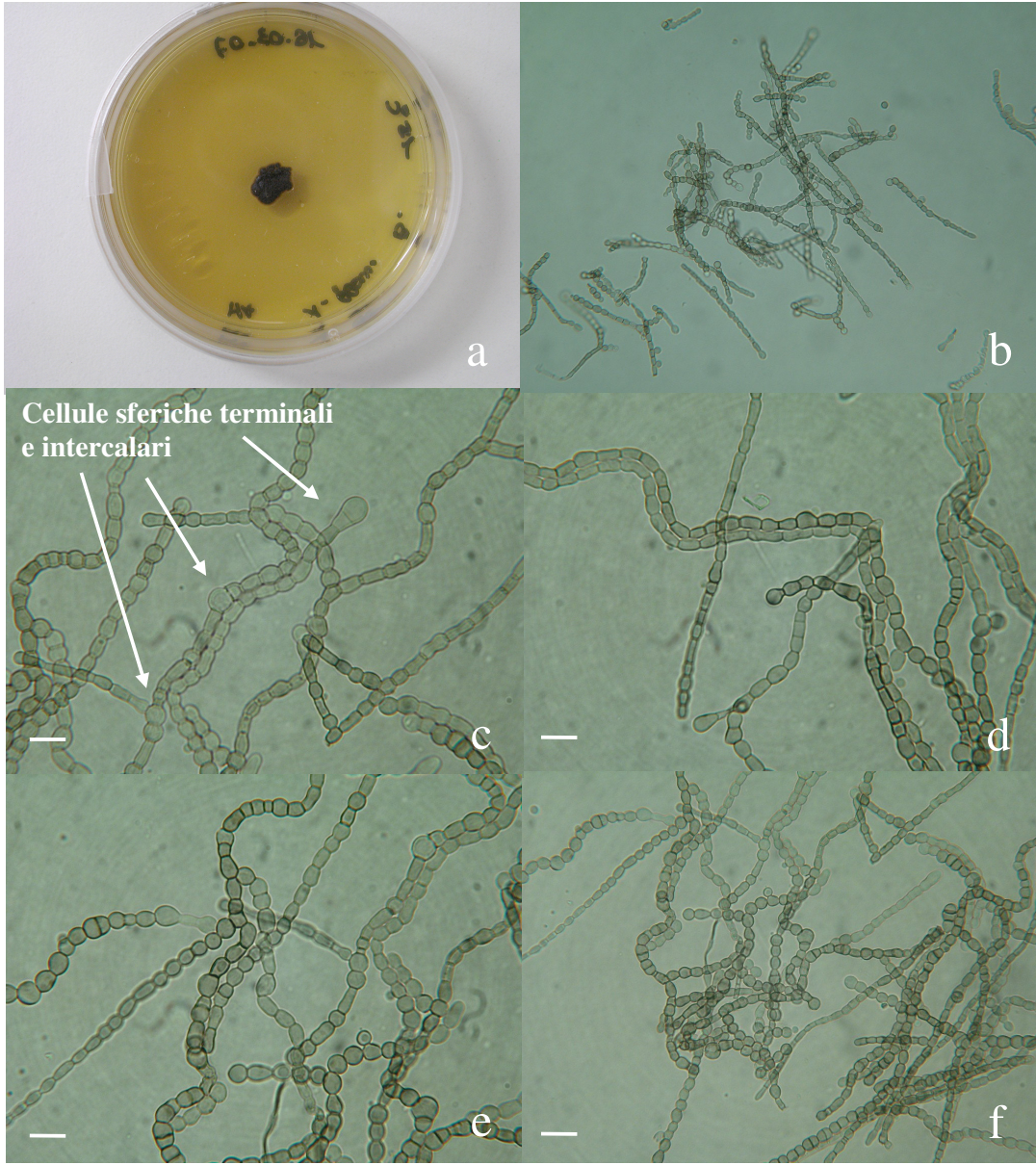


Tavola 10 – CCFEE 5324 colonia su MEA (a); visione generale della microcoltura (b); ife con cellule tondeggianti terminali e intercalari, a volte con setto trasversale (c-f). Barre = 15 μ m.

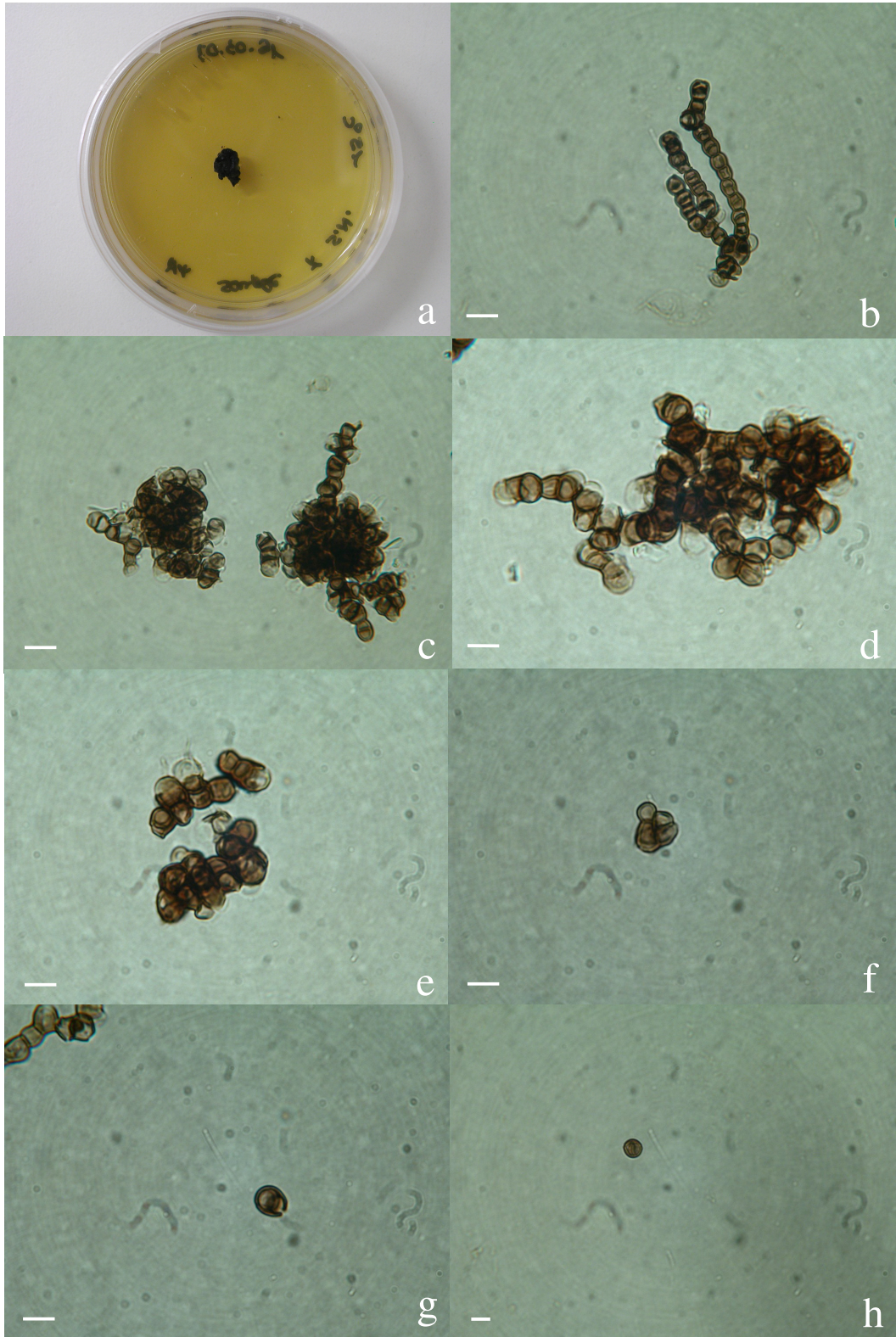


Tavola 11 – CCFEE 5326 colonia su MEA (a); micelio di tipo meristemato generato da cellule ad accrescimento isodiametrico, cellule con setti trasversali e longitudinali (b-e); conidi prodotti per secessione artrica (f-h). Barre = 10 μ m.

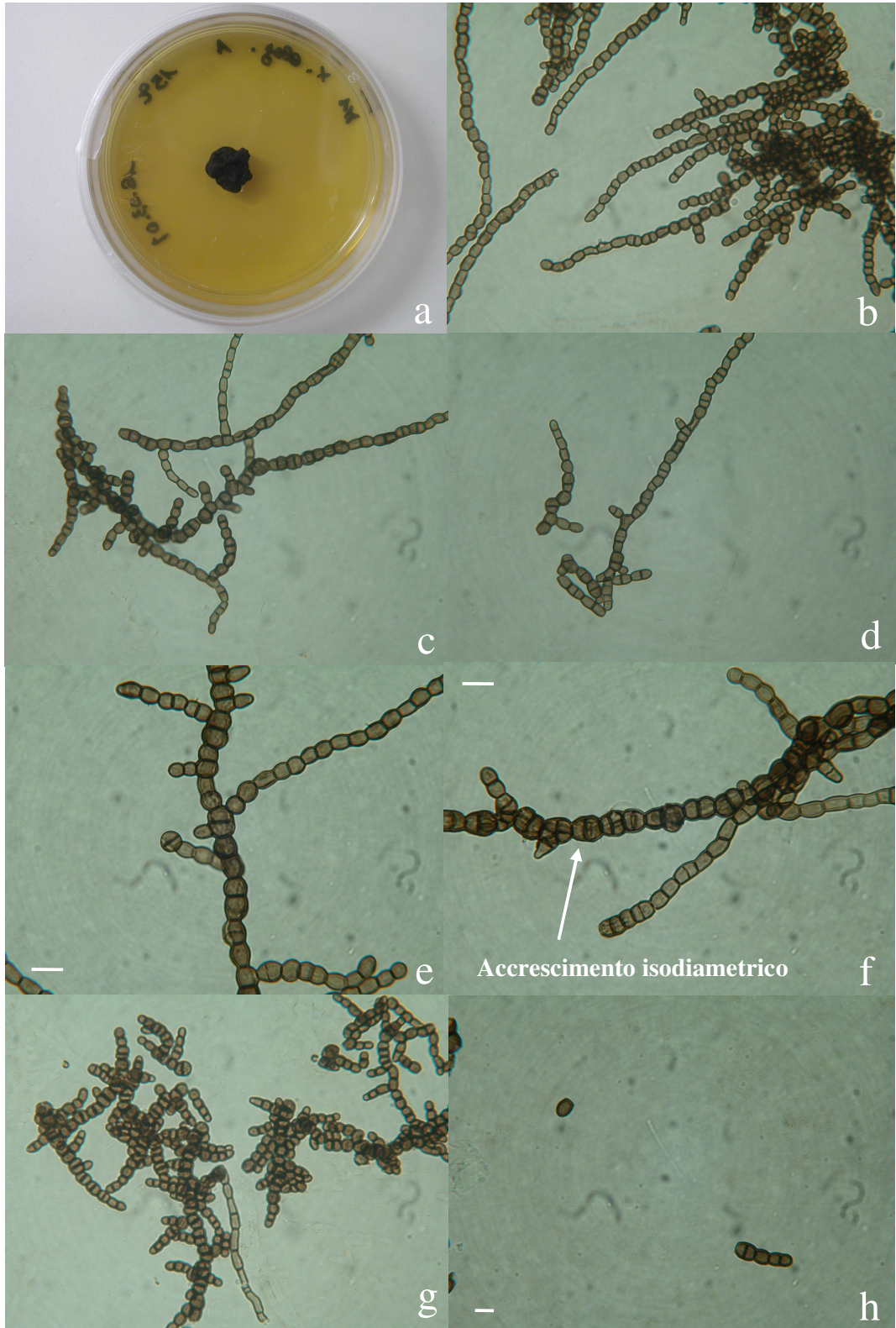


Tavola 12 – CCFEE 5322 colonia su MEA (a); ife toruloidi con cellule settate trasversalmente (b-g); cellule con setti trasversali e longitudinali che portano ad un accrescimento isodiametrico (f, g); conidi prodotti per secessione artrica (h). Barre = 10 μ m.

4.2.2 Preferenze termiche

Le preferenze termiche di tutti i ceppi sopra descritti, valutate esaminando la crescita delle colonie a sei differenti temperature, da 0 a 25°C, dopo 3 mesi di incubazione, sono riportate in tabella 4.2 e rappresentano la media e la deviazione standard ottenute da due repliche. Prima di riportare i dati ottenuti è necessario considerare che tutti i ceppi sono in grado di crescere a 0°C e 5°C, tuttavia gli inoculi sono stati effettuati con colture di 3 mesi su MEA a 15°C. Pertanto, possono mostrare un periodo di latenza di durata variabile dovuto, molto probabilmente, ad una fase di adattamento che si verifica quando i microrganismi vengono trasferiti da una coltura in fase stazionaria ad un terreno fresco della stessa composizione.

Dai dati riportati in tabella si evince che la maggior parte dei funghi saggiati mostra una preferenza termica tra 10 e 20°C con un massimo nei valori diametrici riscontrabile alla temperatura 15°C, che rappresenta quindi l'optimum di crescita, eccetto che per i ceppi CCFEE 5323 e CCFEE 5318 in cui l'optimum è spostato a 20°C. Soltanto quattro dei ceppi isolati (CCFEE 5313, CCFEE 5319, CCFEE 5320 e CCFEE 5322) possiedono la capacità di svilupparsi anche a 25°C, mentre quasi tutti gli isolati crescono molto lentamente alle temperature 0 e 5°C.

Per i ceppi CCFEE 5321 e CCFEE 5326 non è stato possibile riportare una misura in mm viste le scarse dimensioni delle colonie; per questo motivo la crescita è stata registrata e valutata come già descritto per i batteri (vedi paragrafo 3.5). L'assenza di crescita dei ceppi CCFEE 5314 e CCFEE 5324 alla temperatura di 5°C è probabilmente dovuta ad errori durante la fase di inoculo in piastra.

Tab. 4.2 – Preferenze termiche (in mm) dei funghi neri isolati.

Isolato	Preferenze termiche (°C)					
	0	5	10	15	20	25
CCFEE 5313	16,4 ± 0,8	12,9 ± 0,6	25,8 ± 0,4	31,9 ± 3,7	30,8 ± 1,1	19,5 ± 3,5
CCFEE 5319	15,5 ± 0,7	11,9 ± 0,1	22 ± 0	30 ± 0,7	24 ± 0,7	11,8 ± 1,1
CCFEE 5320	14 ± 0,7	10,8 ± 1,1	23 ± 1,4	27,7 ± 0,9	22,5 ± 0,7	16,8 ± 1,8
CCFEE 5314	4,4 ± 0,6	-	7 ± 0	12,3 ± 2,5	-	-
CCFEE 5324	3,5 ± 0,7	-	5,3 ± 0,4	8,8 ± 0	-	-
CCFEE 5323	7 ± 0,7	4,7 ± 0,9	7 ± 2,1	18 ± 0,7	20,5 ± 0,7	-
CCFEE 5303	6,8 ± 1,8	4,3 ± 2,5	11,3 ± 0,4	13,8 ± 1,8	-	-
CCFEE 5318	7,3 ± 0,4	4,1 ± 1,8	13,3 ± 0,4	13 ± 0,4	13,5 ± 0,7	11,3 ± 3,2
CCFEE 5322	10,3 ± 1,8	9,8 ± 1,1	14 ± 1,4	18,4 ± 2,3	4 ± 0	-
CCFEE 5312	6,9 ± 1,3	7,8 ± 1,1	11,8 ± 0,4	18,2 ± 1,9	5,2 ± 1,6	-
CCFEE 5317	4,8 ± 0,4	3,3 ± 0,4	8 ± 1,4	12 ± 0	-	-
CCFEE 5321	-	+	+	++	-	-
CCFEE 5326	-	+	+	++	-	-

- = nessuna crescita; + = crescita minima; ++ = crescita buona.

4.3 CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA E FISIOLOGICA DEI BATTERI OTTENUTI IN COLTURA

Di seguito si riportano le caratteristiche dei batteri studiati sulla base delle osservazioni morfologiche e delle preferenze termiche.

4.3.1 Osservazioni morfologiche

Per ciò che riguarda i batteri, l'osservazione morfologica è stata effettuata solo macroscopicamente sulla base delle caratteristiche delle colonie. Coltivati su TY, il colore delle colonie è molto variabile, vi sono colonie piuttosto traslucide, così come di colore bianco o bianco-crema, fino a colorazioni gialle e miste rosa-rosso piuttosto intense; l'aspetto delle colonie varia da quelle con accrescimento uniforme e lucido a colonie di forma piuttosto irregolare e aspetto opaco. Talvolta più colonie identiche sono state ottenute dallo stesso tallo lichenico (tabella 4.3).

Tab. 4.3 – Caratteristiche macromorfologiche degli isolati batterici.

Specie lichenica	Isolato	Osservazioni morfologiche	Numero di colonie	
<i>Lecanora fuscobrunnea</i>	Est 1	Colonia uniforme, aspetto lucido, colore giallo chiaro	1	
	Est 2	Colonia uniforme, aspetto lucido, colore bianco rosa	1	
	Est 3	Colonia irregolare, aspetto opaco, colore crema	1	
	Est 4	Colonia uniforme, aspetto lucido, colore giallo intenso	2	
<i>Umbilicaria decussata</i>	Est 1	Colonia uniforme, aspetto lucido, colore crema	> 50	
	Est 2	Colonia uniforme, aspetto lucido, colore bianco	> 100	
	Est 3	Colonia uniforme, aspetto lucido, colore bianco rosa	1	
	Est 4	Colonia uniforme, aspetto lucido, colore crema	~ 25	
	Est 5	Colonia uniforme, aspetto lucido, colore giallo chiaro	1	
	Est 6	Colonia uniforme, aspetto lucido, colore crema	> 100	
	Est 7	Colonia uniforme, aspetto lucido, colore giallo chiaro	1	
	Est 8	Colonia uniforme, aspetto lucido, colore giallo chiaro	1	
	Int 1	Colonia uniforme, aspetto lucido, colore bianco	~ 5	
	Int 2	Colonia uniforme, aspetto lucido, colore giallo chiaro	~ 20	
	Int 3	Colonia uniforme, aspetto lucido, colore traslucido	2	
	Int 4	Colonia uniforme, aspetto lucido, colore arancio	1	
	<i>Usnea antarctica</i>	Est 1	Colonia uniforme, aspetto lucido, colore giallo crema	1
		Est 2	Colonia uniforme, aspetto lucido, colore giallo chiaro	2
Est 3		Colonia uniforme, aspetto lucido, colore giallo intenso	1	
Est 4		Colonia irregolare, aspetto opaco, colore bianco	3	
Est 5		Colonia uniforme, aspetto lucido, colore traslucido	4	
Int 1		Colonia uniforme, aspetto opaco, colore biancastro	~ 10	
<i>Xanthoria elegans</i>	Est 1	Colonia irregolare, aspetto opaco, colore bianco	~ 30	
	Est 2	Colonia uniforme, aspetto lucido, colore biancastro	5	
	Est 3	Colonia uniforme, aspetto lucido, colore crema	15	
	Int 1	Colonia uniforme, aspetto lucido, colore rosa	1	
	Int 2	Colonia uniforme, aspetto lucido, colore crema	1	

Est = batteri isolati dall'esterno del tallo; Int = batteri isolati dall'interno del tallo.

4.3.2 Preferenze termiche

In tabella 4.4 vengono riportate le preferenze termiche dei ceppi batterici ottenuti, saggiati a nove diverse temperature da 0 a 40°C. Tra tutti gli isolati ottenuti (tabella 4.1) non è stato possibile saggiare la preferenze termiche per tre ceppi (Int 1, isolato dal campione 11 *Umbilicaria decussata* (vedi tabella 4.1), raccolto a Vegetation Island e Int 3-Int 4 isolati dal campione 14 *Xanthoria elegans* (vedi tabella 4.1), a causa della scarsa quantità di materiale disponibile). Sulla base della definizione di Morita (1975), secondo la quale una specie batterica viene considerata psicrofila se in grado di crescere in un range di temperatura che va da 0°C a 20°C, si può osservare che la maggior parte degli isolati, a differenza di quello che si potrebbe immaginare visti gli ambienti in cui si accrescono, non rientrano in questa categoria.

Alcuni isolati sono in grado di crescere solo a temperature comprese tra 15°C e 25°C mentre altri riescono a svilupparsi anche a temperature inferiori (5°C e 10°C), pur continuando a crescere alla temperatura di 25°C. Tutti gli isolati quindi sono in grado di crescere alla temperatura di 25°C ma con un optimum di crescita compreso tra 15°C e 20°C. Altri ceppi crescono addirittura in un range di temperature molto più ampio, da 0°C/5°C fino a 35 °C; nessun ceppo invece è in grado di crescere alla temperatura di 40°C.

Tab. 4.4 – Preferenze termiche dei batteri isolati.

Specie lichenica	Isolato	Preferenze termiche (°C)								
		0	5	10	15	20	25	30	35	40
<i>Lecanora fuscobrunnea</i>	Est 1	+	+	+	++	++	++	-	-	-
	Est 2	+	+	+	++	++	++	-	-	-
	Est 3	+	+	+	++	++	++	-	-	-
	Est 4	+	+	+	++	++	++	-	-	-
<i>Umbilicaria decussata</i>	Est 1	-	-	-	+	+	++	-	-	-
	Est 2	-	-	-	+	+	++	-	-	-
	Est 3	-	+	+	+++	+++	++	-	-	-
	Est 4	-	-	-	+	+	++	-	-	-
	Est 5	-	-	-	+	+	++	-	-	-
	Est 6	-	-	-	+	+	++	-	-	-
	Est 7	-	-	-	+	++	++	-	-	-
	Est 8	-	-	-	+	++	++	-	-	-
	Int 1	-	-	-	+	+	++	-	-	-
	Int 2	-	-	-	+	+	++	-	-	-
	Int 3	-	-	-	+	+	++	-	-	-
	Int 4	-	+	+	+	++	+++	+	-	-
<i>Usnea antarctica</i>	Est 1	-	-	-	+	++	++	-	-	-
	Est 2	-	-	-	+	++	++	-	-	-
	Est 3	+	++	+++	+++	+++	+++	-	-	-
	Est 4	+	++	++	++	++	++	-	-	-
	Est 5	-	+	+	++	+++	++	-	-	-
	Int 1	+	++	++	++	++	++	-	-	-
<i>Xanthoria elegans</i>	Est 1	-	-	-	-	+++	+++	+++	++	-
	Est 2	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-
	Est 3	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-
	Int 1	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-
	Int 2	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-

Est = batteri isolati dall'esterno del tallo; Int = batteri isolati dall'interno del tallo.
 - = nessuna crescita; + = crescita minima; ++ = crescita buona; +++ = crescita molto buona.

4.4 ANALISI MOLECOLARE

La quantità di materiale genetico ottenuta con i protocolli descritti in Materiali e Metodi (paragrafo 3.7) è stata sempre sufficiente per le reazioni di amplificazione mediante PCR, anche se in qualche caso è stato necessario ripetere le reazioni aggiungendo una concentrazione maggiore di DNA estratto. L'amplificazione eseguita con i primers specifici per funghi e batteri isolati, micobionte e fotobionte per i licheni, ha sempre prodotto una singola banda, visualizzata mediante analisi elettroforetica.

4.4.1 Porzioni genomiche amplificate ottenute da funghi neri

Per ciò che riguarda l'analisi molecolare relativa ai funghi neri, sono state amplificate le regioni SSU e ITS dell'rDNA e le lunghezze delle sequenze nucleotidiche sono riportate nelle tabelle 4.5 e 4.6. La mancanza del valore di lunghezza delle sequenze di alcuni ceppi è dovuta all'impossibilità di ricostruire delle buone sequenze, pur avendo ottenuto il prodotto amplificato di PCR. Come si evidenzia dai dati riportati in tabella 4.5, le lunghezze dei frammenti SSU variano da 1113 basi del ceppo CCFEE 5317 a 1774 basi del ceppo CCFEE 5313. Per ciò che riguarda le regioni ITS (tabella 4.6), ITS1 varia come lunghezza tra 146 basi (ceppi CCFEE 5313, CCFEE 5319 e CCFEE 5320) e 202 basi (ceppi CCFEE 5314, CCFEE 5323 e CCFEE 5324); ITS2 varia in lunghezza tra 143 basi (ceppi CCFEE 5312 e CCFEE 5326) e 165 basi (ceppi CCFEE 5314 e CCFEE 5324). La porzione 5.8s presenta invece per gran parte dei ceppi esaminati una lunghezza di 156 basi, in alcuni casi 157 basi (ceppi CCFEE 5314, CCFEE 5323 e CCFEE 5324) mentre, per un unico ceppo (CCFEE 5326) è stata riscontrata una lunghezza in basi di 183; considerando che si tratta di una regione conservata del DNA, si ritiene opportuno verificare questo dato, ripetendo le operazioni di amplificazione e sequenziamento, per escludere la possibilità di un probabile errore.

Tab. 4.5 – Lunghezza delle sequenze degli isolati fungini (SSU).

Isolato fungino	SSU	Isolato fungino	SSU
CCFEE 5313	1774	CCFEE 5323	1726
CCFEE 5319	1764	CCFEE 5303	-
CCFEE 5320	1769	CCFEE 5318	1766
CCFEE 5314	1185	CCFEE 5322	1731
CCFEE 5324	1744	CCFEE 5312	1729
CCFEE 5317	1113	CCFEE 5326	1761
CCFEE 5321	1772		

CCFEE: Culture Collection of Fungi from Extreme Environments.

Tab. 4.6 – Lunghezza delle sequenze degli isolati fungini (ITS1, 5.8s, ITS2).

Isolato fungino	ITS1	5,8s	ITS2	Isolato fungino	ITS1	5,8s	ITS2
CCFEE 5313	146	156	146	CCFEE 5323	202	157	165
CCFEE 5319	146	156	146	CCFEE 5303	185	156	148
CCFEE 5320	146	156	146	CCFEE 5318	147	156	156
CCFEE 5314	202	157	165	CCFEE 5322	151	156	144
CCFEE 5324	202	157	164	CCFEE 5312	152	156	143
CCFEE 5317	178	156	160	CCFEE 5326	181	183	143
CCFEE 5321	149	156	151				

CCFEE: Culture Collection of Fungi from Extreme Environments.

4.4.2 Porzioni genomiche amplificate ottenute dai batteri

Per ciò che riguarda l'analisi molecolare relativa ai batteri, sono state amplificate le regioni 16s dell'rDNA e le lunghezze delle sequenze nucleotidiche sono riportate nella tabella 4.7. Come si evidenzia dai dati riportati, le lunghezze dei frammenti SSU variano da 1281 a 1497, dove la sequenza più breve è stata rilevata per il ceppo Int 1 isolato da *Usnea antarctica* mentre quella più lunga per il ceppo Est 1 isolato da *Xanthoria elegans*.

Tab. 4.7 – Lunghezza delle sequenze degli isolati batterici (SSU).

Campione di provenienza	Isolato batterico	SSU	Campione di provenienza	Isolato batterico	SSU
<i>Lecanora fuscobrunnea</i>	Est 1	1378	<i>Usnea antarctica</i>	Est 1	1364
	Est 2	1446		Est 2	1368
	Est 3	1439		Est 3	1475
	Est 4	1453		Est 4	1484
<i>Umbilicaria decussata</i>	Est 1	1434		Est 5	1409
	Est 2	1439	Int 1	1281	
	Est 3	1337	<i>Xanthoria elegans</i>	Est 1	1497
	Est 4	1397		Est 2	1481
	Est 5	1427		Est 3	1488
	Est 6	1416		Int 1	1394
	Est 7	1451		Int 2	1374
	Est 8	1368		Int 3	1487
	Int 1	1440		Int 4	1436
	Int 2	1399		<i>Umbilicaria decussata</i>	Int 1
	Int 3	1410			
	Int 4	1455			

Est = batteri isolati dall'esterno del tallo; Int = batteri isolati dall'interno del tallo.

4.4.3 Porzioni genomiche amplificate ottenute dai licheni del gruppo *L. polytropa*

Per ciò che riguarda l'analisi molecolare relativa ai licheni, sono state amplificate le regioni ITS dell'rDNA e RPB1 per il micobionte mentre per il fotobionte sono state amplificate soltanto le regioni ITS.

Nelle tabelle 4.8 e 4.9 (in rosso i campioni antartici di *L. fuscobrunnea*) sono riportate le sequenze ITS e RPB1 del micobionte. La mancanza del valore di lunghezza delle sequenze di alcuni campioni è dovuta all'impossibilità di ricostruire delle buone sequenze, pur avendo ottenuto il prodotto amplificato di PCR. Come si evidenzia dai dati riportati le lunghezze delle regioni ITS1 variano tra 168 basi (campioni S55, S68, S72 e S73) e 205 basi (campione S67), mentre le regioni ITS2 variano tra 121 basi (campione S69) e 153 basi (campione S7); 5.8s presenta una lunghezza di 156 basi. Per ciò che riguarda RPB1, invece, si sono ottenute sequenze con lunghezze variabili da 815 basi a 840 basi, dove la più breve è relativa al campione S17 e la più lunga al campione S9.

**Tab. 4.8 – Lunghezza delle sequenze del micobionte (ITS1, 5,8s, ITS2)
dei licheni del gruppo *Lecanora polytropa* (in rosso sono riportati i campioni antartici).**

Campione	ITS1	5,8s	ITS2	Campione	ITS1	5,8s	ITS2
S1	196	156	140	S18	187	156	150
S2	197	156	149	S20	199	156	149
S3	196	156	149	S31	196	156	149
S4	197	156	151	S55	168	156	150
S5	196	156	149	S59	203	156	150
S6	196	156	149	S60	196	156	149
S7	197	156	153	S65	196	156	149
S8	196	156	149	S66	196	156	149
S9	197	156	149	S67	205	156	150
S10	197	156	149	S68	168	156	143
S11	196	156	149	S69	197	156	121
S12	187	156	150	S70	-	-	-
S13	198	156	149	S71	197	156	149
S14	196	156	149	S72	168	156	150
S15	-	-	-	S73	168	156	150
S16	196	156	149	S74	200	156	150
S17	-	-	-				

**Tab. 4.9 – Lunghezza delle sequenze del micobionte (RPB1)
dei licheni del gruppo *Lecanora polytropa* (in rosso sono riportati i campioni antartici).**

Campione	RPB1 (micobionte)	Campione	RPB1 (micobionte)
S1	837	S18	838
S2	839	S20	839
S3	837	S31	838
S4	837	S55	835
S5	837	S59	836
S6	837	S60	837
S7	836	S65	837
S8	836	S66	837
S9	840	S67	837
S10	838	S68	835
S11	837	S69	837
S12	838	S70	-
S13	836	S71	837
S14	837	S72	835
S15	837	S73	835
S16	837	S74	836
S17	815		

4.5 RICERCA IN BANCA DATI

Tutte le sequenze ottenute sono state confrontate con le sequenze di altri organismi depositate in Banca Dati, ad eccezione delle sequenze ITS e RPB1 ottenute per i micobionti dei licheni, a causa della mancanza di sequenze disponibili in Banca Dati. Ad oggi, infatti, la presente ricerca rappresenta la prima indagine molecolare eseguita per le specie del gruppo *L. polytropa*. In alcuni casi nei Data Base consultati non sono disponibili specie geneticamente affini a quelle esaminate nel presente lavoro, mostrando percentuali di similarità inferiori addirittura al 90%. In questi casi non è stato quindi possibile ottenere dati di confronto attendibili.

4.5.1 Confronto in Banca Dati delle sequenze ottenute da funghi neri

Nelle tabelle 4.10 e 4.11 si riportano i valori più elevati delle percentuali di similarità ottenuti dal confronto delle sequenze SSU (18s) ed ITS (ITS1, 5,8s e ITS2) di ciascun isolato fungino studiato, con le sequenze depositate in Banca Dati, l'organismo da cui è stata ottenuta la sequenza confrontata ed il relativo numero di accesso in Banca Dati.

Come si vede dalla tabella 4.10, molti dei funghi neri studiati mostrano una percentuale di similarità in SSU con sequenze depositate che varia dal 97 al 99%; tuttavia, alcuni di essi mostrano percentuali di similarità inferiori e tra questi il ceppo CCFEE 5317 presenta un valore decisamente basso di solo 95% con *Cladophialophora* sp. e *Coniosporium* sp. Il ceppo CCFEE 5321 mostra una similarità del 99% con *Friedmanniomyces endolithicus* Onofri (Onofri *et al.* 1999), un fungo isolato e descritto da comunità criptoendolitiche antartiche dominate dai licheni. Questo dato è confermato anche dai confronti delle sequenze ITS dove il ceppo CCFEE 5321 mostra una similarità del 97% sempre con lo stesso fungo. I confronti ITS relativi agli altri ceppi fungini studiati presentano percentuali di similarità molto basse con quelle depositate in Banca Dati. Solo il ceppo CCFEE 5318 presenta un valore di similarità del 99% con *Capnobotryella* sp. e 98% con un fungo ascomicete non identificato. Tutti gli altri non sono risultati confrontabili in modo attendibile con nessuna delle sequenze depositate al momento, presentando percentuali di similarità anche al di sotto del 90%. Per i ceppi CCFEE 5317, CCFEE 5326 e CCFEE 5303, addirittura, non è stato possibile ottenere alcun confronto significativo.

Tab. 4.10 – Percentuali di similarità più elevate ottenute dal confronto delle sequenze SSU degli isolati fungini studiati con le sequenze depositate in Banca Dati NCBI.

Isolato	Specie con grado di similarità più elevato	% similarità (18SrDNA)	Isolato	Specie con grado di similarità più elevato	% similarità (18SrDNA)
CCFEE 5312	<i>Capnobotryella</i> sp. nov. (AJ301706)	99%	CCFEE 5317	<i>Cladophialophora</i> sp. (AJ232953)	95%
	<i>Capnobotryella</i> sp. (AJ972856)	99%		<i>Coniosporium</i> sp. (Y11712)	95%
CCFEE 5318	<i>Capnobotryella</i> sp. nov. (AJ301706)	97%	CCFEE 5326	<i>Cladophialophora</i> sp. (AJ232953)	97%
	<i>Capnobotryella</i> sp. (AJ972856)	97%		<i>Capronia coronata</i> (AJ232939)	96%
CCFEE 5321	<i>Friedmanniomyces endolithicus</i> (DQ066715)	99%	CCFEE 5314	<i>Glyphium elatum</i> (AF346419)	99%
	<i>Friedmanniomyces simplex</i> (DQ066716)	99%		<i>Coniosporium perforans</i> (Y11714)	99%
CCFEE 5322	<i>Coccodinium bartschii</i> (U77668)	98%	CCFEE 5323	<i>Glyphium elatum</i> (AF346419)	99%
	<i>Endoconidioma populi</i> (AY604526)	98%		<i>Coniosporium perforans</i> (Y11714)	99%
CCFEE 5313	<i>Friedmanniomyces simplex</i> (DQ066716)	99%	CCFEE 5324	<i>Coniosporium perforans</i> (Y11714)	99%
	<i>Friedmanniomyces endolithicus</i> (DQ066715)	99%		<i>Coniosporium</i> sp. (Y11712)	99%
CCFEE 5319	<i>Friedmanniomyces simplex</i> (DQ066716)	98%	CCFEE 5303	Nessuna similarità significativa	
	<i>Friedmanniomyces endolithicus</i> (DQ066715)	98%			
CCFEE 5320	<i>Friedmanniomyces simplex</i> (DQ066716)	98%			
	<i>Friedmanniomyces endolithicus</i> (DQ066715)	98%			

CCFEE: Culture Collection of Fungi from Extreme Environments.

Tab. 4.11 – Percentuali di similarità più elevate ottenute dal confronto delle sequenze ITS degli isolati fungini studiati con le sequenze depositate in Banca Dati NCBI.

Isolato	Specie con grado di similarità più elevato	% similarità (ITS)	Isolato	Specie con grado di similarità più elevato	% similarità (ITS)
CCFEE 5312	Fungal sp. (DQ068356)	96%	CCFEE 5323	<i>Phaeococcomyces chersonesos</i> (AJ507323)	93%
CCFEE 5318	<i>Capnobotryella</i> sp. (AJ972847)	99%	CCFEE 5320	<i>Mycosphaerella parva</i> (AY626980)	88%
	Ascomycete sp. (AJ972840)	98%	CCFEE 5324	<i>Phaeococcomyces chersonesos</i> (AJ507323)	93%
CCFEE 5321	<i>Friedmanniomyces endolithicus</i> (DQ028272)	97%	CCFEE 5317	Nessuna similarità significativa	
CCFEE 5322	<i>Mycosphaerella parva</i> (AY626980)	87%	CCFEE 5326	Nessuna similarità significativa	
CCFEE 5314	<i>Phaeococcomyces chersonesos</i> (AJ507323)	92%	CCFEE 5303	Nessuna similarità significativa	
CCFEE 5313	<i>Mycocalicium victoriae</i> (AF243135)	89%			
	<i>Mycocalicium victoriae</i> (AJ312123)	89%			
CCFEE 5319	<i>Mycocalicium victoriae</i> (AJ312123)	88%			

CCFEE: Culture Collection of Fungi from Extreme Environments.

4.5.2 Confronto in Banca Dati delle sequenze ottenute da batteri

Nella tabella 4.12 si riportano i valori più elevati delle percentuali di similarità ottenuti dal confronto delle sequenze SSU (16s) di ciascun isolato batterico studiato con le sequenze depositate in Banca Dati, l'organismo da cui è stata ottenuta la sequenza confrontata ed il relativo numero di accesso in Banca Dati.

Tutti i ceppi batterici isolati da *X. elegans* mostrano percentuali di similarità piuttosto elevate, 99%, con specie Gram + e Gram – normalmente isolate da suolo, quali *Bacillus* spp., *Paenibacillus* spp. e *Pseudomonas* spp. Nella componente esterna sono presenti tanto batteri Gram + che Gram –, mentre in quella interna solamente Gram +. Da *L. fuscobrunnea*, invece, sono stati isolati, nella componente esterna, solo batteri che mostrano una similarità del 98% con un batterio attinomicetoide. Da un singolo campione di *Umbilicaria decussata* (campione 10 in tabella 4.1) sono stati isolati ben 12 ceppi batterici di cui 8 dalla componente esterna e 4 da quella interna; molti dei ceppi isolati, tanto dalla componente interna che esterna, mostrano una percentuale di similarità che varia dal 95 al 98% con un batterio non identificato definito come endofitico e isolato da piante delle Alpi (dati non pubblicati). Da un diverso campione di *Umbilicaria decussata* (campione 11 in tabella 4.1) è stato isolato solamente un ceppo batterico dalla componente interna, che mostra una similarità del 98% con un organismo non identificato. Percentuali di similarità del 96 e 98% sono state riscontrate nella componente esterna ed interna rispettivamente (Est 4 ed Int 1), dei batteri isolati da *Usnea antarctica*, con il batterio Gram – *Pseudomonas lutea*. Sullo stesso lichene nella componente esterna sono stati isolati anche due ceppi (Est 2 ed Est 5) aventi il 98% di similarità con *Arthrobacter* spp. ed un batterio attinomicetoide rispettivamente; mentre Est 1 ed Est 3 hanno una similarità di solo 96% con un batterio non identificato definito come endofitico e isolato da piante delle Alpi (dati non pubblicati). Il numero più elevato di isolati ottenuti appartiene al genere *Actinobacteria*.

4.5.3 Confronto in Banca Dati delle sequenze ottenute dai fotobionti

Il confronto è stato eseguito anche per le sequenze ITS del fotobionte ed i dati sono riportati nella tabella 4.13. In tabella vengono inoltre indicati in rosso i campioni antartici di *L. fuscobrunnea*. Tutti i fotobionti dei licheni studiati mostrano la percentuale di similarità più elevata (tra 99 e 100%) con alghe del genere *Trebouxia*. Le uniche eccezioni

riguardano i fotobionti di due campioni della specie *L. fuscobrunnea* (S31 ed S65) per i quali è stata trovata una similarità piuttosto bassa: 94% di S31 con una *Trebouxia* non coltivata e 95% di S65 con l'alga *Trebouxia jamesii*. L'ultimo fotobionte da campione di *L. fuscobrunnea*, S60 invece, mostra 99% di similarità sempre con una *Trebouxia* non coltivata, anche se diversa da quella confrontata con S31.

Tab. 4.13 – Percentuali di similarità più elevate ottenute dal confronto delle sequenze ITS dei fotobionti studiati con le sequenze depositate in Banca Dati NCBI (in rosso sono riportati i campioni antartici).

Sigla campione	Specie con grado di similarità più elevato	% similarità (ITS)	Sigla campione	Specie con grado di similarità più elevato	% similarità (ITS)
S1	-	-	S18	<i>Trebouxia</i> sp. (AF534387)	100%
S2	<i>Trebouxia</i> sp. (AF534387)	100%	S20	<i>Trebouxia</i> sp. (AF534387)	100%
S3	<i>Trebouxia</i> sp. (AF534387)	100%	S31	Uncultured <i>trebouxia</i> (DQ166577)	94%
S4	<i>Trebouxia</i> sp. (AF534387)	100%	S55	<i>Trebouxia</i> sp. (AF534387)	99%
S5	<i>Trebouxia</i> sp. (AF534387)	100%	S59	<i>Trebouxia</i> sp. (AF534387)	100%
S6	<i>Trebouxia jamesii</i> (AJ431574)	99%	S60	Uncultured <i>trebouxia</i> (AM159208)	99%
S7	<i>Trebouxia</i> sp. (AF534387)	100%	S65	<i>Trebouxia jamesii</i> (AF242459)	95%
S8	<i>Trebouxia</i> sp. (AF534387)	99%	S66	<i>Trebouxia jamesii</i> (AJ431574)	99%
S9	<i>Trebouxia jamesii</i> (AJ431575)	99%	S67	<i>Trebouxia jamesii</i> (AJ431574)	99%
S10	<i>Trebouxia</i> sp. (AF534387)	98%	S68	<i>Trebouxia</i> sp. (AF534387)	100%
S11	-	-	S69	-	-
S12	<i>Trebouxia</i> sp. (AF534387)	100%	S70	-	-
S13	<i>Trebouxia</i> sp. (AF534387)	100%	S71	<i>Trebouxia jamesii</i> (AJ431574)	99%
S14	<i>Trebouxia jamesii</i> (AF453264)	99%	S72	<i>Trebouxia jamesii</i> (AF453263)	99%
S15	<i>Trebouxia</i> sp. (AF534387)	100%	S73	<i>Trebouxia jamesii</i> (AJ431574)	99%
S16	<i>Trebouxia</i> sp. (AF534387)	99%	S74	<i>Trebouxia jamesii</i> (AJ431574)	99%
S17	<i>Trebouxia</i> sp. (AF534387)	99%			

Tab. 4.12 – Percentuali di similarità più elevata ottenute dal confronto delle sequenze SSU degli isolati batterici studiati con le sequenze depositate in Banca Dati NCBI (Est = batteri isolati dall'esterno del tallo; Int = batteri isolati dall'interno del tallo).

Isolato	Lichene ospite	Specie con grado di similarità più elevato	% similarità (16SrDNA)	Tassonomia
Est 1	<i>Xanthoria elegans</i>	<i>Bacillus</i> sp. (AY553105)	99%	<i>Phylum Firmicutes</i>
		<i>Bacillus licheniformis</i> (AJ582722)	99%	<i>Phylum Firmicutes</i>
Est 2	<i>Xanthoria elegans</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. (AY747591)	99%	<i>Phylum Proteobacteria</i>
		<i>Pseudomonas lini</i> (AY035996)	99%	<i>Phylum Proteobacteria</i>
Est 3	<i>Xanthoria elegans</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. (AY747591)	99%	<i>Phylum Proteobacteria</i>
		<i>Pseudomonas</i> sp. (AY337597)	99%	<i>Phylum Proteobacteria</i>
Int 1	<i>Xanthoria elegans</i>	<i>Bacillus</i> sp. (DQ192051)	99%	<i>Phylum Firmicutes</i>
		<i>Bacillus simplex</i> (DQ275175)	99%	<i>Phylum Firmicutes</i>
Int 2	<i>Xanthoria elegans</i>	<i>Paenibacillus</i> sp. (DQ339607)	99%	<i>Phylum Firmicutes</i>
		<i>Paenibacillus amylolyticus</i> (AM062689)	99%	<i>Phylum Firmicutes</i>
Est 1	<i>Lecanora fuscobrunnea</i>	<i>Actinomycetales</i> bacterium (AB245399)	98%	<i>Phylum Actinobacteria</i>
Est 2	<i>Lecanora fuscobrunnea</i>	<i>Actinomycetales</i> bacterium (AB245399)	98%	<i>Phylum Actinobacteria</i>
Est 3	<i>Lecanora fuscobrunnea</i>	<i>Actinomycetales</i> bacterium (AB245399)	98%	<i>Phylum Actinobacteria</i>
Est 4	<i>Lecanora fuscobrunnea</i>	<i>Actinomycetales</i> bacterium (AB245399)	98%	<i>Phylum Actinobacteria</i>
Est 1	<i>Umbilicaria decussata</i>	Endophytic bacterium (DQ339615)	98%	<i>Phylum Actinobacteria</i>
		<i>Frigoribacterium</i> sp. (AF157479)	96%	
Est 2	<i>Umbilicaria decussata</i>	Endophytic bacterium (DQ339615)	98%	<i>Phylum Actinobacteria</i>
		<i>Curtobacterium</i> sp. (AY688358)	95%	
Est 3	<i>Umbilicaria decussata</i>	<i>Deinococcus murray</i> (Y13042)	90%	

[continua]

[segue]

Est 4	<i>Umbilicaria decussata</i>	Endophytic bacterium (DQ339615) <i>Frigoribacterium</i> sp. (AF157479)	98% 96%	<i>Phylum Actinobacteria</i>
Est 5	<i>Umbilicaria decussata</i>	Endophytic bacterium (DQ339615) Actinobacterium TB3-4-I (AY599739)	97% 95%	<i>Phylum Actinobacteria</i>
Est 6	<i>Umbilicaria decussata</i>	Endophytic bacterium (DQ339615) <i>Frigoribacterium</i> sp. (AF157479)	96% 95%	<i>Phylum Actinobacteria</i>
Est 7	<i>Umbilicaria decussata</i>	Endophytic bacterium (DQ339615)	98%	
Est 8	<i>Umbilicaria decussata</i>	Endophytic bacterium (DQ339615)	95%	
Int 1	<i>Umbilicaria decussata</i>	Endophytic bacterium (DQ339615) <i>Frigoribacterium</i> sp. (AF157479)	98% 96%	<i>Phylum Actinobacteria</i>
Int 2	<i>Umbilicaria decussata</i>	Endophytic bacterium (DQ339615) <i>Frigoribacterium</i> sp. (AF157479)	98% 96%	<i>Phylum Actinobacteria</i>
Int 3	<i>Umbilicaria decussata</i>	Endophytic bacterium (DQ339615)	98%	
Int 4	<i>Umbilicaria decussata</i>	<i>Knoellia</i> sp. (DQ812538) <i>Janibacter</i> like sp. (AJ244674)	99% 98%	<i>Phylum Actinobacteria</i> <i>Phylum Actinobacteria</i>
Int 1	<i>Umbilicaria decussata</i>	Bacterium H25 (AY345548) <i>Paenibacillus borealis</i> (AJ011321)	98% 97%	<i>Phylum Firmicutes</i>
Est 1	<i>Usnea antarctica</i>	Endophytic bacterium (DQ339615)	96%	
Est 2	<i>Usnea antarctica</i>	<i>Arthrobacter</i> sp. (AM419018) <i>Arthrobacter</i> sp. (AY497355)	98%	<i>Phylum Actinobacteria</i> <i>Phylum Actinobacteria</i>
Est 3	<i>Usnea antarctica</i>	Endophytic bacterium (DQ339615)	96%	
Est 4	<i>Usnea antarctica</i>	<i>Pseudomonas lutea</i> (AY364537) <i>Pseudomonas graminis</i> (Y11150)	98% 98%	<i>Phylum Proteobacteria</i> <i>Phylum Proteobacteria</i>

[continua]

[segue]

Est 5	<i>Usnea antarctica</i>	Uncultured bacterium (AJ576407)	98%	<i>Phylum Actinobacteria</i>
		<i>Actinomycetales</i> bacterium (AB245399)	98%	
Int1	<i>Usnea antarctica</i>	<i>Pseudomonas lutea</i> (AY364537)	96%	<i>Phylum Proteobacteria</i>

4.6 ANALISI FILOGENETICA

Tutti gli organismi che mostrano un'alta percentuale di similarità e quindi particolarmente significativi ai fini dell'inquadrimento tassonomico, insieme agli organismi con valori di similarità più bassi, sono stati utilizzati per le successive analisi di allineamento delle sequenze e costruzione degli alberi filogenetici. Nell'allineamento sono state incluse sequenze di altri organismi, non indicati nelle tabelle con le percentuali di similarità, individuate dal confronto in Banca Dati. In relazione ai funghi neri, alle sequenze così selezionate, sono state aggiunte altre sequenze conservate in Banche Dati private, come indicato in Materiali e Metodi. L'analisi è stata eseguita come sopra descritto allo scopo di consentire una collocazione tassonomica più precisa per i ceppi esaminati nel presente lavoro. Di seguito si riportano gli alberi ottenuti per i diversi organismi: funghi neri (alberi NJ SSU e ITS, figure 4.3 e 4.4), batteri (albero NJ SSU, figura 4.5) e micobionti dei licheni (alberi NJ e MP ITS e RPB1, figure 4.6, 4.7, 4.8 e 4.9). Nessun albero filogenetico è stato costruito per i fotobionti dei licheni in virtù dei dati risultanti dal confronto delle sequenze ottenute con le sequenze depositate in Banca Dati.

4.6.1 Filogenesi dei funghi neri studiati sulla base delle sequenze SSU

In figura 4.3 è riportato l'albero filogenetico costruito sulla base delle sequenze SSU di 102 ceppi fungini ben allineabili con i ceppi studiati. L'albero contiene organismi fungini appartenenti a diversi ordini del Regno *Fungi* quali: *Dothideales*, *Capnodiales*, *Mycocaliciales* *Myriangiales* ed *Hysteriales*; l'ordine *Chaetothyriales* è, invece, stato scelto quale outgroup. Tutti gli isolati ottenuti, indicati con le frecce, rientrano nella classe *Dothideomycetidae*. Tuttavia la maggior parte di essi non può essere assegnata ad un preciso ordine in quanto non mostra nessuna relazione filogenetica diretta con teleomorfi. In ogni caso, tutti gli isolati, ad eccezione dei due ceppi indicati con le frecce di colore nero (CCFEE 5317 e CCFEE 5326), mostrano relazioni filogenetiche con altri funghi neri isolati da comunità criptoendolitiche antartiche o da rocce di altri ambienti. L'albero evidenzia in particolare la presenza di un cluster ben separato (costituito dai tre ceppi CCFEE 5313, CCFEE 5319 e CCFEE 5320) avente come sister group un gruppo di funghi neri isolati da rocce antartiche (*Friedmanniomycecs* spp., Selbmann *et al.*, 2005). Anche i due ceppi CCFEE 5317 e CCFEE 5326 non sembrano essere filogeneticamente direttamente correlati né ad alcuna specie teleomorfa né ad altri funghi noti al momento e

formano un piccolo gruppo ben separato dal resto dei funghi considerati nella presente analisi. Per questi non è stato possibile fare alcuna assegnazione sistematica al di sotto del livello di sottoclasse (*Dothideomycetidae*). I ceppi CCFEE 5314, CCFEE 5323 e CCFEE 5324 formano un gruppo ben supportato assieme ad un altro fungo, CCFEE 457, isolato da comunità criptoendolitiche antartiche (Selbmann *et al.*, 2005). Essi clusterizzano con alcuni ceppi del genere *Coniosporium* isolati da rocce dell'area mediterranea. Nel cluster è presente il teleomorfo *Glyphium elatum* (Grev.) H. Zogg. Pertanto è stato possibile assegnare i nuovi ceppi studiati all'ordine *Hysteriales*.

Gli altri ceppi studiati raggruppano con altri funghi delle rocce, antartiche e non, o con funghi isolati da ambienti caratterizzati da condizioni ambientali stressanti. Ad esempio, nel gruppo formato dai ceppi appartenenti al genere *Friedmanniomyces* (Selbmann *et al.*, 2005) isolati da comunità criptoendolitiche dominate da licheni, clusterizza il ceppo CCFEE 5321, isolato nella presente ricerca da *Lecidea cancriformis* (Terra Vittoria del Nord); pertanto dal punto di vista sistematico tale ceppo può essere incluso in questo genere. Dal punto di vista morfologico esso mostra caratteristiche molto simili a *F. endolithicus* Onofri (Onofri *et al.*, 1999). Questo gruppo risulta essere filogeneticamente correlato al fungo lichenicolo *Hobsonia santessonii* Lowen & Hawksw e ad un ceppo depositato in Banca Dati come *Mycocalicium victoriae* (C. Knight ex F. Wilson) Tibell.

Il ceppo CCFEE 5322 clusterizza con altri due ceppi, CCFEE 5329 e CCFEE 5267, isolati da rocce antartiche colonizzate da comunità criptoendolitiche dominate da licheni e non ancora descritti, formando un gruppo relativamente correlato al fungo *Coccodinium bartschii* A. Massal.

Il ceppo CCFEE 5312 mostra relazioni filogenetiche all'interno di un cluster costituito da altri ceppi isolati da comunità criptoendolitiche dominate da licheni (CCFEE 451, Selbmann *et al.*, 2005, e CCFEE 5177, CCFEE 5205 e CCFEE 5207); nel gruppo sono inclusi alcuni funghi isolati da manufatti marmorei e nominati impropriamente come *Capnobotryella*. Esternamente a questo gruppo si colloca il ceppo CCFEE 5318 che rimane comunque filogeneticamente separato.

Il ceppo CCFEE 5303, infine, l'unico isolato dal campione proveniente dalla Terra Vittoria del Sud, area di Convoy Range, Valli Secche di McMurdo (*Lecanora fuscobrunnea*), mostra una similarità con i ceppi CCFEE 5176 (Selbmann *et al.*, 2005), CCFEE 5284 e CCFEE 5304, isolati da comunità criptoendolitiche dominate da licheni della Terra Vittoria del Nord; ad oggi questo gruppo ha ancora una posizione filogenetica irrisolta.

4.6.2 Filogenesi dei funghi neri studiati sulla base delle sequenze ITS

Per alcuni ceppi studiati è stato possibile avere un allineamento ITS accettabile solo con pochi organismi, mentre per altri non è stata trovata alcuna sequenza ITS allineabile.

Pertanto soltanto per il gruppo costituito dai ceppi CCFEE 5313, CCFEE 5319 e CCFEE 5320 e per il ceppo CCFEE 5321 è stata effettuata un'analisi filogenetica sulla base delle sequenze ITS, in modo da ottenere una più dettagliata analisi che consentisse di arrivare ad una più precisa collocazione sistematica (vedi figura 4.4).

L'albero ITS, generato dall'allineamento di 63 differenti ceppi fungini ed avente quale outgroup il fungo *Capnobotriella renispora* J. Sugiyama (*Capnodiales*), contiene quasi esclusivamente microrganismi isolati da rocce o da altri ambienti caratterizzati da condizioni estreme. Un primo raggruppamento include 15 ceppi di *Hortaea werneckii* (Horta) Nishimura & Miyaji, fungo noto per essere tra i più alofili conosciuti, isolato da saline (Zalar *et al.*, 1999; Kogei *et al.*, 2005), ma anche segnalato come potenziale patogeno umano, essendo agente infettivo della cromoblastomicosi (Sterflinger, 2006; Uezato *et al.*, 2006). Il ceppo antartico CCFEE 507, isolato da comunità criptoendolitiche, rimane esterno a questo gruppo. Altri gruppi ben supportati da valori di bootstrap del 99%, sono formati da funghi delle rocce, quali ad esempio *Pseudotaeniolina*, che ha come sister group un gruppo di altri due funghi delle rocce, il CCFEE 5264 isolato sempre da comunità criptoendolitiche antartiche e TRN 491, isolato da formazioni rocciose a Puebla de la Sierra, Madrid, Spagna. È presente inoltre un gruppo consistente di funghi appartenenti al genere *Trimmatostroma*, noto nella specie *T. abietis* Butin & Pehl per essere in grado di colonizzare tanto aghi di piante del genere *Pinus*, che substrati rocciosi. Alcuni rappresentanti del genere *Mycosphaerella*, noti patogeni vegetali in grado di colonizzare foglie di *Protea* in climi semiaridi, sono presenti nell'albero. La relazione filogenetica con *Trimmatostroma* non stupisce, in quanto questa forma è risultata essere l'anamorfo di alcune specie di *Mycosphaerella*.

Anche l'analisi delle regioni ITS conferma il risultato ottenuto con l'analisi delle regioni SSU per ciò che riguarda il gruppo costituito dai ceppi CCFEE 5313, CCFEE 5319 e CCFEE 5320, supportato da un valore di bootstrap del 100%. Esso si colloca come sister group del raggruppamento relativo al genere *Friedmanniomyces*, supportato da un valore di bootstrap del 99%; il ceppo CCFEE 5321 risulta anche nell'analisi ITS incluso nel gruppo *Friedmanniomyces*. Infine nell'albero sono inclusi alcuni funghi non identificati

isolati da substrati a pH acido; essi formano un raggruppamento filogeneticamente non direttamente correlato con i funghi oggetto di questo studio.

4.6.3 Filogenesi dei batteri studiati sulla base delle sequenze SSU

Come già riportato nel paragrafo 4.5.2, la ricerca in Banca Dati di sequenze significativamente simili agli isolati batterici ottenuti nella presente ricerca ha permesso di individuare l'appartenenza degli isolati a generi diversi di batteri, sia Gram positivi che Gram negativi: *Paenibacillus* e *Bacillus* (*Phylum Firmicutes*), *Pseudomonas* (*Phylum Proteobacteria*), *Deinococcus* (*Phylum Deinococcus-Thermus*) e *Actinomycetales* (*Phylum Actinobacteria*). Anche in questo caso, come per i funghi neri, nell'allineamento sono state incluse altre sequenze per ottenere una migliore collocazione tassonomica dei ceppi. L'albero generato dall'analisi filogenetica della regione 16s dell'rDNA (SSU), illustrato in figura 4.5, è stato ottenuto dal confronto di 114 sequenze batteriche. I gruppi che sono stati individuati sono supportati da valori di bootstrap abbastanza alti nella maggioranza dei casi.

L'albero mostra un ampio gruppo di batteri dove ricadono molti degli isolati oggetto di questo studio. In particolare 8 ceppi, tutti isolati da un campione di *Umbilicaria decussata* (campione 10 in tabella 4.1), formano un gruppo supportato da un valore di bootstrap del 100% ; tale gruppo risulta direttamente correlato ad un isolato batterico isolato da piante delle Alpi, definito come endofitico (dati non pubblicati). È notevole il fatto che dalla componente esterna ed interna dello stesso lichene in realtà siano stati isolati gli stessi batteri; ciò fa supporre che i metodi di isolamento utilizzati non permettano di discriminare le due componenti in modo adeguato. Un altro ceppo isolato dallo stesso campione, Est 7, resta invece isolato dal gruppo sopra descritto. Mentre il ceppo Est 8, proveniente dallo stesso campione e due ceppi (Est 1 ed Est 2) isolati da *Usnea antarctica* (campione 12 in tabella 4.1), si collocano subito all'esterno del gruppo precedentemente descritto formando un gruppo supportato da un valore di bootstrap del 100%. L'isolato Int 4, ottenuto anch'esso da *U. decussata* clusterizza con alcuni batteri del genere *Knoellia* in un gruppo supportato con un valore del 91% di bootstrap. Notevole è la presenza dell'isolato Est 3 che invece raggruppa con il cluster *Deinococcus*, anche questo con un bootstrap 100%, anche se il lungo braccio evidenzia che il nuovo isolato si discosta in modo piuttosto marcato dagli organismi con i quali è stato confrontato. Dal tallo di *U. decussata* (campione 11 in tabella 4.1), proveniente da Vegetation Island, è stato isolato il ceppo Int 1

che è contenuto in un gruppo ben definito e supportato da un valore di bootstrap del 100%, dove è rappresentato esclusivamente il genere Gram + *Paenibacillus*.

Per ciò che riguarda *Usnea antarctica*, oltre agli isolati Est 1 ed Est 2 sopra citati, l'isolato Est 3 raggruppa nel cluster contenente altri 14 ceppi batterici tutti appartenenti al genere *Arthrobacter* e supportato con un valore 100% di bootstrap. Altri due isolati, Est 4 ed Int 1, sono, invece, batteri Gram - e clusterizzano insieme a numerosi ceppi di *Pseudomonas* spp.; nello stesso gruppo sono inclusi anche i ceppi Est 2, Est 3 ed Int 3 isolati da *Xanthoria elegans*. Per ciò che riguarda i Gram + isolati sempre da *X. Elegans*, Int 4 raggruppa al 100% di bootstrap con *Mycobacterium* sp, mentre Int 2 è incluso nel gruppo dei *Paenibacillus*. Est 2 ed Int 1 raggruppano entrambi con batteri del genere *Bacillus* ma in due differenti sottogruppi, ognuno supportato dal 100% di bootstrap.

I 4 isolati della componente esterna di *L. fuscobrunnea* formano, assieme all'isolato Est 5 di *U. antarctica*, un gruppo ben definito e supportato che ha come sister group un piccolo *clade* formato da un batterio attinomicetoide ed un altro ceppo non coltivato.

Pertanto l'analisi evidenzia che in uno stesso lichene possono essere presenti batteri che presentano strette relazioni filogenetiche tra loro (ad esempio gruppo I in figura 4.5) oppure batteri isolati in gruppi ottenuti da sequenze scaricate dalla Banca Dati, come nel caso di *Deinococcus*. Questi ceppi, separati dagli altri all'interno dell'albero, clusterizzano soltanto con specie ottenute dalla Banca Dati condividendo similarità, supportate da alti valori di bootstrap, con batteri provenienti da altri ambienti e quindi non associati a substrati simili a quelli da noi analizzati o ad ambienti dai quali sono stati raccolti i licheni oggetto di questo studio. Una eccezione è rappresentata dall'isolato Est 3 ottenuto dal campione *Usnea antarctica* (campione 12 in tabella 4.1), che mostra una relazione filogenetica (similarità del 98%) con un ceppo precedentemente isolato in Antartide e supportato da un valore di bootstrap del 92%. Tra i ceppi isolati sopra commentati, vi sono alcuni che clusterizzano con specie estremofile: Int 4, isolato da *Umbilicaria decussata* (campione 11 in tabella 4.1), clusterizza con *Knoellia* sp., un ceppo riportato come strettamente oligotrofico (dati non pubblicati); Int 1, isolato da *Xanthoria elegans* (campione 14 in tabella 4.1), clusterizza con *Bacillus* spp. ottenuti da ambienti endolitici e da ambienti estremi (Fajardo-Cavazos & Nicholson, 2006); Int 3, infine, isolato ancora da *Xanthoria elegans*, clusterizza con un "glacial ice bacterium", isolato da ambienti glaciali (Christner, 2002).

Un altro dato notevole che si evidenzia da questa analisi, già emerso dal semplice confronto nelle Banche Dati, è la grande biodiversità batterica presente all'interno di un unico campione.

4.6.4 Filogenesi dei fotobionti studiati sulla base delle sequenze ITS

Nessuna analisi filogenetica è stata eseguita per i fotobionti in quanto, come è evidente in tabella 4.11, dal confronto delle sequenze ITS ottenute da tutti i campioni non emerge nessuna differenza significativa tra le specie algali che formano la simbiosi nei campioni esaminati e le sequenze presenti nella Banca Dati. Tutti i campioni studiati presentano una sovrapposizione del 99-100% con le sequenze depositate e, pertanto, i fotobionti oggetto di studio possono essere verosimilmente assegnati alla specie *Trebouxia jamesii*. Le uniche eccezioni sono rappresentate dai campioni antartici S31 e S65 per i quali non è stata trovata alcuna corrispondenza accettabile nelle Banche Dati. Tuttavia essendo al momento disponibili poche sequenze per generare un allineamento attendibile su cui basare l'analisi filogenetica, si è ritenuto opportuno attendere di sequenziare nuovi fotobionti da licheni, antartici e non, e di rimandare questo approccio ad un prossimo futuro.

4.6.5 Filogenesi dei licheni del gruppo *Lecanora polytropa* studiati sulla base delle sequenze ITS ed RPB1 del micobionte

Gli alberi costruiti utilizzando le sequenze ITS e RPB1 del micobionte di tutti i campioni analizzati sono riportati nelle figure 4.6, 4.7, 4.8 e 4.9. Essi sono stati generati dall'allineamento di 33 diverse sequenze per gli alberi RPB1 e 31 per gli alberi ITS in quanto per i campioni S15 e S17 non è stato possibile ricostruire buone sequenze ITS a partire dagli elettroferogrammi degli amplificati ottenuti dopo le reazioni di PCR. Questo può contribuire a generare alberi con topologie differenti. L'outgroup è invariabilmente per tutti gli alberi costituito dalla specie *Protoparmelia badia* (Hoffn.).

I nomi indicati accanto ad ogni sigla sono quelli precedentemente assegnati alle specie soltanto mediante osservazione della morfologia dei talli. Gli alberi ottenuti appaiono molto simili tra loro, anche se presentano qualche riarrangiamento in alcuni casi.

Le sequenze ITS (figure 4.6 e 4.7) tra le specie analizzate ed anche tra i differenti campioni identificati nella stessa specie su base morfologica nell'ambito del gruppo *L. polytropa*, presentano una notevole eterogeneità. Infatti negli alberi ottenuti, campioni della stessa

specie spesso clusterizzano in gruppi ben separati tra di loro e supportati, in alcuni casi, da elevati valori di bootstrap.

Gli alberi ITS, ottenuti con i due diversi algoritmi NJ e MP, presentano topologie abbastanza sovrapponibili ed i gruppi con elevata percentuale di bootstrap sono confermati dalla filogenesi ottenuta con entrambi i metodi. Si distinguono due principali grandi gruppi di cui il primo comprende i campioni S1, S6, S11, S16, S5, S3, S69, S71, S12, S18, S8, S14, S60, S31, S65, S20, S66, S10, S9, S4, S2, S7 ed il secondo i campioni S74, S59, S67, S13, S68, S72, S73, S55, supportati rispettivamente da valori di bootstrap di 97% e 63% nell'albero NJ e di 85% e 65% nell'albero MP (figure 4.6 e 4.7). All'interno dei due principali raggruppamenti si distinguono clusters individuabili in entrambe gli alberi e con valori di bootstrap molto elevati: i sottogruppi S1, S6, S11, S16 e S5, S3, S69, S71, ad esempio risultano ripetibili con entrambi i metodi così come S8, S14 e S12, S18 anche se la topologia in questo caso non è perfettamente sovrapponibile a causa della posizione non ben risolta dei campioni S66 ed S20, come confermato dai bassi valori di bootstrap dei gruppi di cui fanno parte e dai lunghi rami generati nell'albero MP. I campioni di *L. fuscobrunnea* clusterizzano insieme con entrambi i metodi formando gruppi supportati da valori di bootstrap sempre superiori al 97%, ed hanno come sister group i campioni della specie *L. polytropa* S8 ed S14. La topologia del secondo dei due gruppi principali è confermata in entrambi gli alberi

Gli alberi filogenetici, inoltre, mostrano che le altre specie appartenenti al gruppo *L. polytropa* incluse nello studio (*L. intricata* e *L. silvae-nigrae*) formano dei gruppi ben separati e supportati da alti valori di bootstrap (ad eccezione del campione S10 la cui posizione rimane irrisolta), confermando quindi la giusta separazione tra le due specie, *L. intricata* e *L. polytropa*, già assegnata su base morfologica. Anche la posizione del campione S13 rimane irrisolta, occupando una posizione isolata in particolare nell'albero ITS NJ.

La topologia che risulta dall'analisi delle sequenze ITS è stata verificata generando alberi NJ e MP anche sulla base delle sequenze RPB1 (figg. 4.8 e 4.9). Anche se alcuni riarrangiamenti sono evidenziabili, è confermata la polifilia della specie *L. polytropa*, confermando che su semplice base morfologica non è possibile distinguere i diversi gruppi, mentre le specie *L. intricata* e *L. silvae nigrae* risultano anche qui ben separate sia tra loro che dalla specie *L. polytropa*. Il campione S10 di *L. intricata*, che rimaneva in una posizione irrisolta negli alberi ITS, raggruppa invece perfettamente all'interno del cluster della specie in entrambi gli alberi generati sulla base delle sequenze RPB1, con un

bootstrap relativo al gruppo di 98% sia nell'albero ITS che MP. Sembra essere presente una differenza tra le specie analizzate, infatti l'analisi filogenetica (NJ e MP) mostra lo stesso risultato, confermando la presenza di due gruppi monofiletici, supportati, così come per le regioni ITS, da valori di bootstrap non molto alti.

Fig. 4.3 – Filogenesi dei funghi neri studiati basata sulle sequenze SSU dell'rDNA. L'albero è stato ottenuto utilizzando l'algoritmo NJ sulla base del modello GTR+G scelto su 56 differenti modelli utilizzando MrAIC.

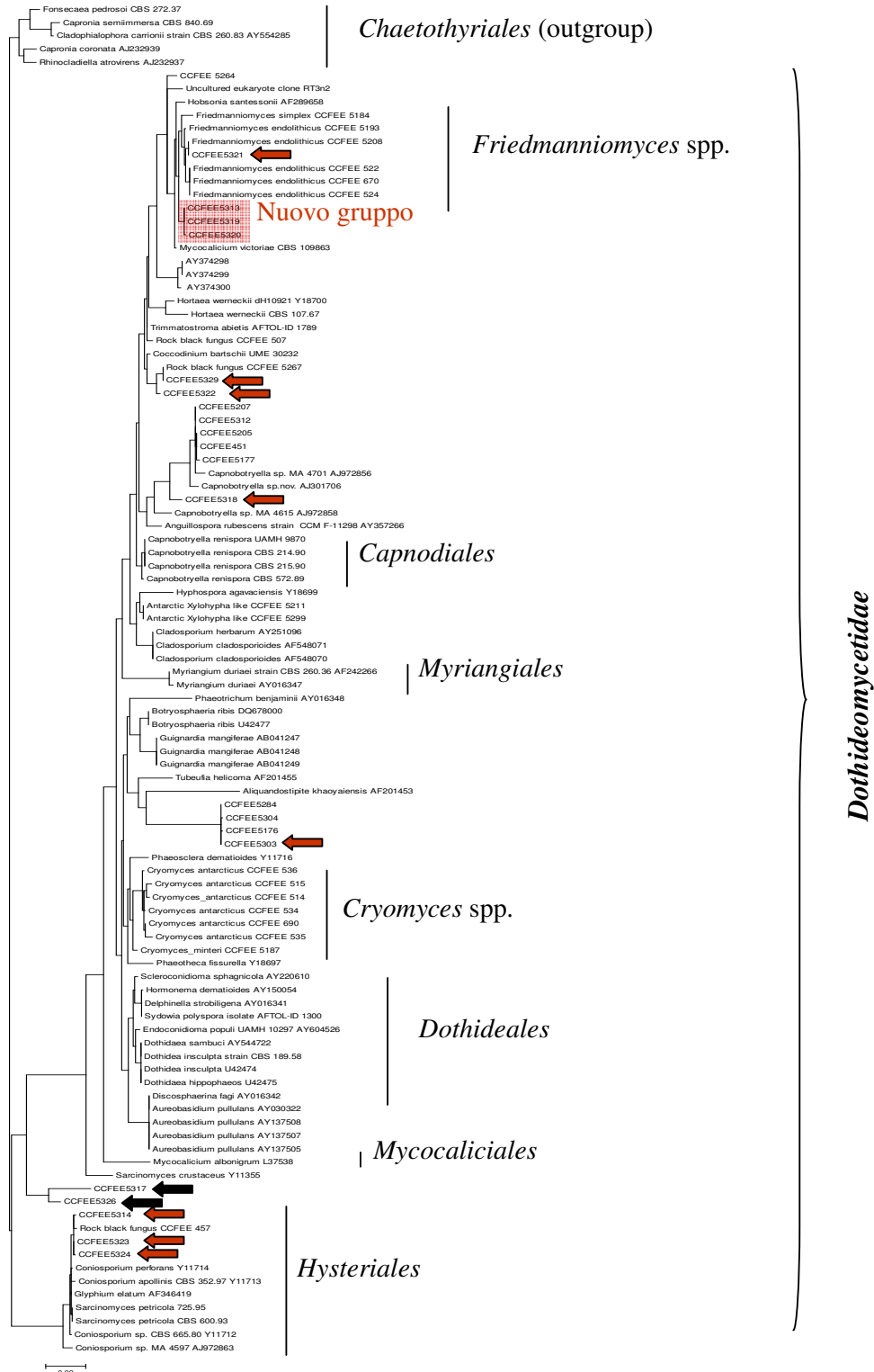


Fig. 4.4 – Filogenesi dei funghi neri studiati basata sulle sequenze ITS dell'rDNA. L'albero è stato ottenuto utilizzando l'algoritmo NJ in MEGA3, i valori di bootstrap rappresentano il risultato di 1000 ricampionamenti.

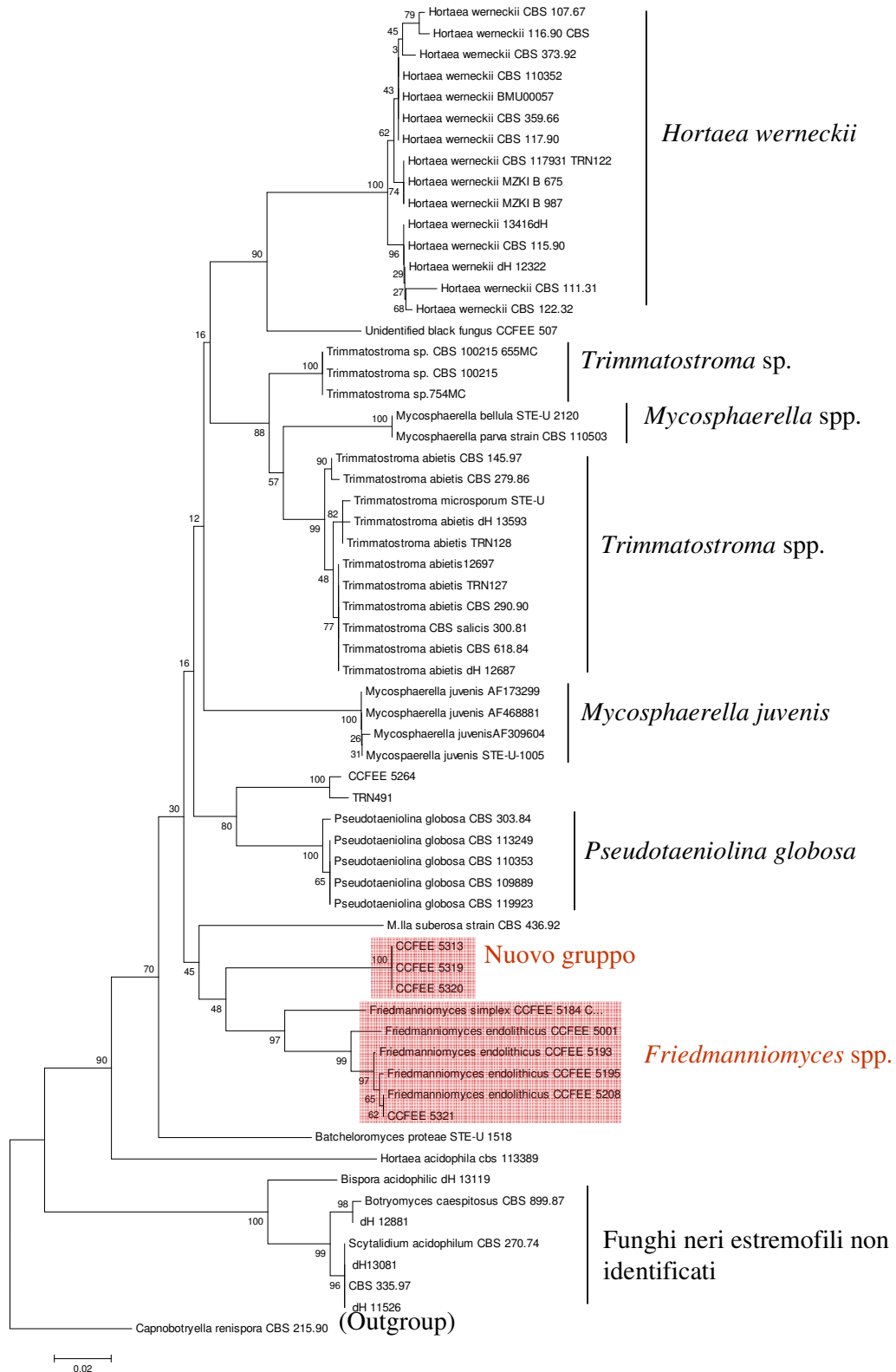


Fig. 4.5 – Filogenesi dei batteri studiati basata sulle sequenze 16s dell'rDNA. L'albero è stato ottenuto utilizzando l'algoritmo NJ in MEGA3, i valori di bootstrap rappresentano il risultato di 1000 ricampionamenti.



Fig. 4.6 – Filogenesi dei licheni appartenenti al gruppo *Lecanora polytropa* studiati basata sulle sequenze ITS dell'rDNA. L'albero è stato ottenuto utilizzando l'algoritmo NJ in MEGA3, i valori di bootstrap rappresentano il risultato di 1000 ricampionamenti.

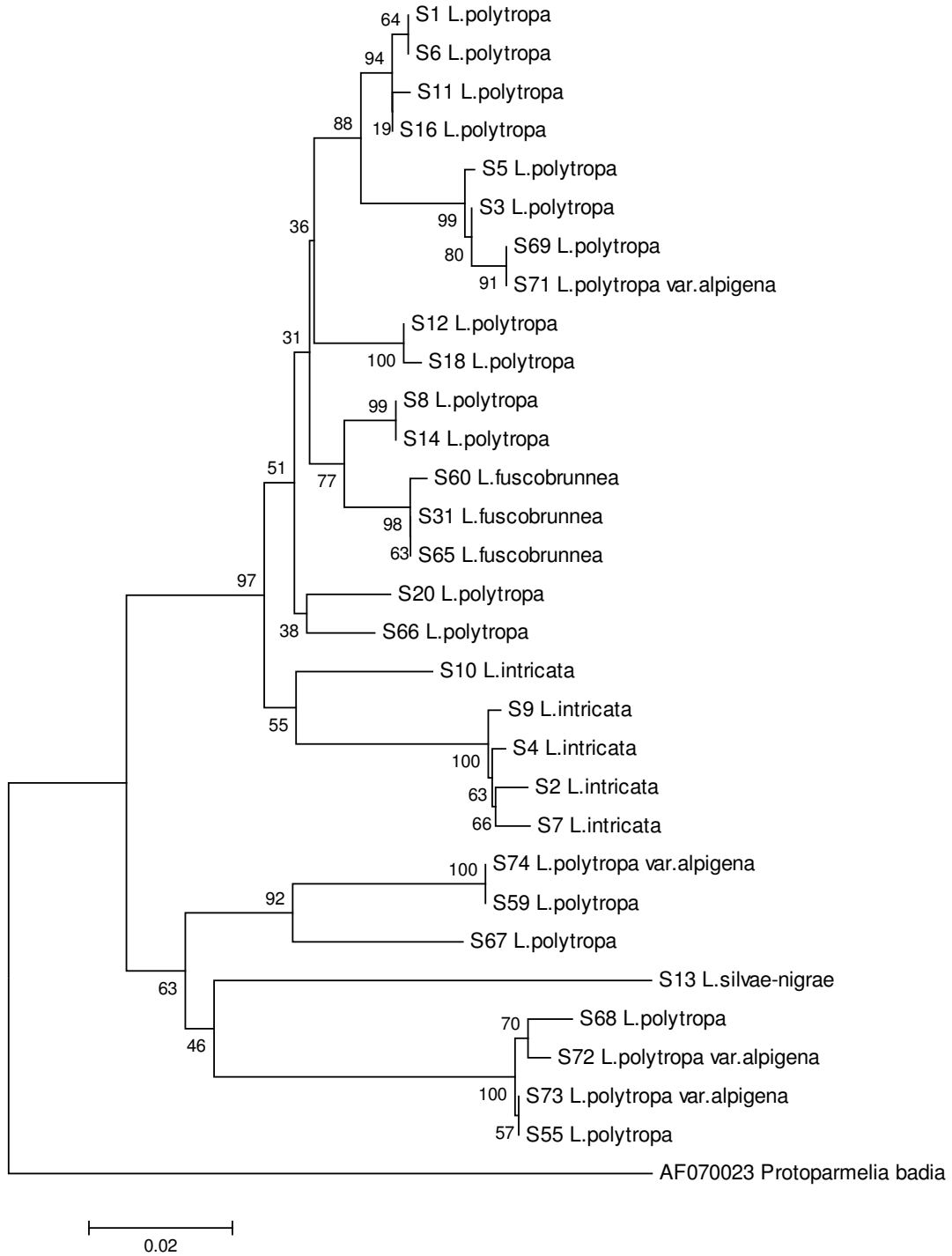


Fig. 4.7 – Filogenesi dei licheni appartenenti al gruppo *Lecanora polytropa* studiati basata sulle sequenze ITS dell'rDNA. L'albero è stato ottenuto utilizzando l'algoritmo MP in MEGA3, i valori di bootstrap rappresentano il risultato di 1000 ricampionamenti.

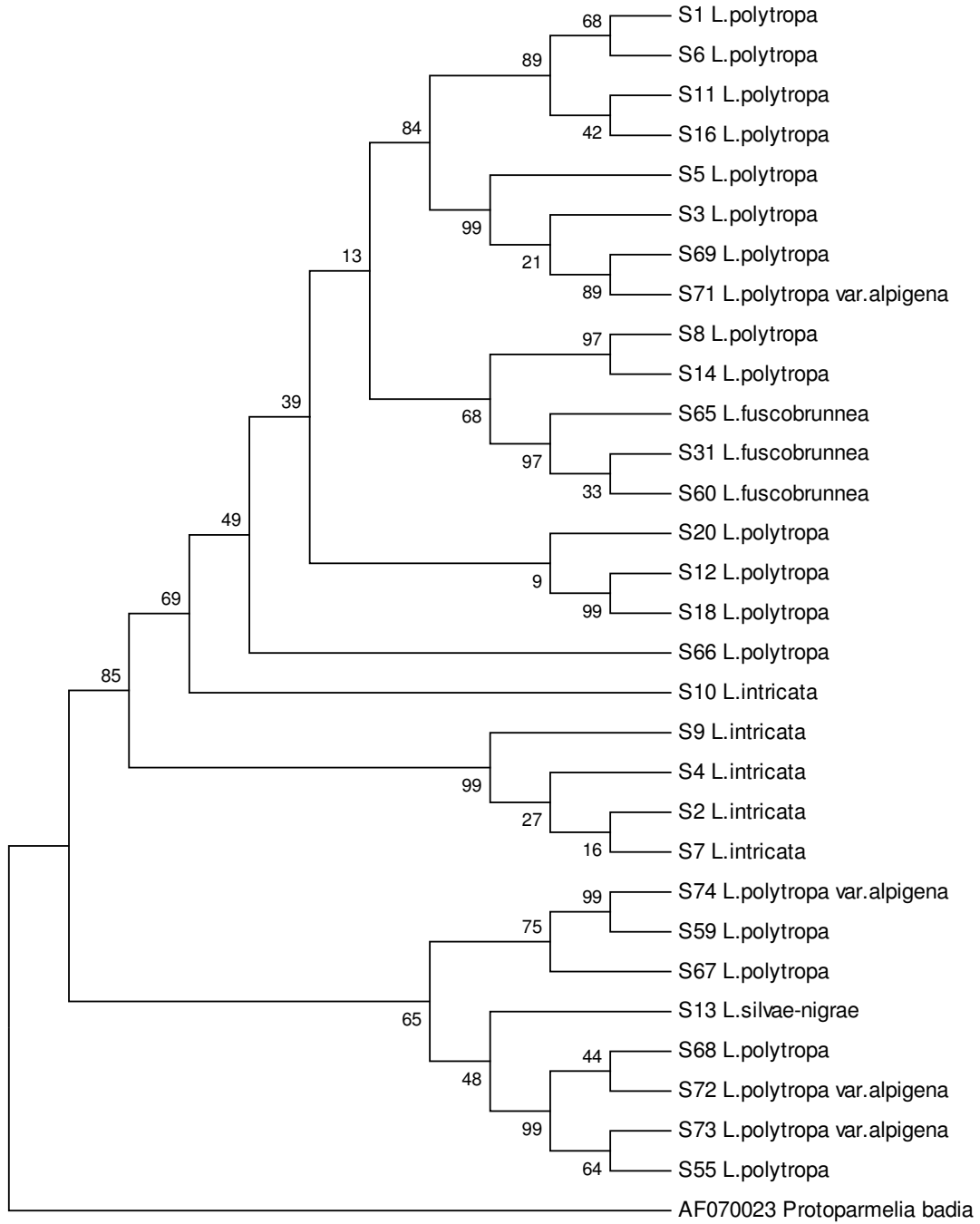


Fig. 4.8 – Filogenesi dei licheni appartenenti al gruppo *Lecanora polytropa* studiati basata sulle sequenze RPB1. L'albero è stato ottenuto utilizzando l'algoritmo NJ in MEGA3, i valori di bootstrap rappresentano il risultato di 1000 ricampionamenti.

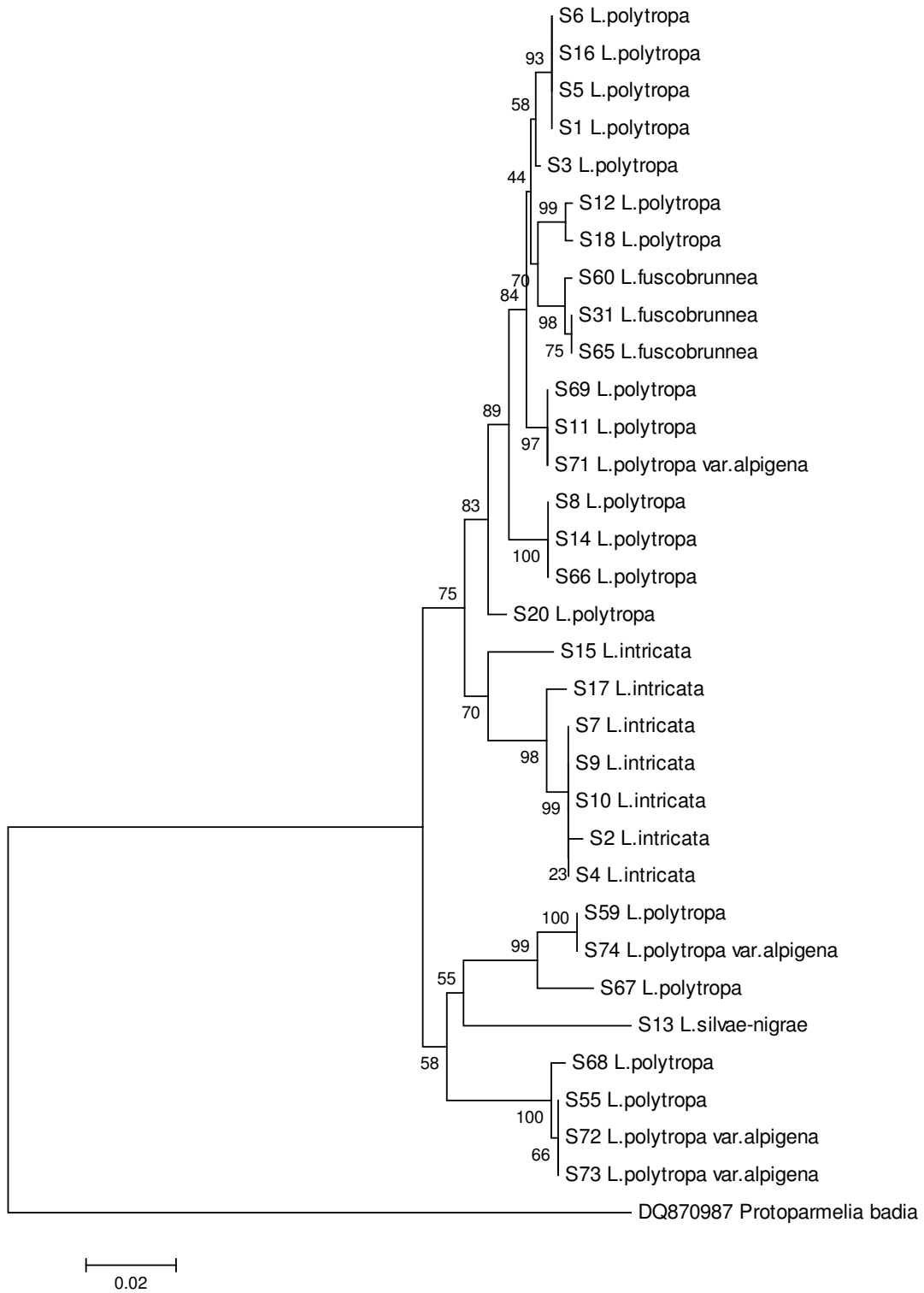
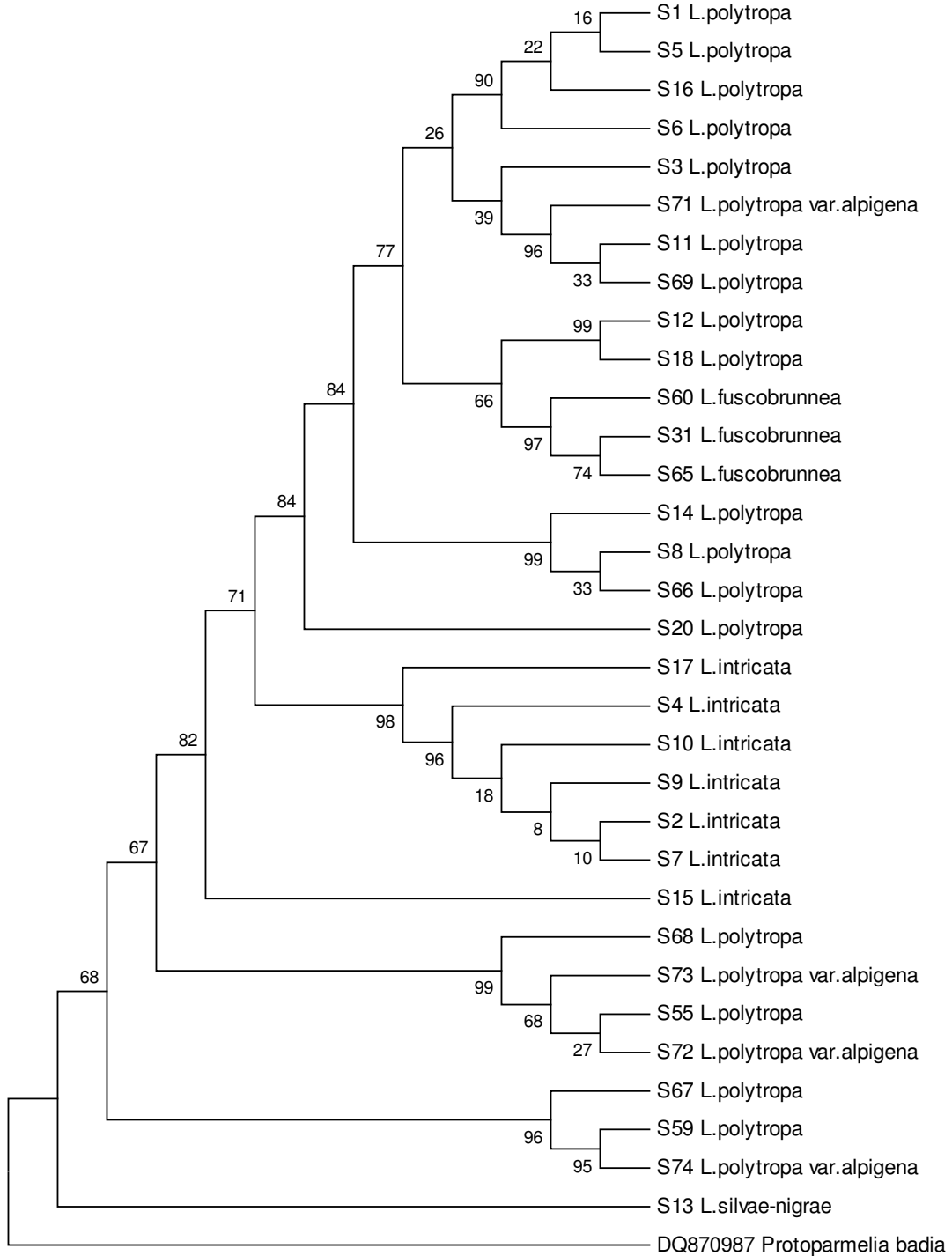


Fig. 4.9 – Filogenesi dei licheni appartenenti al gruppo *Lecanora polytropa* studiati basata sulle sequenze RPB1. L'albero è stato ottenuto utilizzando l'algoritmo MP in MEGA3, i valori di bootstrap rappresentano il risultato di 1000 ricampionamenti.



5 DISCUSSIONE

Nella presente ricerca sono stati analizzati in totale 17 campioni antartici, costituiti da specie licheniche foliose, fruticose e crostose, provenienti da aree diverse della Terra Vittoria del Nord e del Sud (Antartide continentale), al fine di ottenere in coltura gli organismi ad essi associati, e 33 campioni, antartici e non, appartenenti al complesso e discusso gruppo della *Lecanora polytropa*, che comprende anche la specie endemica *L. fuscobrunnea* Dodge & Baker, allo scopo di delimitare il gruppo stesso. Per trattare al meglio questi due aspetti la discussione è stata divisa in due parti, la prima relativa ai risultati ottenuti dagli studi morfologici, fisiologici e molecolari condotti sulla parte coltivabile dei microrganismi associati ai licheni antartici mentre la seconda riguarda risultati ottenuti dall'analisi molecolare nell'ambito del gruppo *Lecanora polytropa*.

PARTE I

ANALISI MOLECOLARE DEI MICRORGANISMI ASSOCIATI AI LICHENI ANTARTICI

Per ciò che riguarda i ceppi fungini ottenuti in coltura, il lavoro è stato indirizzato verso l'analisi dei ceppi costituiti da funghi neri. Con il termine “funghi neri” si indica genericamente un gruppo piuttosto eterogeneo dal punto di vista sistematico di organismi accomunati dalla capacità di colonizzare ambienti che, per gli stress ambientali a cui sono sottoposti, sono generalmente preclusi a funghi cosmopoliti. Si tratta pertanto di un gruppo ecologico di organismi ancora poco conosciuti, nonostante negli ultimi anni siano stati fatti enormi progressi grazie all'impiego di tecniche molecolari (Selbmann *et al.*, 2005). È per questi motivi che la nostra attenzione si è focalizzata su di essi.

Le osservazioni condotte al microscopio ottico su microcolture allestite con i funghi neri isolati hanno permesso di individuare una serie di caratteristiche, in alcuni casi comuni a tutti gli organismi isolati, in altri specifiche solo di alcuni isolati. Tra i tratti morfologici più evidenti e comuni a tutti i ceppi vi è sicuramente la capacità di formare cellule melanizzate a parete ispessita (ad esclusione del ceppo CCFEE 5312). La maggior parte dei ceppi isolati presenta miceli costituiti sia da ife di tipo filamentoso che toruloide che, per secessione artrica, liberano conidi (non osservati in tutti i ceppi); la forma di accrescimento in questi ceppi è costituita da un allungamento enteroblastico apicale. In due

ceppi in particolare è stata osservata una organizzazione di tipo lievitifforme (CCFEE 5303) o meristemoide (CCFEE 5326). Una forma di crescita peculiare, mai riscontrata in altri funghi neri, contraddistingue i ceppi CCFEE 5313, CCFEE 5319 e CCFEE 5320, ed è costituita da un allungamento enteroblastico intercalare. Per il ceppo CCFEE 5319 in particolare è stata osservata la produzione di conidi per secessione artrica. Molte delle caratteristiche morfologiche evidenziate nel presente studio, sono state già in passato messe in relazione con la capacità di tollerare differenti tipi di stress (Sterflinger *et al.*, 1999; Sterflinger, 2006). Le pareti fortemente melanizzate, infatti, proteggono il micelio dalla esposizione alle radiazioni solari ed UV, che in Antartide possono raggiungere valori molto elevati a causa dell'assottigliamento dello strato di ozono, che insiste in modo particolare sul continente (Farman *et al.*, 1985; Frederick & Snell., 1988; Madronich *et al.*, 1998) e dell'effetto dell'albedo. La melanina, inoltre, è stato recentemente dimostrato svolgere un ruolo di protezione per gli organismi sottoposti a stress osmotici (Gunde Cimerman *et al.*, 2005). Anche la crescita di tipo meristemoide permette alla colonia di ottimizzare il rapporto superficie/volume e di esporre al minimo la biomassa allo stress esterno, qualunque esso sia (Sterflinger & Krumbein, 1995). Anche i cicli vitali estremamente ridotti e la conidiogenesi limitata alla formazione di semplici propaguli resistenti che si liberano per secessione artrica senza la produzione di conidiofori, ben si sposano con l'esigenza di concludere l'intero ciclo nel breve tempo in cui nel deserto antartico si creano le condizioni ambientali adatte (Selbmann *et al.*, 2005).

In relazione alle preferenze termiche degli organismi isolati (effettuate per funghi neri e batteri), ciò che emerge dai saggi è che la maggior parte dei ceppi mostra la capacità di crescere in ampi range di temperatura. Vi sono organismi psicofili, mesofili e, in alcuni casi mesofili psicotolleranti, così come precedentemente descritto per alcuni organismi fungini antartici (Zucconi *et al.*, 1996). Nella presente ricerca in realtà, vi sono isolati che potrebbero più giustamente venire indicati come organismi euritermi, probabilmente in risposta alle ampie fluttuazione termiche degli ambienti da essi occupati. Infatti, mentre all'interno delle rocce gli organismi si trovano a vivere in una situazione, per così dire, più controllata, l'instabilità delle temperature esterne a cui sono soggetti gli organismi epilittici, favorisce le specie in grado di sopportare cambiamenti di temperatura ampi e repentini. Molti dei licheni antartici inoltre, come già accennato nell'introduzione, presentano colorazioni piuttosto scure che permettono di intercettare in modo più efficiente la radiazione luminosa e che comportano di conseguenza un aumento della temperatura del

tallo. Sulla base quindi dell'ipotesi della "Community Adaptation" (Friedmann & Sun, 2005; Sun & Friedmann, 2005), si potrebbe affermare che "la comunità", costituita in questo caso dai due simbionti (micobionte e fotobionte) e da tutti i microrganismi associati, risulta essere ben adattata sia alle basse temperature che a temperature maggiori anche se i singoli individui, che in questo caso godono della protezione offerta dall'habitat lichene, potrebbero essere normalmente caratterizzati da comportamenti diversi. Questa flessibilità nei confronti delle fluttuazioni termiche conferisce loro la capacità di tollerare gli estremi, ma allo stesso tempo, di essere ben adattati anche ai repentini cambiamenti di temperatura sia giornalieri che mensili, tipici dell'Antartide.

In relazione agli isolati fungini, i ceppi CCFEE 5313, CCFEE 5319 e CCFEE 5320 in particolare, insieme al ceppo CCFEE 5318, seppur in misura minore per le inferiori dimensioni raggiunte, sono gli unici in grado di crescere a temperature di 25°C e comunque in tutto il range testato (0°C - 25°C). Essi possono essere considerati come organismi particolarmente specializzati nel tollerare le fluttuazioni termiche, essendo in grado di mantenere l'attività metabolica sia alle basse che alle elevate temperature. Questi organismi possono quindi essere considerati organismi mesofili, o più correttamente, euritermi, con un optimum di crescita tipico degli organismi psicrofili, in quanto pari a 15°C. Questo comportamento è probabilmente dovuto, come già sopra discusso, alle ampie fluttuazioni termiche cui sono sottoposti, tipiche dei siti esposti in cui vivono; a differenza dei microrganismi endolitici, infatti, essi vivono sulla superficie delle rocce e devono quindi essere necessariamente in grado di tollerare le repentine fluttuazioni termiche del continente Antartide, senza beneficiare delle condizioni sicuramente più tamponate dell'ambiente endolitico.. I ceppi CCFEE 5303, CCFEE 5314, CCFEE 5324 e CCFEE 5317, possono invece essere considerati psicrofili, sulla base delle definizioni date da van Uden (1984) e Vishniac (1987) per i lieviti ed altri organismi eucarioti. Mentre i ceppi CCFEE 5312, CCFEE 5322 e CCFEE 5323, rientrano tra gli organismi mesofili psicrotolleranti perché in grado di crescere fino a 20°C ma anche alla temperatura di 0°C. Se si confrontano i risultati ottenuti nella presente ricerca con i dati relativi ai funghi isolati da comunità criptoendolitiche (Selbmann *et al.*, 2005) inclusi nell'analisi filogenetica eseguita nella presente ricerca, si possono individuare delle differenze. Il ceppo CCFEE 5303 ad esempio, isolato dalla Terra Vittoria del Sud, che clusterizza nell'albero con il ceppo CCFEE 5176, isolato invece dalla Terra Vittoria del Nord (Selbmann *et al.*, 2005), pur rientrando nella categoria degli organismi psicrofili, come il ceppo CCFEE 5176,

mostra la capacità di crescere anche a 0°C, capacità non espressa invece dal ceppo isolato dalla Terra Vittoria del Nord. La stessa differenza esiste tra i ceppi CCFEE 5314 e CCFEE 5324, isolati nella presente ricerca dalla Terra Vittoria del Nord, e il ceppo CCFEE 457 (Selbmann *et al.*, 2005) isolato dalla Terra Vittoria del Sud con cui essi clusterizzano nell'albero filogenetico SSU. Infine, il ceppo CCFEE 5312, ottenuto nel presente lavoro dalla Terra Vittoria del Nord, clusterizza con il ceppo CCFEE 451 (Selbmann *et al.*, 2005) isolato dalla Terra Vittoria del Sud, ma a differenza di quest'ultimo, è in grado di crescere anche alla temperatura di 0°C.

I maggiori range di temperatura a cui gli organismi isolati nella presente ricerca riescono a sopravvivere, sono probabilmente legati proprio ai diversi habitats occupati dai microrganismi stessi, come già sopra discusso.

I ceppi batterici isolati mostrano anch'essi, nella maggior parte dei casi, la capacità di crescere in un ampio range di temperature, anche se non esiste una corrispondenza precisa tra le preferenze termiche dei ceppi fungini e batterici ottenuti dallo stesso tallo lichenico esaminato, ad eccezione dei batteri isolati dal campione *Usnea antarctica* (campione 12 in tabella 4.1); dal confronto delle tabelle sulle preferenze termiche degli isolati, si può osservare infatti, che il ceppo fungino CCFEE 5313 (isolato appunto da *Usnea antarctica*) e i ceppi batterici isolati dallo stesso tallo sono in grado di crescere in un range di temperature da 0°C a 25°C (soltanto due ceppi batterici mostrano un comportamento diverso, non essendo in grado di crescere alle temperature più basse). Per tutti gli altri isolati però non è possibile riscontrare lo stesso comportamento; i ceppi batterici isolati dal campione *Lecanora fuscobrunnea* (campione 5 in tabella 4.1) e *Xanthoria elegans* (campione 14 in tabella 4.1) prediligono temperature superiori rispetto ai ceppi fungini isolati dagli stessi campioni, che mostrano invece un comportamento psicrofilo o mesofilo psicrotollerante, prediligendo temperature inferiori (0°C – 15/20°C). Lo stesso confronto non può essere eseguito per i ceppi batterici isolati da *Umbilicaria decussata* (campione 10 in tabella 4.1) in quanto da tale tallo sono stati isolati solo funghi ialini.

I risultati delle analisi molecolari eseguite sugli organismi fungini (funghi neri), ottenuti sulla base degli allineamenti delle regioni SSU dell'rDNA, confermano che gli organismi ottenuti in coltura non sono peculiari solo dal punto di vista morfologico e fisiologico. Al momento non è stato infatti possibile collocare molti dei microrganismi studiati in ordini precisi in quanto non mostrano alcuna relazione filogenetica diretta con funghi teleomorfi. L'albero contiene gruppi di funghi rappresentativi di differenti ordini (*Dothideales*, *Capnodiales*, *Mycocaliciales* e *Hysteriales*) della stessa sottoclasse (*Dothideomycetidae*), mentre è stato radicato con funghi inclusi nella famiglia *Herpotrichellaceae* (*Chaetothyriomycetidae*, *Chaetothyriales*). L'attribuzione all'ordine *Hysteriales* è stata possibile per i tre ceppi CCFEE 5314, CCFEE 5323 e CCFEE 5324 sulla base delle relazioni filogenetiche evidenziate con *Glyphium elatum* (Grev. Fr) Zogg, un fungo che è stato in genere isolato da legno morto. Il ceppo CCFEE 5321, clusterizzando perfettamente all'interno del gruppo recentemente descritto da Selbmann *et al.* (2005), *Friedmanniomyces* spp, può verosimilmente essere attribuito alla specie *F. endolithicus* Onofri (Onofri *et al.*, 1999). In relazione a questo ceppo è importante evidenziare che il gruppo con cui clusterizza è costituito da ceppi isolati soltanto da comunità criptoendolitiche antartiche in rocce di arenaria di diverse aree della Terra Vittoria del Nord e del Sud, mentre il ceppo CCFEE 5321 è stato isolato da un tallo lichenico (*Lecidea cancriformis*), della Terra Vittoria del Nord, che si sviluppa su granito. I ceppi CCFEE 5317 e CCFEE 5326 clusterizzano assieme pur mantenendo una posizione isolata nell'albero dove non mostrano alcun evidente comune antenore con gli altri funghi analizzati; probabilmente sarà possibile ottenere una analisi filogenetica più risolta ed assegnare anche questi funghi a dei gruppi, man mano che ulteriori isolamenti verranno eseguiti, e nuove sequenze su cui effettuare gli allineamenti saranno disponibili, sia da talli lichenici che da comunità criptoendolitiche o anche da rocce raccolte in altri ambienti.

I dati ottenuti dall'analisi filogenetica condotta sulla base degli allineamenti delle sequenze SSU inoltre, confermano le peculiarità morfologiche dei tre ceppi CCFEE 5313, CCFEE 5319 e CCFEE 5320, caratterizzati da un accrescimento enteroblastico intercalare; essi, infatti, formano un cluster separato e ben supportato. Tale risultato è inoltre confermato dall'analisi filogenetica condotta sulla base degli allineamenti delle regioni ITS; infatti, l'albero filogenetico costruito includendo tutte le specie che mostrano le relazioni filogenetiche più strette con questo cluster nell'albero SSU, evidenzia di nuovo la separazione del cluster dal resto dei funghi esaminati. Sulla base di quanto detto, pertanto, per questi ceppi riteniamo sia corretto in futuro descrivere un nuovo genere. Da notare che

i ceppi che formano gli unici due gruppi che è stato possibile individuare mediante l'analisi filogenetica, sono caratterizzati anche da lunghezze delle sequenze ITS diverse rispetto a quelle degli altri organismi, ma identiche a quelle degli organismi che ricadono nello stesso gruppo. Infatti, i ceppi CCFEE 5313, CCFEE 5319 e CCFEE 5320, mostrano tutte lunghezze dell'ITS1 di 146 basi, diverse da quelle degli altri funghi esaminati, mentre i ceppi CCFEE 5314, CCFEE 5323 e CCFEE 5324 sono gli unici ad avere lunghezze dell'ITS1 di 202 basi (vedi tabella 4.6).

Tutti gli altri organismi fungini sottoposti all'analisi filogenetica non raggruppano tra di loro ma comunque mostrano relazioni filogenetiche più o meno dirette sempre con altri organismi fungini precedentemente isolati da rocce raccolte in Antartide o rocce esposte provenienti da altri ambienti e che presentano, quindi, un certo grado di estremotolleranza.

Ciò che emerge, inoltre, dall'analisi delle porzioni SSU è che nessuno dei taxa inclusi nell'analisi molecolare risulta essere lichenizzato e che soltanto uno, *Hobsonia santassonii* Lowen & Hawksw è lichenicolo. Come accennato nell'introduzione (vedi paragrafo 1.5), Gargas *et al.*, (1995) affermano che il processo di lichenizzazione è stato probabilmente acquistato e perso più volte, mentre Lutzoni *et al.* (2001) hanno dimostrato che la simbiosi lichenica è una condizione ancestrale che è stata più volte persa nel corso dell'evoluzione mediante l'assunzione di un comportamento lichenicolo. E' da notare però, che tutti i funghi isolati in questo lavoro, filogeneticamente correlati a funghi criptoendolitici associati a comunità dominate da licheni, non risultano essere lichenizzati, nonostante negli habitats offerti dal continente Antartide questo stile di vita sarebbe sicuramente vantaggioso. In questo senso è importante notare che molti funghi neri con cui clusterizzano i ceppi ottenuti nel presente lavoro, sono stati sempre isolati da comunità dominate da licheni mentre sembrano essere assenti in altre comunità criptoendolitiche dell'Antartide. E' probabile quindi che tra questi organismi e i licheni esista una forma di associazione, come mostra in parte la relazione esistente tra il ceppo CCFEE 5321 e il fungo lichenicolo *Hobsonia santassonii* Lowen & Hawksw (similarità della regione SSU del DNA ribosomiale pari al 99%).

In effetti ad oggi i funghi neri antartici sono stati sempre trovati in associazione con i licheni (epi- o endolitici). In realtà però visti i risultati che emergono dalla presente ricerca si può ipotizzare che i ceppi ottenuti non siano funghi lichenicoli *sensu stricto*, ossia dei funghi che formano delle associazioni obbligate con i licheni. Infatti, molti degli isolati mostrano relazioni filogenetiche dirette con funghi isolati da rocce di altri ambienti

che non sono però colonizzate da comunità criptoendolitiche o da licheni epilittici; pertanto la colonizzazione delle rocce da parte di tali funghi non sembra essere strettamente dipendente dalla presenza di licheni, poiché essi sono in grado di vivere anche in ambienti dove sono assenti le condizioni offerte dalla presenza di una comunità. Probabilmente, quindi, nel caso dei funghi neri oggetto di questo studio, l'associazione è favorita dalle severe condizioni di oligotrofia dell'Antartide; gli organismi possono trovare asilo nell'associazione con i licheni criptoendolitici o epilittici, dove i prodotti della fotosintesi sono disponibili per il metabolismo degli eterotrofi e la comunità stessa crea una piccola oasi dove più favorevoli condizioni microambientali sono create dall'azione tamponante dei microrganismi stessi (de los Rios *et al.*, 2003); La natura non obbligata dell'associazione dei nostri funghi neri con i licheni potrebbe anche essere confermata dalla relativa facilità con cui è stato possibile ottenere in coltura gli isolati. Ovviamente per supportare l'ipotesi che l'associazione funghi neri-licheni nel deserto dell'Antartide dipenda strettamente dalla scarsa disponibilità di nutrienti organici, sarà necessario in futuro effettuare isolamenti da rocce antartiche non colonizzate al fine di escludere la presenza dei funghi neri su o nelle rocce dove non è presente colonizzazione lichenica.

I dati ottenuti dalle analisi molecolari eseguite sugli organismi batterici mediante lo studio delle regioni SSU dell'rDNA, sono confermati da altri lavori (González *et al.*, 2005; Cardinale *et al.*, 2006; Liba *et al.*, 2006) in cui le tecniche di isolamento hanno portato sempre all'individuazione di batteri Gram positivi e Gram negativi, in alcuni casi addirittura di batteri appartenenti agli stessi generi individuati nella presente ricerca. A differenza quindi di quanto ottenuto per i funghi neri, è possibile assegnare l'appartenenza degli isolati batterici a dei gruppi specifici (*Paenibacillus* e *Bacillus*, *Phylum Firmicutes*; *Pseudomonas*, *Phylum Proteobacteria*; *Deinococcus*, *Phylum Deinococcus-Thermus*; *Actinomycetales*, *Phylum Actinobacteria*), come descritto nei Risultati (paragrafo 4.7).

L'associazione di batteri del genere *Paenibacillus* con i talli lichenici sembra essere comune e quindi non dipendente dall'ospite o dall'habitat occupato. La loro presenza sembra essere supportata dal fatto che essi sono noti per stabilire associazioni con funghi diversi, ad esempio con funghi appartenenti al *Phylum Basidiomycota* e *Glomeromycota* (Budi *et al.*, 1999; Poole *et al.*, 2001; Bertaux *et al.*, 2003). Anche rappresentanti del *Phylum Actinobacteria*, a cui appartengono molti degli isolati ottenuti nella presente ricerca, sono stati più volte individuati in altri lavori come associati ai talli lichenici (Zook, 1983; González *et al.*, 2005).

Nonostante il protocollo utilizzato per l'isolamento dei batteri sia stato eseguito allo scopo di discriminare gli isolati tra batteri superficiali e interni, si ritiene che con queste tecniche ciò non sia effettivamente possibile; in qualche caso infatti i ceppi, esterni e interni, sono risultati essere geneticamente lo stesso microrganismo. Per poter avere dei risultati in questo senso bisognerebbe sottoporre i talli a dei processi di sterilizzazione come quelli che si utilizzano per le piante, ma ciò ucciderebbe tutti gli organismi della simbiosi vista la grande permeabilità dello strato superficiale dei licheni. Tuttavia, bisogna considerare che per un vero endofita l'associazione con l'ospite è obbligata e, pertanto, si tratta in genere di organismi non coltivabili che devono essere rilevati con metodi diversi da quelli colturali. Ad esempio, il batterio endocellulare *Glomeribacter gigasporarum* all'interno del micelio del fungo glomeromicete *Gigaspora margarita* W.N. Becker & I.R. Hall è stato evidenziato grazie ad osservazioni al microscopio elettronico a trasmissione ed amplificazione del DNA metagenomico, utilizzando primers specifici per batteri (Bianciotto *et al.*, 2003). Studi recenti hanno comunque dimostrato che vi sono casi in cui batteri unicellulari risultano essere associati alle strutture interne di licheni, come nel caso di *Baeomyces rufus* (Huds.) Rebert. (Asta *et al.*, 2001), suggerendo un probabile ruolo nella formazione e successiva trasformazione del tallo.

Inoltre, nella presente ricerca si è proceduto alla selezione di fenotipi differenti da sottoporre poi alle successive analisi e ciò può aver comportato la perdita di ceppi geneticamente diversi seppur con stessa morfologia.

Vista la grande biodiversità di ceppi ottenuti anche da un solo campione e l'appartenenza di alcuni degli isolati a cluster formati da specie isolate da ambienti diversi, anche in questo caso si ritiene che l'associazione sia dovuta alle strette condizioni oligotrofiche dell'ambiente occupato; in questo caso però a trarne vantaggio potrebbe essere il lichene. Infatti, alcune specie appartenenti all'ordine *Actinomycetales* sembrano essere in grado di solubilizzare dei composti che potrebbero venire assorbiti dalla componente fungina del tallo (González *et al.*, 2005).

Di notevole rilevanza, se si considera che i campioni utilizzati nel presente lavoro provengono tutti dall'Antartide (Terra Vittoria), il continente che viene definito come l'Estremo tra tutti i continenti, è il fatto che alcuni degli isolati ottenuti mostrano relazioni filogenetiche con specie estremotolleranti, in particolar modo con una specie appartenente al genere *Arthrobacter*, isolata proprio in Antartide (dati non pubblicati). Tra queste relazioni molto importante è anche quella esistente con un ceppo indicato in Banca Dati come "glacial ice bacterium", isolato da ambienti glaciali (Christner, 2002). Infine, molto

importanti sono anche le relazioni che alcuni isolati mostrano con specie strettamente oligotrofiche appartenenti al genere *Knoellia* e con specie endolitiche e/o legate ad ambienti estremi, appartenenti al genere *Bacillus*.

Nella presente ricerca sono stati isolati sia microrganismi fungini (funghi neri, funghi ialini e lieviti) che batterici da talli lichenici ed in entrambi i casi gli isolati ottenuti sono molto diversificati da un punto di vista sistematico. E' probabile che la composizione di comunità microbiche associate ai talli lichenici sia condizionata da fattori diversi: la posizione filogenetica dei licheni stessi, la loro provenienza, il tipo di substrato su cui si sviluppano, le condizioni del microhabitat che occupano e l'eventuale produzione di metaboliti secondari da parte del micobionte (Cardinale *et al.*, 2006).

Infine, sia per quanto riguarda funghi che batteri, gli organismi individuati nella presente ricerca rappresentano la sola porzione coltivabile; ciò non esclude la presenza di altri microrganismi non coltivabili presenti all'interno della simbiosi, soprattutto se si considera la grande biodiversità riscontrata anche all'interno di un solo tallo.

PARTE II

ANALISI MOLECOLARE NELL'AMBITO DEL GRUPPO *LECANORA POLYTROPA*

La classificazione dei generi lichenizzati è stata sempre guidata principalmente da caratteri morfologici e chimici; ciò è dovuto al fatto che, al contrario dei miceli della maggior parte dei funghi non lichenizzati, i talli lichenici forniscono un insieme di caratteristiche morfologiche facilmente osservabili, soprattutto nel caso di specie foliose e fruticose. Per questi motivi la situazione attuale è caratterizzata dall'esistenza di un numero elevato di generi con accrescimento folioso e fruticoso ben delimitato, mentre la situazione è diversa per organismi appartenenti a generi crostosi, come il genere *Lecanora*.

Il genere *Lecanora*, infatti, incluso nell'ordine più grande tra i funghi lichenizzati (*Lecanorales*), è un esempio perfetto di un genere crostoso ampio ed eterogeneo nell'ambito del quale molti gruppi sono stati inizialmente analizzati e delimitati su base morfologica, come ad esempio il gruppo *L. rupicola* (Leuckert e Poelt, 1989) e il gruppo *L. dispersa* (Poelt *et al.*, 1995). Questi studi però non hanno permesso di risolvere la delimitazione dei gruppi, cosa possibile invece mediante approcci molecolari (Grube *et al.*, 2004).

Per il gruppo *L. polyropa* in particolare, al momento non esistono indagini di tipo molecolare e la sua delimitazione è soltanto su base morfologica. Le analisi molecolari delle sequenze ITS e RPB1 del micobionte, svolte nella presente ricerca, evidenziano come i campioni esaminati, precedentemente assegnati su base morfologica a tale specie formino in realtà in alcuni casi gruppi filogeneticamente non direttamente correlati tra di loro, come nel caso di quelli formati dai campioni S5, S3, S69, S71 e S68, S72, S73, S55 che invece mostrano relazioni filogenetiche più strette con le specie *L. intricata* e *L. silvae nigrae* rispettivamente. Pertanto possiamo concludere che l'osservazione morfologica non consente di discriminare a sufficienza i diversi gruppi e che la sistematica di questi organismi deve per forza di cose basarsi anche su dati ottenuti con altri mezzi. È bene ricordare che tutti i campioni del gruppo esaminato, a parte la specie *L. fuscobrunnea*, sono stati raccolti in Austria (vedi paragrafo 3.2) nella stessa area o aree limitrofe, pertanto si assiste alla presenza di genotipi differenti seppur provenienti da aree vicine, sia geograficamente che dal punto di vista climatico. Invece, i campioni provenienti dall'Antartide formano un unico cluster (anche se costituito da pochi esemplari) ben definito e supportato, quindi i risultati dell'analisi filogenetica sono, in questo caso, concordanti con quella morfologica.

Risultati più esplicativi potrebbero emergere estendendo in futuro l'analisi ad altri campioni da esaminare e diversificando la loro provenienza, includendo specie che appartengono almeno morfologicamente allo stesso gruppo, ma provenienti da ambienti diversi, caratterizzati ad esempio da diverse situazioni climatiche. E' necessario, infatti, disporre di un numero di dati maggiore per poter ottenere un albero maggiormente risolto in cui siano chiarite le posizioni che negli alberi attuali rimangono dubbie.

In relazione alla componente algale della simbiosi, ad oggi le conoscenze sulle specie in grado di stabilire simbiosi lichenica sono ancora piuttosto limitate (Blaha *et al.*, 2006), anche se dai dati in letteratura risulta che più del 60% dei fotobionti è costituito da membri della famiglia delle *Trebouxiophyceae* (Ahmadjian, 1982). Negli ultimi anni la classificazione tradizionale all'interno di questa famiglia di alghe verdi è notevolmente migliorata grazie alle tecniche che si avvalgono di osservazioni al microscopio ottico ed elettronico (Gärtner, 1985; Friedl, 1989; Tschermak-Woess, 1989; Ettl & Gärtner, 1995). Più recentemente, approcci molecolari sono stati utilizzati per risolvere le relazioni esistenti tra fotobionti e chiarire i meccanismi di selettività nei confronti dei partners con cui stabilire la simbiosi (Friedl & Rokitta, 1997; Beck, 1999; Helms *et al.*, 2001). Questi

studi hanno messo in evidenza che specie diverse di fotobionti possono esistere anche in talli della stessa specie (Friedl, 1989).

Nella presente ricerca l'analisi delle sequenze algali (ITS) mostra che la maggior parte dei campioni analizzati condivide lo stesso fotobionte, appartenente al genere *Trebouxia*, rappresentato dalla specie *T. jamesii* (vedi tabella 4.11). L'unica eccezione è costituita dai campioni antartici di *L. fuscobrunnea*. Come si può vedere dalla tabella infatti, nei due campioni S31 e S65 in particolare, provenienti dalla Terra Vittoria del Sud, la simbiosi viene stabilita con organismi algali, almeno ad oggi, non confrontabili con specie le cui sequenze sono depositate in Banca Dati. Probabilmente, la scarsità di lavori effettuati su campioni antartici e la conseguente mancanza di sufficienti sequenze algali disponibili per confronto nelle banche dati, non consente di effettuare confronti attendibili per questi fotobionti. Non si esclude che per i campioni antartici il fotobionte sequenziato possa appartenere ad un nuovo taxon, probabilmente ricorrente nei licheni antartici; per verificare tale ipotesi sarà necessario analizzare diversi altri campioni antartici di *L. fuscobrunnea* nonché di altre specie licheniche.

I risultati ottenuti sembrerebbero comunque indicare che le sequenze ITS del fotobionte non possono essere utilizzate come marker per studi filogenetici nell'ambito del gruppo *L. polytropha* allo scopo di delimitare il gruppo stesso.

Tuttavia, per confermare questo dato sarà necessario in futuro utilizzare un numero maggiore di campioni per poter analizzare la composizione in specie dei fotobionti ed evidenziare, quindi, se e in che modo, essa cambi in rapporto a diverse regioni geografiche e climatiche.

In ogni caso, è bene tener presente che le preferenze dei micobionti nei confronti di specifiche specie algali sembrano essere determinate geneticamente come già dimostrato mediante esperimenti di resintesi da Ahmadjian *et al.* (1980), Ahmadjian & Jacobs (1981) e, più recentemente, Schaper (2003).

6 CONCLUSIONI

PARTE I

ANALISI MOLECOLARE DEI MICRORGANISMI ASSOCIATI AI LICHENI ANTARTICI

Nonostante la simbiosi lichenica comprenda generalmente due partners, un fotobionte (alghe verdi o cianobatteri, in alcuni casi entrambi) e un micobionte, ognuno con precisi ruoli, altri organismi (funghi e/o batteri) possono essere presenti come “co-simbionti” opzionali. La simbiosi lichenica rappresenta, infatti, un’associazione in grado di sopravvivere anche in ambienti estremi. Laddove la colonizzazione superficiale del substrato litico è impedita dalle proibitive condizioni ambientali, come in Antartide, i licheni sono ancora in grado di sopravvivere grazie ad un adattamento di tipo morfologico; essi, infatti, rinunciano a formare il tipico tallo epilittico e colonizzano gli spazi interstiziali delle rocce dove formano delle comunità dette criptoendolitiche. Analisi molecolari hanno già dimostrato come le comunità criptoendolitiche antartiche dominate dai licheni ospitano una grande diversità di microrganismi (de la Torre *et al.*, 2003). Ciò costituisce la base per l’esplorazione di questi organismi, e porta a rivedere il concetto di lichene come simbiosi tra due microrganismi, allargandolo a quello di una comunità costituita da una grande biodiversità. A questo scopo le indagini sono state indirizzate verso l’individuazione di microrganismi “associati” ai licheni epilittici antartici mediante tecniche di isolamento in coltura, seguite da indagini molecolari di sequenze del DNA degli isolati ottenuti.

Pur avendo concentrato l’attenzione soltanto su alcuni degli organismi ottenuti in coltura, la tabella 4.1 mostra chiaramente che i talli lichenici investigati ospitano una grande varietà di microrganismi.

Funghi neri associati ai licheni antartici

L’analisi filogenetica effettuata mediante l’allineamento delle porzioni SSU dell’rDNA dei funghi neri ottenuti con le tecniche di isolamento descritte in Materiali e Metodi rivela che tutti i ceppi ottenuti ricadono nella sottoclasse *Dothideomycetidae*. Questo dato, riportato anche in altri lavori per funghi neri isolati da altri ambienti (Ruibal C. *et al.*, 2005) permette di affermare che molto probabilmente l’appartenenza a questa sottoclasse rappresenta una caratteristica elettiva nel promuovere l’evoluzione verso una condizione di

estremotolleranza o estremofilia, caratteristica fondamentale per la sopravvivenza in Antartide e in tutti gli ambienti caratterizzati da condizioni ambientali stressanti.

Nell'ambito degli organismi ottenuti sono stati individuati alcuni nuovi gruppi di funghi filogeneticamente ben supportati e con caratteristiche morfologiche peculiari che verranno descritti come nuovi generi e specie; tra questi, particolarmente significativi sono il gruppo costituito dai tre ceppi CCFEE 5313, CCFEE 5319 e CCFEE 5320, che rappresenta un sister group del gruppo *Friedmanniomyces* recentemente descritto come nuovo per l'Antartide e ottenuto da rocce colonizzate da comunità criptoendolitiche, e il gruppo formato dai ceppi CCFEE 5314, CCFEE 5323 e CCFEE 5324 nell'ordine *Hysteriales*.

Esclusi i ceppi CCFEE 5317 e CCFEE 5326, la cui posizione al momento rimane non risolta, gli altri ceppi studiati, che non raggruppano tra di loro, mostrano comunque relazioni filogenetiche con funghi già descritti per comunità criptoendolitiche dominate da licheni in Antartide o comunque con altri funghi isolati da rocce non colonizzate da licheni, raccolte in altri ambienti. Per questi motivi si ritiene che in Antartide l'associazione di questi funghi con i licheni non sia un'associazione obbligata, ma sia probabilmente dovuta alle strette condizioni di oligotrofia dell'ambiente stesso. Probabilmente in questo modo gli organismi possono trovare asilo proprio nell'associazione con i licheni criptoendolitici o epilittici, dove i prodotti della fotosintesi sono disponibili per il metabolismo degli eterotrofi e la comunità stessa crea una piccola oasi dove le condizioni microambientali sono più favorevoli.

Batteri associati ai licheni antartici

L'analisi molecolare effettuata sulla base delle porzioni SSU dell'rDNA dei batteri ottenuti in coltura evidenzia la presenza tanto di ceppi gram + che gram -. Nell'albero filogenetico ottenuto sulla base dell'allineamento delle sequenze con quelle utilizzate per i confronti dalle Banche Dati, i ceppi studiati formano nella maggior parte dei casi raggruppamenti ben supportati e possono essere assegnati a diversi generi già individuati in lavori simili (González *et al.*, 2005; Cardinale *et al.*, 2006; Liba *et al.*, 2006). Una eccezione degna di nota è rappresentata per l'isolato Est 3 ottenuto da *Umbilicaria decussata*; si tratta infatti di un ceppo, che non risulta essere mai stato riportato precedentemente come associato a licheni, appartenente al genere *Deinococcus*. In questo genere ricadono specie conosciute come le più resistenti a fattori di stress, ed in particolare alla radiazione UV e a radiazioni ionizzanti (Mattimore & Battista, 1996; Karlin & Mrázek, 2001; Makarova *et al.*, 2001;

Billi & Potts, 2002). Sulla base della posizione nell'albero filogenetico e della lunghezza del ramo inoltre, esso potrebbe costituire ad oggi una nuova specie.

Lo studio ha inoltre evidenziato una biodiversità piuttosto elevata di microrganismi batterici associati anche ad un singolo tallo, anche se, la tecnica di isolamento impiegata nella presente ricerca, non permette in realtà di discriminare tra la componente costituita da specie localizzate all'interno del tallo e la componente costituita invece da specie localizzate sulla superficie del tallo. Organismi associati ai licheni, infatti, possono essere presenti sia sulla superficie dei talli che in spazi intercellulari. Batteri endosimbionti, ad esempio, sono stati riportati per funghi non lichenizzati appartenenti a *Phyla* diversi: *Ascomycota* (Barbieri *et al.*, 2000), *Basidiomycota* (Bertaux *et al.*, 2003, 2005), *Glomeromycota* (Bianciotto *et al.*, 2000) e *Zygomycota* (Partida-Martinez & Hertweek, 2005).

Se si considera che i licheni vivono generalmente, almeno in Antartide, in condizioni ambientali piuttosto severe, caratterizzate da una ristretta disponibilità di nutrienti, ospitare batteri in grado di produrre amminoacidi o di solubilizzare determinati composti, come dimostrato da Liba *et al.* (2006), costituisce sicuramente un vantaggio. Gli amminoacidi ad esempio, possono venire assorbiti dal micobionte o dal fotobionte, permettendo ai talli stessi di risparmiare le energie necessarie per la loro sintesi (Liba *et al.*, 2006).

L'ampia biodiversità di microrganismi evidenziata nel presente lavoro ci porta a suggerire di riconsiderare la definizione stessa di lichene, da sempre interpretato come una simbiosi tra due microrganismi, un fungo (micobionte) ed un'alga (fotobionte), soprattutto alla luce del fatto che l'approccio utilizzato nella presente ricerca ha permesso di mettere in evidenza la sola porzione coltivabile dei microrganismi associati che, di certo, non può essere considerata come rappresentativa di tutti i microrganismi potenzialmente in grado di stabilire un'associazione con i talli lichenici. Ciò significa, quindi, che la conoscenza sulla biodiversità tassonomica di organismi associati ai licheni antartici è ancora piuttosto limitata.

L'analisi delle interazioni multiple stabilite tra i microrganismi associati alla simbiosi lichenica offre nuove chiavi di lettura per una maggiore comprensione di sistemi complessi come le simbiosi. Per stabilire il ruolo che i licheni potrebbero svolgere come *nicchia* per altri organismi e arrivare a conclusioni circa la specificità tra specie ospite e

isolati sarebbe opportuno confrontare le comunità isolate dai talli lichenici con quelle isolate dal substrato su cui i talli si accrescono, sia per i microrganismi fungini che batterici.

Questo lavoro, infine, mette in evidenza la facilità con cui da alcune nicchie di ambienti come quello antartico, ancora poco investigati, è possibile scoprire la presenza di nuove entità tassonomiche; infatti, le forti pressioni ambientali e l'isolamento geografico e genetico a cui gli organismi sono sottoposti per tempi significativamente lunghi guidano la radiazione adattativa ed i processi di speciazione (Vincent, 2000).

PARTE II

ANALISI MOLECOLARE NELL'AMBITO DEL GRUPPO *LECANORA POLYTROPA*

I risultati ottenuti mediante l'analisi filogenetica delle regioni ITS e RPB1 del micobionte sembrano dimostrare, almeno con i dati finora disponibili, che il gruppo *L. polytropa*, costituito da specie psicrofile e che comprende la specie endemica antartica *L. fuscobrunnea*, non è un gruppo monofiletico. Esso sembra in realtà essere costituito da gruppi polifiletici che comprendono specie diverse. Risulta essere confermata invece, la separazione da *L. polytropa* delle due specie *L. intricata* e *L. silvae-nigrae* da sempre comunque assegnate al gruppo, pur mostrando alcune differenze morfologiche rispetto ai talli indicati come *L. polytropa* (vedi figure 3.2a e 3.2b).

L'analisi filogenetica inoltre, evidenzia la separazione nell'albero del cluster formato dai campioni antartici di *L. fuscobrunnea*, che, a differenza di alcuni dei campioni non antartici (*L. polytropa* var. *alpigena* e *L. silvae-nigrae*), si presenta con caratteristiche morfologiche decisamente diverse (vedi figure 3.2a e 3.2b).

Dai dati ottenuti, pertanto, sembra che all'interno di quello che fino a questo momento veniva definito gruppo *L. polytropa*, siano in realtà individuabili diversi gruppi filogenetici dove anche individui morfologicamente identici risultano separati. Il fatto che alcuni gruppi filogenetici non siano perfettamente riproducibili sulla base delle analisi filogenetiche ottenute da porzioni genetiche differenti, suggerisce che i campioni esaminati nella presente ricerca possono non essere geneticamente uniformi. Uno dei fattori potenzialmente responsabile dei livelli di variazione genetica osservati è rappresentato dalla natura del sistema di riproduzione sessuale adottato. E' probabile, infatti, che il tipo di riproduzione che caratterizza questo gruppo sia di tipo eterotallico (outcrossing obbligato); ciò comporterebbe come conseguenza un elevato grado di variazione genetica. Questo tipo di riproduzione ad esempio è già stato osservato in licheni antartici, adattati quindi ad ambienti estremi, del genere *Caloplaca*, appartenente anch'esso all'ordine *Lecanorales* (Seymour *et al.*, 2005).

L'eventuale conferma di questo risultato mediante analisi future eseguite su specie assegnate a questo gruppo soltanto sulla base delle caratteristiche morfologiche comporterebbe delle implicazioni sulla tassonomia del gruppo. Pertanto, i dati ottenuti dall'analisi filogenetica effettuata nella presente ricerca costituiscono una base di partenza per future ricerche che, a nostro avviso, dovrebbero portare ad una revisione del gruppo *L. polytropa*. A tal fine sarebbe opportuno eseguire un'analisi anche delle regioni SSU

dell'rDNA (regioni conservate); l'analisi delle sole regioni ITS, infatti, (anche se confermata in questo caso dalle sequenze della regione variabile RPB1), può comportare una sovrastima della variazione genetica presente all'interno del gruppo (Dyer & Murtagh, 2001). Inoltre, soltanto un'analisi che comprenda un numero maggiore di campioni, accompagnata da analisi molecolari che si avvalgono di altri markers discriminatori, potrà fornire maggiori indicazioni sulla vera estensione del gruppo *L. polytropa*.

In ogni caso, non bisogna mai dimenticare che uno studio basato solo su dati molecolari fornirebbe una visione parziale di quelle che sono le caratteristiche degli organismi oggetto di studio. Non bisogna, infatti, mai trascurare di analizzare anche le caratteristiche morfologiche, fisiologiche ed ecologiche al fine di comprendere a fondo la storia evolutiva, l'adattamento, le relazioni con l'ambiente e con gli altri organismi.. E' quindi importante che gli studi filogenetici siano comunque accompagnati da ulteriori indagini che abbiano come oggetto caratteri non molecolari.

BIBLIOGRAFIA

- ADAMS B.J., BARDGETT R.D., AYRES E., WALL D.H., AISLABIE J., BAMFORTH S., BARGAGLI R., CARY G., CAVACINI P., CONNELL L., COVEY P., FELL J.W., FRATI F., HOGG I.D., NEWSHAM K.K., O'DONNELL A., RUSSEL N., SEPPELT R.D., STEVENS M.I. (2006) Diversity and distribution of Victoria Land biota. *Soil Biology & Biochemistry* 38: 3003-3018.
- AHMADJIAN V. (1970) Adaptations of Antarctic terrestrial plants. In: Holdgate H.V. (ed.), *Antarctic Ecology*, Academic Press, London, pp: 801-811.
- AHMADJIAN V. (1982) Algal/fungal symbiosis. *Progress in Phycology Research* 1: 179-233.
- AHMADJIAN V. (1993) The lichen photobiont – what can it tell us about lichen systematics? *The Bryologist* 96: 310-313.
- AHMADJIAN V. (1995) Lichens – Specialized Groups of Parasitic Fungi. In: Kohmoto K., Singh U.S., Singh R.P. (eds.), *Pathogenesis and host selectivity in plant diseases*. Vol. II *Eukaryotes*.
- AHMADJIAN V., HENRIKSSON E. (1959) Parasitic relationship between two culturally isolated and unrelated lichen components. *Science* 130: 1251.
- AHMADJIAN V, JACOBS J.B. (1981) Relationship between fungus and alga in the lichen *Cladonia cristatella* Tuck. *Nature* 289: 169-172.
- AHMADJIAN V., PARACER S. (1986) *Symbiosis: An Introduction to Biological Associations*. London, University Press of New England, 212 pp.
- AHMADJIAN V., RUSSEL L.A., HILDRETH K.C. (1980) Artificial reestablishment of lichens. I. Morphological interactions between the phycobionts of different lichens and the mycobionts of *Cladonia cristatella* and *Lecanora chrysoleuca*. *Mycologia* 72: 73-89.
- ALMBORN O. (1974) Review of “Dodge C.W.: Lichen Flora of the Antarctic Continent”. *Botaniska Notiser* 127: 454-455.
- ALTSCHUL S.F., GISH W., MILLER W., MYERS E.W., LIPMAN D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410.
- ALTSCHUL S.F., MADDEN T.L., SCHÄFFER A.A., ZHANG J., ZHANG Z., MILLER W., LIPMAN D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402.
- ALSTRUP V. (2002) Revisions of some lichens and lichenicolous fungi from Antarctica. *Folia Cryptogamica Estonia* 39: 1-2.

- APTROOT A., VAN DER KNAAP W.O. (1993) The lichen flora of Deception Island, South Shetland Islands. *Nova Hedwigia* 56: 183-192.
- ARMALEO D., CLERC P. (1995) A rapid and inexpensive method for the purification of DNA from lichens and their symbionts. *The Lichenologist* 27: 207-213.
- ARVIDSSON L. (1979) Svampangrepp pa lavar-en orsak till lavoken. Fungus attacks on lichens and lichen deserts in cities. *Svensk Botanisk Tidskrift* 72: 285-292.
- ASTA J., ORRY F., TOUTAIN F., SOUCHIER B., VILLEMEN G. (2001) Micromorphological and ultrastructural investigations of the lichen-soil interface. *Soil Biology and Biochemistry* 33: 323-337.
- BARBIERI E., POTENZA L., ROSSI I., SISTI D., GIOMARO G., ROSSETTI S., BEIMFOHR C., STOCCHI V. (2000) Phylogenetic characterisation and in situ detection of a *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* phylogroup bacterium in *Tuber borchii* Vittad. ectomycorrhizal mycelium. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 5035-5042.
- BARINAGA M. (1995) Origins of Lichen Fungi Explored. *Science* 268: 1437.
- BARRETT J.E., VIRGINIA R.A., HOPKINS D.W., AISLABIE J., BARGAGLI R., BOCKHEIM J.G., CAMPBELL I.B., LYONS W.B., MOORHEAD D., NKEM J., SLETTEN R.S., STELTZER H., WALL D.H., WALLENSTEIN M. (2006) Terrestrial ecosystem processes of Victoria Land, Antarctica. *Soil Biology and Biochemistry* 38: 3019-3034
- BARTOLI A. (1996) I licheni. In: Rambelli A. & Pasqualetti M. (eds.), *Nuovi fondamenti di micologia*, Jaca Book, Milano, pp: 409-459.
- BECK A (1999) Photobiont inventory of a lichen community growing on heavy-metal-rich rock. *The Lichenologist* 31: 501-510.
- BECK A. (2002) Selektivität der Symbionten schwermetalltoleranter Flechten. Dissertation, Ludwig – Maximilians. Universität München.
- BERTEAUX J., SCHMID M., CHEMIDLIN PREVOST-BOURE N., CHURIN J.L., HARTMANN A., GARBAYE J., FREY-KLETT P. (2003) *In situ* identification of intracellular bacteria related to *Paenibacillus* spp. in the mycelium of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* S238N. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 4243-4248.
- BERTEAUX J., SCHMID M., HUTZLER P., HARTMANN A., GARBAYE J., FREY-KLETT P. (2005) Occurrence and distribution of endobacteria in the plant-associated mycelium of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* S238N. *Environmental Microbiology* 7: 1786-1795.
- BIANCIOOTTO V., LUMINI E., LANFRANCO L., MINERDI D., BONFANTE P., PEROTTO S. (2000) Detection and identification of bacterial endosymbionts in arbuscular mycorrhizal fungi belonging to Gigasporaceae. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 4503-4509.

- BIANCOTTO V., LUMINI E., BONFANTE P., VANDAMME P. (2003) 'Candidatus Glomeribacter gigasporarum' gen. nov., sp. nov., an endosymbiont of arbuscular mycorrhizal fungi. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53: 121-124.
- BILLI D., POTTS M. (2002) Life and death of dried prokaryotes. *Research in Microbiology* 153: 7-12.
- BJELLAND T., EKMAN S. (2005) Fungal diversity in rock beneath a crustose lichen as revealed by molecular markers. *Microbial Ecology* 49: 598-603.
- BLAHA J., BALOCH E., GRUBE M. (2006) High photobiont diversity associated with the euryoecious lichen-forming ascomycete *Lecanora rupicola* (Lecanoraceae, Ascomycota) *Biological Journal of the Linnean Society* 88: 283-293.
- BLANCO Y., BLANCH M., FONTANIELLA B., LEGAZ M.E., MILLANES A.M., PEREIRA E.C., VICENTE C. (2002) Bioproduction of lichen phenolics by immobilized lichen cells with emphasis on the role of epiphytic bacteria. *Journal of the Hattori Botanical Laboratory* 92: 245-260.
- BLUM O.B. (1974) Water relations. In: Ahmadjian V., Hale E.M. (eds.), *The lichens*, Academic Press, New York, pp: 381-400.
- BONFANTE P. (2003) Plants, Mycorrhizal Fungi and Endobacteria: a Dialog Among Cells and Genomes. *Biological Bulletin* 204: 215-220.
- BONFANTE P., BIANCIOTTO V., RUIZ-LOZANO J.M., MINERDI D., LUMINI E., PEROTTO S. (2001) Arbuscular mycorrhizal fungi and their endobacteria. In: Seckbach J. (ed.), *Symbiosis*, Kluwer, Dordrecht, pp: 323-337.
- BOUCHER D.H. (1985) *The Biology of Mutualism: Ecology and Evolution*. Oxford University Press, New York.
- BOUCHER D.H., JAMES S., KEELER K.H. (1982) The ecology of mutualism. *Annual Review of Ecology and Systematics* 13: 315-347.
- BOWMAN B.H., TAYLOR J.W., BROWILEE A.G., LEE J., LU S., WHITE T.J. (1992) Molecular evolution of the fungi: relationship of basidiomycetes, ascomycetes and chytridiomycetes. *Molecular Biology and Evolution* 9: 285-296.
- BROADY P.A. (1987a) The morphology, distribution and ecology of *Pseudococcomyxa simplex* (Mainx) Fott (Chlorophyta, *Chlorellaceae*), a widespread terrestrial antarctic alga. *Polar Biology* 7: 25-30.
- BROADY P.A. (1987b) A floristic survey of algae at four locations in northern Victoria Land. *New Zealand Antarctic Record* 7(3): 8-19.
- BROADY P.A. (1989a) Survey of algae and other terrestrial biota at Edward VII Peninsula, Marie Byrd Land. *Antarctic Science* 1: 215-224.

- BROADY P.A. (1989b) Broadscale patterns in the distribution of aquatic and terrestrial vegetation at three ice-free regions on Ross Island, Antarctica. *Hydrobiologia* 172: 77-95.
- BROADY P.A. (1993) Soils heated by volcanism. In: Friedmann E.I. (ed.), *Antarctic Microbiology*. Wiley-Liss, New York, pp: 413-432.
- BROADY P.A. (1996) Diversity, distribution and dispersal of Antarctic terrestrial algae. *Biodiversity and Conservation* 5: 1307-1335.
- BROADY P.A. (1998) Algae, lichens and fungi in La Gorce Mountains, Antarctica. *Antarctic Science* 10: 376-385.
- BRONSTEIN J.L. (1994) Our current understanding of mutualism. *Quarterly Review of Biology* 69: 31-51.
- BRUNS T.D., FOGEL R., TAYLOR J.W. (1990) Amplification and sequencing of DNA from fungal herbarium specimens. *Mycologia* 82: 175-184.
- BRUNS T.D., WHITE T.J., TAYLOR J.W. (1991) Fungal molecular systematics. *Annual Reviews of Ecology and Systematics* 22: 525-564.
- BUDI S.W., VAN TUINEN D., MARTINOTTI G., GIANINAZZI S. (1999) Isolation from the *Sorghum bicolor* mycorrhizosphere of a bacterium compatible with arbuscular mycorrhiza development and antagonistic towards soilborne fungal pathogens. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 5148-5150.
- BUTTERFIELD N.J. (2005) Probable proterozoic fungi. *Paleobiology* 31: 165-182.
- CARDINALE M., PUGLIA A.M., GRUBE M. (2006) Molecular analysis of lichen-associated bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology* 57: 484-495.
- CASTELLO M. (1995) The lichen genus *Xanthoria* in Antarctica. *Cryptogamie, Bryologie Lichenologie* 16:79-87.
- CASTELLO M. (2003) Lichens of the Terra Nova Bay area, Northern Victoria Land (Continental Antarctica). *Studia Geobotanica* 22: 3-54.
- CASTELLO M., NIMIS P.L. (1994a) Critical notes on Antarctic yellow *Acarosporaceae*. *The Lichenologist* 26: 283-294.
- CASTELLO M., NIMIS P.L. (1994b) Critical notes on the genus *Candelariella* (Lichens) in Antarctica. *Acta Botanica Fennica* 150: 5-10.
- CASTELLO M., NIMIS P.L. (1994c) A revision of yellow *Acarosporaceae* (Lichens) from Antarctica. In: Battaglia B., Bisol P.M., Varotto V. (eds.), *Proceedings 2nd Meeting on Antarctic Biology*, Padova, pp: 1-18.
- CASTELLO M., NIMIS P.L. (1995a) A critical revision of Antarctic lichen species described by CW Dodge. *Bibliotheca Lichenologica* 57: 71-92.

- CASTELLO M. & NIMIS P.L. (1995b) The lichen vegetation of Terra Nova Bay (Victoria Land, Continental Antarctica). *Bibliotheca Lichenologica* 58: 43-55.
- CASTELLO M., NIMIS P.L. (1997) Diversity of Lichens in Antarctica. In: Battaglia B., Valencia J., Walton W.H. (eds.), *Antarctic communities*. Cambridge University Press, Cambridge, pp: 15-21.
- CASTELLO M., NIMIS P.L. (2000) A key to the lichens of Terra Nova Bay (Victoria Land, Continental Antarctica). *Italian Journal of Zoology Supplement* 1: 175-184.
- CLARIDGE G.G.C., CAMPBELL I.B. (1985) In: Bonner W.N., Walton D.W.H. (eds.), *Key Environments*. Antarctica Pergamon Press, Oxford, pp: 62-70.
- CHRISTNER B.C. (2002) Recovery of bacteria from glacial and subglacial environments (Unpublished Thesis). Ohio State University, 484 W. 12th Avenue, Columbus, OH, USA.
- COCCHIETTO M., SKERT N. & NIMIS P.L. (2002) A review on usnic acid, and interesting natural compound. *Naturwissenschaften* 89: 137-146.
- CUBERO O.F., CRESPO A., FATEHI J., BRIDGE P.D. (1999) DNA extraction and PCR amplification method suitable for fresh, herbarium stored and lichenized fungi. *Plant Systematics and Evolution* 216: 243-249.
- DE LA TORRE J.R., GOEBEL B.M., FRIEDMANN E.I., PACE N.R. (2003) Microbial diversity of cryptoendolithic communities from the McMurdo Dry Valleys, Antarctica. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 3858-3867.
- DE LOS RÍOS A., GRUBE M (2000) Host-parasite interfaces of some lichenicolous fungi in the *Dacampiaceae* (*Dothideales*, *Ascomycota*). *Mycological Research* 104: 1348-1353.
- DE LOS RÍOS A., WIERZCHOS J., ASCASO C. (2002a) Microhabitats and chemical microenvironments under saxicolous lichens growing on granite. *Microbial Ecology* 43: 181-188.
- DE LOS RÍOS A., WIERZCHOS J., SANCHO L.G., GRUBE M., ASCASO C. (2002b) 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 Settembre 2002 (ESA SP-518, Novembre 2002).
- DE LOS RÍOS A., WIERZCHOS J., SANCHO L.G., ASCASO C. (2003) Acid microenvironments in microbial biofilms of Antarctic endolithic microecosystems. *Environmental Microbiology* 5: 231-237.
- DE LOS RÍOS A., WIERZCHOS J., SANCHO L.G., ASCASO C. (2004) Exploring the physiological state of continental Antarctic endolithic microorganisms by microscopy. *FEMS Microbiology Ecology* 50: 143-152.

- DE LOS RÍOS A., WIERZCHOS J., SANCHO L.G., GREEN A., ASCASO C. (2005) Ecology of endolithic lichens colonizing granite in continental Antarctica. *The Lichenologist* 37: 383-395.
- DENTON A.L., MCCONAUGHY B.L., HALL B.D. (1998) Usefulness of RNA polymerase II coding sequences for estimation of green plant phylogeny. *Molecular Biology and Evolution* 15: 1082-1085.
- DEPRIEST P.T. (2004) Early molecular investigations of lichen-forming symbionts. *Annual Review of Microbiology* 58: 273-301.
- DOYLE J.J. (1992) Gene trees and species trees: molecular systematics as one-character taxonomy. *Systematic Botany*, 17: 144-163.
- DYER P.S., MURTAGH G.J. (2001) Variation in the ribosomal ITS-sequence of the lichen *Buellia frigida* and *Xanthoria elegans* from the Vestfold Hills, eastern Antarctica. *The Lichenologist* 33: 151-159.
- DYER P.S., INGRAM D.S., JOHNSTONE K. (1992) The control of sexual morphogenesis in the Ascomycotina. *Biological Reviews* 67: 421-458.
- DODGE C.W. (1964) Ecology and geographical distribution of Antarctic lichens. In: Carrick R., Holdgate M., Prevost J. (eds.) *Biologie Antarctique*. Hermann, Paris, pp: 165-171.
- DODGE C.W. (1973) *Lichen Flora of the Antarctic Continent and adjacent islands*. Phoenix Publishing, Canaan, New Hampshire, 399 pp.
- DODGE C.W., BAKER G.E. (1938) The Second Byrd Antarctic Expedition - Botany. II. Lichens and lichen parasites. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 25(2): 515-718.
- EKMAN S. (1999) PCR optimization and troubleshooting, with special reference to the amplification of ribosomal DNA in lichenized fungi. *The Lichenologist* 31: 517-531.
- ELWOOD H.J., OLSEN G.J., SOGIN M.L. (1985) The small subunit ribosomal RNA gene sequences from the hypotrichous ciliates *Oxytricha nova* and *Stylonchia pustulata*. *Molecular Biology and Evolution* 2: 399-410.
- ENGELSKJØN T., JØRGENSEN P.M. (1986) Phytogeographical relations of the cryptogamic flora of Bouvetøya. *Norsk Polarinstitutt Skrifter* 185: 71-79.
- ETAYO J., SANCHO L.G. (2006) Two lichenicolous ascomycetes on austral species of *Usnea* (Lecanorales, Ascomycota). *Nova Hedwigia* 83: 483-488.
- ETTL H., GÄRTNER G. (1995) *Syllabus der Boden-, Luft- und Flechtenalgen*. Stuttgart: Gustav Fischer.

- FAJARDO-CAVAZOS P., NICHOLSON W. (2006) *Bacillus* Endospores Isolated from Granite: Close Molecular Relationships to Globally Distributed *Bacillus* spp. From Endolithic and Extreme Environments. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 2856–2863
- FARMAN J.C., GARDINER B.G., SHANKLIN J.D. (1985) Large losses of total ozone in Antarctica reveal season ClO_x/NO_x interaction. *Nature* 315: 207-210.
- FARRAR J.F. (1976) The lichens as an ecosystem: observation and experiment. In: Brown D.H., Hawksworth D.L., Bailey R.H. (eds.), *Lichenology: Progress and Problems*. Academic Press, London, pp: 385-406.
- FERRAR H.T. (1905) Summary of the geological observations made during the course of the S.S. Discovery, 1901-1904. In: Scott R.F. (ed.), *The voyage of the Discovery*, vol. 2. Smith, Elder and Co., London, pp: 437-468.
- FRANK R. JR. (1957) *Storia dell'Antartide*. Sansoni, Firenze, 268 pp.
- FREDERICK J.E., SNELL H.E. (1988) Ultraviolet radiation levels during the Antarctic spring. *Science* 241: 438-440.
- FRIEDL T. (1987) Thallus development and phycobionts of the parasitic lichen *Diploschistes muscorum*. *The Lichenologist* 19: 183-191.
- FRIEDL T. (1989) Systematik und Biologie von *Trebouxia* (*Microthamniales*, *Chlorophyta*) als Phycobiont der Parmeliaceae (lichenisierte Ascomyceten). Inaugural-Dissertation Fakultät Biologie, Universität Bayreuth, Bayreuth.
- FRIEDL T., ROKITTA C. (1997) Species relationship in the lichen alga *Trebouxia* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae): molecular phylogenetic analyses of nuclear-encoded large subunit rRNA gene sequences. *Symbiosis* 23: 125-148.
- FRIEDMANN E.I. (1978) Melting snow in the Dry Valleys is a source of water for endolithic microorganisms. *Antarctic Journal of the United States* 13: 162-163.
- FRIEDMANN E.I. (1982) Endolithic Microorganisms in the Antarctic Cold Desert. *Science* 215: 1045-1053.
- FRIEDMANN E.I. (1993) *Antarctic microbiology*. Wiley-Liss, New York, 634 pp.
- FRIEDMANN E.I., OCAMPO R. (1976) Endolithic blue-green algae in the Dry Valleys: primary producers in the Antarctic desert ecosystem. *Science* 193: 1247-1249.
- FRIEDMANN E.I., KIBLER A.P. (1980) Nitrogen economy of endolithic microbial communities in hot and cold deserts. *Microbial Ecology* 6: 95-108.
- FRIEDMANN E.I., OCAMPO-FRIEDMANN R. (1984) Endolithic microorganisms in extreme dry environments: analysis of a lithobiontic microbial habitat. In: Klug M.J., Reddy C.A. (eds.), *Current Perspectives in Microbial Ecology*. American Society for Microbiology, Washington D.C. pp: 177-185

- FRIEDMANN E.I., WEED R. (1987) Microbial Trace-Fossil Formation, Biogenous, and Abiotic Weathering in the Antarctic Cold Desert. *Science* 236: 645-752.
- FRIEDMANN E.I., KORIEM A.M. (1989) Life on Mars: how it disappeared (if it was there). *Advances in Space Research* 9: 167-172.
- FRIEDMANN E.I., SUN H.J. (2005) Communities adjust their temperature optima by shifting producer-to-consumer ratio, shown in lichens as models: I. Hypothesis. *Microbial Ecology* 49: 523-527.
- FRIEDMANN E.I., MCKAY C., NIENOW J.A. (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 E.I., HUA M., OCAMPO-FRIEDMANN R. (1988) Cryptoendolithic lichen and cyanobacterial communities of the Ross Desert, Antarctica. *Polarforschung* 58: 251-259.
- GALLOWAY D.J. (1991) Phytogeography of Southern Hemisphere Lichens. In: Nimis P.L., Crovello T.J. (eds.), *Quantitative approaches to phytogeography*. Kluwer, Dordrecht, pp: 233-262.
- GAMS W., DIEDERICH P., PÖLDMAA K. (2004) Fungicolous fungi. In: Mueller G.M., Bills G.F., Foster M.S. (eds.), *Biodiversity of fungi. Inventory and Monitoring Methods*. Elsevier Academic Press, pp. 343-392.
- GARDES M., BRUNS T.D. (1993) ITS primers and enhanced specificity for basidiomycetes application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2: 113-118.
- GARGAS A., TAYLOR J.W. (1992) Polymerase chain reaction (PCR) primer for amplifying and sequencing nuclear 18S rDNA from lichenized fungi. *Mycologia* 84: 589-592.
- GARGAS A., DEPRIEST P.T., GRUBE M., TEHLER A. (1995) Multiple Origins of Lichen Symbioses in Fungi Suggested by SSU rDNA Phylogeny. *Science* 268: 1492-1495.
- GÄRTNER G. (1985) Die Gattung *Trebouxia* Puymaly (Chlorellales, Chlorophyceae). *Archiv Fuer Hydrobiologie. Supplementband. Algological Studies* 41: 495-548.
- GENKEL' P.A., PLOTNIKOVA T.T. (1973) Nitrogen-fixing bacteria in lichens. *Izvestiya Akademii Nauk SSSR Seriya Biologicheskaya* 6: 807-813.
- GILBERT G.S. (2002) Evolutionary ecology of plant diseases in natural ecosystems. *Annual Review of Phytopathology* 40: 13-43.
- GLENN M.G., GOMEZ-BOLEA A., ORSI E.V. (1997) Effects of thallus damage on interaction of lichens with non-lichenized fungi under natural and laboratory conditions. *The Lichenologist* 29(1): 51-65.

- GOLUBIC S., FRIEDMANN E.I., SCHNEIDER J. (1981) The lithobiontic ecological niche, with special reference to microorganisms. *Journal of Sedimentary Petrology* 51: 475-478.
- GONZÁLEZ I., AYUSO-SACIDO A., ANDERSON A., GENILLOUD O. (2005) Actinomycetes isolated from lichens: Evaluation of the diversity and detection of biosynthetic gene sequences. *FEMS Microbiology Ecology* 54: 401-415.
- GREEN T.G.A., SEPPELT R.D., SCHWARZ A.-M.J. (1992) Epilithic lichens on the floor of the Taylor Valley, Ross Dependency, Antarctica. *The Lichenologist* 24: 57-61.
- GREEN T.G.A., SCHROETER B., SANCHO L.D. (1999) Plant life in Antarctica. In: Pugnaire F.I., Valladares F. (eds.), *Handbook of Functional Plant Ecology*, Marcel Dekker Inc. Basel, New-York, pp: 495-543.
- GREUTER W., MCNEILL J., BARRIE F.R., BURDET H.M., DEMOULIN V., FILGUEIRAS T.S., NICOLSON D.H., SILVA P.C., SKOG J.E., TREHANE P., TURLAND N.J., HAWKSWORTH D.L. (2000) *International Code of Botanical Nomenclature (Saint Louis Code)*. Koeltz Scientific Books, Königstein, Germany.
- 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., DEPRIEST P.T., GARGAS A., HAFELLNER J. (1995) DNA isolation from lichen ascomata. *Mycological Research* 90: 1321-1324.
- GRUBE M., BALOCH E., ARUP U. (2004) A phylogenetic study of the *Lecanora rupicola* group (*Lecanoraceae*, *Ascomycota*). *Mycological Research* 108: 506-514.
- GUEGAN J.F., MORAND S., POULIN R. (2005) Are there general laws in parasite community ecology? The emergence of spatial parasitology and epidemiology. In: Thomas F., Renaud F., Guegan J.F. (eds.). *Parasitisms and ecosystems*. Oxford, University Press, UK.
- GUNDE-CIMERMAN N, OREN A., PLEMENITAŠ A. (2005) Adaptation to life at high salt concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya. Springer, The Netherlands. 577 pp.
- HAINES J.H., COOPER C.R. (1993) DNA and mycological herbaria. In: Reynolds D.R., Taylor J.W. (eds.), *Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics*. Wallingford: CBA International, pp: 305-315.
- HALE M.E. (1987) Epilithic lichens in the Beacon sandstone formation, Victoria Land, Antarctica. *The Lichenologist* 19: 269-287.
- HALUWYN C. VAN, LEROND M. (1993) *Guide des lichens*. Éditions Lechevalier, Paris.
- HAWKSWORTH D.L. (1979) The lichenicolous hyphomycetes. *Bulletin of the British Museum of Natural History (Botany)* 6: 183-300.

- HAWKSWORTH D.L. (1981) The lichenicolous Coelomycetes. *Bulletin of the British Museum Natural History (Botany)* 9:1-98.
- HAWKSWORTH D.L. (1982a) Co-evolution and detection of ancestry in lichens. *Journal of the Hattori Botanical Laboratory* 52:323-329.
- HAWKSWORTH D.L. (1982b) Secondary fungi in lichen symbioses: parasites, saprophytes and parasymbionts. *Journal of the Hattori Botanical Laboratory* 52: 357-366.
- HAWKSWORTH D.L. (1983) A key to the lichen-forming, parasitic, parasymbiotic and saprophytic fungi occurring on lichens in the British Isles. *The Lichenologist* 15: 1-44
- HAWKSWORTH D.L. (1988) The variety of fungal-algal symbiosis, their evolutionary significance, and the nature of lichens. *Botanical Journal of the Linnean Society* 96: 3-20.
- HAWKSWORTH D.L. (1997) The fascination of fungi: exploring fungal diversity. *Mycologist* 11: 18-22.
- HAWKSWORTH D.L. (2003) The lichenicolous fungi of Great Britain and Ireland: an overview and annotated checklist. *The Lichenologist* 35(3): 191-232.
- HAWKSWORTH D.L., HONEGGER R. (1994) The lichen thallus: a symbiotic phenotype of nutritionally specialized fungi and its response to gall producers. In: William M.A.J. (ed.), *Plant Galls*. Systematics Association Special Volume no. 49, Clarendon Press Oxford, pp: 77-98.
- HAWKSWORTH D.L., ITURRIAGA T. (2006) Lichenicolous fungi described from Antarctica and the sub-Antarctic islands by Carroll W. Dodge (1895-1988). *Antarctic Science* 18: 291-301.
- HAWKSWORTH D.L., KIRK P.M., SUTTON B.C., PEGLER D.N. (1995) *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*. International Mycological Institute, Egham, Surrey, U.K.
- HECKMAN D.S., GEISER D.M., EIDELL B.R., STAUFFER R.L., KARDOS N.L., HEDGES S.B. (2001) Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants. *Science* 293: 1129-1133.
- HEDENÅS H., LUNDIN K., ERICSON L. (2002) The role of lichen parasites in conservation biology. In: Hedenås H. (ed.) *Epiphytic lichens on Populus tremula: Implication for Conservation*. Ph.D Dissertation, Umeå University.
- HELMS G., FRIEDL T., RAMBOLD G., MAYRHOFFER H. (2001) Identification of photobionts from the lichen family Physciaceae using algal-specific ITS rDNA sequencing. *The Lichenologist* 33: 73-86.

- HENDRIKS L., GORIS A., NEEFS J.M., PEER Y. VAN DE, HENNEBERT G., WACHTER R. DE (1989) The nucleotide sequence of the small ribosomal subunit RNA of the yeast *Candida albicans* and the evolutionary position of the fungi amongst the Eukaryotes. *Systematic and Applied Microbiology* 12: 223-229.
- HENKEL P.A., YUZHAKOVA L.A. (1936) Nitrogen-fixing bacteria in lichens. *Izv Biol Inst Permsk Gos Univ* 10: 9-10.
- HERTEL H. (1984) Über saxicole, lecideoide Flechten der Subantarktis. *Beihefte Nova Hedwigia* 79: 399-500.
- HERTEL H. (1987) Progress and problems in the taxonomy of Antarctic saxicolous lecideoid lichens. *Bibliotheca Lichenologica* 25: 219-242.
- HERTEL H. (1988) Problems in monographing Antarctic crustose lichens. *Polarforschung* 58: 65-76.
- HIBBET D.S., GILBERT L.B., DONOGHUE M.J. (2000) Evolutionary instability of ectomycorrhizal symbioses in basidiomycetes. *Nature* 407: 506-508.
- HILLIS D.M., DIXON M.T. (1991) Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Quarterly Reviews in Biology* 66: 411-453.
- HOLDGATE M.V. (1977) Terrestrial ecosystems in the Antarctic. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological Science* 279: 5-25.
- HONEGGER R. (1996a) Mycobionts. In: Nash III T.H. (ed.) *Lichen Biology*, Cambridge: Cambridge University Press, pp: 24-36.
- HONEGGER R. (1996b) Morphogenesis. In: Nash III T.H. (ed.) *Lichen Biology*, Cambridge: Cambridge University Press, pp: 65-87.
- HONEGGER R. (1998) The lichen symbiosis – What is so spectacular about it? *The Lichenologist* 30: 193-212.
- HONEGGER R. (2001) The symbiotic phenotype of lichen-forming ascomycetes. In: Hock B. (ed.), *The Mycota IX, Fungal Associations*, Springer-Verlag, Berlin, pp: 165-188.
- IHDA T.A., NAKANO T., YOSHIMURA I., IWATSUKI Z. (1993) Photobionts isolated from Japanese species of *Anzia* (Lichenes). *Archiv für Protistenkunde* 143: 163-172.
- INGÓLFSDÓTTIR K., BLOOMFIELD S.F., HYLANDS P.J. (1985) In vitro evaluation of the antimicrobial activity of lichen metabolites as potential preservatives. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 28: 289-292.
- INOUE M. (1995) The lichen flora and habitats of the Syowa Region, Continental Antarctica. *The Lichenologist* 27: 451-462.
- ISKINA R.Y. (1938) On nitrogen fixing bacteria in lichens. *Isv Biol Inst Permsk* 11: 133-139.

- JAHNS H.M. (1987) New trends in developmental morphology of the thallus. *Bibliotheca Lichenologica* 25: 17-33.
- JAMES P.S., WHELEN, HALL B.D. (1991) The RETI gene of yeast encodes the second-largest subunit of RNA polymerase III. *Journal of Biological Chemistry*, 266: 5616-5624.
- KAPPEN L. (1974) Response to extreme environments. In: Ahmadjian V., Hale E.M. (eds.), *The lichens*, Academic Press, New York, pp: 311-380.
- KAPPEN L. (1985a) Vegetation and ecology of ice-free areas of northern Victoria Land, Antarctica. I. The lichen vegetation of Birthday Ridge and an inland mountain. *Polar Biology* 4: 213-225.
- KAPPEN L. (1985b) Vegetation and ecology of ice-free areas of northern Victoria Land, Antarctica. II. Ecological conditions in typical microhabitats of lichens at Birthday Ridge. *Polar Biology* 4: 227-236
- KAPPEN L. (1993) Lichens in the Antarctic region. In: Friedmann E.I. (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.
- KAPPEN L. (2004) The diversity of lichens in Antarctica, a review and comments. *Bibliotheca Lichenologica* 88: 331-343.
- KAPPEN L., FRIEDMANN E.I., GARTY J. (1981) Ecophysiology of lichens in the Dry Valleys of Southern Victoria Land. Antarctica I. Microclimate of the cryptoendolithic lichen habitat. *Flora* 171: 216-235.
- KAPPEN L., SCHROETER B., SCHEIDEGGER C., SOMMERKORN M., HESTMARK G. (1996) Cold resistance and metabolic activity of lichens below 0°C. *Advances in Space Research* 18: 119-128.
- KARLIN S., MRÁZEK J. (2001) Predicted highly expressed and putative alien genes of *Deinococcus radiodurans* and implications for resistance to radiation damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 5240-5245.
- KERSHAW K.A. (1983) The thermal operating environment of a lichen. *The Lichenologist* 15: 191-207.
- KIS-PAPO T., KIRZHNER V., WASSER S.P., NEVO E. (2003) Evolution of genomic diversity and sex at extreme environments: fungal life under hypersaline Dead Sea stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 14970-14975.

- KOGEJ T., RAMOS J., PLEMENITAS A., GUNDE-CIMERMAN N. (2005) The Halophilic Fungus *Hortaea werneckii* and the Halotolerant Fungus *Aureobasidium pullulans* Maintain Low Intracellular Cation Concentrations in Hypersaline Environments. *Applied And Environmental Microbiology* 71: 6600–6605.
- KOLUMBE E. (1927) Purpurbakterien und Flechten. *Mikrokosmos* [Franckh'sche Verlagshandlung, Stuttgart] 21: 53-55.
- KRASIL'NIKOV N.A. (1949) Does *Azotobacter* occur in lichens? *Microbiologiya* 18: 3-6.
- KROKEN S., TAYLOR J.W. (2000) Phylogenetic species, reproductive mode, and specificity of the green alga *Trebouxia* forming lichens with the fungal genus *Letharia*. *Bryologist* 103: 645-660.
- KUMAR S., TAMURA K., NEI M. (2004) MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5:150-163.
- KURTZ D.D., BROMWICH D.H. (1985) A recurring, atmospherically-forced polynya in Terra Nova Bay. *Antarctic Research Series, Oceanology of the Antarctic Continental Shelf*, 43, edited by Jacobs S.S., A.G.U., Washington, D. C., pp. 177-201.
- LANFRANCO L., WYSS P., MARZACHI C., BONFANTE P. (1995) Generation of RAPD-PCR primers for the identification of isolates of *Glomus mosseae*, an arbuscular mycorrhizal fungus. *Molecular Ecology* 4: 61-68.
- LANGE O.L. (1953) Hitze- und Trockenresistenz der Flechten in Beziehung zu ihrer Verbreitung. *Flora* 140: 39-97.
- LANGE O.L. (1954) Einige Messungen zum Wärmehaushalt poikilohydrer Flechten und Moose. *Archiv für Meteorologie, Geophysik und Bioklimatologie, Serie B: Allgemeine und Biologische Klimatologie* 5: 182-190.
- LANGE O.L., KAPPEN K. (1972) Photosynthesis of lichens from Antarctica. In: *Antarctic Research Series* 20, American Geophysical Union, Washington D.C., pp: 83-95.
- LANGE O.L., KILIAN E., ZIEGLER H. (1986) Water vapour uptake and photosynthesis of lichens: performance differences in species with green and blue-green algae as phycobionts. *Oecologia* 71: 104-110.
- LARENA I., SALAZAR O., GONZÁLES V., JULIAN M.C., RUBIO V. (1999) Design of a primer for ribosomal DNA internal transcribed spacer with enhanced specificity for ascomycetes. *Journal of Biotechnology* 75: 187-194.
- LAW R., LEWIS D.H. (1983) Biotic environments and the maintenance of sex - some evidence from mutualistic symbiosis. *Biological Journal of the Linnean Society* 20: 249-276.
- LAWREY J.D. (1984) *Biology of lichenized fungi*. Praeger, NY.

- LAWREY J.D. (1986) Biological role of lichen substances. *Bryologist* 89: 111-122.
- LAWREY J.D. (1987) Nutritional ecology of lichen/moss arthropods. In: Slansky F. Jr., Rodriguez J.G. (eds.), *Nutritional Ecology of Insects, Mites, and Spiders*. Wiley, NY, pp: 209-233.
- LAWREY J.D. (1993) Chemical ecology of *Hobsonia christiansenii*, a lichenicolous hyphomycete. *American Journal of Botany* 80: 1109-1113.
- LAWREY J.D. (1997) Isolation, Culture, and Degradative Behavior of the Lichen Parasite *Hobsonia santessonii*. *Symbiosis* 23: 107-116.
- LAWREY J.D., DIEDERICH P. (2003) Lichenicolous Fungi: Interactions, Evolution, and Biodiversity. *The Bryologist* 106: 80-120.
- LAWREY J.D., ROSSMAN A.Y., LOWEN R. (1994) Inhibition of selected hypocrealean fungi by lichen secondary metabolites. *Mycologia* 86: 502-506.
- LEUCKERT C., POELT J. (1989) Studien über die *Lecanora rupicola*-Gruppe in Europa (*Lecanoraceae*). *Nova Hedwigia* 49: 121-167.
- LEWIS SMITH R.I. (1984) Terrestrial plant biology of the sub-Antarctic and Antarctic. In: Laws R.M., 8th edition, *Antarctic Ecology*, Academic Press, London 1: 61-162.
- LIBA C.M., FERRARA F.I.S., MANFIO G.P., FANTINATTI-GARBOGGINI F., ALBUQUERQUE R.C., PAVAN C., RAMOS P.L., MOREIRA-FILHO C.A., BARBOSA H.R. (2006) Nitrogen-fixing chemo-organotrophic bacteria isolated from cyanobacteria-deprived lichens and their ability to solubilize phosphate and to release amino acids and phytohormones. *Journal of Applied Microbiology* 101: 1076-1086.
- LINDSAY D.C. (1974) Review of C.W. Dodge's "Lichen Flora of the Antarctic Continent and adjacent islands". *The Lichenologist* 6: 130-131.
- LINDSAY W.L. (1869) Enumeration of Micro-lichens on other lichens. *Quarterly Journal of Microscopical Science* 9: 49-57.
- LINDSEY A.A. (1940) Recent advances in antarctic biogeography. *Quarterly Review Biology* 15: 456-465.
- LIU Y.J., HALL B.D. (2004) Body plan evolution of ascomycetes, as inferred from an RNA polymerase II phylogeny. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 4507-4512.
- LIU Y.J., WHELEN S., HALL B.D. (1999) Phylogenetic Relationships Among Ascomycetes: Evidence from an RNA Polymerase II Subunit. *Molecular Biology and Evolution* 16 (12): 1799-1808.

- LONGTON R.E. (1988a) *The Biology of Polar Bryophytes and Lichens*. Cambridge: Cambridge University Press.
- LONGTON R.E. (1988b) Adaptations and strategies of polar bryophytes. *Botanical Journal of the Linnean Society* 98: 253-268.
- LÜCKING R., BERNECKER-LÜCKING A. (2000) Lichen feeders and lichenicolous fungi: do they affect dispersal and diversity in tropical foliicolous lichens communities? *Ecotropica* 6: 23-41.
- LUTZONI F., PAGEL M. (1997) Accelerated evolution as a consequence of transitions to mutualism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 11422-11427.
- LUTZONI F., PAGEL M., REEB V. (2001) Major fungal lineages are derived from lichen symbiotic ancestors. *Nature* 411: 937-940.
- MADRONICH S., MCKENZIE R.L., BJÖRN L.O., CALDWELL M.M. (1998) Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 46: 5-19.
- MAKAROVA K.S., ARAVIND L., WOLF Y.I., TATUSOV R.L., MINTON K.W., KOONIN E.V., DALY M.J. (2001) Genome of the extremely radiation-resistance bacterium *Deinococcus radiodurans* viewed from the prospective of comparative genomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65: 44-79.
- MALLOCH D.W., PIROZYNSKI K.A., RAVEN P.H. (1980) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77: 2113-2118.
- MANZONI M. (2001) *La natura dell'Antartide*, Springer-Verlag Italia, 346 pp.
- MARGULIS L., FESTER R. (1991) *Symbiosis as a source of Evolutionary Innovation: Speciation and Morphogenesis*, Cambridge, MA: MIT Press.
- MARTÍN M.P., WINKA K. (2000) Alternative methods of extracting and amplifying DNA from lichens. *The Lichenologist* 32: 189-196.
- MATHENY P.B., LIU Y.J., AMMIRATI J.F., HALL B.D. (2002) Using RPB1 sequences to improve phylogenetic inference among mushrooms (*Inocybe*, Agaricales). *American Journal of Botany* 89 (4): 688-698.
- MATTIMORE V., BATTISTA J.R. (1996) Radioresistance of *Deinococcus radiodurans*: functions necessary to survive ionizing radiation are also necessary to survive prolonged desiccation. *Journal of Bacteriology* 178: 633-637.
- MAYNARD SMITH J., SZATHMÁRY E. (1995) *The major transitions in evolution*. Oxford: Freeman.
- MORITA R.Y. (1975) Psychrophilic bacteria. *Bacteriological Reviews* 39: 144-167.

- MUGNIER J. (1994) *PCR Catalogue: Fungi*. Lyon: Rhône-Poulenc Agro.
- MULLIS K.B., FALOONA F.A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155: 335-350.
- MURTHAG G.J., DYER P.S., MCCLURE P.C., CRITTENDEN P.D. (1999) Use of randomly amplified polymorphic DNA markers as a tool to study variation in lichen-forming fungi. *The Lichenologist* 31: 257-267.
- NIENOW J.A., FRIEDMANN E.I. (1993) Terrestrial lithophytic (rock) communities. In: Friedmann E.I. (ed.), *Antarctic Microbiology*. Wiley-Liss, New York, pp: 343-412.
- NIENOW J.A., MCKAY C.P., FRIEDMANN E.I. (1988) The cryptoendolithic microbial environment in the Ross Desert of Antarctica: mathematical models of the thermal regime. *Microbial Ecology* 16: 253-270.
- NIMIS P.L. (1990) Lo stato delle conoscenze lichenologiche sul continente Antartico. In: Battaglia B., Bisol P.M., Varotto V. (eds.), *Proceedings 1st Meeting on Biology in Antarctica*. Rome, CNR, pp: 5-54.
- OLECH M. (2001) *Annotated checklist of Antarctic lichens and lichenicolous fungi*. Poland, Institute of Botany of the Jagiellonian University, Kraków, 136 pp.
- ONOFRI S. (1999) Antarctic microfungi. In: Seckbach J. (ed.), *Enigmatic microorganisms and life in extreme environments*. Kluwer Academic publishers, Dordrecht, Boston, London, pp: 323-336.
- ONOFRI S., TOSI S. (1992) *Arthrobotrys ferox* sp. nov. a springtail-capturing hyphomycete from Continental Antarctica. *Mycotaxon* 44: 445-451.
- ONOFRI S. & FRIEDMANN E.I. (1998) Cryptoendolithic microorganisms in sandstone and pegmatite in the Northern Victoria Land. In: Tamburrini M., D'Avino R. (eds.), *Newsletter of the Italian Biological Research in Antarctica*. No. 2, Camerino University Press, Camerino: 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 A.R., TOSI S., MAGRINO A., PAGANO S., SELBMANN L., ZUCCONI L., VISHNIAC H.S., OCAMPO-FRIEDMANN R., FRIEDMANN E.I. (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 G.S. (2005b) The Mycota of Continental Antarctica. *Terra Antarctica Reports* 11: 37-42.
- ONOFRI S., ZUCCONI L., TOSI S. (2007a) *Continental Antarctic Fungi*. IHW-Verlag, Eching, 247 pp.
- ONOFRI S., ZUCCONI L., SELBMANN L., DE HOOG G.S., DE LOS RIOS A., RUISI S., GRUBE M. (2007b) 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.
- OROMBELLI G. (1986) La prima spedizione del Programma Nazionale di Ricerche in Antartide. Osservazioni geomorfologiche. *Rivista Geografica Italiana* 93: 129-169.
- OTT S. (1987) Sexual reproduction and development adaptations in *Xanthoria parietina*. *Nordic Journal of Botany* 7: 219-228.
- OTT S., BRINKMANN M., WIRTZ N., LUMBSCH H.T. (2004) Mitochondrial and nuclear ribosomal DNA data do not support the separation of the Antarctic lichens *Umbilicaria kappenii* and *Umbilicaria antarctica* as distinct species. *The Lichenologist* 36: 227-234.
- ØVSTEDAL D.O., HAWKSWORTH D.L. (1986) Lichenicolous ascomycetes from Bouvetøya. *Norsk polarinstitutt Skrifter* 185: 57-60.
- ØVSTEDAL D.O., LEWIS SMITH R.I. (2001) Lichens of Antarctica and South Georgia. In: Øvstedal D.O. & Lewis Smith R.I. (eds.), *A guide to their identification and ecology*. Studies in Polar Research, University of Cambridge, pp: 4-5.
- PANOSYAN A.K., NIKOGOSYAN V.G (1966) The presence of *Azotobacter* in lichens. *Akad Nauk Armian SSR, Biol Zhurm Armen* 19: 3-11.
- PARTIDA-MARTINEZ L.P., HERTWECK C. (2005) Pathogenic fungus harbours endosymbiotic bacteria for toxin production. *Nature* 437: 884-888.
- PEROTTO S., BONFANTE P. (1997) Bacterial associations with mycorrhizal fungi: close and distant friends in the rhizosphere. *Trends in Microbiology* 5: 496-503.
- PETRINI O., HAKE U., DREYFUSS M.M. (1990) An analysis of fungal communities isolated from fruticose lichens. *Mycologia* 82: 444-451.
- PICKARD J. (1986) Antarctic oasis, Davis station and the Vestfold Hills. In: Pickard J. (ed.), *Antarctic Oasis: Terrestrial Environments and History of the Vestfold Hills*. Academic Press Australia, Sydney, pp: 1-19.
- PICKARD J., SEPPELT R.D. (1984) Phytogeography of Antarctica. *Journal of Biogeography* 11: 83-102.
- PIROZYNSKI K.A., MALLOCH D.W. (1975) The origins of land plants: a matter of mycotrophism. *BioSystems* 6: 153-164.

- POELT J., LEUCKERT C., ROUX C. (1995) Die Arten der *Lecanora dispersa*-Gruppe (Lichenes, *Lecanoraceae*) auf kalkreichem Gestein im Bereich der Ostalpen – Eine Vorstudie. *Bibliotheca Lichenologica* 58: 289-333.
- POOLE E.J., BENDINO G.D., WHIPPS J.M. READ D.J. (2001) Bacteria associated with *Pinus sylvestris*-*Lactarius rufus* ectomycorrhizas and their effects on mycorrhiza formation in vitro. *New Phytologist* 151: 743-751.
- PRICE P.W., WESTOBY M., RICE B., ATSATT P.R., FRITZ R.S., THOMPSON J.N. MOBLEY K. (1986) Parasite mediation in ecological interactions. *Annual Review of Ecology and Systematics* 17: 487-505.
- PRILLINGER H., KRAEPELIN G., LOPANDIC K., SCHWEIGKOFER W., MOLNAR O., WEIGANG F., DREYFUSS M.M. (1997) New species of *Fellomyces* isolated from epiphytic lichen species. *Systematic and Applied Microbiology* 20: 572-584.
- PURVIS W. (2000) *Lichens*. Life Series. Published by The Natural History Museum, London, 112 pp.
- RAMBOLD G., TRIEBEL D. (1992) The inter-lecanoralean associations. *Bibliotheca Lichenologica* 48: 1-201.
- ROMEIKE J., FRIEDL T., HELMS G., OTT S. (2002) Genetic diversity of algal and fungal partners in four species of *Umbilicaria* (Lichenized Ascomycetes) along a transect of the Antarctic peninsula. *Molecular Biology and Evolution* 19: 1209-1217.
- RUIBAL C., PLATAS G., BILLS G.F. (2005) Isolation and characterization of melanized fungi from limestone formations in Mallorca *Mycological Progress* 4: 23-38.
- RUISI S., BARRECA D., SELBMANN L., ZUCCONI L., ONOFRI S (2007) Fungi in Antarctica. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 6: 127-141.
- RUNDEL P.W. (1978) The ecological role of secondary lichen substances. *Biochemical Systematics and Ecology* 6: 157-170.
- SANCHO L.G., SCHULZ F., SCHROETER B., KAPPEN L. (1999) Bryophyte and lichen flora of South Bay (Livingston Island: South Shetland Islands, Antarctica). *Nova Hedwigia* 68: 301-337.
- SANDERS W.B. (2006) A feeling for the superorganism: expression of plant form in the lichen thallus. *Botanical Journal of the Linnean Society* 150: 89-99.
- SANGER F., NICKLEN S., COULSON A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 74: 5463-5467.
- SAVOLAINEN V., CUÉNOUD P., SPICHIGER R., MARTÍNEZ M.D.P. CRÈVECOEUR M., MANEN J. (1995) The use of herbarium specimens in DNA phylogenetics; evaluation and improvement. *Plant Systematics and Evolution* 197: 87-98.

- SCHAPER G.M. (2003) Komplexe Interaktionsmuster und die Dynamik von Entwicklungsprozessen in Flechtenökosystemen. Unpublished Dphil Thesis, Düsseldorf: Heinrich-Heine-Universität.
- SCHLICK A., KUHLS K., MEYER W., LIECKFELDT E., BORNER T., MESSNER K. (1994) Fingerprinting reveals gamma-ray induced mutations in fungal DNA: implications for identification of patent strains of *Trichoderma harzianum*. *Current Genetics* 26: 74-78.
- SCHWARZ A.M. J., GREEN, T.G.A., SEPPELT, R.D (1992) Terrestrial vegetation at Canada Glacier, southern Victoria Land, Antarctica. *Polar Biology* 12:397-404.
- SCHWENDENER S. (1869) Die Algentypen der Flechtengonidien. Programm für die Rectoratsfeier der Iniversität. Universitätsbuchdruckerei von C. Schultze, Basel, 42 pp.
- SCOTT G.D. (1956) Further investigations of some lichens for fixation of nitrogen. *New Phytologist* 55: 111-116.
- SELBMANN L., DE HOOG G.S., MAZZAGLIA A., FRIEDMANN E.I., ONOFRI S. (2005) Fungi at the edge of life: cryptoendolithic black fungi from Antarctic desert. *Studies in Mycology* 51: 1-32.
- SELOSSE M.A. (2002) *Prototaxites*: a 400 Myr old giant fossil, a saprophytic holobasidiomycete, or a lichen? *Mycological Research* 106: 642-644.
- SEPPELT R.D., GREEN T.G.A., SCHROETER B. (1995) Lichens and mosses from the Kar Plateau, Southern Victoria Land, Antarctica. *New Zeland Journal of Botany* 33: 203-220.
- SEPPELT R.D., GREEN T.G.A., SCHROETER B. (1996) Additions and corrections to the lichen flora of the Kar Plateau, Southern Victoria Land, Antarctica. *New Zeland Journal of Botany* 34: 329-331.
- SEPPELT R.D., NIMIS P.L., CASTELLO M. (1998) The genus *Sarcogyne* (*Acarosporaceae*) in Antarctica. *The Lichenologist* 30: 249-258.
- SEYMOUR F.A., CRITTENDEN P.D., DYER P.S. (2005) Sex in the extremes: lichen-forming fungi. *Mycologist* 19: 51-58.
- SHACKLETON E.H. (1909) *The Heart of the Antarctic*, vol. 2. Heinemann, London, 419 pp.
- SIMON L., BOUSQUET J., LÉVESQUE R.C., LALONDE M. (1993) Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature (London)* 363: 67-69.
- ŚLIWA L., OLECH M., (2002) Notes on species of *Lecanora* (lichenized Ascomycotina) from the Antarctic. *Polish Polar Research* 23: 117-133.
- SMITH R.I.L. (2000) Plants of extreme habitats in Antarctica. In: Schroeter B., Schlenzog M., Green T.G.A. (eds.), *New Aspects in Cryptogamic Research: contributions in Honour of Ludger Kappen*. J. Cramer, Stuttgart, Berlin, pp: 405-419.

- STALEY J.T., PALMER F.E. ADAMS J.B. (1982) Microcolonial common inhabitants on desert rocks? *Science* 215: 1093-1095.
- STERFLINGER K. (2006). Black Yeasts and Meristematic Fungi: Ecology, Diversity and Identification In: Rosa C.A., Péter G. (eds.), *Biodiversity and ecophysiology of yeasts*. Springer Berlin Heidelberg, pp: 501-514.
- STERFLINGER K., KRUMBEIN W.E. (1995) Multiple stress factors affecting growth of rock inhabiting black fungi. *Botanica Acta* 108: 467–538.
- STERFLINGER K., DE HOOG G.S., HAASE G. (1999) Phylogeny and ecology of meristematic ascomycetes. *Studies in Mycology* 43: 5-22.
- STILLER J.W., HALL B.D. (1997) The origin of red algae: implications for plastid evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 94: 4520-452.
- SUESSENGUTH K. (1926) Zür Frage der Vergesellschaftung von Flechten mit Purpurbakterien. *Bericht der Deutschen botanischen Gesellschaft* 44: 573-578.
- SUN H.J., FRIEDMANN E.I. (2005) Communities adjust their temperature optima by shifting producer-to-consumer ratio, shown in lichens as models: II. Experimental Verification. *Microbial Ecology* 49: 528-535.
- TAYLOR J.W., SWANN E.C. (1994) DNA from herbarium specimens. In: Herrman B., Hummel S. (eds.), *Ancient DNA*. Berlin, Springer, pp: 166-181.
- TAYLOR T.N., OSBORN J.M. (1996) The importance of fungi in shaping the paleoecosystem. *Review of Paleobotany and Palynology* 90: 249-262.
- TEHLER A. (1988) A cladistic outline of the Eumycota. *Cladistic* 4: 227-277.
- TEHLER, A., LITTLE, D., FARRIS, J.S. (2003) The full-length phylogenetic tree from 1551 ribosomal sequences of chitinous fungi, Fungi. *Mycological Research* 107: 901-916.
- THOMPSON J.D., GIBSON T.J., PLEWNIAK F., JEANMOUGIN F., HIGGINS D.G. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 24: 4876-4882.
- TOSI S., BEGOÑA C., GERDOL R., CARETTA G. (2002) Fungi isolated from Antarctic mosses. *Polar Biology* 25: 262-268.
- TSCHERMAK-WOESS E. (1988) The algal partner. In: Galun M. (ed.), *CRC Handbook of Lichenology*. Volume I. CRC Press, Inc., Boca Raton, pp: 39-92.
- TSCHERMAK-WOESS E. (1989) Developmental studies in trebouxoid algae and taxonomical consequences. *Plant Systematics and Evolution* 164: 161-195.

- UEZATO H., GUSHI M., HAGIWARA K., KAYO S., HOSOKAWA A., NONAKA S. (2006) A case of tinea nigra palmaris in Okinawa, Japan. *Journal of Dermatology* 1: 23–29
- UPHOF J.C.T. (1925a) Purple bacteria as symbionts of a lichen. *Science* 61: 67.
- UPHOF J.C.T. (1925b) The occurrence of purple bacteria as symbionts of a lichen. *American Journal of Botany* 12: 97-103.
- VAN UDEN N. (1984) Temperature profiles of yeasts. *Advances in Microbiological Physiology* 25: 195-251.
- VARTIA K.O. (1973) Antibiotics in lichens. In: Ahmadjian V., Hale M.E. (eds.), *The Lichens*. Academic Press, NY, pp: 547-561.
- VINCENT W.F. (2000) Evolutionary origins of Antarctic microbiota: invasion, selection and endemism. *Antarctic Science* 12(3): 374-385.
- VISHNIAC H.S. (1987) Psychrophily and systematics of yeast-like fungi. In: de Hoog G.S., Smith M.Th., Weijman A.C.M. (eds.), *The expanding Realm of yeast-like Fungi. Studies in Mycology* 30: 389-402.
- WANG-YANG J.R., AHMADJIAN V. (1972) A morphological study of the algal symbionts of *Cladonia rangiferina* (L.) Web. and *Parmelia caperata* (L.) Ach. *Taiwania* 17: 170-181.
- WEDIN M., DÖRING H., GILENSTAM G. (2004) Saprotrophy and lichenization as options for the same fungal species on different substrata: environmental plasticity and fungal lifestyles in the *Stictis-Conotrema* complex. *New Phytologist* 164: 459-465.
- WEED R., ACKERT R.P. JR. (1986) Chemical weathering of Beacon Supergroup sandstones and implications for Antarctic glacial chronology. *South African Journal of Science* 82: 513-516.
- WEISBURG W.G., BARNS S.M., PELLETIER D.A., LANE D.J. (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173: 697-703.
- WHITE T.J., BRUNS T., LEE S., TAYLOR J.W. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M.A., Gelgard D.H., Sninsky J.J., White T.J. (eds.), *Protocols: A Guide to Methods and Applications*. New York: Academic Press, pp: 315-322.
- WIERZCHOS J., ASCASO C. (2002) Microbial fossil record of rocks from the Ross Desert, Antarctica: implication in the search for past life on Mars. *International Journal of Astrobiology* 1: 51-59.
- YUAN X., XIAO S., TAYLOR T.N. (2005) Lichen-Like Symbiosis 600 Million Years Ago. *Science* 308: 1017-1020.
- ZALAR P., DE HOOG G.S., GUNDE-CIMERMAN N. (1999) Ecology of halotolerant dothideaceous black yeasts. *Studies in Mycology* 43: 38-48.

- ZOLLER S., SCHEIDEGGER C., SPERISEN C. (1999) PCR primers for the amplification of mitochondrial small subunit ribosomal DNA of lichen-forming ascomycetes. *The Lichenologist* 31: 511-516.
- ZOOK P.D. (1983) *A study of the role of bacteria in lichens.* (thesis). Clark University, Worcester, MA.
- ZUCCONI L., PAGANO S., FENICE M., SELBMANN L., TOSI S. ONOFRI S. (1996) Growth temperature preferences of fungal strains from Victoria Land, Antarctica. *Polar Biology* 25: 500-505.