

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA**

SCUOLA DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI  
(DISTAV)

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA TERRA, DELL'AMBIENTE E  
DELLA VITA

Corso di Laurea Magistrale in Biologia ed Ecologia Marina

**Caratterizzazione micologica di sedimenti marini profondi della  
piana abissale di Tolone**

Relatori:

*Mirca Zotti*

*Grazia Cecchi*

Candidato:

*Michael De Benedetto*

Correlatore:

*Simone Di Piazza*

Anno accademico 2021/2022

# Indice

<b>Introduzione</b> .....	1
<b>Capitolo 1</b> .....	2
<b>1.1 Funghi marini</b> .....	2
<b>1.2 Filogenesi e biologia</b> .....	3
<i>1.2.1 Ascomycota</i> .....	3
<i>1.2.2 Basidiomycota</i> .....	4
<i>1.2.3 Chytridiomycota</i> .....	4
<i>1.2.4 Funghi anamorfi</i> .....	5
<b>1.3 Adattamenti all'ambiente marino</b> .....	6
<b>1.4 Ruolo ecologico</b> .....	7
<i>1.4.1 Saprotrofi</i> .....	7
<i>1.4.2 Simbionti mutualistici</i> .....	8
<i>1.4.3 Parassiti</i> .....	9
<b>1.5 Ambienti e substrati di crescita</b> .....	10
<i>1.5.1 Ecosistema delle mangrovie</i> .....	10
<i>1.5.2 Macroalghe</i> .....	10
<i>1.5.3 Ecosistema delle fanerogame marine</i> .....	11
<i>1.5.4. Ecosistema delle paludi salate</i> .....	11
<i>1.5.5 Ecosistema corallino</i> .....	12
<i>1.5.6 Mare profondo</i> .....	13
<i>1.5.7 Ambienti ipersalini</i> .....	13
<b>1.6 Applicazioni biotecnologiche</b> .....	14
<b>Capitolo 2</b> .....	15
<b>2.1 Sito oggetto di studio</b> .....	15
<b>Capitolo 3</b> .....	16
<b>3. 1 Materiali e metodi</b> .....	16
<i>3.1.1 Campionamento dei sedimenti</i> .....	16
<i>3.1.2 Caratterizzazione micologica</i> .....	16
<i>3.1.3 Protocollo per l'isolamento dei ceppi fungini</i> .....	17
<i>3.1.4 Identificazione morfologica dei ceppi fungini</i> .....	17
<i>3.1.5 Identificazione molecolare dei ceppi fungini</i> .....	21
<b>Capitolo 4</b> .....	22

<b>4.1 Risultati dell'isolamento dei ceppi fungini</b> .....	22
<b>4.1.1 Campione 1</b> .....	22
<b>4.1.2 Campione 2</b> .....	24
<b>4.1.3 Campione 3</b> .....	27
<b>4.1.4 Campione 4</b> .....	29
<b>Capitolo 5</b> .....	31
<b>5.1 Discussioni</b> .....	31
<b>5.1.1 Ricchezza specifica e abbondanza</b> .....	31
<b>5.1.2 Analisi ecofisiologica e pattern di distribuzione</b> .....	33
<b>5.1.3 Efficienza di crescita</b> .....	35
<b>Conclusioni</b> .....	37
<b>Bibliografia</b> .....	39

## Introduzione

I funghi sono componenti essenziali della biosfera, hanno un ruolo cruciale nel ciclo dei nutrienti e con i batteri risultano i più importanti organismi decompositori soprattutto di materia organica. Essi possono, inoltre, essere sia organismi simbiotici mutualisti, soprattutto con le piante superiori, sia simbiotici parassitici nei confronti di piante e animali (uomo compreso). Queste strategie ecologiche sono state ampiamente esplorate negli ecosistemi terrestri, mentre il ruolo dei funghi nell'ambiente marino è decisamente meno investigato.

I funghi marini sono stati presi in considerazione da tempi relativamente brevi e pertanto se ne ha ancora una conoscenza molto limitata. Negli ultimi decenni, però, lo studio di questi organismi ha subito un'importante accelerata, in relazione soprattutto all'impiego e alle potenzialità che questi organismi marini hanno in campo biotecnologico. È importante sottolineare anche come lo studio dei funghi negli ultimi anni sia stato facilitato da nuove tecnologie che hanno permesso l'accesso a luoghi difficilmente accessibili, come gli ambienti profondi e gli *Hydrothermal vents*. A ciò va aggiunto la scoperta e l'utilizzo di tecniche di sequenziamento, come metodo Sanger e *New Generation Sequencing* (NGS), che hanno dato una notevole spinta agli studi di genomica e metagenomica, permettendo di scoprire una notevole quantità di organismi in pochi anni. Nonostante ciò, le conoscenze sono ancora scarse, sia in termini di biodiversità, che in ambito biologico ed ecologico e risulta quindi importante continuare le ricerche in tal senso.

Questo studio si propone di indagare la diversità fungina in un ambiente marino estremo, al fine di ampliare le conoscenze dal punto di vista tassonomico, biologico, ecologico e biotecnologico.

Nel Capitolo 1 verranno illustrati alcuni aspetti generali sui funghi marini, quali: storia dello studio di questi organismi, filogenesi, biologia, ruolo ecologico, ambienti e substrati di crescita e applicazioni biotecnologiche.

Nel Capitolo 2 verrà presentato brevemente il sito oggetto di studio.

Nel Capitolo 3 verranno dettagliati i materiali e i metodi con cui è stato condotto il lavoro, a partire dal campionamento fino alle fasi di studio in laboratorio.

Nel Capitolo 4 verranno presentati i risultati ottenuti.

Nel Capitolo 5 verranno discussi i dati ottenuti anche in relazione letteratura scientifica di riferimento.

Infine, verranno tratte le conclusioni ed elencata la letteratura scientifica di riferimento esaminata.

# Capitolo 1

## 1.1 Funghi marini

Lo studio dei funghi marini inizia a metà 800' (Desmazieres 1849; Durieu de Mainsonneuve e Montagne 1869), ma il boom riguardante lo studio di questi organismi lo si ha tra il 1990 e gli anni 2000 quando diversi micologi di tutto il mondo hanno iniziato a scoprire e descrivere nuove specie all'interno dell'habitat marino. Ad oggi le specie descritte sono circa 1857, ma si ipotizza che possano essere oltre 12000 ([www.marinefungi.org](http://www.marinefungi.org)).

La definizione di fungo marino ha subito diverse modifiche nel corso degli anni. La prima, data da Sparrow (1961), si basava sulle esigenze fisiologiche, venivano infatti definiti funghi marini quelli in grado di svilupparsi completamente e riprodursi in ambiente marino (anche se esposti a salinità pari e oltre al 30% e/o continuamente sommersi o inondati ad intermittenza dalle maree). Successivamente Kohlmeyer e Kohlmeyer (1979) hanno dato una nuova definizione, ad oggi ancora molto utilizzata. Questi autori hanno diviso i funghi marini in due gruppi ecologici: funghi marini obbligati e facoltativi. I funghi marini obbligati sono quelli che crescono e sporulano esclusivamente in un habitat marino o di estuario; i funghi marini facoltativi sono quelli provenienti da ambienti d'acqua dolce o terrestri, in grado di crescere e sporulare in ambienti marini (Goncalves et al. 2022). Tuttavia, questa distinzione non è sempre facile né chiara da stabilire, ed è in qualche modo controversa. Negli ultimi anni si è cercato di ampliare questa definizione per includere anche ceppi terrestri a proliferazione marina. Per tali motivi ad oggi i funghi sono considerati un gruppo ecologico più che tassonomico di organismi che condividono caratteristiche eco fisiologiche. Viene così coniato il termine *marine derived fungi*, usato per la maggior parte dei funghi isolati da campioni marini non classificati in modo dimostrabile come microorganismi marini obbligati o facoltativi (Osterhage, 2001). Mahè et al. (2014) definiscono in base al ruolo attivo o passivo i funghi marini in tre categorie: funghi strettamente endemici ed attivi in mare, funghi ubiquitari, ma metabolicamente attivi in mare e funghi ubiquitari passivi in mare. Per determinare il ruolo attivo o passivo l'autore propone diversi metodi: studiare le strutture biologiche tramite coloranti, ricercare la funzione metabolica dei geni tramite la metagenomica, apprendere il ruolo in ambiente marino ed investigare la possibilità di crescita in coltura. Recentemente, Pang et al. (2016) hanno esaminato l'uso dei termini funghi marini e *marine derived fungi* e hanno proposto una definizione di più ampio respiro. Da questo punto in poi, i funghi marini sono definiti come qualsiasi fungo in grado di: crescere e/o sporulare (su substrati) in ambienti marini; formare relazioni simbiotiche con altri organismi marini; adattarsi ed evolvere o essere metabolicamente attivi in ambienti marini.

## 1.2 Filogenesi e biologia

Nel regno dei funghi sette *phyla* hanno “rappresentanti marini”: *Aphelidiomycota*, *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Blastocladiomycota*, *Chytridiomycota*, *Mortierellomycota* e *Mucoromycota*, ([www.marinefungi.org](http://www.marinefungi.org)).

Di seguito sono presentati i gruppi più importanti dal punto di vista del ruolo ecologico, dell’abbondanza e della ricchezza specifica, in ambiente marino.

### 1.2.1 *Ascomycota*

Questo gruppo comprende, sia funghi lievitiforimi unicellulari, che filamentosi pluricellulari. La riproduzione sessuata avviene mediante produzione di sporomi, definiti ascomi, di dimensioni anche importanti, nell’ordine del centimetro, e organizzazione complessa. Il micelio presenta setti semplici con corpi di Woronin. A livello della parete cellulare le componenti, nei filamentosi, sono chitina e glucani, mentre per i lieviti glucani e mannani, ai quali si accostano componenti proteiche e pigmenti. Possono essere saprotrofi, parassiti e simbionti mutualistici di piante, alghe e cianobatteri.

È il più importante gruppo fungino marino in termini di ricchezza specifica. Tra le classi più importanti e rappresentate annoveriamo: *Dothideomycetes*, *Eurotiomycetes*, *Leotiomycetes*, *Lichinomycetes*, *Orbiliomycetes*, e *Sordariomycetes*. Jones et al. (2015) hanno elencato un totale di 943 *Ascomycota* marini (805 funghi filamentosi in 352 generi), lieviti 138 specie (in 35 generi). I principali gruppi di *Ascomycota* marini includono gli ordini *Microascales* (*Halosphaeriaceae*), *Pleosporales*, *Eurotiales* e *Saccharomycetales*. Tra questi, gli ultimi due costituiscono *taxa* principalmente associati ad acqua di mare, sedimenti, substrati vegetali e animali (Jones et al. 2015). I *Dothideomycetes* sono un gruppo numeroso, conta 108 specie appartenenti a 64 generi, la maggior parte compresi nell’ordine delle *Pleosporales*. Quest’ultimo ordine comprende molte specie terrestri ben note, mentre quelle di ambiente marino risultano essere molte meno, suggerendo che questo gruppo di funghi marini potrebbe essersi evoluto recentemente in mare (Vijaykrishna et al. 2006; Jones et al., 2015). Questa visione è supportata da studi riguardanti alcuni meccanismi molecolari, che lasciano pensare che i *Dothideomycetes* marini si siano sviluppati da specie terrestri (Vijaykrishna et al. 2006; Suetrong et al. 2009). I *Sordariomycetes* si sono evoluti anch’essi da antenati terrestri (Vijaykrishna et al. 2006). Tra questi il gruppo più importante è la famiglia *Halosphaeriaceae* evolutasi dall’ambiente terrestre (Spatafora et al. 1998), prevalentemente marino con 166 specie presenti in 63 generi (Jones et al. 2015, 2017), molti dei quali monofiletici. Un altro ordine con *taxa* esclusivamente marini è *Lulworthiales* (Kohlmeyer et al. 2000). Molte specie di questo ordine si trovano obbligatoriamente su macroalghe o coralli (Kohlmeyer et al. 2000, Campbell et al. 2005).

### 1.2.2 *Basidiomycota*

*Phylum* di funghi prevalentemente filamentosi, organizzati in sporomi definiti basidiomi, che spesso presentano pseudotessuti complessi. Generalmente, i basidiomi dei *Basidiomycota* marini sono piccoli, raramente superiore a 5 mm di diametro, questo è attribuibile alle condizioni di elevata idrodinamicità alle quali sono sottoposti in habitat marino (Jones 1982, 1988; Binder Hibbett 2001). Non mancano però specie con basidi di dimensioni maggiori, infatti in alcuni casi questi possono essere riconosciuti ad occhio nudo. A questo gruppo appartengono la maggior parte dei funghi macroscopici, raramente si osservano specie lievitiiformi. Presentano un micelio settato, nella massima parte dei casi con un doliporo complesso. talora presentano connessioni a fibbia. La parete è composta di chitina e glucani, nei filamentosi, o chitina e mannani, nei lievitiiformi, a tali polisaccaridi sono accompagnate componenti proteiche e pigmenti. Sono soprattutto saprotrofi, non mancano però i simbionti ectomicorrizici e i patogeni di piante e alghe, raramente parassitano animali.

In ambiente marino risulta poco rappresentato, presenta 4 classi (*Agaricomycetes*, *Exobasidiomycetes*, *Tritirachiomycetes* e *Ustilaginomycetes*). Sono solitamente filamentosi e lieviti, molti endofiti. Sono stati elencati 22 specie in 17 generi per quanto riguarda i filamentosi e 85 specie in 39 generi per quanto riguarda i lieviti ([www.marinefungi.org](http://www.marinefungi.org)). L'elevato numero di generi di lieviti è dovuto ad un'importante revisione filogenetica di questi ultimi da parte di Liu et al. (2015a, b, c) e Wang et al. (2015a, b).

### 1.2.3 *Chytridiomycota*

*Phylum* meno evoluto rispetto ai precedenti. Presentano un tallo tipicamente unicellulare che si ancora ai substrati per mezzo di rizoidi, i quali sono anche adibiti all'assorbimento di nutrienti dai substrati stessi. Presentano zoospore monoflagellate, mobili in acqua, e sono cenocitici. Nella maggior parte delle specie il tallo si trasforma interamente in uno sporangio all'interno del quale si ha clivaggio, con formazione di zoospore. Sono inoltre in grado di produrre spore di resistenza, a parete spessa, che perdurano nel tempo in condizioni di dormienza. La parete è costituita da chitina e glucani. Possono essere saprotrofi o parassiti. In ambiente marino sono importanti parassiti di microalghe, svolgendo un ruolo cruciale nella regolazione del fitoplancton, in particolare, molte delle infezioni risultano a discapito delle diatomee. Ubiquitari sia in acque marine che dolci, sono stati rilevati anche in acque profonde ed anossiche, abbondanti nelle acque fredde.

Jones et al. (2015) elencano 27 specie in 13 generi. Tuttavia, secondo lavori di sequenziamento eseguiti a livello di sedimenti marini e colonna d'acqua questo gruppo viene sottostimato (Hassett et al. 2017). In altri lavori svolti nelle acque costiere europee i *Chytridiomycota* hanno rappresentato oltre il 60% delle sequenze di rDNA campionate (Massana et al. 2015; Richards et al. 2015). Inoltre, altri studi hanno reso noto come questo gruppo risulti essere il più abbondante in acque artiche e sub-artiche (Hassett and Gradinger 2016; Hassett et al. 2017).

#### ***1.2.4 Funghi anamorfi***

Definiti anche funghi mitosporici, conidiali o imperfetti. Sono caratterizzati da cicli di riproduzione esclusivamente asessuata, per mitosi. In molti casi potrebbe non essere nota la riproduzione sessuata, in vero molti dei funghi appartenenti a questo gruppo potrebbero essere annoverati agli Ascomycota. Presentano spore mitotiche mono o pluricellulari definite conidi. Queste sono ospitate all'interno di strutture specializzate, i conidiomi, i quali sono classificati in quattro tipologie: sinnema, sporodochio, acervolo e picnidio. Il gruppo marino conta 143 specie.

Nell'ultima classificazione Jones et al. (2015) hanno elencato 300 taxa marini in 91 generi.

### 1.3 Adattamenti all'ambiente marino

I funghi marini sono sottoposti a pressioni abiotiche molto diverse rispetto alle loro controparti terrestri. Devono tollerare un'elevata salinità, l'esposizione alla luce ultravioletta, accesso limitato ai substrati di crescita e, in alcuni casi, una notevole pressione idrostatica. Inoltre, le correnti possono creare problemi a livello di ancoraggio e dispersione. Il fattore di stress più evidente negli oceani è l'elevata salinità che genera stress osmotico e ionico. Un meccanismo chiave nella risposta a condizioni iperosmotiche è la via HOG (*high-osmolarity-glycerol*), la quale regola la risposta di geni implicati nell'osmoregolazione (Plemenitaš 2021). Un altro fattore di adattamento potrebbe essere legato al fatto che i funghi si sono evoluti per la crescita ad alte concentrazioni ambientali di osmoliti, essendo in grado di svilupparsi all'interno degli stessi substrati di cui si nutrono (Gladfelter 2019). Per quanto riguarda l'elevata esposizione ai raggi ultravioletti, questa può essere contrastata con la produzione di importanti quantità di melanine, come accade nei lieviti neri. Un altro meccanismo di difesa è la produzione di essudati che vanno a generare melme, ciò si osserva soprattutto nei funghi implicati nella decomposizione del legno (Gladfelter 2019). Tali essudati, inoltre, coadiuvano l'ancoraggio ed impediscono la diluizione degli esoenzimi da parte dell'acqua (Gladfelter 2019). Al fine di disperdersi in ambiente acquatico un importante adattamento è la presenza di un flagello, ciò è comune nel gruppo fungino *Chytridiomycota* e nei *fungus-like* (*Hyphochytriomycota* e *Oomycota*). Altri gruppi, appartenenti per lo più ad *Ascomycota* e *Basidiomycota*, presentano adattamenti a livello delle spore, quali la presenza di forme o appendici che migliorano assetto e dispersione in colonna d'acqua, alcuni esempi sono i generi *Corollospora*, *Lulworthia*, *Pleospora* e *Ceriopsis*. Gli adattamenti per colonizzare l'ambiente marino profondo riguardano modifiche a livello trascrizionale, per la produzione di proteine che siano stabili a livelli di pressione elevati (Gladfelter 2019). Inoltre, un'ulteriore variazione è osservabile a carico delle membrane cellulari, queste presentano percentuali di acidi grassi insaturi elevati, al fine di migliorare l'elasticità delle membrane stesse.

## 1.4 Ruolo ecologico

I funghi marini sono una delle componenti principali nelle reti alimentari marine e possono presentarsi come saprotrofi, parassiti e mutualisti. In virtù delle loro attività ecologiche, hanno il potenziale per svolgere un ruolo di rilevanza nella regolamentazione del flusso di energia negli ecosistemi marini. Infatti, i funghi associati a organismi vivi e morti svolgono vari ruoli nel trasferimento di energia. Attualmente ci sono prove sufficienti che dimostrano come i funghi possano influenzare il flusso di energia negli oceani con diverse modalità: parassitosi dei produttori primari (Marano et al. 2012; Gutiérrez et al. 2016), decomposizione ed aumento della biomassa (Newell and Porter 2000), consumo e riciclo di materia organica, DOM (*dissolved organic matter*) e POM (*particulate organic matter*) (Wang et al. 2014; Gutiérrez et al. 2011), contributo all'incremento e alla variabilità della neve marina (pioggia di particolato organico e inorganico che si ritrova presso le profondità oceaniche) (Bochdansky et al. 2017), fonte di cibo per *grazers* e detritivori (Newell and Bärlocher 1993; Bärlocher and Newell 1994).

### 1.4.1 Saprotrofi

I funghi saprotrofi hanno un ruolo chiave nella degradazione della materia organica morta e nel ricircolo dei nutrienti. La colonizzazione ed il consumo degli organismi alla loro morte è un aspetto fondamentale del flusso di energia nella rete trofica. L'aumento del detrito porta ad un aumento della biomassa fungina, con conseguente aumento del materiale organico particolato (POM), composto dal detrito stesso e dai microrganismi ad esso associati. Questo aspetto risulta rilevante per la componente di organismi che si nutre di POM, come detritivori e *grazers*. Altro aspetto importante è la capacità dei funghi di alterare le proprietà biochimiche dei detriti, aumentando il loro valore nutrizionale e rendendoli disponibili alla colonizzazione di altre specie. Alcune delle migliori prove del ruolo dei funghi in questi processi provengono dallo studio condotto sui detriti delle macrofite costiere, come foglie di mangrovie, legno, vegetali delle paludi salate e macroalghe (Lee et al. 2017; Raghukumar 2017). Altri lavori Bai et al. (2018) hanno evidenziato come la colonizzazione della neve marina da parte dei funghi ed i *fungus-like* vada a modificare le concentrazioni di POM, le sue proprietà nutritive ed il tasso di sprofondamento della stessa. Questi aspetti risultano fondamentali per le comunità abissali, ed i funghi potrebbero giocare un ruolo chiave nella rete trofica di tali organismi. Infatti, studi condotti da Bochdansky et al. (2017) sulla neve marina della zona batipelagica hanno sottolineato come la somma della biomassa fungina e dei *fungus-like* possa essere maggiore della biomassa dei procarioti. A tal proposito, Gutiérrez et al. (2011, 2016) e Raghukumar (2017) affermano che la biomassa fungina in colonna d'acqua sarebbe confrontabile con quella batterica, ciò darebbe ulteriore importanza ai processi attuati dai funghi nei cicli di decomposizione e riciclo della materia nell'ecosistema marino.

### 1.4.2 Simbionti mutualistici

Secondo Jones (2011) le specie di funghi simbionti di alghe, piante marine e animali marini potrebbero attestarsi intorno a 6000. Gruppo molto diversificato distribuito in vari generi e ordini, per lo più appartenenti all'habitat terrestre, questi vivono come endobionti in macrofite, macroalghe e come simbionti nei licheni (Gueidan et al. 2009). Tuttavia, la loro importanza quantitativa non è stata adeguatamente studiata. Tra questi risultano importanti i funghi micorrizici che generano associazioni mutualistiche tra l'apparato radicale delle piante ed il micelio fungino, denominate micorrize. La pianta ricava sostanze minerali come azoto e fosforo, spesso limitanti per la sua crescita, mentre il fungo riceve fotosintetati utili al suo sviluppo. Alcuni esempi in ambiente marino riguardano *Gigaspora* sp. e *Glomus* sp., generi a cui appartengono specie che generano endomicorrize con piante marine, quali *Zostera marina* Linneaus, 1753 e *Thalassia testudinum* K.D.Koenig, 1805 (Hyde et al. 1998). Un esempio di ectomicorrize riguarda l'associazione tra *Posidonia oceanica* (L.) Delile, 1813 e Ascomycota del genere *Pleospora* (Borovec and Vohník 2018). Un'altra importante associazione mutualistica riguarda quella tra funghi e alghe/cianobatteri nei licheni, o funghi lichenizzanti. In questo caso il fungo ha un ruolo dominante, questo fornisce acqua e sali minerali all'alga ed in cambio riceve fotosintetati. Un'ulteriore prova del fatto che la relazione è sbilanciata in termini di importanza verso il fungo è il fatto che in caso di interruzione del rapporto mutualistico il fungo sopravvive indipendentemente, mentre l'organismo vegetale no. In ambiente marino sono comuni *Caloplaca* spp., *Xanthoria* spp. e *Verrucaria* spp. Un'altra relazione comune è la micoficobiosi, nella quale un fungo vive all'interno di macroalghe senza risultare un parassita, seppur simile, tale relazione risulta molto differente rispetto a quella che coinvolge i licheni. Nella micoficobiosi, infatti, l'organismo vegetale non necessita del fungo per sopravvivere. Inoltre, in questo caso il fungo vive immerso nel partner fotosintetico, mentre nei licheni è il fungo stesso a generare la struttura che circonda l'alga. Nella micoficobiosi il ruolo essenziale dell'alga è quello di svolgere la fotosintesi. Quello del fungo è meno evidente, ma potrebbe essere legato a trasferimenti di minerali all'interno del tallo, ad un effetto repellente sugli erbivori e, soprattutto, alla resistenza all'essiccazione dell'organismo vegetale che colonizza la zona di marea (Kohlmeyer et al. 1983).

Altra importante relazione è quella che intercorre tra funghi marini e poriferi. Ad oggi, tramite metodi colturali, sono stati isolate oltre 200 specie di funghi dai poriferi (Höller et al. 2000 Morrison-Gardiner, Sarah 2002; Pivkin et al, 2006, Gao et al. 2008). La natura e la funzione ecologica dei funghi che abitano le spugne rimane tutt'ora dibattuta. È stato proposto che i funghi che abitano le spugne appartengano a due categorie: funghi residenti e funghi transienti (Li et al. 2009). I funghi residenti sono specifici della spugna, mentre i funghi transienti sono derivanti da spore intrappolate nelle spugne durante il processo di alimentazione. Diversi studi supportano un'associazione simbiotica tra spugne e funghi. Prove della simbiosi di un lievito con spugne del genere *Chondrilla* sono state osservate in studi sul tessuto spugnoso adulto e sulle strutture riproduttive, indicando la trasmissione verticale del lievito simbiote (Maldonado et al. 2005). La risposta antifungina della spugna *Suberites domuncula* Olivi, 1792 a livello molecolare indica una relazione tra spugne e funghi (Perovic-Ottstadt, Sanja, 2004). Il trasferimento genico orizzontale di un introne

mitocondriale da un fungo a spugne del genere *Spirophorida* ha suggerito una relazione simbiotica tra funghi e spugne (Rot et al. 2006).

### ***1.4.3 Parassiti***

Come parassiti dei produttori primari, i funghi possono influire su produzione e riciclo della materia organica disciolta (DOM), inoltre attuano un importante controllo sulle popolazioni di microalghe. Tra questi ricoprono un ruolo fondamentale i *Chytridiomycota*, in particolare nelle acque fredde, dove risulta il gruppo dominante tra i funghi marini (Hassett and Gradinger 2016; Gutierrez et al. 2016). Ciò può influire in maniera importante sui produttori secondari. Altri organismi comunemente parassitati dai funghi sono coralli, spugne, nematodi, crostacei, molluschi e pesci. Un esempio è *Saprolegnia* spp. (Oomycota), patosista di pesci marini e di acqua dolce, capace di causare anche gravi danni agli impianti di acquacoltura (Bruno et al. 2011). Altro importante parassita è *Aspergillus sydowii* (Bainier & Sartory) Thom & Church, 1926, responsabile dell'aspergillosi, malattia diffusa in diversi gruppi di coralli, come gorgonie, sclerattinie e madrepora (Gleason et al. 2017). Altro esempio riguarda *Aspergillum tubigenis* R.Mosseray, 1934, fungo facente parte del gruppo degli aspergilli neri, il cui capostipite è *Aspergillus niger* van Tieghem, 1867. Molto diffusi nell'ambiente, normalmente sono saprotrofi ma con importanti capacità opportuniste, rivelandosi patogeni sia per l'uomo che per animali terrestri e marini. In ambiente marino può trovarsi associato al porifero *Chondrosia reniformis* Nardo, 1847, del quale può essere patogeno, causando gravi infezioni che possono portare alla morte dell'ospite (Greco et al. 2019).

## 1.5 Ambienti e substrati di crescita

### 1.5.1 Ecosistema delle mangrovie

Questo ecosistema presenta la maggiore presenza e varietà di funghi marini al mondo. Dati provenienti da 80 paesi ci informano che attualmente sono noti circa 500 funghi marini tipici di questo habitat, distribuiti su 69 specie di mangrovie, sedimenti e acqua di mare (Jones et al. 2019). I funghi marini sono distribuiti nei mangrovi di tutto il mondo, con una maggiore ricchezza specifica negli oceani Indiano e Pacifico, rispetto all'Atlantico (Schmit and Shearer 2003). Questo dato va di pari passo con la ricchezza specifica delle mangrovie, che, infatti, risulta maggiore nelle zone tropicali indiane e pacifiche (Schmit and Shearer 2003). L'elevata biomassa prodotta dalle mangrovie agisce da substrato di crescita per i funghi. In questo ambiente il gruppo più rappresentato è quello dei funghi endofiti, in grado di diventare saprotrofi alla morte dell'ospite vegetale, ma sono abbastanza rappresentati anche i parassiti. Tra i saprotrofi hanno rilevanza i lignicoli, in grado di degradare la lignina tramite cellulasi ed emicellulasi. Si ha una sorta di successione di specie che colonizzano il legno di mangrovia in decomposizione. Sono descritte tre fasi distinte: *early*, *intermediate* e *late*, solo un ridotto numero di specie è presente in tutte le fasi della decomposizione, la maggior parte solo in alcune. In generale il picco di biodiversità si ha durante la fase *intermediate*. La biomassa fungina nei detriti fogliari raggiunge fino all'1.7% del peso secco. Tutto ciò favorisce la comunità detritivora. Tra le specie più comuni di questo habitat troviamo *Aurantiochytrium mangrovei* Raghukumar, 1988 e *Aurantochytrium limaceum* Yokoyama and Honda, 2007, entrambi *Oomycota*.

### 1.5.2 Macroalghe

Dopo le mangrovie, le alghe rappresentano il secondo substrato più colonizzato da parte dei funghi marini (Bugni and Ireland 2004). I funghi associati alle macroalghe possono essere parassiti, saprotrofi e simbionti. I gruppi più comuni sono *Penicillium*, *Aspergillus* e *Cladosporium*. L'associazione avviene con tutte le tipologie di macroalghe, verdi, rosse e brune. Un'importante associazione è la già citata micoficobiosi. Risultano importanti anche le relazioni patosiste, moltissime macroalghe sono infettate da una grande varietà di funghi (Jones et al. 2019). Tra questi molti sono *marine derived fungi* che si trovano anche su tronchi alla deriva. Sembra che i parassiti specifici siano limitati alle sole alghe brune, suggerendo una coevoluzione tra i due gruppi (Harvey et al 2004; Zuccaro et al. 2008). Un esempio è *Haloguignardia cystoseira* J. Kohlmeyer & V. Demoulin, 1981, fungo marino obbligato parassita di alghe brune del genere *Cystoseira* (Alongi et al. 1999).

### ***1.5.3 Ecosistema delle fanerogame marine***

In questo ecosistema troviamo funghi parassiti, endofiti e saprotrofi. Per endofita si intende un organismo endosimbiote associato esclusivamente alle cellule vegetali. Questi possono essere associati sia alle foglie che alla rizosfera. Alcuni funghi a livello della rizosfera penetrano l'epidermide e lisano le pareti delle cellule ipodermiche della radice, andando a risiedere nel lume delle cellule ipodermiche e corticali. Probabilmente svolgono una funzione molto simile a quella ben nota nelle piante terrestri, andando a creare vere e proprie micorrize (Borovec and Vohník 2018). Risultano importanti anche i parassiti, soprattutto tenendo conto che le fanerogame, andando a creare vere e proprie praterie, generano uno degli ecosistemi più importanti dell'ambiente marino, al quale sono associate migliaia di specie. Normalmente le fanerogame producono difese chimiche contro la parassitosi e la predazione, questo però non evita la presenza di alcuni funghi e *fungus-like*, come *Labyrinthula zoosterae* D. Porter & Muehlst. in Muehlstein & Short, 1991. Questo parassita penetra nelle cellule fogliari e invade, il tessuto. L'infezione è molto rapida, infatti le cellule si muovono fino a 170 um/m (Ralph et al. 2002). La malattia si trasmette tramite contatto con una foglia infetta o con porzioni di piante staccate che fluttuano in acqua (Ralph et al. 2002). Le lesioni provocano la perdita dell'efficienza fotosintetica (Ralph et al. 2002). La malattia è scatenata da condizioni ambientali che stressano l'ospite, come avvenuto durante la grave epidemia degli anni 30', che ha portato alla scomparsa di oltre il 90% di *Zoostera marina* nelle coste atlantiche di Nord America ed Europa (Muehlstein et al. 1991; Ralph et al. 2002). Studi recenti effettuati in mar Mediterraneo hanno evidenziato la presenza di 210 taxa associati a fanerogame marine (Poli et al. 2021). In particolare, 196 associati a *Posidonia oceanica*, di cui 187 risultano esclusivi. Dei funghi isolati dalle fanerogame prese in esame, l'86% appartiene al *phylum Ascomycota*, il 9,8% a *Basidiomycota* e solo il 3,7% e lo 0,5% a *Chytridiomycota* e *Mucoromycota*, rispettivamente (Poli et al. 2021). Ciò ad ulteriore prova dell'importanza ecologica ed in termini di ricchezza specifica dei funghi marini in questo ricco ed importante ecosistema.

### ***1.5.4. Ecosistema delle paludi salate***

Ambiente in cui troviamo funghi simbiotici, endobionti e saprotrofi, tra questi, anche molti gruppi obbligati che si trovano esclusivamente come decompositori di queste piante. Le parti morte delle piante sono ampiamente colonizzate dai funghi, in certi casi, ancora prima di staccarsi dalla pianta stessa. Inoltre, i funghi endofitici e quelli del filloplano colonizzano i vegetali, o parti di essi in fase senescente, per poi cibarsene una volta morte. Come visto per le mangrovie, anche in questo caso la decomposizione è guidata da varie fasi. Una prima fase di lisciviazione dei composti organici, una seconda fase attiva di decomposizione ed una fase finale, in cui le foglie cadono nel sedimento per poi frammentarsi. È da notare, come nella terza fase, diversità e massa fungina diminuiscono a favore dei batteri. Studi effettuati su *Spartina alterniflora* Loisel. hanno evidenziato come i funghi siano importanti colonizzatori e decompositori di questi vegetali, infatti, la biomassa fungina risulta essere circa il 20% della massa fogliare secca detritica della pianta (Newell et al 1993; Graça et al 2000). I funghi marini sono importanti non solo nel ciclo di vita dei vegetali, ma influenzano

anche il comparto animale. Infatti, tramite il loro ruolo di decompositori rendono i detriti vegetali altamente nutritivi per molti detritivori che abitano questo ambiente, come il mollusco gasteropode *Littoraria irrorata* (Say, 1822) (Silliman et al. 2013).

### ***1.5.5 Ecosistema corallino***

In questo ambiente troviamo funghi epi- ed endobionti, in grado di crescere su sclerattinie e madrepora. In particolare, sono abbondanti i funghi endolitici, in grado di colonizzare gli scheletri carbonatici degli antozoi. Le ife dei funghi endolitici sono in grado di penetrare il substrato calcareo, risultano quindi importanti nel ruolo della bioerosione, sia di animali vivi che morti. Tra questi la maggior parte sono funghi marini facoltativi. Tra i funghi endolitici ricordiamo *Aspergillus sydowii* e *Penicillium avellaneum* Thom & Turesson, 1915 (Gleason et al. 2017). In condizioni ambientali normali, coralli e funghi vivono in simbiosi, mutualismo e commensalismo. Nel momento in cui alterazioni ambientali causano stress agli antozoi, i funghi possono diventare parassiti, causando anche gravi danni alle barriere coralline. Un esempio è il già citato *Aspergillus sydowii*. Questo fungo è un parassita opportunisto, infatti normalmente è un saprotrofo terrestre. Negli ultimi anni la diffusione è notevolmente aumentata nelle barriere coralline. Durante gli anni 1995 e 1996 ha causato la morte di oltre il 95% dei coralli caraibici (Smith et al. 1996; Nagelkerken et al. 1997). Ad oggi è stato segnalato in Australia, Singapore, mare delle Andamane e sulle coste del sud est asiatico. Nel 2017 è stato segnalato anche nel porto di Genova (Greco et al. 2017). Tuttavia, i funghi marini sono anche coinvolti in attività che mantengono la buona salute degli ecosistemi corallini (Roik et al. 2022). Il potenziale probiotico dei funghi associati alle barriere coralline rimane per lo più inesplorato, ma molti tratti fungini, in particolare alcune proprietà metaboliche, sembrano avere effetto benevolo sugli antozoi (Peixoto et al. 2021; Roik et al. 2022). Ad esempio, la mitigazione dello stress cellulare attraverso le proprietà antiossidanti dei probiotici è considerata una potenziale strategia per alleviare gli effetti dello stress da calore negli olobionti di corallo (Rosado et al. 2019, Dungan et al. 2021 Roik et al. 2022). Gli antibiotici ed i metaboliti secondari fungini potrebbero essere utili per i loro ospiti attraverso la protezione dai patogeni o come antifouling, ciò potrebbe aiutare a mantenere stabile la comunità microbica associata all'ospite in condizioni di stress (Ritchie 2006; Xu et al. 2015; Roik et al. 2022). Infine, i funghi marini sono anche coinvolti in benefici nutrizionali forniti per sostenere l'olobionte marino durante i periodi di bassa disponibilità di nutrienti o stress ambientale (Cardini et al. 2015; Roik et al. 2022). Inoltre, i funghi marini, essendo protagonisti nel ciclo dell'N, elemento limitante negli ecosistemi corallini oligotrofici, risultano rilevanti per l'omeostasi nutrizionale delle barriere coralline (Rädecker et al. 2015; Roik et al. 2022). Ciò è particolarmente importante in ottica del bleaching, stato morboso che segue l'espulsione di massa delle alghe endosimbionti intracellulari del corallo (Strake et al. 1988; Roik et al. 2022). È, infatti, noto come diversi *Nitrogen Cycling Pathways* siano implicati nel mantenimento o nella destabilizzazione della simbiosi corallo-alghe, sotto influenza delle condizioni ambientali (Rädecker et al. 2015, Pogoreutz et al. 2017; Roik et al. 2022). In quest'ottica, i funghi potrebbero svolgere un ruolo cruciale nella salute e nella

strutturazione del microbioma degli olobionti che vivono nella barriera corallina, come i coralli (Roik et al. 2022).

### ***1.5.6 Mare profondo***

Il mare profondo rappresenta un ambiente estremo, oltre i 200 m di profondità, caratterizzato da assenza di luce, elevate pressioni, basse temperature, ad eccezione degli *Hydrothermal vents* dove, si raggiungono i 400 °C, scarsità di O<sub>2</sub> e carenza di nutrienti. Nonostante le condizioni avverse i funghi sono in grado di colonizzare queste zone ostili, venendo osservati a migliaia di metri di profondità. Dalla prima scoperta avvenuta nel 1964 (Roth et al. 1964) sono stati identificate oltre 120 specie da diversi ambienti profondi (Nagano and Nagahama, 2012), quali *Hydrothermal vents*, *Cold seeps*, fosse oceaniche, fondi sabbiosi, ecc. Questi ambienti sono dominati da Ascomycota e Basidiomicota per la maggior parte associabili a specie presenti anche in ambiente terrestre, con alcuni funghi esclusivi di questi ambienti (Nagahama et al., 2001; Nagahama, 2003; Zhang et al., 2013). Qui i funghi sono importanti nel ruolo di biomineralizzatori, in particolar modo negli *Hydrothermal vents* (Xu et al. 2018), dove possono svolgere un ruolo chiave nell'equilibrio della ricca comunità ad essi associati. Sono in grado di colonizzare diversi substrati (acqua, sedimenti, legno, chitina, conchiglie calcaree) (Raghukumar et al. 2010), con la capacità di degradarli assumendo un ruolo chiave nei cicli biogeochimici di queste zone. Negli *hydrothermal vents* la maggior parte dei funghi è associata ad animali bentonici (Xu et al. 2017), tra questi alcuni sono stati identificati come parassiti (Moreira and Lopez-Garcia, 2003, Van Dover et al., 2007), suggerendo anche una funzione nella regolazione delle comunità dei *vents*. La capacità di abitare questi ambienti estremi fa sì che questi organismi sviluppino metodologie e producano sostanze, quali enzimi, in grado di farli sopravvivere a tali condizioni estreme. Ciò li rende importanti come possibili produttori di molecole di interesse biotecnologico.

### ***1.5.7 Ambienti ipersalini***

In questo ambiente si trovano soprattutto funghi appartenenti al gruppo degli Ascomycota. Si tratta di funghi xerofili o specie terrestri osomofile (Zalar et al. 2005). Essi presentano adattamenti particolari per tollerare le condizioni di salinità estrema. Uno dei più importanti è l'abbassamento del potenziale idrico intracellulare al di sotto di quello ambientale, al fine di facilitare il trasporto dell'acqua (Gunde-Cimerman et al 2009). Ciò avviene tramite sintesi ed accumulo di miscele di polioli, in particolare glicerolo (Gunde-Cimerman et al 2009; Plemenitaš 2021). Sono in grado di produrre particolari enzimi e spore in grado di sopravvivere in queste condizioni per settimane, inoltre hanno specifici adattamenti per la fluidità delle membrane biologiche e particolari vie di regolazione per la trascrizione dei geni (Gunde-Cimerman et al 2009). Tra i gruppi maggiormente rappresentati vi sono i lieviti neri (Zalar et al. 2005) e il genere *Wallemia* (Kralj et al. 2010), quest'ultimo considerato un modello di studio per gli adattamenti alle condizioni ipersaline.

## 1.6 Applicazioni biotecnologiche

La potenzialità dei funghi nell'ambito biotecnologico è ormai nota da secoli. Gli umani hanno iniziato a servirsi di questi organismi fin dai tempi antichi, basti pensare ai processi di lievitazione che portano alla produzione di cibi e bevande, quali pane, birra, ecc. I più importanti composti ricavati dai funghi sono i loro metaboliti secondari (laccasi, lipasi, cellulasi, cefalosporine, ecc.), ampiamente utilizzati in ambito industriale e farmaceutico. Tra questi l'esempio più celebre è la Penicillina, scoperta da Alexander Fleming nel 1928.

Il primo a studiare le potenzialità biotecnologiche dei funghi marini fu Giuseppe Brotzu, il quale, nel 1945, isolò *Acremonium crysogenum* (Thurum. & Sukapure) W. Gams, 1971. Da questo si ricavò la Cefalosporina C, un'importante antibatterico (Newton and Abraham 1955). Ad oggi si stima che siano oltre 4000 i *natural products* scoperti da funghi marini (Jones et al. 2019). La maggior parte della ricerca sui *natural products* nei funghi marini si è concentrata su alcuni generi: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* e *Cladosporium* (Imhoff 2016; Gonçalves et al. 2022). Tuttavia, gli studi continuano ad aumentare e sono stati estesi ad altri generi (Imhoff 2016). Considerando che lo studio dei funghi marini è una branca della micologia relativamente giovane e che moltissimi processi fisiologici e cellulari legati a questi organismi sono poco o per nulla conosciuti, è facile stimare che il potenziale biotecnologico di questi organismi sia estremamente elevato. Inoltre, c'è da considerare che la maggior parte degli studi si concentra sulla descrizione di questi composti, tramite test biologici *in vitro*, ne deriva che le applicazioni concrete, ad oggi, siano molto poche (Gonçalves et al. 2022). Le applicazioni maggiori si hanno dal punto di vista farmaceutico, attualmente 14 *natural products* marini sono approvati come farmaci ed altri 30 risultano in differenti fasi di studi clinici (Gonçalves et al. 2022; Papon et al. 2022).

Oltre all'ambito delle tecnologie rosse (farmaceutiche) e bianche (industriali), i funghi marini stanno acquisendo rilevanza anche a livello delle biotecnologie grigie (ambientali). Un esempio riguarda lo studio effettuato su *Zalerion maritimum* (Linder) Anastasiou, 1963 (Paço et al. 2017), fungo in grado di biodegradare le microplastiche di polietilene. Le microplastiche al giorno d'oggi rappresentano uno dei maggiori problemi ambientali legati ai comparti acquatici, questo ed altri possibili studi aprono le porte ad importanti prospettive future legate al biorisanamento ambientale.

È doveroso sottolineare quanto sia importante isolare i funghi tramite metodi colturali, di modo da poter produrre una micoteca (collezione di microrganismi fungini vitali). Questo, infatti, permette di poterli utilizzare e sfruttare quando necessario.

## Capitolo 2

### 2.1 Sito oggetto di studio

Il sito di campionamento è situato a 2443 m di profondità, 10 Km a largo di Tolone (sud-est della Francia) (Cutroneo et al. 2022). A questa profondità ci troviamo a livello della piana abissale (Cutroneo et al. 2022). Per quanto riguarda i parametri abiotici, la zona presenta principalmente sedimenti a granulometria fine, una temperatura di 13,3 °C ed una salinità di 38.48 PSU (Cutroneo et al. 2022). Dal punto di vista biotico è caratterizzata da scarsità di macrofauna e flora bentonica (Cartes et al. 2004; Cutroneo et al. 2022). Dal punto di vista oceanografico, l'area di studio si trova al confine tra il bacino ligure-provenzale ed il Golfo del Leone, questa zona è caratterizzata dalla presenza di una circolazione ciclonica superficiale di 50 km, la Corrente del Nord nota anche come Corrente Ligure-Provenzale-Catalana (Millot et al. 2005; Cutroneo et al. 2022). A causa dell'attività ciclonica l'area è interessata da massicci *downwelling* che hanno effetto su idrodinamicità e tasso di erosione della piana abissale (Cutroneo et al. 2022). È da notare, inoltre, che l'aria è fortemente antropizzata ed interessata da un intenso traffico navale (Cutroneo et al. 2022). Questo, unito alla particolare circolazione porta ad un aumento degli inquinanti nelle acque profonde. Ne deriva che la qualità delle acque possa risentirne, andando ad influenzare il comparto biologico presente.

È interessante, inoltre, evidenziare che lo studio che ha portato al campionamento dei sedimenti di interesse si inserisce all'interno di un progetto più ampio. Il campionamento dei sedimenti è stato effettuato durante una campagna oceanografica francese nell'ambito del progetto MEUST NUMerEnv, il quale fa utilizzo della struttura KM3NeT (AdriánMartínez et al. 2016; Cutroneo et al. 2022). KM3NeT è una nuova infrastruttura di ricerca costituita da una rete di telescopi per neutrini situati nelle acque profonde del Mediterraneo (KM3Net 2021) (Cutroneo et al. 2022). Gli scopi principali di questa struttura riguardano la ricerca in campo fisico, quali studio dei neutrini, della materia oscura ed effetti della gravità quantistica. Tuttavia, l'infrastruttura KM3NeT consente di eseguire anche studi biologici in acque profonde, come il monitoraggio della bioluminescenza ed il rilevamento acustico dei mammiferi marini (Cutroneo et al. 2022).

## Capitolo 3

### 3.1 Materiali e metodi

#### 3.1.1 Campionamento dei sedimenti

Il campionamento è stato effettuato il 21 ottobre 2019. Sono stati prelevati i sedimenti superficiali a 2443 m di profondità tramite l'HROV Ariane (Cutroneo et al. 2022) (Fig. 1). I sedimenti, tramite il braccio del ROV, sono stati posti dapprima all'interno di un contenitore in plastica posto all'interno del cestello del ROV stesso (Cutroneo et al. 2022). Il braccio robotico ha prelevato 3 porzioni di sedimento superficiale di circa 5 cm di spessore (Cutroneo et al. 2022) (Fig. 1). Una volta recuperato il ROV sulla nave, il sedimento è stato prelevato dal contenitore e diviso in quattro campioni conservati in barattoli di vetro con tappo rivestito in alluminio (Cutroneo et al. 2022). Dal momento del recupero del campione, a bordo della nave, fino al momento dell'analisi, i campioni sono stati conservati a 4 °C.



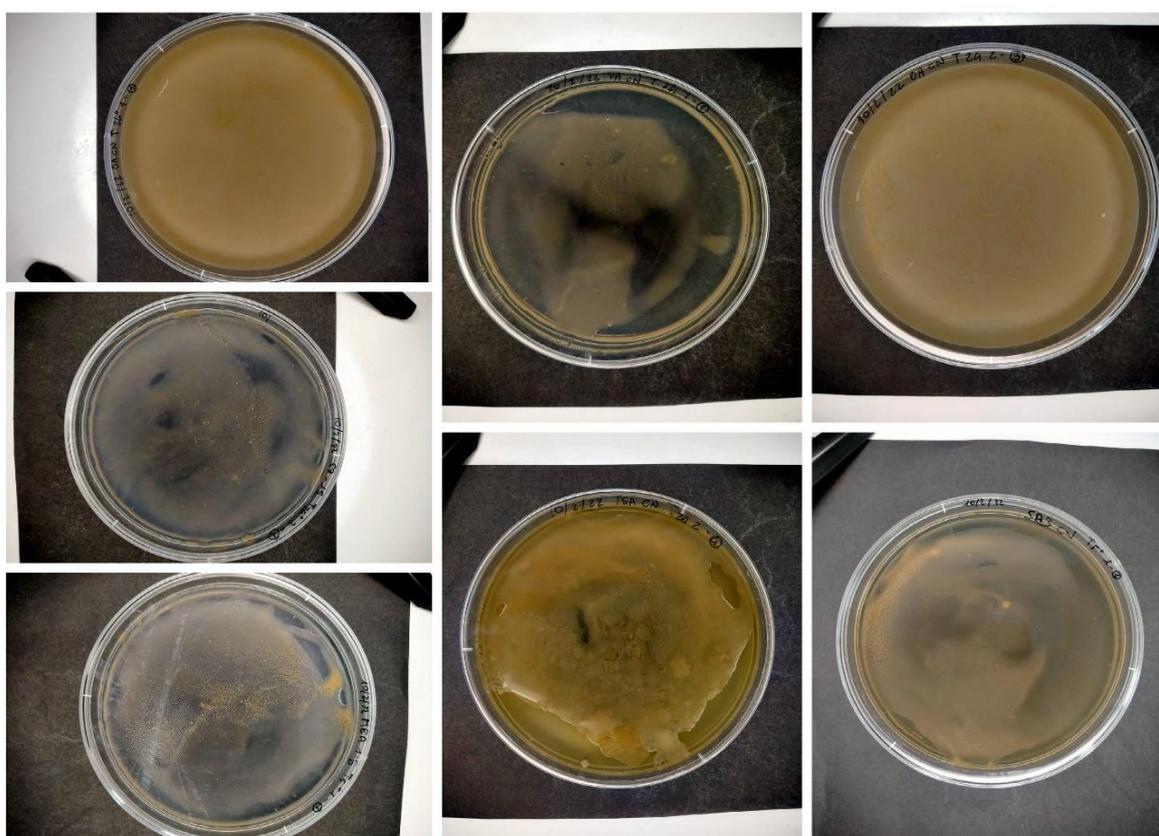
Fig. 1 HROV Ariane (sinistra). Campionamento tramite il braccio robotico (destra) (Cutroneo et al. 2022)

#### 3.1.2 Caratterizzazione micologica

La caratterizzazione micologica è avvenuta su 4 campioni di sedimento. Dapprima i sedimenti campionati sono stati diluiti con rapporto 1:10. Per la coltivazione dei funghi sono stati utilizzati 7 differenti terreni di coltura: *Czapek Dox Agar* (CDA); *Malt Extract Agar* (MEA); *Oatmeal Agar* (OA); *Potato Dextrose Agar* (PDA); *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA); *Yeast Extract Agar* (YA); *Tryptic Soy Agar* (TSA) (Fig. 2). I terreni sono stati preparati in laboratorio e, dopo opportuna sterilizzazione in autoclave a 120 °C, inoculati in piastre da 15 cm di diametro, alle quali è stato successivamente aggiunto il campione di sedimento diluito (1mL). Sono stati utilizzati terreni con tipologie e quantità di nutrienti differenti, concentrazione tal quale e concentrazione 1:5 al fine di favorire la crescita di più microfunghi possibili. Questi sono stati realizzati con concentrazione salina compatibile con quella della profondità di prelievo.

### 3.1.3 Protocollo per l'isolamento dei ceppi fungini

Per ogni tipologia di terreno sono state prodotte 8 repliche, per un totale di 56 repliche per campione. 2 repliche aventi terreno di coltura non diluito e temperatura di crescita di 24 °C, 2 repliche aventi terreno di coltura non diluito e temperatura di crescita di 5 °C, 2 repliche aventi terreno di coltura diluito 1:5 e temperatura di crescita di 24 °C, 2 repliche aventi terreno di coltura diluito 1:5 e temperatura di crescita a 5 °C. Le diluizioni 1:5 sono state effettuate per simulare l'ambiente oligotrofico in cui sono stati campionati i sedimenti. Per quanto riguarda le temperature, le piastre sono state incubate a 5 °C e 24 °C per permettere la germinazione di conidi, spore e forme di resistenza, in modo da favorire una maggiore diversità.

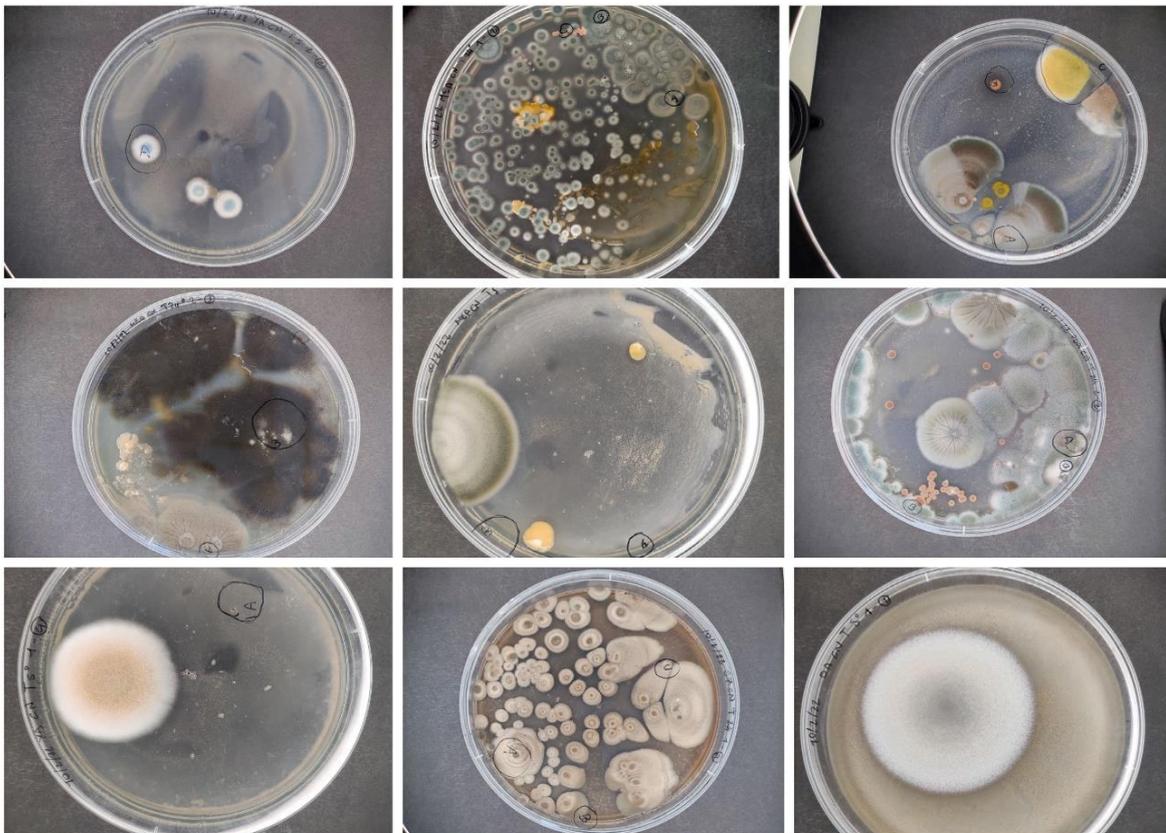


**Fig 2.** I sette terreni di coltura: *Czapek Dox Agar* (CDA); *Malt Extract Agar* (MEA); *Oatmeal Agar* (OA); *Potato Dextrose Agar* (PDA); *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA); *Yeast Extract Agar* (YA); *Tryptic Soy Agar* (TSA). Con la sigla (CN) si indica il terreno non diluito, la dicitura (1:5) indica il terreno diluito.

### 3.1.4 Identificazione morfologica dei ceppi fungini

Le 224 piastre sono state monitorate settimanalmente per due mesi. Durante il monitoraggio è stata fatta una stima qualitativa e quantitativa delle colonie. Il primo step ha previsto il conteggio delle differenti colonie (UFC), discriminate tramite caratteristiche morfologiche macroscopiche, quali: colore, dimensione e rugosità (Fig. 3). Il numero di colonie per ogni piastra è stato aggiornato settimanalmente per tutta la durata dell'esperimento. Identificate

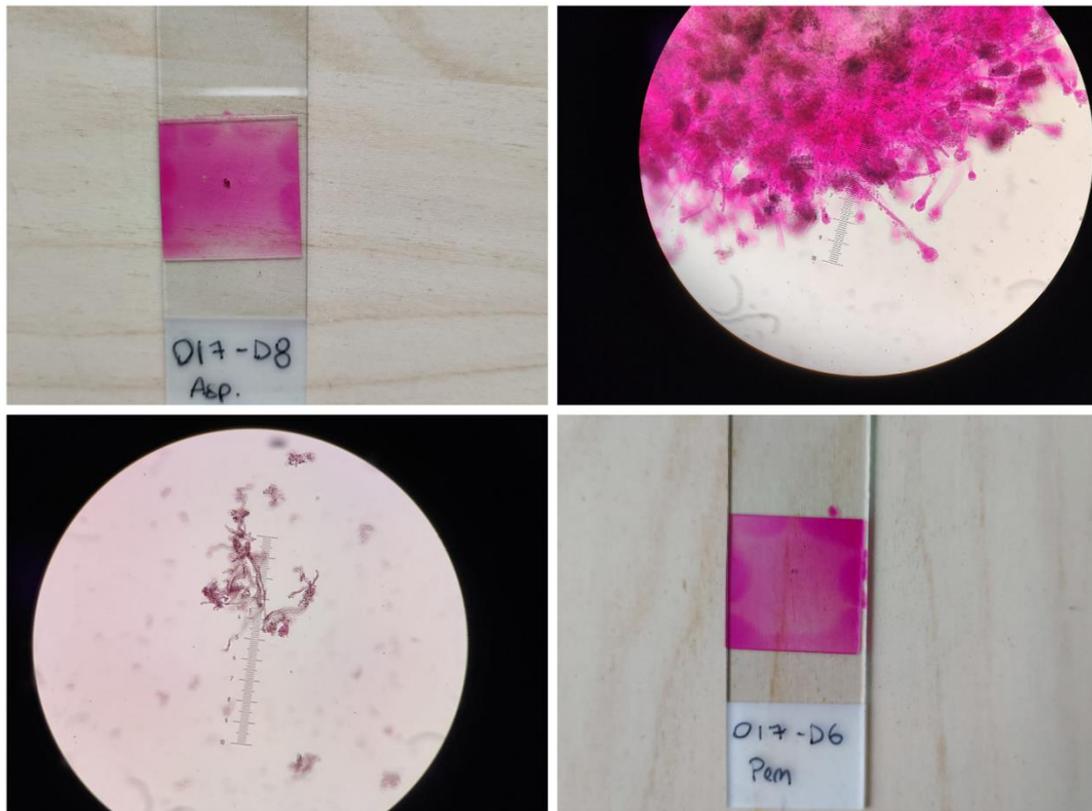
visivamente le colonie, è stato attuato un protocollo di isolamento delle stesse. Il protocollo ha previsto l'asportazione, sotto cappa, di parte della colonia dalla piastra originale di 15 cm di diametro ad una piastra vergine di dimensioni minori (Fig. 4). Quest'ultima contenente terreni di coltura MEA o YA, anch'essi con le stesse concentrazioni saline del sito di campionamento. Il prelievo delle colonie è stato effettuato tramite un'ansa metallica, precedentemente sterilizzata, strisciata dalle 3 alle 4 volte sul nuovo terreno di coltura, di modo da distribuire i funghi all'interno e al di sopra di esso. Effettuato l'isolamento, sulla nuova piastra è stato riportato lo stesso codice della piastra dalla quale è stata prelevata la colonia. Inoltre, sono state indicate le caratteristiche macroscopiche identificative. Infine, i vari isolamenti sono stati posti in incubatori alla stessa temperatura di crescita della piastra originale. Come per le piastre di 15 cm di diametro anche quelle per il trapianto sono state monitorate settimanalmente. Nei casi in cui l'isolamento non ha avuto successo, a causa della presenza di contaminazioni, il protocollo è stato ripetuto fino all'ottenimento della colonia pura di interesse. Al conseguimento del risultato le colonie pure sono state esaminate al fine di rilevare le caratteristiche morfologiche microscopiche, quali: analisi delle ife, dei conidi e dei conidiofori (Fig. 5; Fig. 6). L'analisi è stata effettuata, tramite microscopio ottico, su vetrini che presentavano porzioni della colonia di interesse colorate con il colorante "Fucsina". Tramite l'analisi di questi parametri è stata fatta un'identificazione preliminare, su base morfologica, delle potenziali specie isolate.



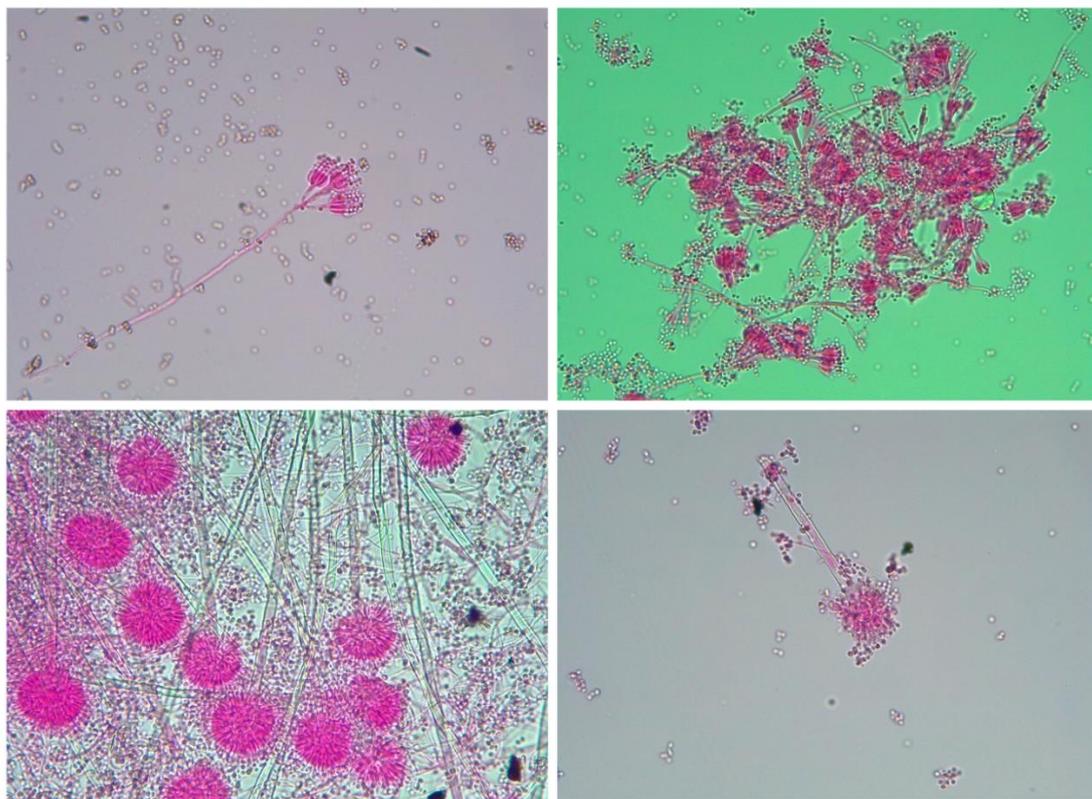
**Fig 3.** Terreni colonizzati da colonie fungine. Il cerchio nero contrassegnato da una lettera identifica una singola colonia tra le diverse presenti nella stessa piastra. Su ogni piastra è indicato il codice identificativo e la temperatura della camera climatica alla quale è stata collocata.



**Fig. 4.** Isolamenti. Su ogni piastra è indicato il codice identificativo e la temperatura della camera climatica alla quale è stata collocata. Su ogni piastra è indicato il codice identificativo della piastra originale da 15 cm dal quale è stato effettuato il trapianto (Fig. 3), la temperatura della camera climatica alla quale è stata collocata la piastra da 15 cm e le caratteristiche morfologiche macroscopiche necessarie all'identificazione della singola colonia.



**Fig. 5** In alto vetrino e dettaglio al microscopio di *Aspergillus restrictus*; In basso vetrino e dettaglio al microscopio di *Penicillium steckii*.



**Fig. 6** Dettaglio di conidi, conidiofori ed ife. In alto *Penicillium sp.*; In basso *Aspergillus sp.*

### 3.1.5 Identificazione molecolare dei ceppi fungini

L'analisi molecolare ha previsto l'estrazione del DNA da 100 mg di porzione di fungo vitale, tramite il metodo con *hexadecyltrimethylammonium bromide* (CTAB) (Doyle e Doyle 1987). Tale metodo è una modifica del protocollo di Saghai-Marroof et al (1984). Successivamente, il materiale genetico è stato amplificato tramite il protocollo di reazione a catena della polimerasi (PCR), secondo i seguenti passaggi: 1 × 5 min a 95 °C; 30–35 × (40 s a 94 °C; 45 s a 55 °C; 1 min a 72 °C); 1 × 10 min a 72 °C; e 1 × 10 °C per ∞ (Cecchi et al. 2021). L'amplificazione della regione ITS (*Internal Transcribed Spacer*), è stata ottenuta con l'impiego dei *primer* universali ITS1F/ITS4 (White et al. 1990; Gardes and Bruns 1993). L'ITS è una regione non codificante del DNA ribosomiale (DNAr), questa porzione del codice genetico è la maggiormente amplificata nella biologia molecolare fungina. Al termine del ciclo, i prodotti della PCR sono stati purificati e sequenziati da Macrogen Inc. (Seoul, Repubblica di Corea) (Cecchi et al. 2021). L'assemblaggio e l'editing delle sequenze sono stati eseguiti utilizzando Sequencher® (Gene Codes Corporation, versione 5.2) (Cecchi et al. 2021). L'assegnazione tassonomica dei campioni sequenziati è stata effettuata utilizzando l'algoritmo BLASTN, al fine di confrontare le sequenze ottenute con il database GenBank (Cecchi et al. 2021).

Alcune porzioni delle colonie isolate sono state destinate al *Cryostock*. Queste sono state conservate ad una temperatura di -20 °C nella collezione di microorganismi COLD-UNIGE JRU MIRRI – IT del Laboratorio di Micologia del Dipartimento di Scienze della Terra, dell'Ambiente e della Vita dell'Università di Genova. I funghi a tali temperature si mantengono in stato vitale, sono, quindi, capaci di germinare nuovamente in condizioni ambientali favorevoli. Questo permette di coltivarli nuovamente in caso di necessità.

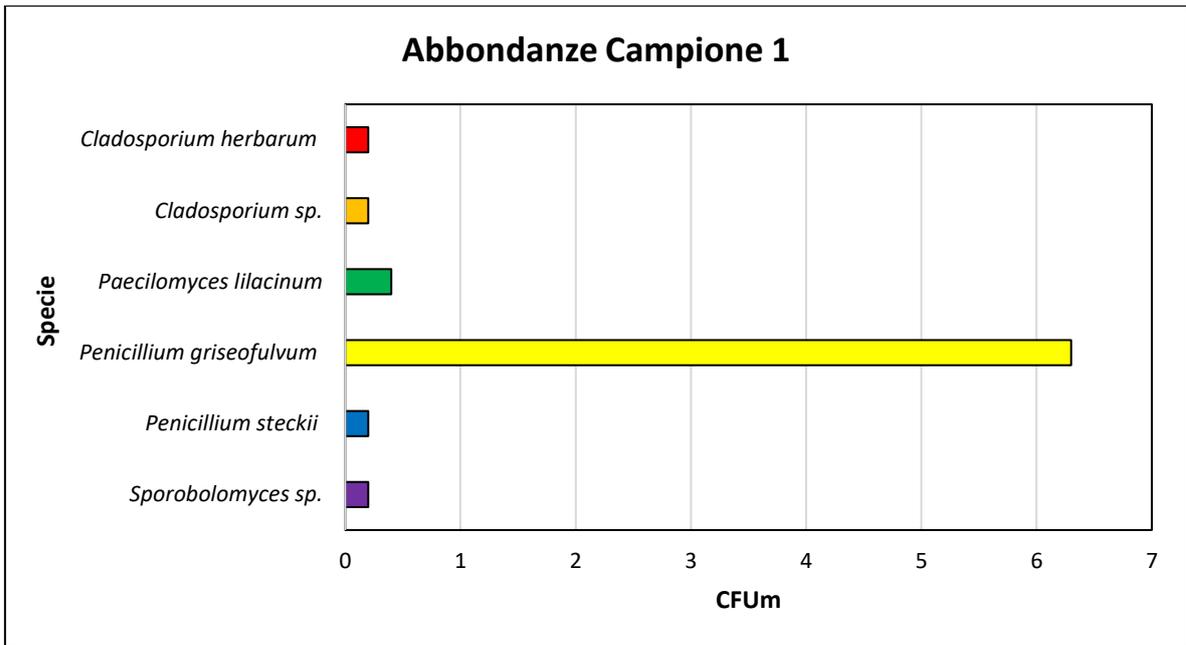
## Capitolo 4

### 4.1 Risultati dell'isolamento dei ceppi fungini

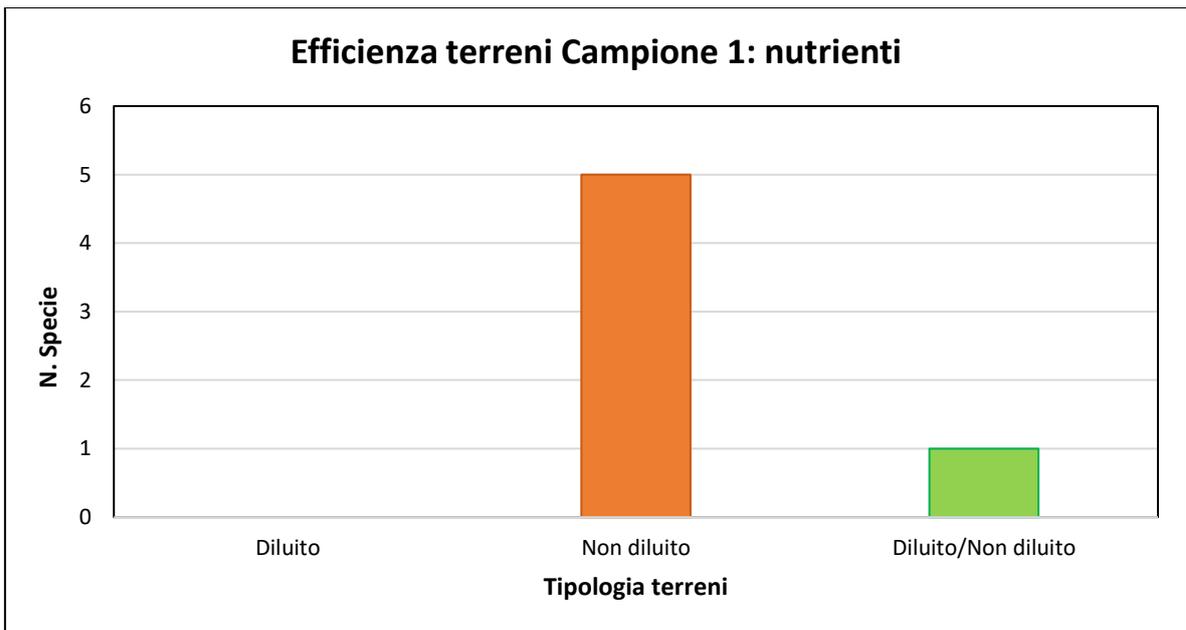
Sono stati isolati funghi da tutti e quattro i campioni. I Campioni sono frutto di una diluizione con proporzione 1:10. Su questa base, al fine di ottenere i CFU il conteggio delle colonie è stato moltiplicato per 10. In questo modo è stato calcolato il numero di CFU totali (CFUt), che tiene conto di tutte e 56 le repliche. È stato anche calcolato il valore medio di CFU per grammo di sedimento (CFUm), questo è stato ottenuto dividendo i CFUt per 56, il numero delle repliche per campione.

#### 4.1.1 Campione 1

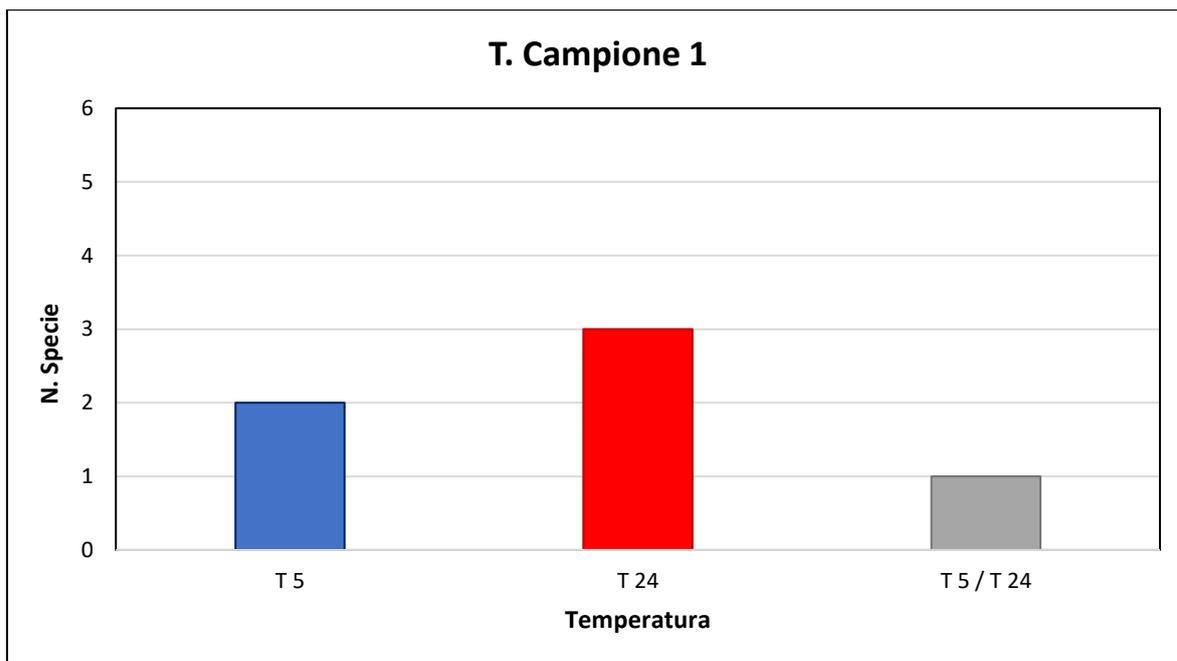
Sono state individuate sei specie. Il genere più rappresentato, in termini di abbondanza è *Penicillium* (*P. griseofulvum*, *P. steckii*) che presenta l'87% della totalità delle specie del campione (Fig. 7). Tra queste risulta dominante *P. griseofulvum* (350 CFUt; 6.3 CFUm), compone infatti l'82% delle specie totali. Segue *P. steckii* (10 CFUt; 0.2 CFUm). Al pari di *Penicillium*, in termini di ricchezza specifica, c'è il genere *Cladosporium* (*C. herbarum*, *C. sp.*). Entrambi sono presenti in egual misura (10 CFUt; 0.2 CFUm). Osserviamo successivamente il genere *Paecilomyces* (*P. lilacinum*) che conta 10 CFUt e 0.2 CFUm. Infine, abbiamo il genere *Sporobolomyces* del quale non è stato possibile risalire alla specie. Il terreno più performante risulta il MEA con tre specie su sei sviluppatesi su di esso. In generale i terreni non si sono dimostrati efficienti: la conta dei CFUt si attesta su 410, quella dei CFUm è 7.3. Si osserva un comportamento fortemente selettivo da parte delle varie specie. A parte *P. griseofulvum*, cresciuto su quattro media differenti, le altre specie si sono sviluppate su un singolo terreno di coltura. È rilevante, inoltre, come quest'ultima specie sia stata l'unica capace di crescere su terreno diluito 1:5 (Fig. 8). Per quanto riguarda la temperatura, notiamo una maggiore crescita a 24°C, sia in termini di ricchezza specifica che abbondanza (Fig. 9). È comunque interessante notare che il 50% delle specie si è sviluppato a 5°C. Tra queste sono rilevanti quelle appartenenti al genere *Cladosporium*, le quali si sono sviluppate esclusivamente a questa temperatura.



**Fig. 7** Grafico dell'abbondanza relativa al Campione 1. In ascissa sono riportati i valori CFU medi (CFUm).



**Fig. 8** Efficienza dei terreni relativa al Campione 1. L'analisi concerne la valutazione del parametro riguardante il quantitativo di nutrienti. Il grafico evidenzia il numero di specie cresciute unicamente su terreno diluito 1:5 (Diluito), unicamente su terreno non diluito (Non diluito) o su entrambe le tipologie (Diluito/Non diluito).

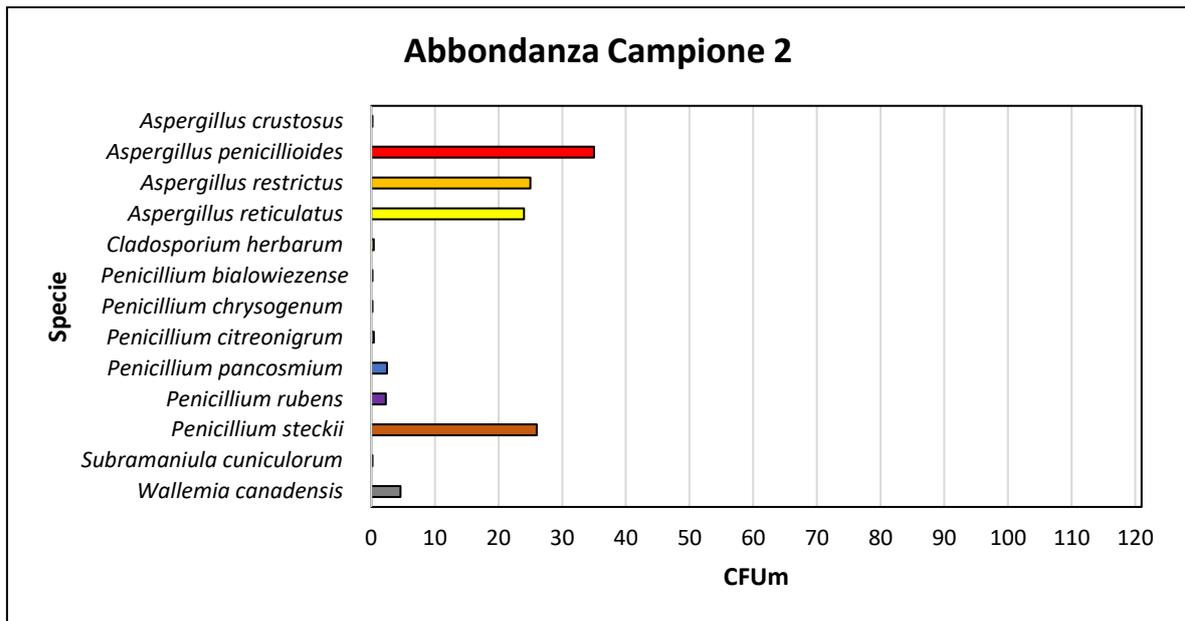


**Fig. 9** Temperatura di crescita delle diverse specie relativa al Campione 1. Il grafico evidenzia il numero di specie cresciute unicamente a 5 °C (T 5), unicamente a 24 °C (T 24) o ad entrambe le temperature (T 5 / T 24).

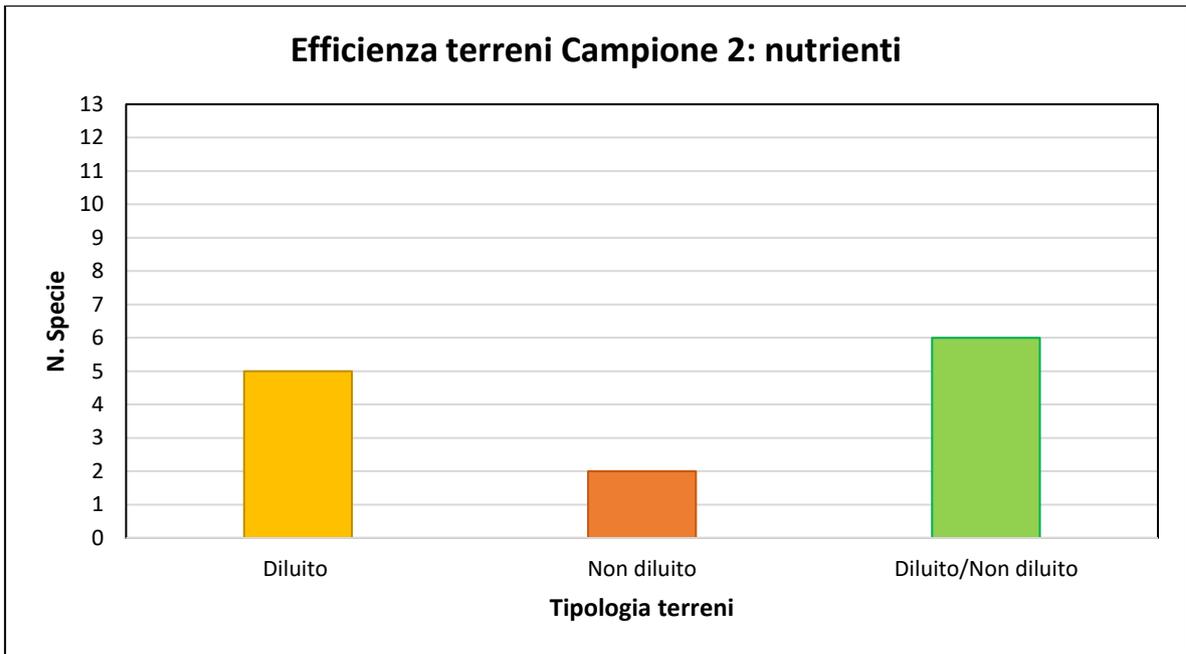
#### 4.1.2 Campione 2

Sono state individuate tredici specie. Il genere più rappresentato in termini di abbondanza è *Aspergillus* (*A. crustosus*, *A. penicilloides*, *A. reticulatus*, *A. restrictus*) che rappresenta il 70% della totalità delle specie del campione (Fig. 10). Tra questi la specie più abbondante è *A. penicillioides* (1950 CFUt; 35 CFUm), seguito da *A. restrictus* (1390 CFUt; 25 CFUm), *A. reticulatus* (1380 CFU; 24 CFUm) e *A. crustosus* (10 CFUt; 0.2 CFUm). In termini di ricchezza specifica i numeri sono a favore del genere *Penicillium* (*P. bialowiezense*, *P. chrysogenum*, *P. citreonigrum*, *P. pancosmium*, *P. rubens*, *P. steckii*). In particolare, dominante è *P. steckii* (1440 CFUt; 26 CFUm) che rappresenta l'82% del genere, seguito da *P. pancosmium* (140 CFUt; 2.5 CFUm), *P. rubens* (130 CFUt; 2.3 CFUm), *P. citreonigrum* (20 CFUt; 0.4 CFUm), *P. bialowiezense* 1901 (10 CFUt; 0.2 CFUm) e *P. chrysogenum* (10 CFUt; 0.2 CFUm). Seguono poi tre generi rappresentati da una singola specie: *Wallemia canadensis* (260 CFUt; 4.6 CFUm), *Cladosporium herbarum* (20 CFUt; 0.4 CFUm) e *Subramaniula cuniculorum* (10 CFUt; 0.2 CFUm). È da notare come questi ultimi generi siano molto poco rappresentati in termini di abbondanza, infatti contano rispettivamente 3.8% per *W. canadensis*, 0.30% per *C. herbarum*, 0.14% per *S. cuniculorum* del totale. Il terreno più performante è risultato SAB su cui sono cresciute dieci specie su tredici. In generale tutti i terreni hanno avuto un buon comportamento, difatti, hanno ospitato dal 30% al 50% delle specie. Ciò è corroborato dall'elevato valore di CFUt e CFUm, rispettivamente pari a 6770 e 121. Si osserva una buona selettività dei media da parte delle specie poco rappresentate in termini di abbondanza (*S. cuniculorum*; *P. rubens*; *P. bialowiezense*; *P. chrysogenum*; *P. citreonigrum*; *A. crustosus*, *W. canadensis*; *C. herbarum*), difatti queste sono presenti su massimo due terreni colturali diversi. Di contro le specie che presentano numeri maggiori (*A. penicillioides*; *A. restrictus*; *A. reticulatus*; *P. steckii*), hanno una

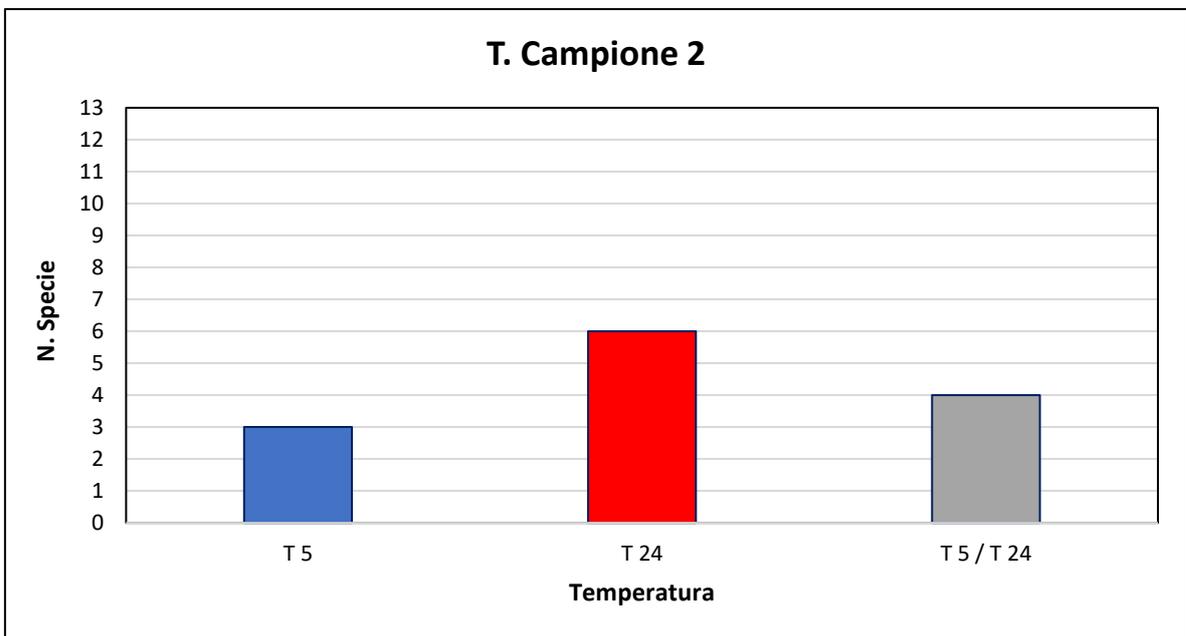
tendenza ubiquitaria. La medesima tendenza di questi ultimi vale anche per *P. pancosmium* che, nonostante la relativa poca abbondanza, è presente su quattro differenti media. Sui terreni diluiti osserviamo una maggiore ricchezza specifica, sono, infatti, colonizzati dal'85% delle specie contro il 62% per i terreni non diluiti (Fig. 11). Per quanto riguarda la temperatura a 24°C vi è sia maggiore abbondanza che ricchezza specifica, nonostante ciò, a 5°C si osserva una buona crescita delle colonie, in vero su queste piastre vi è la presenza di sette specie sulle tredici totali (Fig. 12). È da notare inoltre che *P. chrysogenum*, *P. citreonigrum* e *C. herbarum* presentano sviluppo esclusivo a 5°C.



**Fig. 10** Grafico dell' abbondanza relativa al Campione 2. In ascissa sono riportati i valori CFU medi (CFUm).



**Fig. 11** Efficienza dei terreni relativa al Campione 2. L'analisi concerne la valutazione del parametro riguardante il quantitativo di nutrienti. Il grafico evidenzia il numero di specie cresciute unicamente su terreno diluito 1:5 (Diluito), unicamente su terreno non diluito (Non diluito) o su entrambe le tipologie (Diluito/Non diluito).



**Fig. 12** Temperatura di crescita delle diverse specie relativa al Campione 2. Il grafico evidenzia il numero di specie cresciute unicamente a 5 °C (T 5), unicamente a 24 °C (T 24) o ad entrambe le temperature (T 5 / T 24).

### 4.1.3 Campione 3

Sono state isolate sette specie. Il genere più rappresentato, sia in termini di abbondanza che di ricchezza specifica è *Penicillium* (*P. pancosmium*, *P. rubens*, *P. steckii*) (Fig. 13). Questo rappresenta il 62% del campione, in particolare si ha una dominanza di *P. steckii* (1030 CFUt; 18 CFUm) che da solo rappresenta l'89% del genere ed il 55% del campione. Quest'ultimo è seguito da *P. pancosmium* (80 CFUt; 1.4 CFUm) e *P. rubens* (50 CFUt; 0.9 CFUm). Il secondo genere per importanza è *Aspergillus* (*A. reticulatus*, *A. restrictus*). Il più presente è *A. reticulatus* (320 CFUt; 5.7 CFUm), segue *A. restrictus* (180 CFUt; 3.2 CFUm). Il terzo genere presente, con una sola specie, è *Wallemia* (*W. canadensis*) che conta 110 CFUt e 1.9 CFUm. Infine, osserviamo, con una singola specie, *Cladosporium* (*C. halotolerans*) che conta 90 CFUt e 1.6 CFUm. Per quanto riguarda i terreni di coltura, i più performanti sono MEA, SAB, CZ ed OA, i quali hanno ospitato quattro specie su sette. È da sottolineare che TSA ed YA non hanno ospitato nessuna specie. Anche per questo motivo i valori di CFUt e CFUm si attestano su numeri mediamente bassi, rispettivamente pari a 1860 e 33. Si osserva una media selettività nei confronti del terreno di coltura, abbiamo tre specie poco selettive, cresciute su quattro media diversi, *A. reticulatus*, *P. steckii* e *W. canadensis*. Le altre specie risultano piuttosto selettive, sviluppandosi su massimo due terreni. Osserviamo una maggiore ricchezza specifica sui terreni non diluiti, in vero, tutte le specie si sono sviluppate su di essi, mentre sui diluiti ne sono cresciute solo quattro (Fig. 14). Sul fronte della temperatura è da segnalare che nessuna specie è stata in grado di svilupparsi a 5°C (Fig. 15).

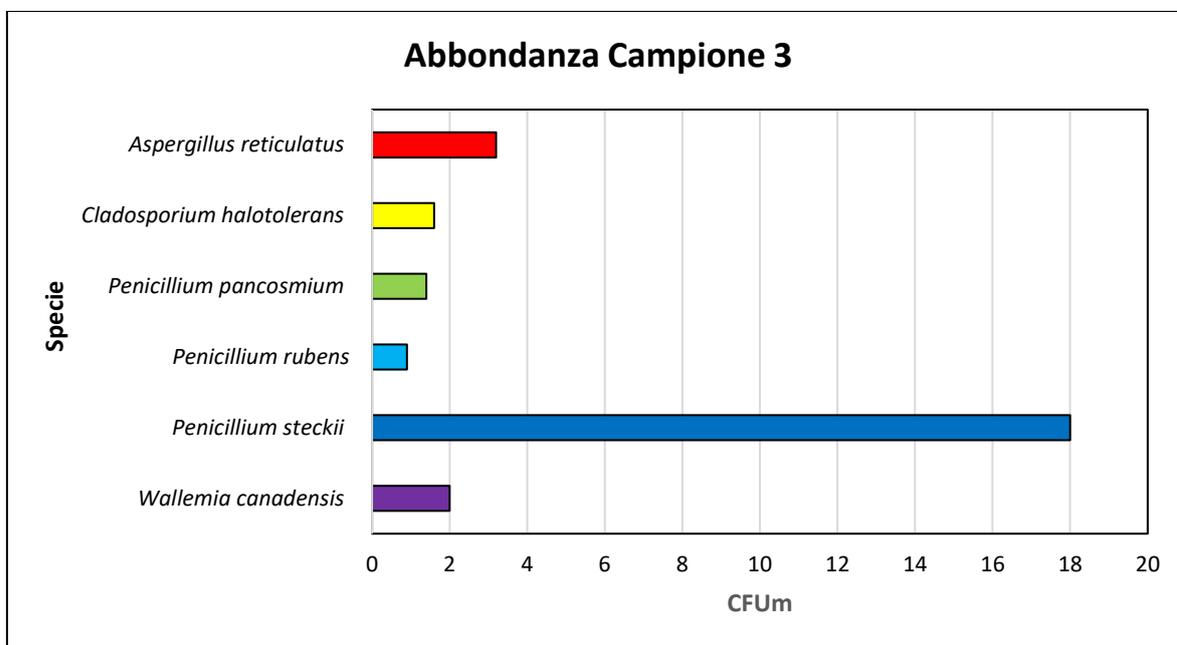
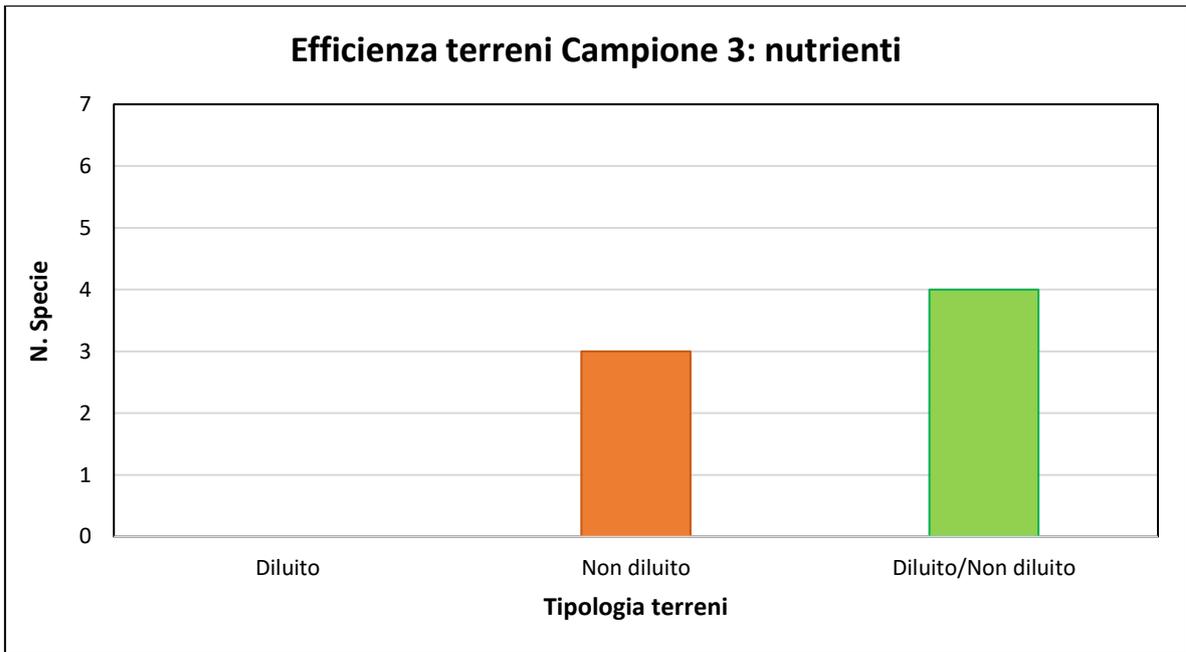
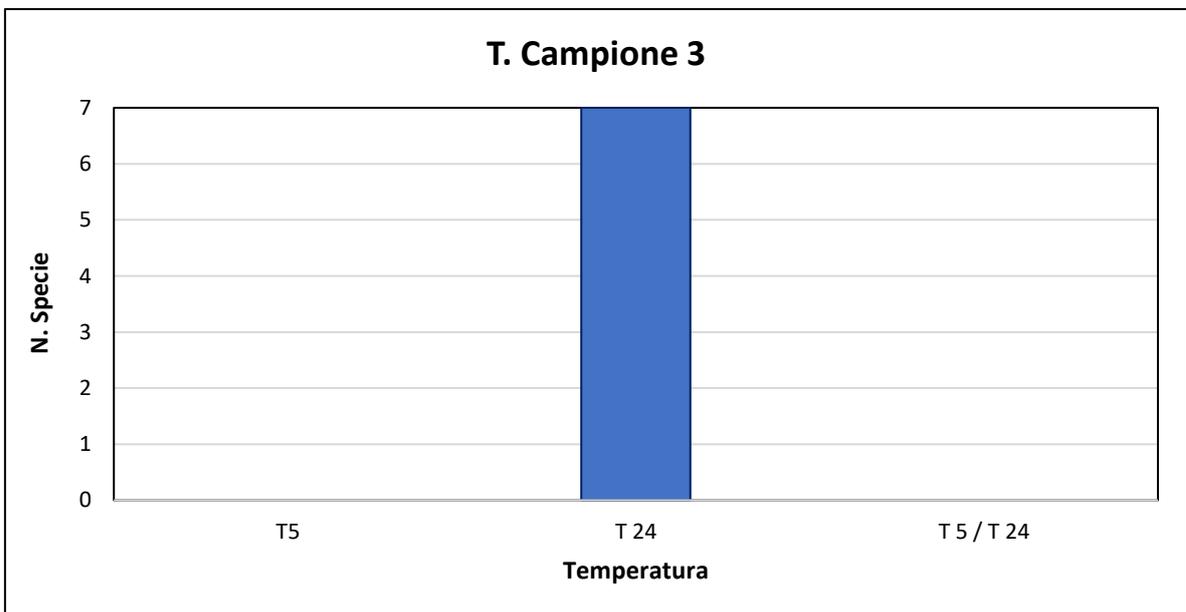


Fig. 13 Grafico dell'abbondanza relativa al Campione 3. In ascissa sono riportati i valori CFU medi (CFUm).



**Fig. 14** Efficienza dei terreni relativa al Campione 3. L'analisi concerne la valutazione del parametro riguardante il quantitativo di nutrienti. Il grafico evidenzia il numero di specie cresciute unicamente su terreno diluito 1:5 (Diluito), unicamente su terreno non diluito (Non diluito) o su entrambe le tipologie (Diluito/Non diluito).



**Fig. 15** Temperatura di crescita delle diverse specie relativa al Campione 3. Il grafico evidenzia il numero di specie cresciute unicamente a 5 °C (T 5), unicamente a 24 °C (T 24) o ad entrambe le temperature (T 5 / T 24).

#### 4.1.4 Campione 4

Sono state isolate sette specie. il genere più rappresentato è *Penicillium* (*P. bialowiezense*, *P. chrysogenum*, *P. citreonigrum*, *P. steckii*), sia in termini di abbondanza che di ricchezza specifica (Fig. 16). Quest'ultimo conta il 70% della totalità delle specie del campione. In particolare, si ha una dominanza della specie *Penicillium steckii* (2010 CFU; 36 CFUm) che da solo rappresenta il 97% del genere ed il 64% delle specie totali. Questo è seguito da *P. bialowiezense* (20 CFU; 0.4 CFUm), *P. chrysogenum* (20 CFU; 0.4 CFUm) e *P. citreonigrum* (20 CFU; 0.4 CFUm). Il secondo genere presente è *Aspergillus* (*A. restrictus*, *A. creber*, *A. reticulatus*). Tra questi la specie più abbondante è *A. restrictus* (610 CFU; 11 CFUm) che rappresenta da solo il 69% del genere, seguito da *A. reticulatus* (150 CFU; 2.7 CFUm) e *A. creber* (120 CFU; 2.1 CFUm). Tra i terreni quello con la maggiore ricchezza specifica è il MEA che vede la crescita di quattro specie. Molti terreni di coltura, in particolare OA, TSA ed YA vedono una bassa presenza di colonie. Tuttavia, vi è una compensazione degli altri media, il che permette di avere un valore di CFU importante, pari a 2950 CFU e 53 CFUm. In generale si osserva un'elevata selettività nei confronti del medium, infatti a parte *P. steckii*, cresciuto su tre differenti terreni e *A. creber*, cresciuto su due, le altre specie si sono sviluppate su un singolo terreno. È da notare una maggiore ricchezza specifica sui terreni diluiti 1:5, troviamo infatti cinque specie sviluppatesi su di essi, di contro in termini di abbondanza i terreni non diluiti presentano abbondanze maggiori (Fig. 17). Prendendo in considerazione la temperatura è chiara la preponderanza della crescita a 24°C, invero, solo *A. creber* è riuscito a crescere a 5°C (Fig. 18).

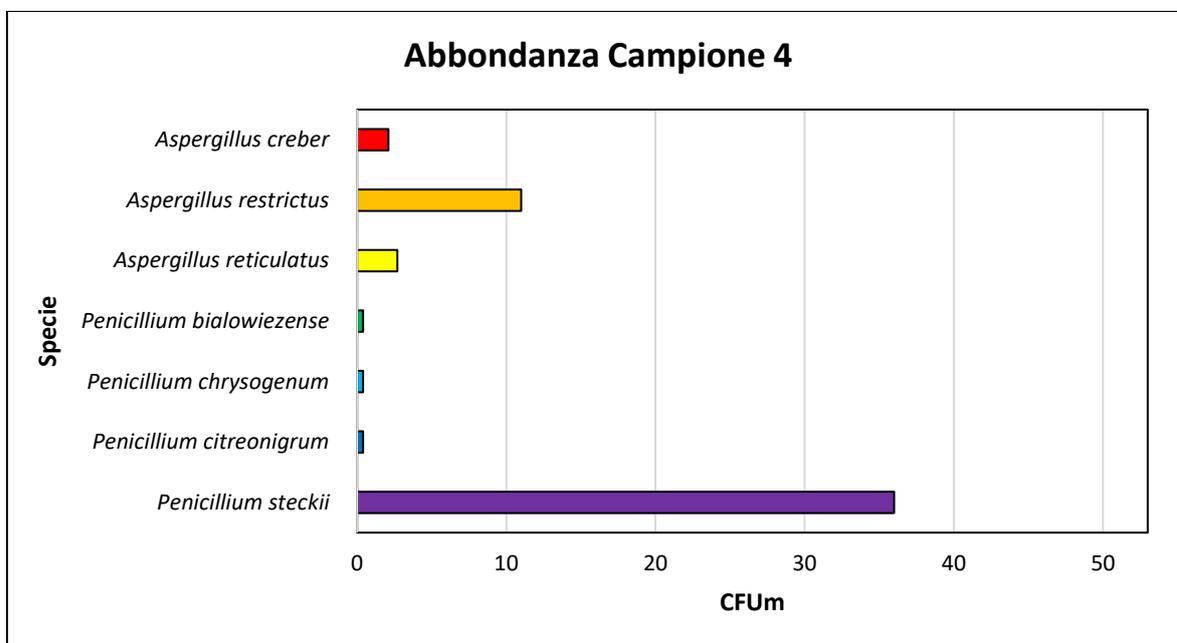
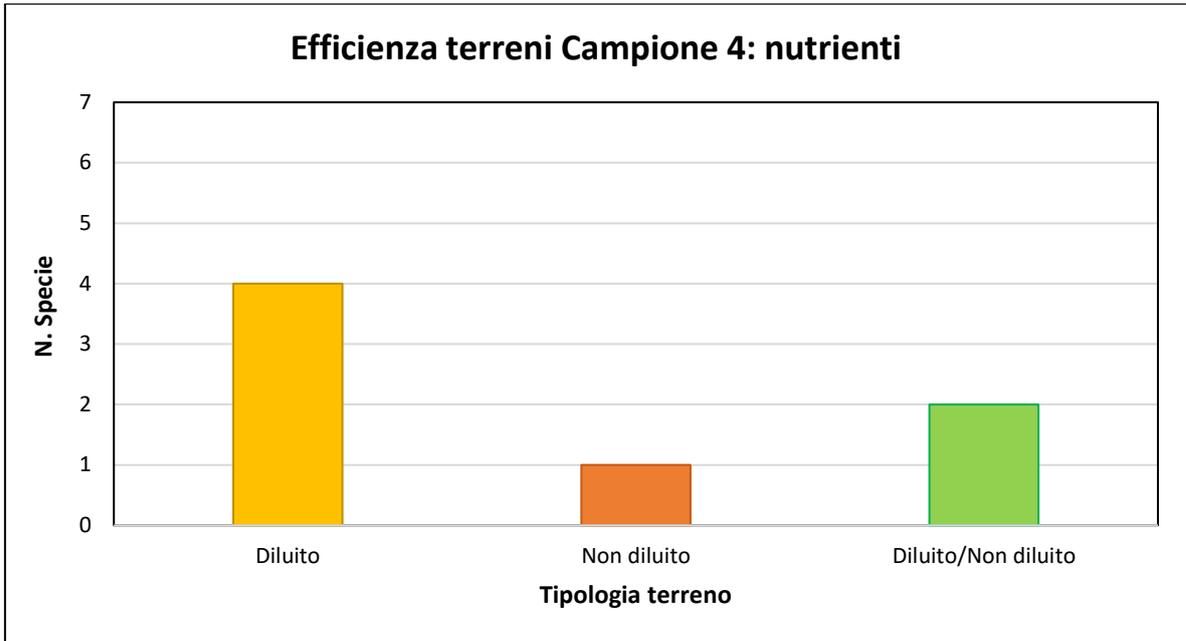
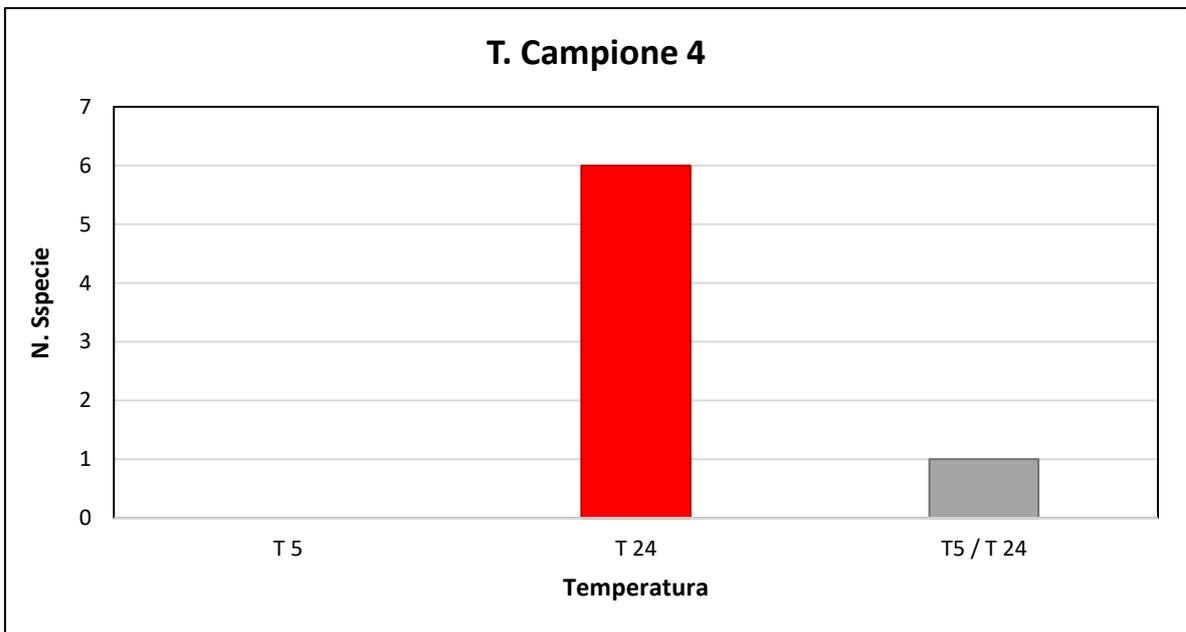


Fig. 16 Grafico dell'abbondanza relativa al Campione 4. In ascissa sono riportati i valori CFU medi (CFUm).



**Fig. 17** Efficienza dei terreni relativa al Campione 4. L'analisi concerne la valutazione del parametro riguardante il quantitativo di nutrienti. Il grafico evidenzia il numero di specie cresciute unicamente su terreno diluito 1:5 (Diluito), unicamente su terreno non diluito (Non diluito) o su entrambe le tipologie (Diluito/Non diluito).



**Fig. 18** Temperatura di crescita delle diverse specie relativa al Campione 4. Il grafico evidenzia il numero di specie cresciute unicamente a 5 °C (T 5), unicamente a 24 °C (T 24) o ad entrambe le temperature (T 5 / T 24).

## Capitolo 5

### 5.1 Discussioni

Lo scopo di questo studio era valutare i sedimenti marini profondi al fine di individuare la presenza di funghi coltivabili. Sono stati esaminati i sedimenti marini superficiali raccolti a 2443 m di profondità, 10 Km a largo di Tolone. In totale sono state isolate 19 (Tab. 1) specie appartenenti a 7 generi (*Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Sporobolomyces*, *Paecilomyces*, *Subramaniula*, *Wallemia*). Il numero totale di CFU si attesta a 11990, mentre il valore medio è pari a 214.

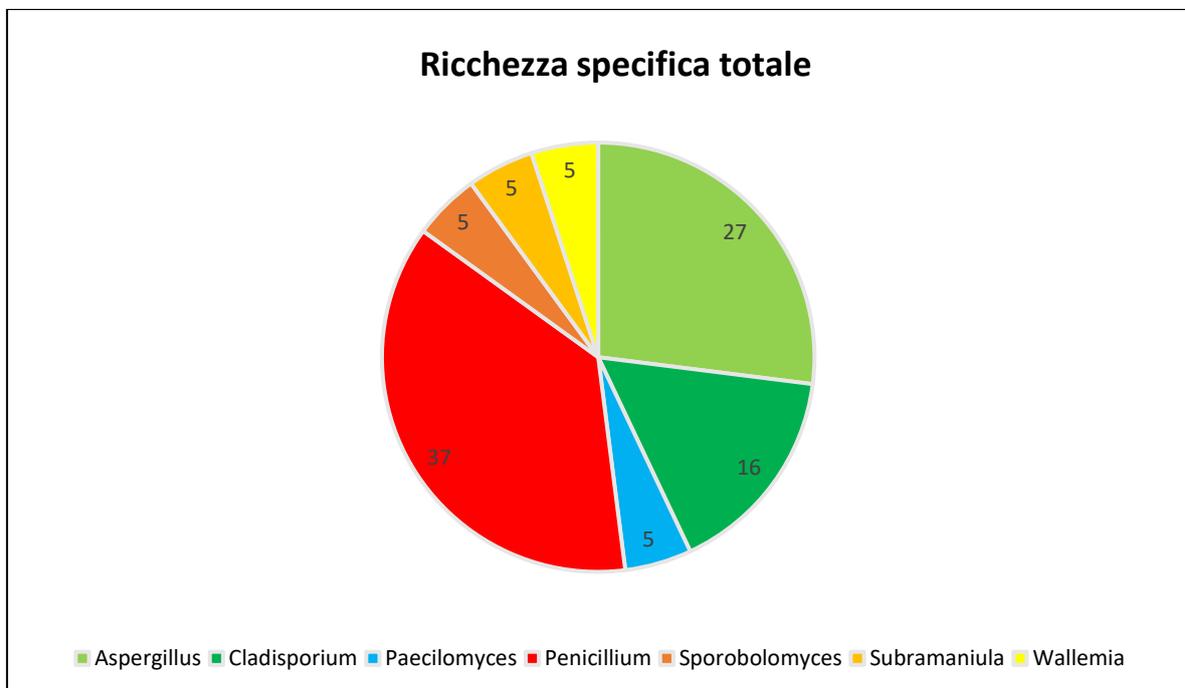
Specie	C. 1	C. 2	C. 3	C. 4
<i>Aspergillus creber</i> Jurjević, S.W. Peterson & B.W. Horn, 2012				x
<i>Aspergillus crustosus</i> Raper & Fennell, 1965		x		
<i>Aspergillus penicillioides</i> Speg. 1986		x		
<i>Aspergillus restrictus</i> G. Sm. 1931		x		x
<i>Aspergillus reticulatus</i> Sklenar, Jurjević, S.W. Peterson & Hubka, 2017		x	x	x
<i>Cladosporium halotolerans</i> Zalar, de Hoog, Schroers, Crous, Groenewald & Gunde-Cimerman, 2007			x	
<i>Cladosporium herbarum</i> (Pers.) Link, 1816	x	x		
<i>Cladosporium</i> sp.	x			
<i>Paecilomyces</i> cfr. <i>lilacinum</i> (Thom) Luangsa-ard, Hou-braken, Hywel-Jones & Samson, 2011	x			
<i>Penicillium bialowiezense</i> K.M. Zalesky, 1927		x		x
<i>Penicillium chrysogenum</i> Thom, 1910		x		x
<i>Penicillium citreonigrum</i> C. Ramírez & A.T. Martínez, 1980		x		x
<i>Penicillium griseofulvum</i> Dierckx, R.P. 1901	x			
<i>Penicillium pancosmium</i> Houbraken, Frisvad & Samson 2011		x	x	
<i>Penicillium rubens</i> Biourge, 1910		x	x	
<i>Penicillium steckii</i> K.W. Zalesky, K.M. 1927	x	x	x	x
<i>Sporobolomyces</i> sp.	x			
<i>Subramaniula cuniculorum</i> (Fuckel) X.Wei Wang & Samson, 2016		x		
<i>Wallemia canadensis</i> S.Jančić, H.D.T.Nguyen, Seifert & Gunde-Cim. 2015		x	x	

**Tab. 1** Elenco totale delle specie isolate dai 4 campioni. Per ogni specie è indicato il campione (C.1; C2; C3; C4) dal quale è stata isolata.

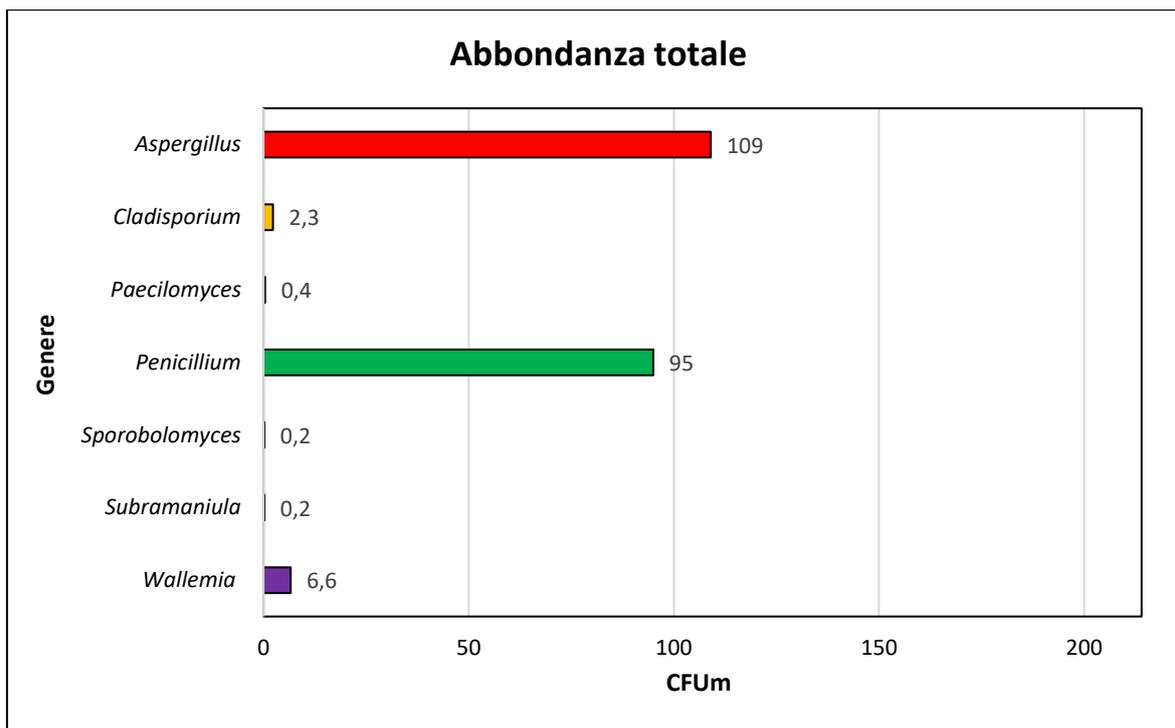
#### 5.1.1 Ricchezza specifica e abbondanza

Il genere più rappresentato, in termini di ricchezza specifica (Fig. 19) è *Penicillium*, che conta sette specie (*P.bialowiezense*, *P.chrysogenum*, *P.citreonigrum*, *P. griseofulvum*, *P. pancosmium*, *P. sinense*, *P.steckii*), pari al 37% del totale. È da notare che è l'unico genere presente in tutti i campioni. In termini di abbondanza (Fig. 20) conta 5340 CFU e 95 CFUM, pari al 45% del totale. Tra i *Penicillium* la specie più abbondante risulta *P. steckii*, lo ritroviamo in tutti i campioni. Rappresenta l'84% del suo genere, nonché il 37% del totale

delle specie. Segue il genere *Aspergillus* che conta cinque specie (*A. creber*; *A. crustosus*; *A. penicilloides*; *A. restrictus*; *A. reticulatus*), pari al 26% del totale. È presente in tre campioni su quattro, risulta mancante nel Campione 1. In termini di abbondanza conta 6110 CFUt e 109 CFUm, pari al 51% del totale. L'elevata abbondanza si ha grazie ai numeri di *Aspergillus penicilloides*, *A. restrictus* e *A. reticulatus* che nel campione 2 contano, insieme, ben 4720 CFUt e 84 CFUm. Queste due specie in generale presentano abbondanze molto simili. *Aspergillus penicilloides* nonostante l'elevato valore di CFU è presente solo nel Campione 2. Successivamente troviamo il genere *Cladosporium* che conta 3 specie (*C. halotolerans*; *C. herbarum*), più una non identificata, pari al 16% del totale. In termini di abbondanza il gruppo è presente con 130 CFUt e 2.3 CFUm, rappresentando circa l'1% del totale. Il genere è presente in tutti i campioni escluso il 4. La specie più abbondante risulta *Cladosporium halotolerans* che rappresenta il 69% del gruppo, pur presente solo nel campione 3. Il quarto genere è *Wallemia*, presente con la sola specie *W. canadensis*, la quale conta 370 CFUt e 6.6 CFUm, pari al 3% del totale, presente nei campioni 2 e 3. Il quinto genere individuato è *Pecilomyces*, presente con la sola specie *P. lilacinum*. Questo è presente con 20 CFUt e 0.4 CFUm, pari a 0.17%, nel solo campione 1. Il sesto genere è *Subramaniula*, presente con la sola specie *Subramaniula cuniculorum*. Presente con 10 CFUt e 0.2 CFUm, pari allo 0.08% del totale nel solo campione 2. Il settimo genere individuato è *Sporobolomyces* sp., del quale non si è riusciti ad ottenere informazioni genetiche tali da poter individuare l'organismo a livello di specie. Questo è presente con 10 CFUt e 0.2 CFUm, pari allo 0.08% del totale, nel solo campione 1.



**Fig. 19** Grafico della ricchezza specifica relativa ai 4 campioni. I valori sono espressi in percentuale.



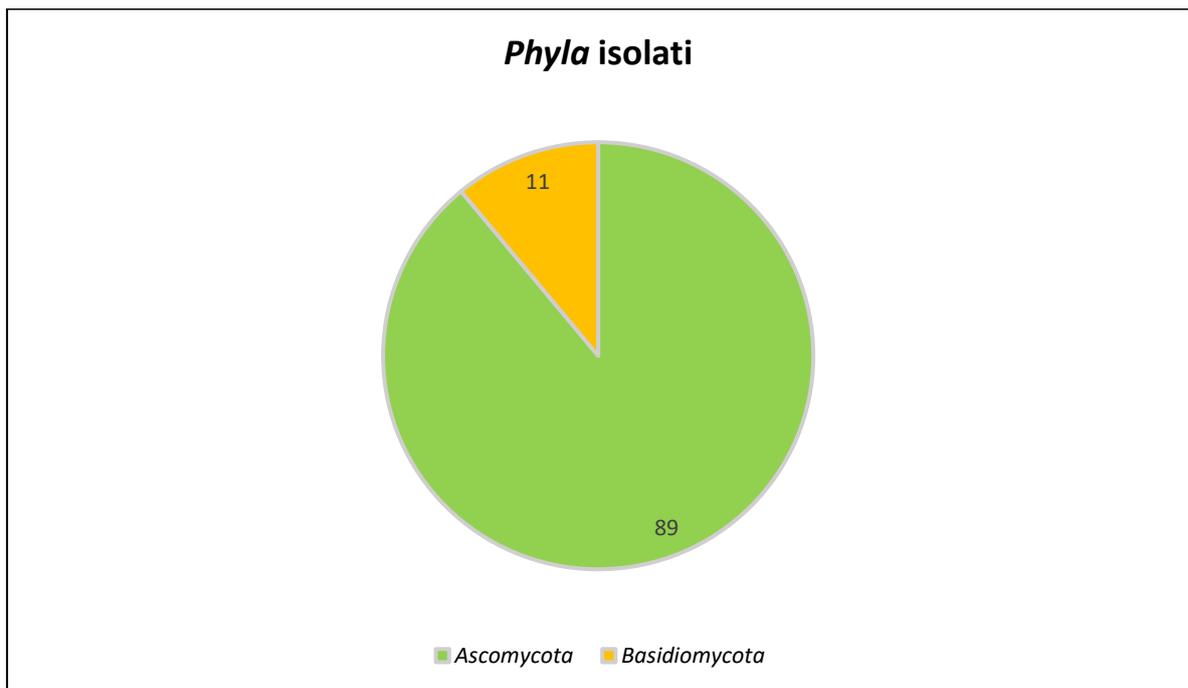
**Fig. 20** Grafico dell'abbondanza relativa ai Generi dei 4 campioni. In ascissa sono riportati i valori CFU medi (CFUm) dati dalla somma dei 4 campioni.

### 5.1.2 Analisi ecofisiologica e pattern di distribuzione

A livello di *Phylum* si osserva una dominanza di *Ascomycota*, che rappresenta l'89% del totale nei 4 campioni (Fig. 21). Questi valori sono in accordo con la letteratura: questo gruppo risulta dominante in molti lavori concernenti analisi dei sedimenti marini profondi con rappresentanti filamentosi (Rédou et al. 2015). Il *phylum Ascomycota* è stato segnalato dominare la comunità fungina nei sedimenti di acque profonde in tutto il mondo, ad esempio: nella dorsale dell'India sud-occidentale dell'Oceano Indiano (Xu et al. 2018; Luo et al. 2020), nella depressione di Okinawa (Zhang et al. 2016) e nell'altopiano di San Paolo dell'Oceano Atlantico (Nagano et al. 2017; Luo et al. 2020). Il secondo *phylum* presente è *Basidiomycota*, spesso presente in questi ambienti, specialmente con rappresentanti lievitiforimi (Rédou et al. 2015; Singh et al. 2012). In alcuni casi questo *phylum* può risultare anche molto abbondante, ad esempio Xu et al. (2019) hanno rilevato alti livelli di *Basidiomycota* in diversi campioni di sedimenti di acque profonde. Rämä et al. (2017) hanno scoperto che i *phyla* fungini dominanti possono essere substrato-specifici nell'ambiente marino, *Chytridiomycota* e *Basidiomycota* prevalgono a livello del ghiaccio marino ed in colonna d'acqua, mentre *Ascomycota* risulta abbondante su legni e sedimenti.

A livello di genere notiamo una forte preponderanza dei generi *Aspergillus*, *Cladospirium* e *Penicillium*, che, anche in base alla letteratura, risultano i gruppi più abbondanti e adattati agli ambienti abissali (Nagano and Nagahama 2012; Nagano et al. 2017; Xu et al. 2014, 2016, 2017, 2018; Luo et al. 2020). I generi *Aspergillus* e *Penicillium* sono noti per essere

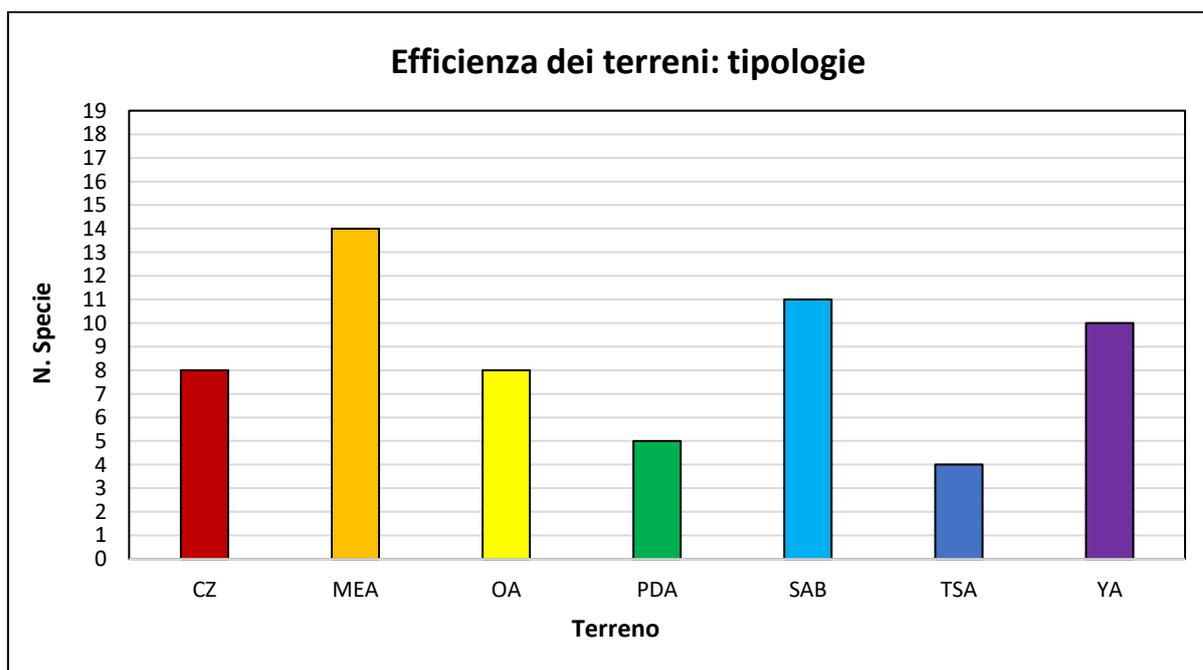
*taxa* fungini distribuiti a livello globale. Sembra che le specie appartenenti a tali generi non siano indigene degli ambienti di acque profonde (Zhang et al. 2014). Ciò è corroborato da prove di adattamento fisiologico di queste specie agli ambienti marini profondi riportate da Raghukumar et al. (2004). Anche il Genere *Cladosporium*, ben noto in ambiente terrestre, viene spesso rilevato in ambienti marini profondi, ed anch'esso, probabilmente, presenta specie non indigene dell'ambiente marino profondo (Zhang et al. 2014). Queste informazioni suggeriscono un potenziale ed importante ruolo dei processi di sedimentazione e nella colonizzazione dei sedimenti marini profondi da parte dei funghi marini facoltativi. Come per le loro controparti terrestri, le specie di tali generi, grazie alla loro plasticità fisiologica, si dimostrano attive e cruciali nei processi ecologici dell'ambiente marino profondo (Raghukumar et al. 2017). Tali funghi possono essere, infatti, importanti decompositori e parassiti. Inoltre, *Aspergillus* spp. sono state frequentemente rilevate in sedimenti marini anaerobici e hanno dimostrato di svolgere un ruolo importante nel processo di denitrificazione (Jebaraj et al. 2010). Questi risultati suggeriscono che le specie di *Aspergillus* possono svolgere un ruolo versatile nei principali processi ecologici degli ambienti di acque profonde.



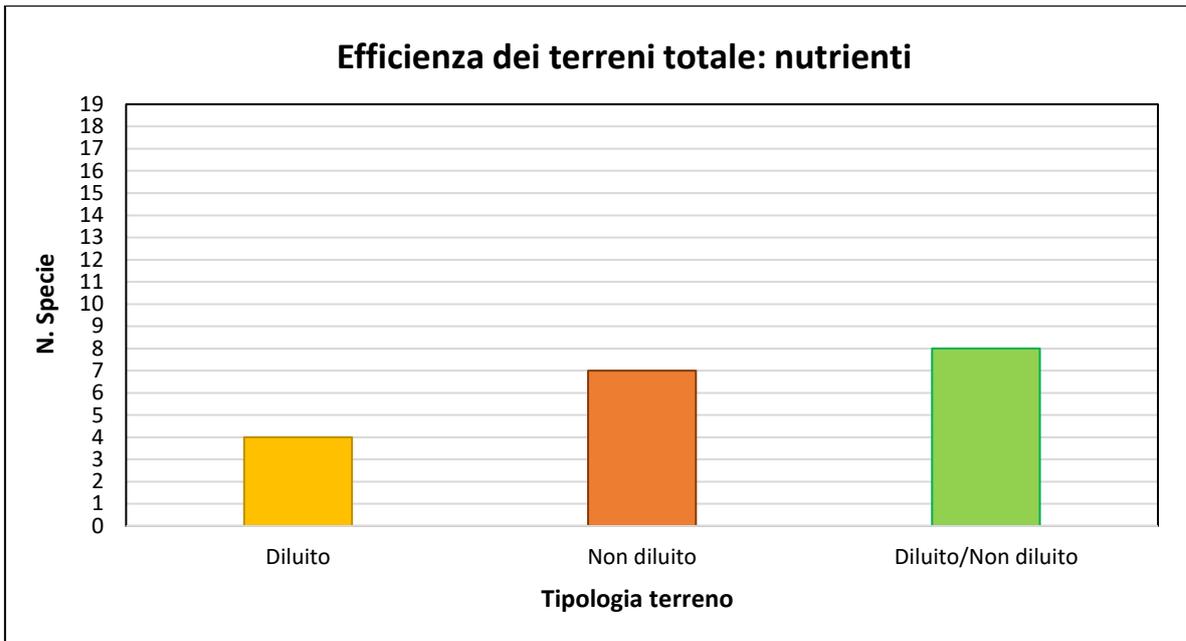
**Fig. 21** Grafico relativo ai Phyla isolati nei 4 campioni. I valori sono espressi in percentuale.

### 5.1.3 Efficienza di crescita

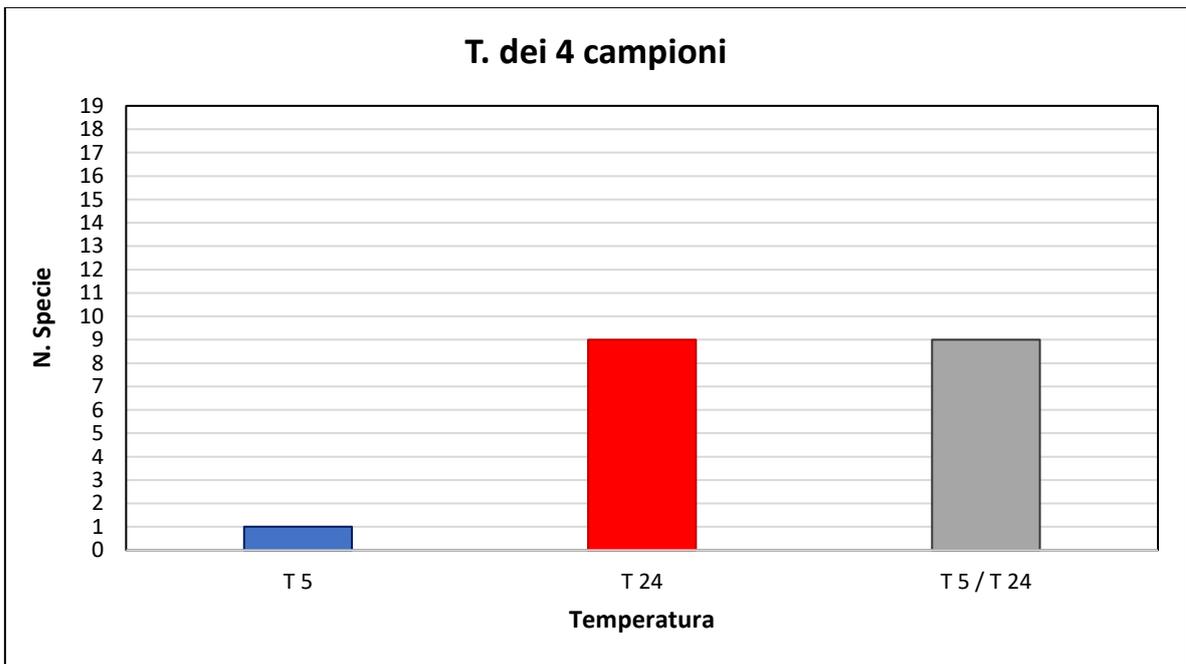
Sono stati isolati funghi da tutti e 4 i campioni. Tutti i terreni hanno permesso la crescita di almeno una specie (Fig 22). PDA e TSA risultano i terreni meno performanti, avendo ospitato rispettivamente 5 e 3 specie sulle 19 totali. CZ, OA, YA e SAB hanno avuto buone performance, ospitando dalle 8 alle 11 specie. MEA risulta il terreno più efficiente, ha ospitato, infatti, 14 specie. Per quanto riguarda il quantitativo di nutrienti (Fig. 22) si nota come quasi la metà delle specie (8) siano cresciute su entrambe le tipologie di terreno, diluito 1:5 e non diluito, a dimostrazione di un buon grado di adattabilità. Si ha una maggiore ricchezza specifica sui terreni non diluiti rispetto ai diluiti, rispettivamente 7 specie contro 4. È da sottolineare che delle 4 specie cresciute unicamente su terreno diluito 3 appartengono al genere *Penicillium* (*P. bialowiezense*; *P. chrysogenum*; *P. citreonigrum*) e una ad *Aspergillus* (*A. crustosus*). Questi due generi sono, infatti, considerati quelli più facilmente adattabili alle condizioni abissali estreme, quale la deplezione trofica. Per quanto riguarda la temperatura (Fig. 23) si nota come quasi metà delle specie (9) si siano sviluppate ad entrambe le temperature, indice di un buon grado di adattabilità. Pari ricchezza specifica si ha anche per la crescita unicamente a 24 °C. Esclusivamente a 5 °C vi è la crescita di una sola specie, *Cladosporium* sp., della quale non si hanno però certezze dal punto di vista tassonomico.



**Fig. 22** Grafico riguardante l'efficienza dei 7 terreni relativa ai 4 campioni. Tipologie: *Czapek Dox Agar* (CDA); *Malt Extract Agar* (MEA); *Oatmeal Agar* (OA); *Potato Dextrose Agar* (PDA); *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA); *Yeast Extract Agar* (YA); *Tryptic Soy Agar* (TSA). Viene riportato il numero di specie cresciute su ogni terreno prendendo in considerazione tutti i 4 campioni.



**Fig. 23** Efficienza dei terreni relativa ai 4 campioni. L'analisi concerne la valutazione del parametro riguardante il quantitativo di nutrienti. Il grafico evidenzia il numero di specie cresciute unicamente su terreno diluito 1:5 (Diluito), unicamente su terreno non diluito (Non diluito) o su entrambe le tipologie (Diluito/Non diluito).



**FIG 23** Temperatura di crescita delle diverse specie relativa ai 4 campioni. Il grafico evidenzia il numero di specie cresciute unicamente a 5 °C (T 5), unicamente a 24 °C (T 24) o ad entrambe le temperature (T 5 / T 24).

## Conclusioni

L'obiettivo dello studio era esaminare la biodiversità fungina associata ai sedimenti marini profondi. A tale scopo sono stati analizzati quattro campioni di sedimento, prelevati nella piana abissale antistante l'area portuale di Tolone (Francia), ad una profondità di circa 2.400 m. I sedimenti sono stati inoculati su 7 differenti terreni di coltura ed incubati a 2 differenti temperature (5°C e 24 °C). Lo studio ha reso possibile isolare 19 ceppi fungini appartenenti a 7 generi. Tra questi ultimi sono risultati dominanti *Penicillium*, *Aspergillus* e *Cladosporium*, noti già in letteratura per avere esponenti che ben si adattano alle condizioni limitanti di diversi ambienti marini. I vari terreni di coltura saggiati hanno portato alla crescita di differenti specie, avvalorando la tesi per cui in condizioni limitanti dal punto di vista ambientale, la variazione di determinati nutrienti nel substrato di crescita sia essenziale per aumentare il numero di specie isolate. Gli studi futuri prevedono l'analisi delle loro proprietà biotecnologiche dei ceppi isolati, sia dal punto di vista farmaceutico (per indagare la produzione, ad esempio, di nuovi antibiotici), sia ambientale (per indagare la produzione di composti bioattivi e metaboliti sfruttabili in processi di biorisanamento).

L'ecosistema marino è il più vasto del pianeta ma, nonostante ciò, molti ambienti di esso sono ancora inesplorati, sia per mancanza di interesse, che per mancanza di mezzi. Negli ultimi decenni alcuni ambienti prima poco considerati hanno suscitato una maggiore curiosità, tra cui quelli marini profondi e gli *hydrothermal vents*, luoghi in cui la diversità di organismi può essere cruciale per lo studio di processi fisiologici e per l'estrazione di composti utili all'uomo. Non è un caso, infatti, che l'avvento di nuove tecnologie abbia aperto nuovi filoni di ricerche incentrate su questi luoghi e sullo studio di biologia, fisiologia ed ecologia dei loro abitanti.

Un incentivo è senza dubbio l'opportunità di ricavare molecole, quali enzimi, o meccanismi fisiologici utili in campo industriale, farmaceutico e ambientale. Quello biotecnologico è infatti un campo in continua evoluzione e l'indagine di nuovi ambienti è spesso legata all'opportunità di ricavare nuove molecole.

Di pari passo si è quindi iniziato anche a proteggere questi luoghi da un feroce sfruttamento. Risulta cruciale, quindi, conoscere la diversità ambientale di questi luoghi per poterli preservare, evitando la distruzione di habitat rari e affascinanti non solo per le risorse impiegabili in ambito biotecnologico, ma soprattutto dal punto di vista naturalistico. Su questo fronte anche l'importanza ecologica dei funghi marini è probabilmente sottostimata, soprattutto se prendiamo in considerazione da quanto tempo questi organismi abitano il pianeta, il ruolo cruciale che hanno avuto nella conquista delle terre emerse da parte degli organismi vegetali e il ruolo che hanno oggi negli ambienti terrestri.

Le opportunità future sono molte, basti pensare che nonostante in pochi anni siano state scoperte una notevole quantità di specie fungine marine mai descritte, queste sono solo una piccola parte di quelle potenzialmente presenti in mari e oceani. A ciò si aggiunga che molti dei processi fisiologici che permettono a questi organismi di adattarsi all'ambiente marino e, in particolar modo ai suoi comparti estremi, sono poco conosciuti o sconosciuti del tutto. Ne deriva che il loro potenziale biotecnologico è enorme, i funghi, infatti, sono da migliaia

di anni sfruttati dall'uomo in importanti processi, è logico pensare, quindi, che anche quelli presenti nel comparto marino possano riservare utili e importanti scoperte in questo campo. In più è da notare che tutti gli organismi che abitano gli ambienti estremi devono evolvere adattamenti tali da poter resistere all'elevato stress ambientale, ciò porta allo sviluppo di molecole, spesso uniche, che possono rivelarsi cruciali in alcuni processi tecnologici umani.

## Bibliografia

- Adrian-Martinez, Silvia, et al. "Letter of intent for KM3NeT 2.0." *Journal of Physics G: Nuclear and Particle Physics* 43.8 (2016): 084001.
- Alongi, G., M. Catra, and M. Cormaci. "First Record of Haloguignardia cystoseira (Ascomycota) Parasitic on Cystoseira elegans (Fucophyceae) from the Mediterranean Sea." (1999): 33-35.
- Bai, Mohan, et al. "Molecular detection and spatiotemporal characterization of Labyrinthulomycete protist diversity in the coastal waters along the Pearl River Delta." *Microbial ecology* 77.2 (2019): 394-405
- Bärlocher, F., and S. Y. Newell. "Growth of the salt marsh periwinkle *Littoraria irrorata* on fungal and cordgrass diets." *Marine Biology* 118.1 (1994): 109-114.
- Binder, Manfred, David S. Hibbett, and Hans P. Molitoris. "Phylogenetic relationships of the marine gasteromycete *Nia vibrissa*." *Mycologia* 93.4 (2001): 679-688.
- Bochdansky, Alexander B., Melissa A. Clouse, and Gerhard J. Herndl. "Eukaryotic microbes, principally fungi and labyrinthulomycetes, dominate biomass on bathypelagic marine snow." *The ISME Journal* 11.2 (2017): 362-373.
- Borovec, Ondřej, and Martin Vohník. "Ontogenetic transition from specialized root hairs to specific root-fungus symbiosis in the dominant Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica*." *Scientific reports* 8.1 (2018): 1-11.
- Bruno, D. W., Pieter VanWest, and G. W. Beakes. "Saprolegnia and other oomycetes." *Fish Diseases and Disorders: Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections, 2nd Edition* (2011).
- Bugni, Tim S., and Chris M. Ireland. "Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms." *Natural Product Reports* 21.1 (2004): 143-163.
- Campbell, Jinx, et al. "A re-evaluation of Lulworthiales: relationships based on 18S and 28S rDNA." *Mycological Research* 109.5 (2005): 556-568.
- Cardini, Ulisse, et al. "Functional significance of dinitrogen fixation in sustaining coral productivity under oligotrophic conditions." *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 282.1818 (2015): 20152257.
- Cecchi, Grazia, et al. "Culturable fungi from dredged and marine sediments from six ports studied in the framework of the SEDITERRA Project." *Journal of Soils and Sediments* 21 (2021): 1563-1573.
- Cutroneo, Laura, et al. "Microplastics in the abyss: a first investigation into sediments at 2443-m depth (Toulon, France)." *Environmental Science and Pollution Research* 29.6 (2022): 9375-9385.

- Desmazières, J. B. H. J. "Planètes cryptogames de France. 2nd." *Edition. N°1778. NA, Lille* (1849).
- Dhanasekaran, V., Rajesh Jeewon, and Kevin D. Hyde. "Molecular taxonomy, origins and evolution of freshwater ascomycetes." *Fungal Diversity* (2006).
- Doyle, Jeff J., and Jane L. Doyle. *A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue*. No. RESEARCH. 1987.
- Dungan, Ashley M., et al. "Development of a free radical scavenging bacterial consortium to mitigate oxidative stress in cnidarians." *Microbial Biotechnology* 14.5 (2021): 2025-2040.
- Durieu de Maisonneuve, C., and J. F. C. Montagne. "pyrenomycetes Fr." *Bory de Saint-Vincent J and Durieu de Maisonneuve C, eds. Exploration Scientifique de Algerie. Paris: Botanique. p* (1869): 443-608.
- Gao, Zheng, et al. "Molecular detection of fungal communities in the Hawaiian marine sponges *Suberites zeteki* and *Mycale armata*." *Applied and Environmental Microbiology* 74.19 (2008): 6091-6101.
- Gardes, Monique, and Thomas D. Bruns. "ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts." *Molecular ecology* 2.2 (1993): 113-118.
- Gonçalves, Micael FM, Ana C. Esteves, and Artur Alves. "Marine Fungi: Opportunities and Challenges." *Encyclopedia* 2.1 (2022): 559-577.
- Gladfelter, Amy S., Timothy Y. James, and Anthony S. Amend. "Marine fungi." *Current Biology* 29.6 (2019): R191-R195.
- Gleason, Frank H., et al. "The roles of endolithic fungi in bioerosion and disease in marine ecosystems. I. General concepts." *Mycology* 8.3 (2017): 205-215.
- Graça, M. A., S. Y. Newell, and R. T. Kneib. "Grazing rates of organic matter and living fungal biomass of decaying *Spartina alterniflora* by three species of salt-marsh invertebrates." *Marine Biology* 136.2 (2000): 281-289.
- Greco, G., et al. "Another possible risk for the Mediterranean Sea? *Aspergillus sydowii* discovered in the Port of Genoa (Ligurian Sea, Italy)." *Marine Pollution Bulletin* 122.1-2 (2017): 470-474.
- Greco, Giuseppe, et al. "First identification of a fatal fungal infection of the marine sponge *Chondrosia reniformis* by *Aspergillus tubingensis*." *Diseases of Aquatic Organisms* 135.3 (2019): 227-239.
- Gueidan, Cécile, Holger Thüs, and Sergio Pérez-Ortega. "Phylogenetic position of the brown algae-associated lichenized fungus *Verrucaria tavaresiae* (Verrucariaceae)." *The Bryologist* (2011): 563-569.
- Gunde-Cimerman, Nina, Jose Ramos, and Ana Plemenitaš. "Halotolerant and halophilic fungi." *Mycological research* 113.11 (2009): 1231-1241.

- Gutiérrez, M. H., et al. "The role of fungi in processing marine organic matter in the upwelling ecosystem off Chile." *Marine Biology* 158.1 (2011): 205-219.
- Gutiérrez, Marcelo H., Ana M. Jara, and Silvio Pantoja. "Fungal parasites infect marine diatoms in the upwelling ecosystem of the Humboldt current system off central Chile." *Environmental Microbiology* 18.5 (2016): 1646-1653.
- Harvey, Julio BJ. *Phylogenetic studies of the marine brown algae Cystoseira and Halidrys including coevolution with the associated fungal endophyte Haloguignardia irritans*. University of California, Santa Cruz, 2004.
- Hassett, B. T., and R. Gradinger. "Chytrids dominate arctic marine fungal communities." *Environmental microbiology* 18.6 (2016): 2001-2009.
- Hassett, Brandon T., et al. "Spatial distribution of aquatic marine fungi across the western Arctic and sub-arctic." *Environmental microbiology* 19.2 (2017): 475-484.
- Höller, Ulrich, et al. "Fungi from marine sponges: diversity, biological activity and secondary metabolites." *Mycological Research* 104.11 (2000): 1354-1365.
- Hyde, Kevin D., et al. "Role of fungi in marine ecosystems." *Biodiversity & Conservation* 7.9 (1998): 1147-1161.
- Imhoff, Johannes F. "Natural products from marine fungi—Still an underrepresented resource." *Marine drugs* 14.1 (2016): 19.
- Jebaraj, Cathrine S., et al. "Fungal diversity in oxygen-depleted regions of the Arabian Sea revealed by targeted environmental sequencing combined with cultivation." *FEMS Microbiology Ecology* 71.3 (2010): 399-412.
- Jiménez, Carlos. "Marine natural products in medicinal chemistry." *ACS medicinal chemistry letters* 9.10 (2018): 959-961.
- Jones, E. B. G. "Decomposition by basidiomycetes in aquatic environments." *Symposium series-British Mycological Society*. 1982.
- Jones, EB Gareth. "Do fungi occur in the sea?." *Mycologist* 2.4 (1988): 150-157.
- Jones, EB Gareth. "Are there more marine fungi to be described?." (2011): 343-354.
- Jones, E. B., et al. "Classification of marine ascomycota, basidiomycota, blastocladiomycota and chytridiomycota." *Fungal Diversity* 73.1 (2015): 1-72.
- Jones, EB Gareth, et al. "The halosphaeriaceae revisited." *Botanica Marina* 60.4 (2017): 453-468.
- Jones, E. B., et al. "An online resource for marine fungi." *Fungal Diversity* 96.1 (2019): 347-433.
- KM3NeT. Available online: [https:// www. km3net. org/](https://www.km3net.org/) (accessed on 24 March 2021).

Kohlmeyer, J., and E. Kohlmeyer. "Marine Mycology: The Higher Fungi—Acad." Press, NY, USA (1979).

Kohlmeyer, Jan, and Michael W. Hawkes. "A SUSPECTED CASE OF MYCOPHYCOBIOSIS BETWEEN MYCOSPHAERELLA APOPHLAEAE (ASCOMYCETES) AND APOPHLAEA SPP.(RHODOPHYTA) 1." *Journal of Phycology* 19.2 (1983): 257-260.

Kohlmeyer, Jan, Joseph W. Spatafora, and Brigitte Volkmann-Kohlmeyer. "Lulworthiales, a new order of marine Ascomycota." *Mycologia* 92.3 (2000): 453-458.

Kohlmeyer, Jan, and Erika Kohlmeyer. *Marine mycology: the higher fungi*. Elsevier, 2013.

Kralj Kunčič, Marjetka, et al. "Morphological response of the halophilic fungal genus *Wallemia* to high salinity." *Applied and environmental microbiology* 76.1 (2010): 329-337.

Lee, Shing Yip, Erik Kristensen, and Robert R. Twilley. *Mangrove ecosystems: a global biogeographic perspective*. Springer Science+ Business Media, 2017.

Li, Quanzi, and Guangyi Wang. "Diversity of fungal isolates from three Hawaiian marine sponges." *Microbiological research* 164.2 (2009): 233-241.

Liu, X-Z., et al. "Phylogeny of tremellomycetous yeasts and related dimorphic and filamentous basidiomycetes reconstructed from multiple gene sequence analyses." *Studies in mycology* 81.1 (2015a): iii-iii.

Liu, X-Z., et al. "Towards an integrated phylogenetic classification of the Tremellomycetes." *Studies in mycology* 81.1 (2015b): 85-147.

Liu, Yang, et al. "Bisthiodiketopiperazines and acorane sesquiterpenes produced by the marine-derived fungus *Penicillium adametzioides* AS-53 on different culture media." *Journal of Natural Products* 78.6 (2015c): 1294-1299.

Luo, Ye, et al. "Fungal diversity in deep-sea sediments from the Magellan seamounts as revealed by a metabarcoding approach targeting the ITS2 regions." *Mycology* 11.3 (2020): 214-229.

Mahé, Stéphane, et al. "Fungi in deep-sea environments and metagenomics." *The Ecological Genomics of Fungi* (2013): 325-354.

Maldonado, Manuel, et al. "Endosymbiotic yeast maternally transmitted in a marine sponge." *The Biological Bulletin* 209.2 (2005): 94-106.

Marano, Agostina V., et al. "11 Hyphochytriomycota, Oomycota and Perkinsozoa (Super-group Chromalveolata)." *Marine Fungi*. de Gruyter, 2012. 167-214.

Massana, Ramon, et al. "Marine protist diversity in European coastal waters and sediments as revealed by high-throughput sequencing." *Environmental microbiology* 17.10 (2015): 4035-4049.

- Millot, Claude, and Isabelle Taupier-Letage. "Circulation in the Mediterranean sea." *The Mediterranean Sea* (2005): 29-66.
- Moreira, David, and Purificación López-García. "Are hydrothermal vents oases for parasitic protists?." *TRENDS in Parasitology* 19.12 (2003): 556-558.
- Morrison-Gardiner, Sarah. "Dominant fungi from Australian coral reefs." *Fungal Divers* 9 (2002): 105-121.
- Muehlstein, Lisa K., David Porter, and Frederick T. Short. "Labyrinthula zosterae sp. nov., the causative agent of wasting disease of eelgrass, *Zostera marina*." *Mycologia* 83.2 (1991): 180-191.
- Nagahama, Takahiko, et al. "Rhodotorula lamellibrachii sp. nov., a new yeast species from a tubeworm collected at the deep-sea floor in Sagami Bay and its phylogenetic analysis." *Antonie van Leeuwenhoek* 80.3 (2001): 317-323.
- Nagahama, Takahiko, et al. "Cryptococcus surugaensis sp. nov., a novel yeast species from sediment collected on the deep-sea floor of Suruga Bay." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53.6 (2003): 2095-2098.
- Nagano, Yuriko, and Takahiko Nagahama. "Fungal diversity in deep-sea extreme environments." *Fungal Ecology* 5.4 (2012): 463-471.
- Nagelkerken, Ivan, et al. "Widespread disease in Caribbean sea fans." *Marine Ecology Progress Series* 160 (1997): 255-263.
- Newel, Steven Y., and Felix Bárlocher. "Removal of fungal and total organic matter from decaying cordgrass leaves by shredder snails." *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 171.1 (1993): 39-49.
- Newell, Steven Y. "Decomposition of shoots of a salt-marsh grass." *Advances in microbial ecology*. Springer, Boston, MA, (1993). 301-326.
- Newell, Steven Y., and David Porter. "Microbial secondary production from salt marsh-grass shoots, and its known and potential fates." *Concepts and controversies in tidal marsh ecology*. Springer, Dordrecht, 2002. 159-185.
- Newton, G. G. F., and E. P. Abraham. "Cephalosporin C, a new antibiotic containing sulphur and D- $\alpha$ -amino adipic acid." *Nature* 175.4456 (1955): 548-548.
- Osterhage, Claudia. *Isolation, structure determination and biological activity assessment of secondary metabolites from marine-derived fungi*. Diss. 2001.
- Paço, Ana, et al. "Biodegradation of polyethylene microplastics by the marine fungus *Zalerion maritimum*." *Science of the Total Environment* 586 (2017): 10-15.
- Pang, Ka-Lai, et al. "'Marine fungi' and 'marine-derived fungi' in natural product chemistry research: toward a new consensual definition." *Fungal Biology Reviews* 30.4 (2016): 163-175.

- Papon, Nicolas, Brent R. Copp, and Vincent Courdavault. "Marine drugs: Biology, pipelines, current and future prospects for production." *Biotechnology Advances* 54 (2022): 107871.
- Peixoto, Raquel S., et al. "Coral probiotics: premise, promise, prospects." *Annual review of animal biosciences* 9 (2021): 265-288.
- Perovic-Ottstadt, Sanja. "A (1-> 3)-beta-D-glucan recognition protein from the sponge *Suberites domuncula*. Mediated activation of fibrinogen-like protein and epidermal growth factor gene expression." *Eur J Biochem* 271 (2004): 1924-1937.
- Pivkin, M. V., et al. "Fungal assemblages associated with sponges of the southern coast of Sakhalin Island." *Russian Journal of Marine Biology* 32 (2006): 207-213.
- Plemenitaš, Ana. "Sensing and responding to hypersaline conditions and the HOG signal transduction pathway in fungi isolated from hypersaline environments: *Hortaea werneckii* and *Wallemia ichthyophaga*." *Journal of Fungi* 7.11 (2021): 988.
- Pogoreutz, Claudia, et al. "Sugar enrichment provides evidence for a role of nitrogen fixation in coral bleaching." *Global Change Biology* 23.9 (2017): 3838-3848.
- Poli, Anna, et al. "Seagrasses, seaweeds and plant debris: an extraordinary reservoir of fungal diversity in the mediterranean sea." *Fungal Ecology* 60 (2022): 101156.
- Rädecker, Nils, et al. "Nitrogen cycling in corals: the key to understanding holobiont functioning?." *Trends in microbiology* 23.8 (2015): 490-497.
- Raghukumar, Chandralata, et al. "Buried in time: culturable fungi in a deep-sea sediment core from the Chagos Trench, Indian Ocean." *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 51.11 (2004): 1759-1768.
- Raghukumar, Chandralata, Samir R. Damare, and Purnima Singh. "A review on deep-sea fungi: occurrence, diversity and adaptations." (2010): 479-492.
- Raghukumar, Seshagiri. "The marine environment and the role of fungi." *Fungi in coastal and oceanic marine ecosystems*. Springer, Cham, 2017. 17-38.
- Ralph, Peter J., and Frederick T. Short. "Impact of the wasting disease pathogen, *Labyrinthula zosterae*, on the photobiology of eelgrass *Zostera marina*." *Marine Ecology Progress Series* 226 (2002): 265-271.
- Rämä, Teppo, Brandon T. Hassett, and Ekaterina Bubnova. "Arctic marine fungi: from filaments and flagella to operational taxonomic units and beyond." *Botanica marina* 60.4 (2017): 433-452.
- Rédou, Vanessa, et al. "Species richness and adaptation of marine fungi from deep-subseafloor sediments." *Applied and environmental microbiology* 81.10 (2015): 3571-3583.
- Richards, Thomas A., et al. "Marine fungi: their ecology and molecular diversity." *Annual review of marine science* 4.1 (2012): 495-522.

- Richards, Thomas A., et al. "Molecular diversity and distribution of marine fungi across 130 European environmental samples." *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 282.1819 (2015): 20152243.
- Ritchie, Kim B. "Regulation of microbial populations by coral surface mucus and mucus-associated bacteria." *Marine Ecology Progress Series* 322 (2006): 1-14.
- Roik, Anna, Miriam Reverter, and Claudia Pogoreutz. "A roadmap to understanding diversity and function of coral reef-associated fungi." *FEMS Microbiology Reviews* 46.6 (2022): fuac028.
- Rosado, Phillipe M., et al. "Marine probiotics: increasing coral resistance to bleaching through microbiome manipulation." *The ISME journal* 13.4 (2019): 921-936.
- Rot, Chagai, et al. "Putative cross-kingdom horizontal gene transfer in sponge (Porifera) mitochondria." *BMC evolutionary biology* 6.1 (2006): 1-11.
- Roth Jr, F. J., P. A. Orpurt, and Donald G. Ahearn. "Occurrence and distribution of fungi in a subtropical marine environment." *Canadian Journal of Botany* 42.4 (1964): 375-383.
- Saghai-Marroof, M. A., et al. "Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81.24 (1984): 8014-8018.
- Silliman, Brian R., and Steven Y. Newell. "Fungal farming in a snail." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100.26 (2003): 15643-15648.
- Schmit, John Paul. "A checklist of mangrove-associated fungi, their geographical distribution and known host plant." *Mycotaxon* 85 (2003): 423-477.
- Singh, Purnima, et al. "Fungal diversity in deep-sea sediments revealed by culture-dependent and culture-independent approaches." *Fungal Ecology* 5.5 (2012): 543-553.
- Smith, Garriet W., et al. "Caribbean sea-fan mortalities." *Nature* 383.6600 (1996): 487-487.
- Spatafora, Joseph W., Brigitte Volkmann-Kohlmeyer, and Jan Kohlmeyer. "Independent terrestrial origins of the Halosphaeriales (marine Ascomycota)." *American Journal of Botany* 85.11 (1998): 1569-1580.
- Strake, D. Te, et al. "Fungal filaments in *Millepora complanata* Lamarck, 1816 (Cnidaria: hydrozoa) after mass expulsion of zooxanthellae." *Florida Scientist* (1988): 184-188.
- Suetrong, Satinee, et al. "Molecular systematics of the marine Dothideomycetes." *Studies in Mycology* 61.1 (2009): 157-163.
- Tedersoo, Leho, et al. "High-level classification of the Fungi and a tool for evolutionary ecological analyses." *Fungal diversity* 90.1 (2018): 135-159.
- Van Dover, Cindy Lee, et al. "A fungal epizootic in mussels at a deep-sea hydrothermal vent." *Marine Ecology* 28.1 (2007): 54-62.

Wang, Xin, et al. "Distribution and diversity of planktonic fungi in the West Pacific Warm Pool." *PLoS One* 9.7 (2014): e101523.

Wang, Junfeng, et al. "Cytotoxic cytochalasins from marine-derived fungus *Arthrinium arundinis*." *Planta medica* 81.02 (2015a): 160-166.

Wang, Q-M., et al. "Phylogeny of yeasts and related filamentous fungi within Pucciniomycotina determined from multigene sequence analyses." *Studies in mycology* 81.1 (2015b): 27-53.

White, Thomas J., et al. "Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics." *PCR protocols: a guide to methods and applications* 18.1 (1990): 315-322.

[www.marinefungi.org](http://www.marinefungi.org)

Xu, Wei, Ka-Lai Pang, and Zhu-Hua Luo. "High fungal diversity and abundance recovered in the deep-sea sediments of the Pacific Ocean." *Microbial ecology* 68 (2014): 688-698.

Xu, Lijian, et al. "Antibacterial and antifungal compounds from marine fungi." *Marine drugs* 13.6 (2015): 3479-3513.

Xu, Wei, et al. "Fungal community analysis in the deep-sea sediments of the Pacific Ocean assessed by comparison of ITS, 18S and 28S ribosomal DNA regions." *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 109 (2016): 51-60.

Xu, Wei, et al. "Fungi associated with chimney and sulfide samples from a South Mid-Atlantic Ridge hydrothermal site: distribution, diversity and abundance." *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 123 (2017): 48-55.

Xu, Wei, et al. "Fungal diversity in deep-sea sediments of a hydrothermal vent system in the Southwest Indian Ridge." *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 131 (2018): 16-26.

Xu, Wei, et al. "Fungal diversity in the deep-sea hadal sediments of the Yap Trench by cultivation and high throughput sequencing methods based on ITS rRNA gene." *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 145 (2019): 125-136.

Zalar, Polona, et al. "Halophilic black yeasts colonize wood immersed in hypersaline water." (2005): 323-326.

Zhang, Xiao-Yong, et al. "Diverse deep-sea fungi from the South China Sea and their antimicrobial activity." *Current Microbiology* 67.5 (2013): 525-530.

Zhang, Xiao-yong, et al. "Insights into deep-sea sediment fungal communities from the East Indian Ocean using targeted environmental sequencing combined with traditional cultivation." *PLoS One* 9.10 (2014): e109118.

Zhang, Xiao-Yong, et al. "Exploring fungal diversity in deep-sea sediments from Okinawa Trough using high-throughput Illumina sequencing." *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 116 (2016): 99-105.

Zuccaro, Alga, et al. "Detection and identification of fungi intimately associated with the brown seaweed *Fucus serratus*." *Applied and environmental microbiology* 74.4 (2008): 931-941.