

La biodiversità fungina nel suolo: un approccio di metagenomica

La metagenomica è una tecnologia relativamente recente che nasce grazie ai veloci progressi ottenuti con la genomica: si pone infatti l'obiettivo di sequenziare il genoma di tutti i microrganismi che proliferano in un determinato ambiente, o in una specifica nicchia. Questi studi si basano infatti sull'ipotesi che un determinato ecosistema (un oceano, ma anche l'intestino umano) funzioni grazie all'integrazione di attività metaboliche che provengono da svariati microrganismi. Diventa cruciale, pertanto, da una parte avere la lista dei microbi presenti (e quindi descrivere la biodiversità di quell'ambiente), ma dall'altra anche conoscere la funzionalità del sistema attraverso l'annotazione dei geni identificati nel processo di sequenziamento.

Alcune analisi metagenomiche hanno raggiunto entrambi gli obiettivi: ad esempio il gruppo di Craig Venter che non solo ha elencato i procarioti presenti ma ha anche identificato nuove funzioni in ambiente oceanico. Altri ambienti assai complessi ed eterogeni come il suolo si sono posti come primo obiettivo quello di descrivere la biodiversità.

I FUNGHI:

UNA COMPONENTE ESSENZIALE DELLA COMUNITÀ MICROBICA DEL SUOLO

Procarioti e funghi rappresentano i componenti principali della biodiversità microbica di un suolo. I procarioti, presenti con un ampio numero di *taxa* differenti, sono il gruppo più abbondante nella maggior parte dei terreni con un

* Istituto Protezione Piante, IPP- UOS Torino CNR e Dipartimento Biologia Vegetale, Università di Torino

numero di specie compreso tra 2000 e 8.3 milioni (Gans et al., 2005; Schloss e Handelsman, 2006), di cui solo una piccola parte è stata descritta, perché coltivabile. Il secondo raggruppamento di cui si compone la microflora del suolo è quello dei funghi. Studi recenti suggeriscono che il numero di specie fungine sia di circa 1 milione e mezzo, di cui poco più di 45.000 descritte (Hawskworth, 2001). Nonostante i funghi del suolo siano studiati da secoli, le moderne tecniche di biologia molecolare dimostrano che le strategie basate sulla coltivazione *in vitro* hanno fortemente sottostimato la ricchezza totale di comunità fungine che vivono nel terreno (Schadt et al., 2003; Jumpponen et al., 2005; O'Brien et al., 2005). Nel comparto suolo, anche se i batteri, in termini numerici, eccedono di alcuni ordini di grandezza i funghi, sono questi ultimi a fornire la maggiore biomassa (500-5.000 kg di massa umida per ettaro di suolo).

I funghi hanno una struttura miceliare grazie alla quale colonizzano tutti i substrati, ed – esplorando il suolo – assorbono elementi minerali e sostanze organiche necessarie per il loro metabolismo. Grazie a queste loro capacità hanno svolto un ruolo di fondamentale importanza aiutando le piante a conquistare le terre emerse più di 450 milioni di anni fa. Le funzioni svolte dai funghi nel suolo sono numerose: controllo dei cicli biogeochimici, della nutrizione e salute delle piante, della strutturazione e fertilità del suolo. Questa molteplicità di azioni è dovuta da un lato alla loro grande abbondanza, e dall'altro alle svariate modalità di nutrizione che essi hanno e che spaziano dalla chemioeterotrofia fino a relazioni trofiche tipiche delle simbiosi (Girlanda et al., 2007; Bonfante e Genre, 2010).

La straordinaria diversità genetica e funzionale dei funghi e la ricchezza di specie trovate nel suolo li rendono, pertanto, una componente chiave di quasi tutti gli ecosistemi con una grande potenzialità per ricadute applicative in diversi settori delle biotecnologie agro-ambientali.

Lo scopo del presente articolo è quello di sottolineare come l'utilizzo di un approccio di metagenomica basato sul pirosequenziamento (gene-target pirosequencing approach) possa aiutare a comprendere la distribuzione, la composizione e la dinamica delle comunità fungine nel suolo e in particolare quelle micorrizico arbuscolari (AM), che rappresentano il gruppo di funghi simbiotici maggiormente diffuso in molti ecosistemi naturali e agrari.

I SIMBIONTI MICORRIZICI: UN PONTE TRA IL SUOLO E LE PIANTE

Tra le varie categorie di funghi, quelli micorrizici rappresentano un gruppo particolarmente importante da un punto di vista ecologico perché colonizzano

la quasi totalità degli ecosistemi terrestri. I funghi micorrizici sono microorganismi del suolo che entrano in simbiosi con le radici delle piante (Smith e Read, 2008) stabilendo una simbiosi detta “micorriza”. Le associazioni pianta-fungo sono ampiamente distribuite nel regno vegetale: non solo essi sono presenti nelle radici del 95% delle piante da seme, ma anche nei gametofiti di molte briofite e pteridofite, nonché negli sporofiti di queste ultime (Bonfante e Genre, 2008; Smith e Read, 2008; Brundrett, 2009). La funzione ormai riconosciuta per queste simbiosi è il miglioramento della nutrizione minerale della pianta ospite con conseguente effetto positivo sulla sua crescita e cessione di zuccheri all'ospite fungino. Grazie alla simbiosi micorrizica, la pianta risulta essere più resistente a stress biotici o abiotici, aumenta la tolleranza alla mancanza di acqua o alla presenza di inquinanti, e porta a una riduzione della sensibilità ai comuni agenti patogeni (Smith e Read, 2008). Le diverse associazioni micorriziche sono divise in numerose categorie tra cui le più diffuse sono: micorrize arbuscolari, ectomicorrize, micorrize ericoidi e micorrize delle orchidee.

Le associazioni micorriziche si trovano nella quasi totalità delle piante annuali e perenni. Circa i due terzi di queste piante, sono piante erbacee appartenenti a specie coltivate (per esempio, mais, leguminose e pomodoro) e formano simbiosi con i funghi micorrizici arbuscolari (AMF) appartenenti al *phylum* dei *Glomeromycota*. In particolare, le simbiosi AM aumentano la disponibilità di elementi minerali (es. fosforo) per la pianta, controllano la qualità delle comunità vegetali aumentandone la biodiversità e produttività e vengono perciò considerati dei biofertilizzatori naturali. Assumono, quindi, un notevole interesse nello sviluppo di una agricoltura sostenibile, basata fondamentalmente sulla limitazione dei fertilizzanti, sul rispetto degli equilibri microbiologici e sulla conservazione della struttura del suolo.

Per tutti questi motivi lo studio della distribuzione, della composizione e della dinamica delle comunità fungine AM nel suolo risulta prioritario per conoscere e comprendere il ruolo svolto da questi importanti microrganismi che rappresentano il gruppo di funghi simbiotici maggiormente diffuso negli ecosistemi naturali e agrari.

Considerazioni sulla biodiversità dei funghi AM: un capitale ecologico del suolo

La preservazione del patrimonio della biodiversità nel suolo è un obiettivo condiviso dalla comunità scientifica e dalle agenzie internazionali di ricerca (un esempio: Terragenome- International Soil Metagenome Sequencing

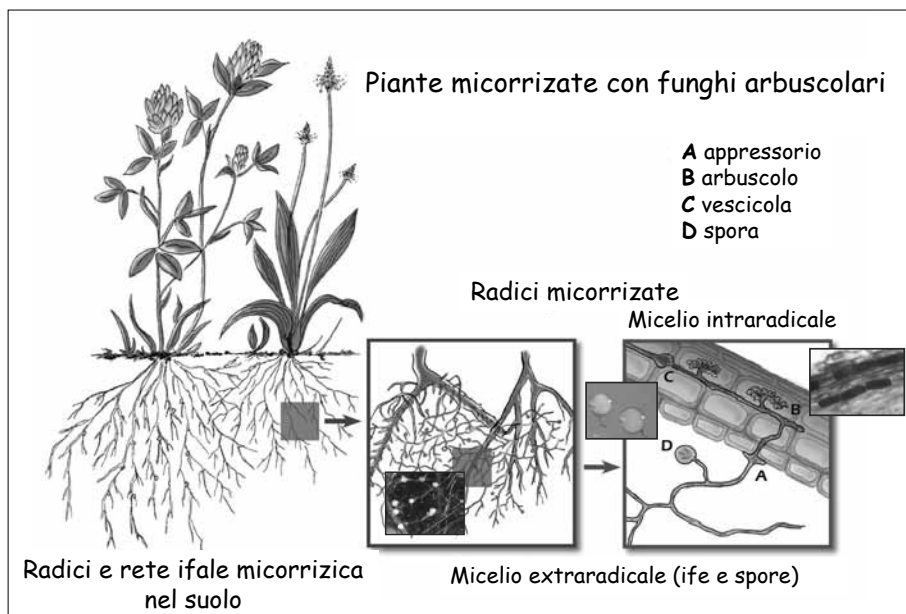


Fig. 1 *Ciclo vitale dei funghi micorrizici arbuscolari (AMF). I funghi AM colonizzano le radici delle piante ospiti e proliferano nel suolo formando spore e una fitta rete ifale extraradica. Questa rete miceliare si estende dalle radici delle piante ospiti nel suolo contribuendo alla sua strutturazione*

Consortium, <http://www.terragenome.org/>). La sua realizzazione richiede una migliore comprensione della capacità delle comunità microbiche indigene di rimanere stabili se sottoposte a perturbazioni ambientali causate dalle attività umane. In questo quadro si comprende l'importanza del mantenimento della biodiversità dei funghi AM in quanto essi rappresentano una risorsa genetica che, variando, determina modificazioni nella qualità del suolo e delle comunità vegetali a essi associate. Essi, infatti, essi sono responsabili dell'incremento della biodiversità e dell'equidistribuzione delle specie in una comunità vegetale (van der Heijden et al., 2008). Questo effetto benefico è tanto maggiore quanto più elevata è la biodiversità dei funghi stessi in quanto la presenza di più generi o famiglie garantisce un tasso più alto di tratti funzionali (Gamper et al., 2010). Una comunità di AMF del suolo con il suo patrimonio genetico è formata sia da micelio extraradica sia da spore (fig. 1). I miceli extraradicali rappresentano circa l'85% della biomassa dei funghi AM e il 20-30% della biomassa dei microrganismi del terreno (Girlanda et al., 2007). Nonostante l'elevata biomassa miceliare presente nel suolo, la maggior parte degli studi condotti finora

sulla biodiversità di funghi micorrizici-arbuscolari è stata basata sull'analisi di radici micorrizzate e/o di spore raccolte da suolo.

Il nostro gruppo ha intrapreso invece, per la prima volta, la caratterizzazione delle comunità fungine AM direttamente dal suolo applicando un approccio metagenomico di ultima generazione per l'analisi della biodiversità del "capitale genetico AMF" presente in un sito mediterraneo lungo un gradiente di uso del suolo (Lumini et al., 2010).

LE NUOVE STRATEGIE PER LO STUDIO DEI MICRORGANISMI APRONO UNA FINESTRA SULLA DIVERSITÀ FUNGINA DEL SUOLO

A partire dagli anni Novanta gli ecologi hanno incominciato a usare sempre più frequentemente un approccio cosiddetto di «Metagenomica» o «Genomica Ambientale» o «Genomica delle Comunità» (Hugenholtz e Tyson, 2008). Si tratta dello studio di genomi, o meglio di sequenze amplificate da genomi, ottenuti direttamente da campioni ambientali. Negli ultimi anni la metagenomica ha conosciuto un forte impulso, dovuto allo sviluppo di nuovi strumenti bioinformatici e al miglioramento delle tecniche di amplificazione del DNA. Recentemente, tra coloro che si occupano di analisi della biodiversità, ha trovato crescenti apprezzamenti nello studio dei metagenomi la tecnica del pirosequenziamento e in particolare le piattaforme 454 di pirosequenziamento massivo (Genome Sequencer FLX System, Roche), che evitando il processo di clonaggio permettono di ottenere un numero di sequenze così elevato (400 milioni di basi di alta qualità per in una corsa di circa 10 ore) che con le tecniche molecolari classiche sarebbe impossibile ottenere. Inoltre, l'alto numero di sequenze ottenute permette di catturare sequenze di organismi rari altrimenti non determinati.

Questa strategia di nuova generazione è basata sull'amplificazione massiva di frammenti di DNA di molecole target (gene-target approach sequencing) atte sia all'identificazione dei microrganismi a diversi livelli tassonomici (DNA barcoding *sensu lato*) che alla caratterizzazione di geni funzionali chiave per l'ecosistema studiato.

Dal 2009 a oggi sempre più gruppi di ricerca hanno utilizzato questo nuovo approccio negli studi di metagenomica volti ad analizzare le comunità fungine totali presenti in diversi ecosistemi: Buée et al. (2009) su suoli forestali francesi, Jumpponen et al. (2009 and 2010) sulla fillosfera e rizosfera di *Quercus* spp., Ghannoum et al. (2010) sull'apparato boccale di individui sani, Lim et al. (2010) su suoli di tre isole del Mar Giallo in Korea, Rousk et al. (2010) su aree a pH variabile di suoli agrari, Tedersoo et al. (2010) su suoli

tropicali del Korup National Park in Cameroon e Wallander et al. (2010) in impianti forestali di *Picea abies* in Svezia.

Fino a ora soltanto 2 gruppi di ricerca hanno focalizzato la loro attenzione sulla componente fungina AM (Öpik et al., 2009; Lumini et al., 2010). Öpik e colleghi (2009) hanno utilizzato la strategia del pirosequenziamento per l'analisi delle comunità di AMF in radici di differenti piante erbacee in una foresta estone. Questo studio ha aumentato il numero di taxa fungini AM rilevati nello stesso sito forestale: 20 taxa in più rispetto ai 31 taxa precedentemente trovati utilizzando un approccio classico di clonaggio e sequenziamento (Öpik et al., 2008), evidenziando così una maggiore e inattesa diversità fungina. Il nostro gruppo, invece ha utilizzato la strategia del pirosequenziamento per caratterizzare e confrontare le comunità di AMF presenti in un sito mediterraneo (Berchidda, Olbia) in cinque suoli lungo un gradiente di uso del territorio (vigneto lavorato, vigneto inerbito, erbaio, pascolo, formazione forestale a *Quercus suber* – sughereta) (Lumini et al., 2010).

Questo studio è il primo e offre il più grande set di dati di sequenza AMF finora ottenuti da suolo. Esso ha utilizzato un approccio di “gene-target pyrosequencing” basato sull'amplificazione massiva di frammenti di rDNA (18S-SSU) come molecola target utilizzando diversi set di primer ritenuti adatti all'amplificazione di *taxa* appartenenti a *Glomeromycota*. Uno degli aspetti più critici del nostro studio è stato l'identificazione delle sequenze ottenute. Il primo passaggio dell'analisi bioinformatica delle sequenze ottenute è stata la creazione di *Operational Taxonomic Units* (OTUs) con un grado di similarità del 97%. Un'OTU, infatti, è definita come un gruppo di sequenze aventi non più del 3% di dissimilarità l'una dall'altra. Questo valore percentuale non è scelto casualmente, in quanto esso consente una discriminazione a livello di specie (Hugenholtz et al., 1998; Sait et al., 2002; Schloss et al., 2004).

Dopo aver identificato ciascuna OTUs è stato stabilito di utilizzare esclusivamente quelle formate da sequenze di lunghezza ≥ 200 bp. Questa soglia ha permesso di escludere le sequenze troppo corte e non sufficientemente significative per individuare in modo sicuro un organismo. Infatti i *database* che raccolgono sequenze di specie fungine AM non sono ancora sufficientemente sviluppati per consentire un'analisi completa delle comunità del suolo e solo con il tempo e con nuove strategie metodologiche sarà possibile ovviare a questa mancanza. Un primo passo in questo senso è l'open-access *database* MaarjAM (<http://maarjam.botany.ut.ee>) che comprende la maggior parte delle sequenze disponibili di *Glomeromycota* e i relativi metadata associati (Opik et al., 2010). Tale *database* infatti può guidare e aiutare il corretto

assegnamento delle sequenze ottenute ai diversi livelli tassonomici voluti (ordine, genere, specie).

Da un punto di vista ecologico, il principale risultato che emerge dal nostro studio sulle comunità fungine AM presenti nel suolo è l'inaspettata biodiversità rilevata negli ambienti analizzati arrivando a evidenziare fino a 74 *taxa* virtuali di *Glomeromycota* in un unico terreno. Questo risultato rappresenta il numero più alto di *taxa* finora descritti in un singolo suolo. In particolare i *taxa* appartenenti a *Glomerales* sono risultati dominanti in tutti e cinque i suoli indagati (vigneto lavorato, vigneto inerbito, erbaio, pascolo e la formazione forestale a quercia da sughero). Questo risultato non è casuale dato che tale *taxon* comprende il maggior numero di funghi AM noti al momento e predominanti sia in simbiosi con svariati ospiti vegetali che in moltissimi ambienti: dai suoli a coltivazione intensiva alle foreste tropicali e boreali, passando per le praterie e i pascoli (Öpik et al., 2006).

L'analisi condotta e i risultati ottenuti portano a una serie di considerazioni relative sia alla biodiversità complessiva del sito mediterraneo oggetto di studio sia di quella individuata singolarmente nei cinque sistemi agroforestali. Infatti, utilizzando i valori dell'indice di Shannon-Wiener per una stima della biodiversità dei funghi AM presente nei cinque diversi suoli si è notato che la biodiversità maggiore si trova nel pascolo, mentre quella più bassa nell'erbaio. Questo trova una spiegazione valutando la tipologia di ambiente: il primo ha un carattere più "naturale", mentre il secondo è un sito "artificiale" in quanto sottoposto annualmente a pratiche agronomiche che, è stato dimostrato, portano a una riduzione della biodiversità di AMF (Jansa et al., 2002; Öpik et al., 2006). Un altro dato significativo che emerge è il tasso di AMF trovato nel vigneto inerbito, superiore rispetto a quello del vigneto lavorato. Questo risultato conferma e suggerisce, in accordo con altri studi (Hijri et al., 2006, Balestrini et al., 2010), come attività agronomiche poco perturbanti, inclusa la rotazione colturale e il mantenimento della copertura vegetale, predispongano il suolo a preservare e incrementare il suo "capitale genetico" di funghi AM. Il valore dell'indice di Shannon-Wiener ottenuto nella formazione forestale a *Quercus suber* è risultato essere il più basso in assoluto. Questo non stupisce se si considerano le caratteristiche ecologiche della sughereta che è colonizzata prevalentemente da altri simbionti fungini, quelli ectomicorrizici. Infatti è noto che la presenza di specie arboree e arbustive determina la sostituzione delle comunità fungine endosimbiotiche (AMF) con gruppi micorrizici aventi altre peculiarità (Girlanda et al., 2007).

In generale, i risultati ottenuti hanno evidenziato l'influenza di due fattori diversi sulla biodiversità fungina AM: input antropico e caratteristiche eco-

logiche. Altri input antropici (ad esempio l' erbaio) hanno determinato bassa biodiversità AMF e vice-versa. Allo stesso modo, la presenza di tratti forestali (come nella formazione a quercia da sughero) determina una riduzione della diversità AMF.

PROBLEMATICHE LEGATE ALLO STUDIO DEL METAGENOMA FUNGINO DEL SUOLO

Considerando la probabile diffusione di approcci di metagenomica per la caratterizzazione della biodiversità fungina, basati sia su tecnologie di sequenziamento tradizionali che nuove, alcune considerazioni generali sui problemi inevitabili, che dovranno essere affrontati, sono obbligatorie.

Il primo problema che deve essere affrontato in uno studio di metagenomica è la strategia di campionamento, valutando criticamente le tecniche e il disegno sperimentale che si intende utilizzare per evidenziare il maggior numero di specie fungine presenti nei campioni. Infatti si deve tener presente la grande eterogeneità spaziale dell'ambiente suolo. Quando si studia la diversità fungina, solitamente si utilizzano repliche di 1-5 g di suolo per ciascun campione. Uno dei problemi legati a questo tipo di campionamento è l' intrinseca eterogeneità presente in ogni suolo. Il rischio è quindi quello di rilevare solo le comunità dominanti sottostimando la biodiversità. Alcuni autori suggeriscono di effettuare campionamenti su bassa scala, con numerosi prelievi in uno spazio limitato, in modo da valutare la diversità fungina a livello di micro-*habitat*. Un criterio base per cercare di ottimizzare i risultati è quello di effettuare campionamenti *random*: il campionamento casuale, infatti, permette a ogni campione di avere la stessa identica probabilità di essere scelto come elemento rappresentativo del sistema che si sta analizzando. In questo modo si ha il vantaggio di eliminare gli errori sistemici aumentando la significatività statistica dei risultati trovati, ovvero la loro attendibilità. Tuttavia, nelle comunità microbiche complesse, come quelle presenti nel terreno, una grande frazione di specie fungine è presente in basse quantità e anche con i recenti progressi nelle tecnologie di sequenziamento, un censimento completo di tutte le specie fungine, risulta essere un obiettivo difficile da raggiungere. Per questo, una strategia che preveda repliche statistiche dei campioni è sicuramente obbligatoria per ottenere la migliore copertura della biodiversità studiata e per operare confronti di ambienti diversi (Prosser, 2010).

Una volta che il disegno sperimentale è deciso, il secondo problema che deve essere superato riguarda l'ottimizzazione della estrazione del DNA.

Questo passaggio è particolarmente difficile quando il campione esaminato è una matrice complessa, come il suolo. Estrazioni di DNA da campioni ambientali sono possibili utilizzando sia kit commerciali che protocolli “fatti in casa”. Tuttavia, in alcuni casi, come per i terreni ricchi di argilla e/o sostanze umiche, è necessario modificare i protocolli disponibili, al fine di ottenere un DNA di buona qualità. Diversi articoli hanno riportato errori associati all'estrazione del DNA dal suolo e le possibili soluzioni per aggirare questo problema (Feinstein et al., 2009).

Una volta che il DNA metagenomico viene estratto, il terzo problema che deve essere affrontato per lo studio di una comunità fungina, riguarda la scelta di una o più coppie di primer idonea per analizzare la biodiversità complessiva. Infatti, oltre alla mancanza di un set di primer unico, in grado di coprire tutti i maggiori raggruppamenti fungini (*Basidiomycota*, *Ascomycota*, *Zygomycota*, *Glomeromycota*) o di amplificare tutti i *taxa* attualmente descritti all'interno dei singoli raggruppamenti, la possibilità di utilizzare il pirosequenziamento ha portato in evidenza il problema della lunghezza dell'amplificato. La piattaforma di pirosequenziamento attualmente disponibile (GS FLX Titanium Series) permette di ottenere sequenze di una lunghezza media di 400 bp, che potrebbe non essere adeguata per discriminare i *taxa* in modo sufficientemente informativo scendendo a bassi livelli tassonomici o per valutarne le relazioni filogenetiche. Nonostante l'ampio passo compiuto grazie alla biologia molecolare questo problema è particolarmente rilevante in mancanza di un *database* di riferimento sufficientemente ampio e curato. Infatti i *database* che raccolgono più in generale le specie fungine non sono ancora sufficientemente sviluppati per consentire un'analisi completa delle comunità del suolo e solo con il tempo e con nuove strategie metodologiche sarà possibile ovviare a questa mancanza. Primi risultati in questo senso sono il *database* UNITE (<http://unite.ut.ee/>) che comprende circa 163500 sequenze provenienti da campioni fungini ben caratterizzati, essenzialmente funghi ectomicorrizici, (Abarenkov et al., 2010) e l' open-access *database* MaarjAM (<http://maarjam.botany.ut.ee>) che comprende la maggior parte delle sequenze disponibili di *Glomeromycota* e i relativi metadata associati (Opik et al., 2010).

Tali *database* possono infatti facilitare l'individuazione di artefatti biologici e tecnici, che sono molto frequenti, come è stato riportato in alcuni recenti studi che hanno utilizzato il metodo del pirosequenziamento (Quinlan et al., 2008, Kunin et al., 2010; Medinger et al., 2010). Oltre a ciò, c'è un crescente interesse per lo sviluppo di nuovi algoritmi che siano in grado di gestire insieme di dati di grandi dimensioni e di eliminare gli errori di sequenziamento

(Gomez-Alvarez et al., 2009; Quince et al., 2009). Infatti, con una corsa di pirosequenziamento, è possibile ottenere fino a 1.200.000 sequenze. Il grande numero di dati ottenuti con questa metodologia in un tempo relativamente breve porta a molte domande sulla loro gestione.

Il quarto problema riguarda l'identificazione della specie. Gli ecologi e biologi molecolari di solito identificano delle *Operational Taxonomic Units* (OTUs) cioè dei gruppi di sequenze aventi un determinato valore di similarità l'una con l'altra. Un'OTU, infatti, è definita come un gruppo di sequenze aventi non più del 3% di dissimilarità l'una dall'altra. Questo valore percentuale consente una discriminazione a livello di specie, mentre il 5% a livello di genere e il 10% a livello di famiglia/classe. Tuttavia, il livello di somiglianza scelto per la separazione delle OTU come specie unica è arbitrario e discutibile. Questo, naturalmente, è un argomento molto importante perché influenza direttamente il livello di biodiversità rilevato e non è di facile soluzione in quanto uno standard globale per definire le specie fungine non esiste e la diversità genetica varia da *taxon* a *taxon*. Tuttavia, sia il nostro gruppo che Öpik e colleghi (2009) hanno utilizzato il 97% come livello di cut-off per discriminare a un "livello di specie virtuali" le sequenze dei funghi AM.

Un altro problema riguarda la corretta identificazione delle sequenze. Molte delle letture ottenute non trova corrispondenza con alcuna sequenza depositata nelle banche dati. Ciò è dovuto alla percentuale molto bassa (0,6-1,3%, a seconda se si considera 1,5 o 3,5 milioni il numero stimato di specie fungine) delle sequenze fungine rappresentati nelle banche dati (Hibbett et al., 2009). Vi è inoltre il rischio che il crescente numero di studi basati su queste nuove tecnologie possa peggiorare tale situazione poiché molte delle sequenze depositate sono denominate "campione ambientale (environmental sample)" o "organismo sconosciuto (unknown organism)". Per questo motivo, la collaborazione tra tassonomisti, ecologi e bioinformatici è necessaria per stabilire degli standard accettati da tutti al fine di individuare, descrivere e registrare nuove specie fungine, non solo utilizzando metodologie tradizionali, ma anche le nuove risorse molecolari. Studi recenti (Tedersoo et al., 2010; Napoli, 2009) hanno confrontato le prestazioni del pirosequenziamento con approcci di sequenziamento tradizionali per la caratterizzazione di specie di funghi ectomicorizici. Anche se il pirosequenziamento e il metodo tradizionale hanno prodotto simili risultati dal punto di vista qualitativo, ci sono state significative differenze a livello della composizione tassonomica delle comunità fungine rilevati per mezzo dei due approcci, in particolare nel numero di taxa rari che sono stati recuperati (i cosiddetti "singleton", che sono *taxa* rappresentati da una sola sequenza).

Concludendo si può dunque affermare che rispetto ai metodi di sequenziamento tradizionali il pirosequenziamento risulta essere un potente strumento per la caratterizzazione delle comunità fungine del suolo.

RINGRAZIAMENTI

La Ricerca è stata finanziata dal Progetto Soil-Sink-FISR del Miur e dal Progetto Europeo ENDURE (European Network of Excellence). Si ringraziano il Dr. Alberto Orgiazzi e il Dr. Roberto Borriello che hanno collaborato alle ricerche e il Dr. Giuseppe Torrisi per l'elaborazione grafica della figura.

RIASSUNTO

Negli ultimi anni gli studi di metagenomica hanno offerto nuovi approcci per far luce sulle comunità microbiche in una grande varietà di ambienti. In questo contesto il pirosequenziamento viene utilizzato sempre più per indagare le comunità di microrganismi presenti nell'ambiente suolo. I funghi, che sono componenti essenziali della comunità microbica del terreno, dove agiscono come decompositori, agenti patogeni e simbionti micorrizici, sono stati invece largamente trascurati in queste ricerche. Tuttavia, gli ultimi due anni (2009-10) sono stati caratterizzati da un'esplosione di studi di metagenomica applicati alle comunità fungine del suolo e basati sulla tecnologia del pirosequenziamento. Lo scopo della presentazione è quello di sottolineare come l'utilizzo di un approccio di metagenomica basato sul pirosequenziamento (gene-target pirosequencing approach) può aiutare a comprendere la distribuzione, la composizione e la dinamica delle comunità fungine in suoli soggetti a diversi input antropici e in particolare quelle micorrizico arbuscolari che rappresentano il gruppo di funghi simbionti maggiormente diffuso in molti ecosistemi naturali e agrari.

ABSTRACT

Metagenomics is a relatively recent technology that was born thanks to the fast progress in genomics, with the main goal of sequencing the genome of all organisms that proliferate in a particular environment, or in a specific niche. These studies are in fact based on the assumption that a given ecosystem (an ocean, but also the human intestine) functions through the integration of metabolic activities that come from a variety of microorganisms. It becomes crucial, therefore, on one hand to get a list of microbes (and then describe the biodiversity of specific environment), but also know functionality of an environment through the annotation of the genes identified in the process of sequencing. Some metagenomic analyses achieved both objectives: for example, Craig Venter's group not only listed the prokaryotes present but also identified new genomic functions in oceans. For other highly complex and heterogeneous environments such as soil the first objective is to describe the microbial biodiversity.

REFERENCES

- ABARENKOV K., NILSSON R.H., LARSSON K.-H., ALEXANDER I.J., EBERHARDT U., ERLAND S., HØILAND K., KJØLLER R., LARSSON E., PENNANEN T., SEN R. ET AL. (2010): *The UNITE database for molecular identification of fungi e recent updates and future perspectives*, «New Phytologist», 186, pp. 281-285.
- BALESTRINI R., MAGURNO F., WALKER C., LUMINI E., BIANCIOTTO V. (2010): *Cohorts of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in Vitis vinifera, a typical Mediterranean fruit crop*, «Environmental Microbiology Report», 2 (4), pp. 594-604.
- BONFANTE P., GENRE A. (2008): *Plants and arbuscular mycorrhizal fungi: an evolutionary-developmental perspective*, «Trends Plant Science», 13, pp. 492-498.
- BONFANTE P., GENRE A. (2010): *Mechanisms underlying beneficial plant – fungus interactions in mycorrhizal symbiosis*, «Nature Communication», pp. 1-48.
- BRUNDRETT M.C. (2009): *Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis*, «Plant and Soil», 320, pp. 37-77.
- BUÉE M., REICH M., MURAT C., MORIN E., NILSSON R.H., UROZ S., MARTIN F. (2009): *454 pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpected high fungal diversity*, «New Phytologist», 184, pp. 449-456.
- FEINSTEIN L.M., SUL W.J., BLACKWOOD C.B. (2009): *Assessment of bias associated with incomplete extraction of microbial DNA from soil*, «Applied Environmental Microbiology», 75, pp. 5428-5433.
- GAMPER H.A., VAN DER HEIJDEN M.G.A., KOWALCHUK G.A. (2010): *Molecular trait indicators: moving beyond phylogeny in arbuscular mycorrhizal ecology*, «New Phytologist», 185, pp. 67-82.
- GANS J., WOLINSKY M., DUNBAR J. (2005): *Computational Improvements Reveal Great Bacterial Diversity and High Metal Toxicity in Soil*, «Science», 309 (5739), pp. 1387-1390.
- GHANNOUM M.A., JUREVIC R.J., MUKHERJEE P.K., CUI F., SIKAROODI M., NAQVI A., GILLEVET, P.M. (2010): *Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals*, «PLoS Pathogens», 6, p. e1000713.
- GIRLANDA M., PEROTTO S., BONFANTE P. (2007): *Mycorrhizal Fungi: Their Habitats and Nutritional Strategies*, in *The Mycota. IV. Environmental and Microbial Relationships*, a cura di Kubicek, C.P., Druzhinina I.S., Springer-Verlag: Berlin, 2nd edn., pp. 229-256.
- HAWSKWORTH D.L. (2001): *The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species revisited*, «Mycological Research», 105, pp. 1422-432.
- HIBBETT D.S., OHMAN A., KIRK P.M. (2009): *Fungal ecology catches fire*, «New Phytologist», 184, pp. 279-282.
- HIJRI I., SYKOROVA Z., OEHL F., INEICHEN K., MÄDER P., WIEMKEN A., REDECKER D. (2006): *Communities of arbuscular mycorrhizal fungi in arable soils are not necessarily low in diversity*, «Molecular Ecology», 15, pp. 2277-2289.
- HUGENHOLTZ P., GOEBEL B.M., PACE N.R. (1998): *Impact of culture independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity*, «Journal of Bacteriology», 180, pp. 4765-74.
- HUGENHOLTZ P., TYSON G.W. (2008): *Microbiology: metagenomics*, «Nature», 455, pp. 481-483.
- JANSA J., MOZAFAR A., KUHN G., ANKEN T., RUH R., SANDERS I.R., FROSSARD E. (2003): *Soil tillage affects the community structure of mycorrhizal fungi in maize roots*, «Ecological Application», 13, pp. 1164-1176.

- JUMPPONEN A., JOHNSON L.C. (2005): *Can rDNA analyses of diverse fungal communities in soil and roots detect effects of environmental manipulations - a case study from tallgrass prairie*, «Mycologia», 97, pp. 1177-94.
- JUMPPONEN A., JONES K.L. (2009): *Massively parallel 454-sequencing indicates hyperdiverse fungal communities in temperate Quercus macrocarpa phyllosphere*, «New Phytologist», 184, pp. 438-448.
- LIM Y.W., KIM B.K., KIM C., JUNG H.S., KIM B.S., LEE J.H., CHUN J. (2010): *Assessment of soil fungal communities using pyrosequencing*, «Journal of Microbiology», 48, pp. 284-289.
- LUMINI E., ORGIAZZI A., BORRIELLO R., BONFANTE P., BIANCIOTTO V. (2010): *Disclosing arbuscular mycorrhizal fungal biodiversity in soil through a land-use gradient using a pyrosequencing approach*, «Environmental Microbiology», 12, pp. 2165-2179.
- MEDINGER R., NOLTE V., PANDEY R.M., JOST S., OTTENWÄLDER B., SCHLÖTTERER C., BOENIGK J. (2010): *Diversity in a hidden world: potential and limitation of next-generation sequencing for surveys of molecular diversity of eukaryotic microorganisms*, «Molecular Ecology», 19, pp. 32-40.
- NAPOLI C. (2009): *Dissecting the dynamics of microbial communities in a natural truffle-ground: an approach of environmental genomics*, «PhD Thesis» pp. 1-152, Turin University.
- O'BRIEN H., PARRENT J., JACKSON J., MONCALVO J., VILGALYS R. (2005): *Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples*, «Applied Environmental Microbiology», 71, pp. 5544-50.
- ÖPIK M., METSIS M., DANIELL T.J., ZOBEL M., MOORA M. (2009): *Large-scale parallel 454 sequencing reveals host ecological group specificity of arbuscular mycorrhizal fungi in a boreonemoral forest*, «New Phytologist», 184, pp. 424-437.
- ÖPIK M., MOORA M., LIIRA J., ZOBEL M. (2006): *Composition of root-colonizing arbuscular mycorrhizal fungal communities in different ecosystems around the globe*, «Journal Ecology», 94, pp. 778-790.
- ÖPIK M., MOORA M., ZOBEL M., SAKS Ü., WHEATLEY R., WRIGHT F., DANIELL T. (2008): *High diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a boreal herb-rich coniferous forest*, «New Phytologist», 179, pp. 867-876.
- ÖPIK M., VANATO A., VANATO E., MOORA M., DAVISON J., KALWIJ J.M., REIER Ü., ZOBEL M. (2010): *The online database MaarjAM reveals global and ecosystemic distribution patterns in arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota)*, «New Phytologist», 188, pp. 223-241.
- PROSSER J.I. (2010): *Replicate or lie*, «Environmental Microbiology», 12, pp. 1806-1810.
- QUINLAN A.R., STEWART D.A., STRÖMBERG M.P., MARTH G.T. (2008): *Pyrobayes: an improved base caller for SNP discovery in pyrosequences*, «Nature Methods» 5, pp. 179-181.
- ROUSK J., BAATH E., BOOKES P.C., LAUBER C.L., LOZUPONE C., CAPORASO J.G., KNIGHT R., FIERER N. (2010): *Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil*, «ISME Journal», 10, pp. 1-12.
- SAIT M., HUGENHOLTZ P., JANSSEN P.H. (2002): *Cultivation of globally distributed soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in cultivation-independent surveys*, «Environmental Microbiology», 4 (11), pp. 654-666.
- SCHADT C.W., MARTIN A.P., LIPSON D. A., SCHMIDT S.K. (2003): *Seasonal dynamics of previously unknown fungal lineages in tundra soils*, «Science», 301, pp. 1359-61.
- SCHLOSS P.D., HANDELSMAN J. (2004): *Status of the Microbial Census*, «Microbiology and Molecular Biology Reviews», 68 (4), pp. 686-91.

- SCHLOSS P. D. AND HANDELSMAN J. (2006): *Toward a Census of Bacteria in Soil*, «PLOS Computational Biology», 2 (7), pp. e92.
- SMITH S.E., READ D.J. (2008): *Mycorrhizal symbiosis* 3rd edn. (Academic Press).
- TEDERSOO L., NILSSON R.H., ABARENKOV K., JAIRUS T., SADAM A., SAAR I., BAHAM M., BECHEM E., CHUYONG G., KÖLJALG U. (2010): *454 Pyrosequencing and Sanger sequencing of tropical mycorrhizal fungi provide similar results but reveal substantial methodological biases*, «New Phytologist», 188, pp. 291-301.
- VAN DER HEIJDEN M.G.A., BARDGETT R.D., VAN STRAALLEN N.M. (2008): *The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems*, «Ecology Letters», 11 (3), pp. 296-310.
- WALLANDER H., JOHANSSON U., STERKENBURG E., BRANDSTRÖM DURLING M., LINDAHL B.D. (2010): *Production of ectomycorrhizal mycelium peaks during canopy closure in Norway spruce forests*, «New Phytologist», 187, pp. 1124-1134.