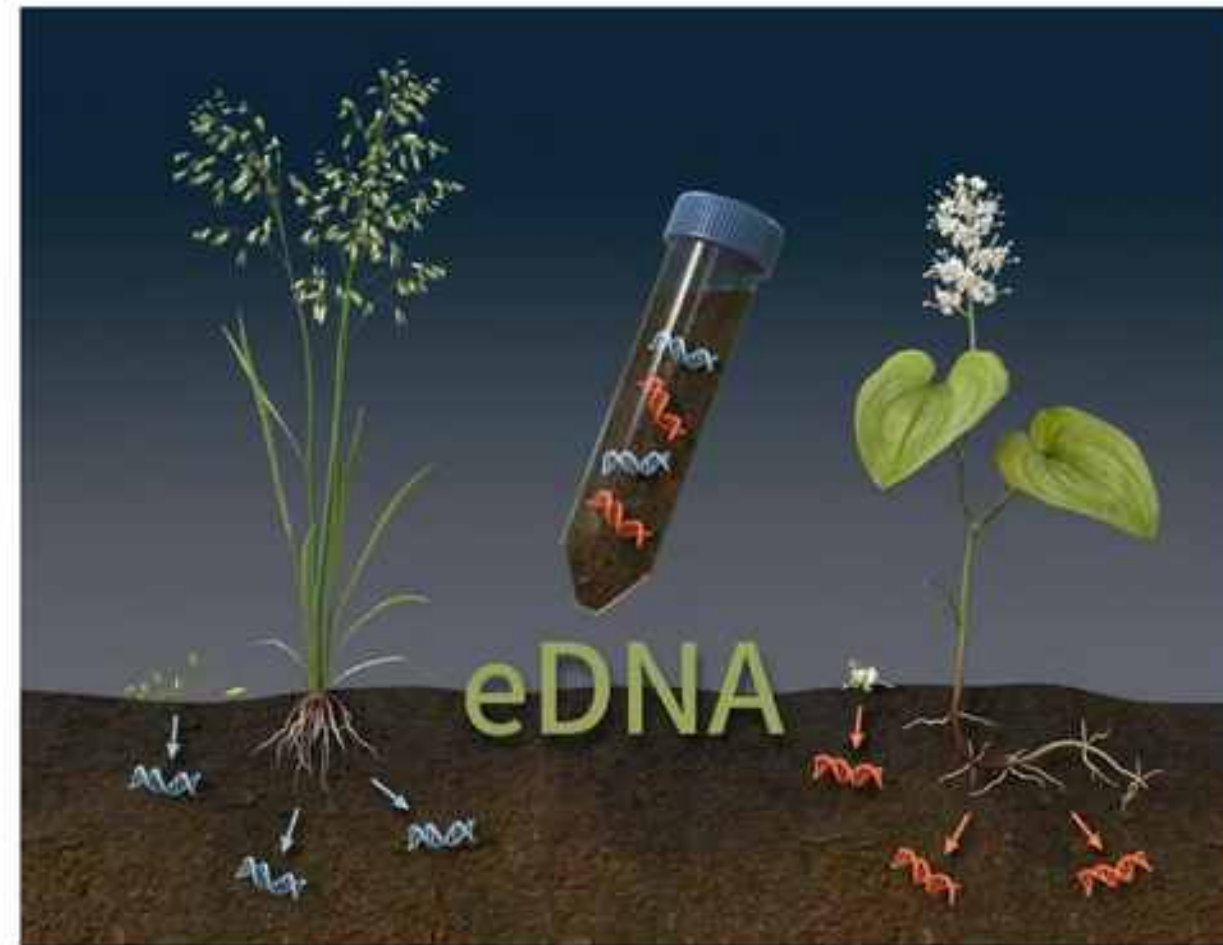
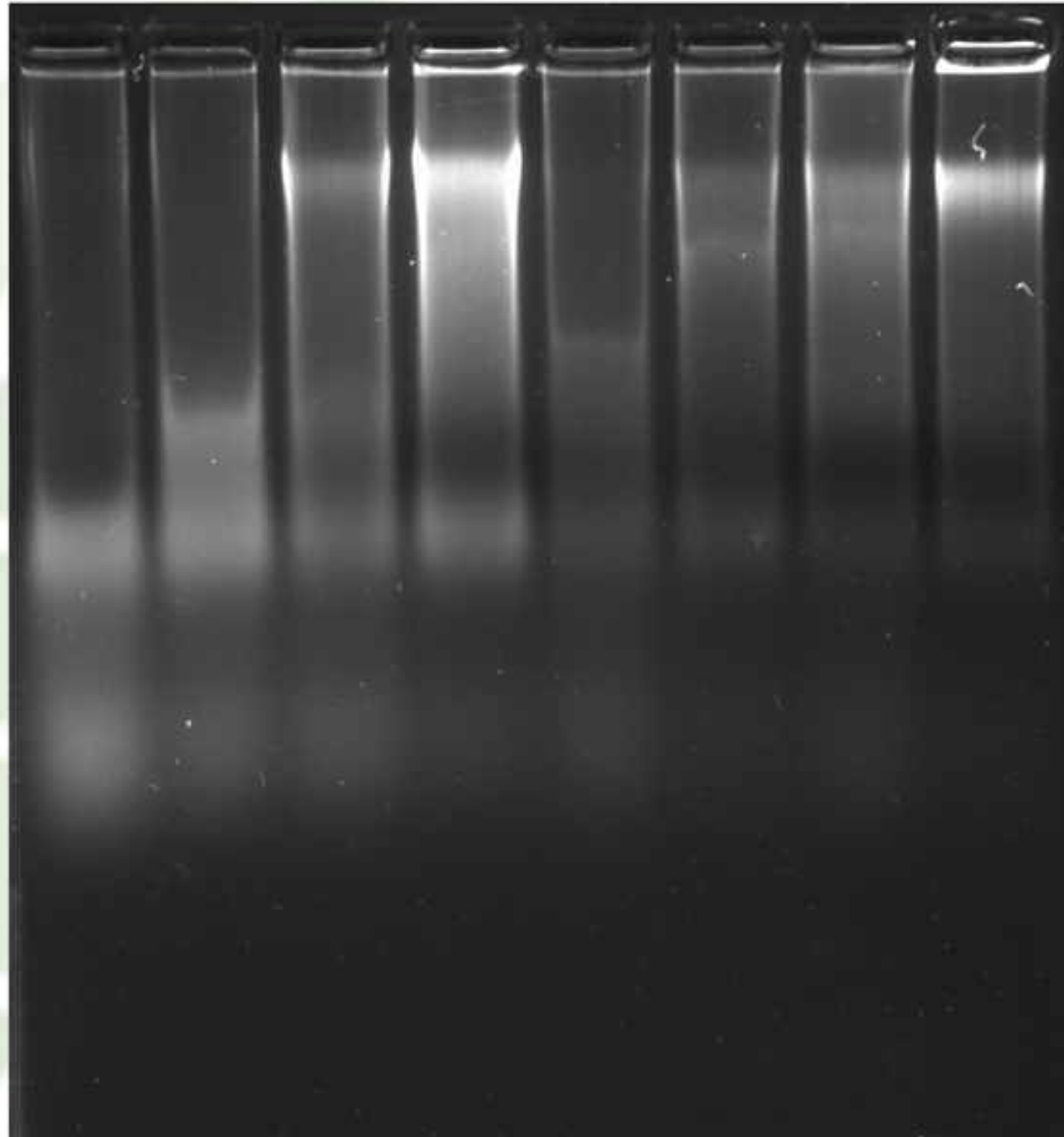


# Messa a punto estrazione eDNA

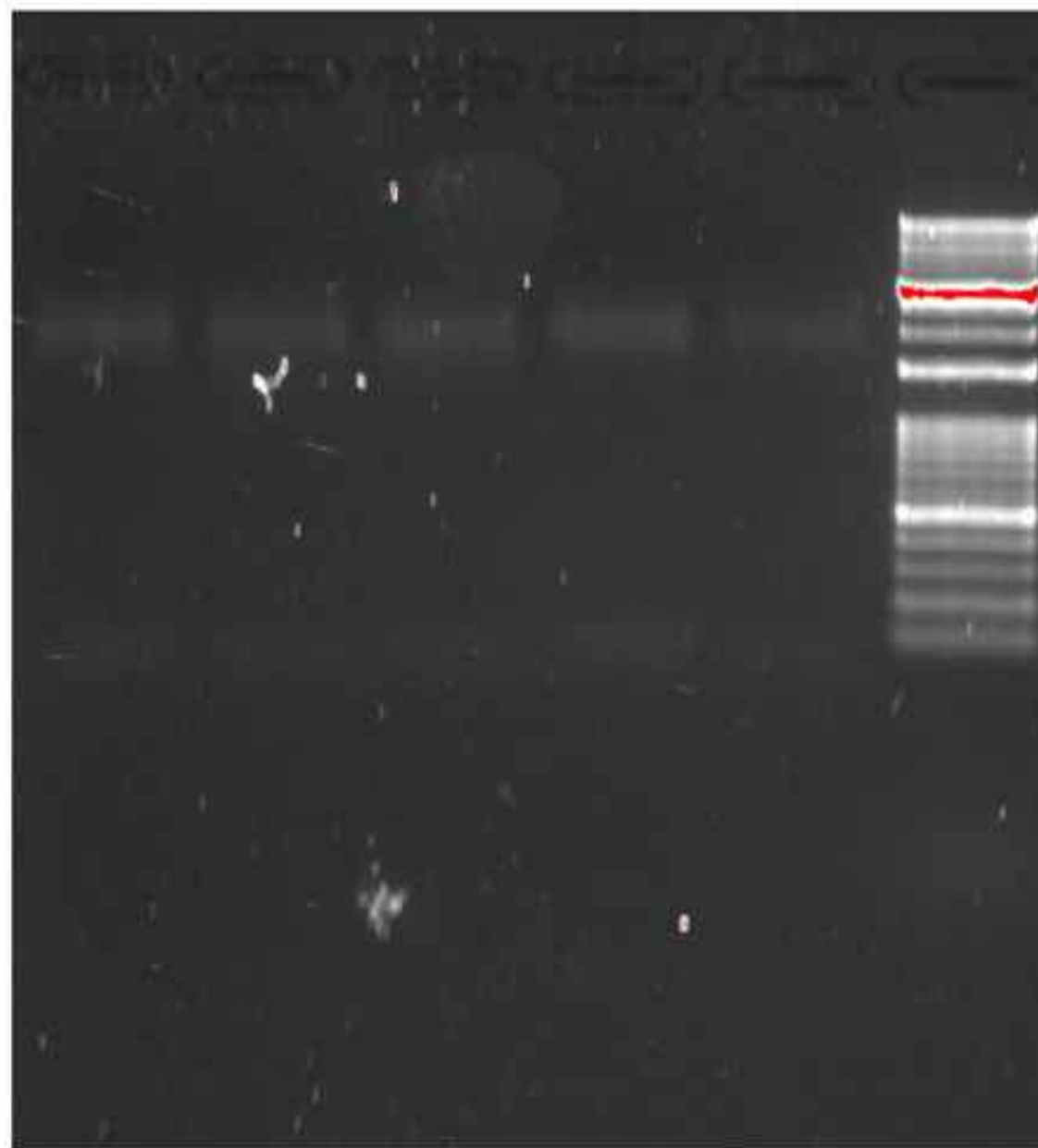




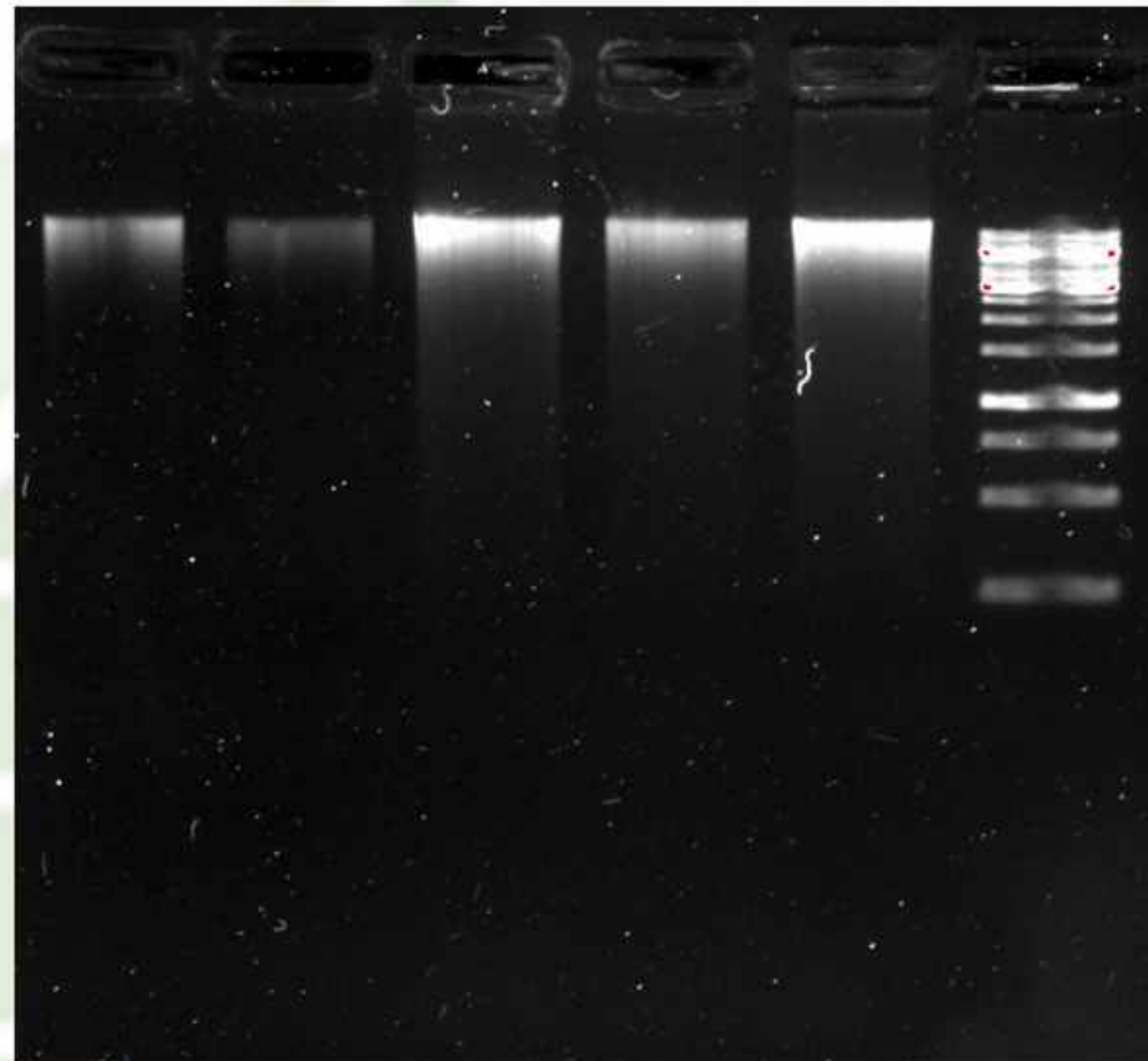


## eDNA estratto

- Degradato
- Qualità bassa
- Quantità bassa
- Non amplificabile

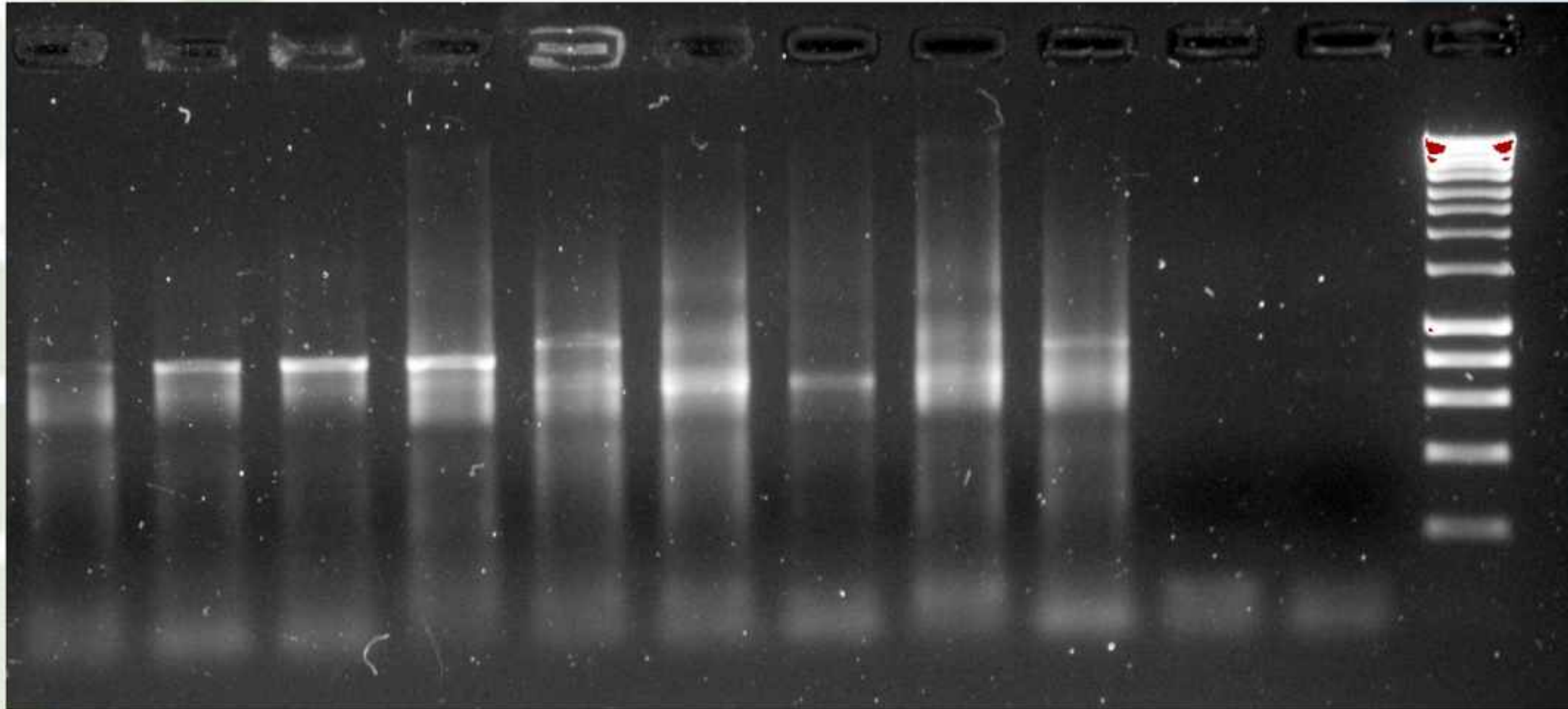






## eDNA estratto

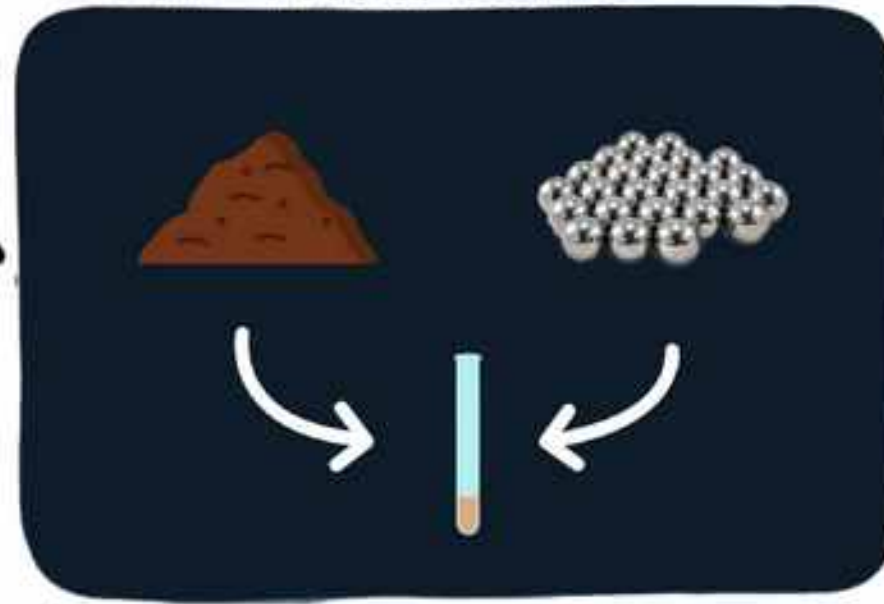
- Integro
- Qualità migliorata
- Quantità elevata
- Amplificabile



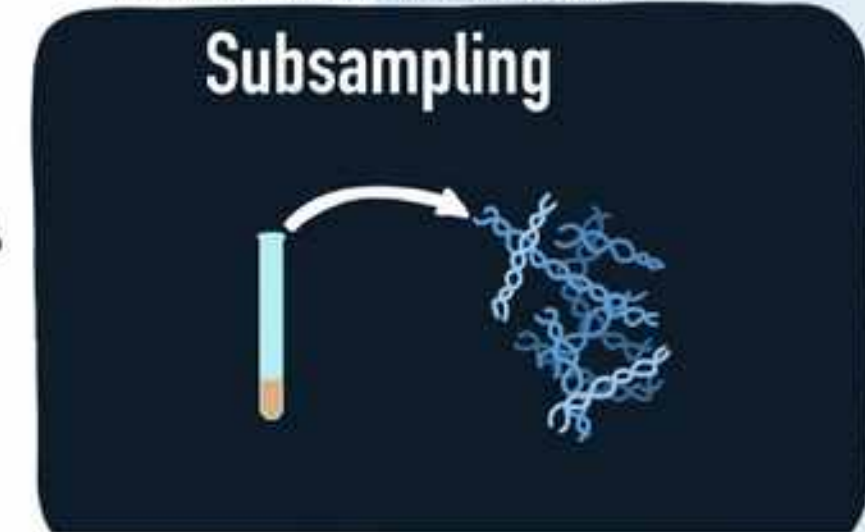
**SAMPLE TYPE**



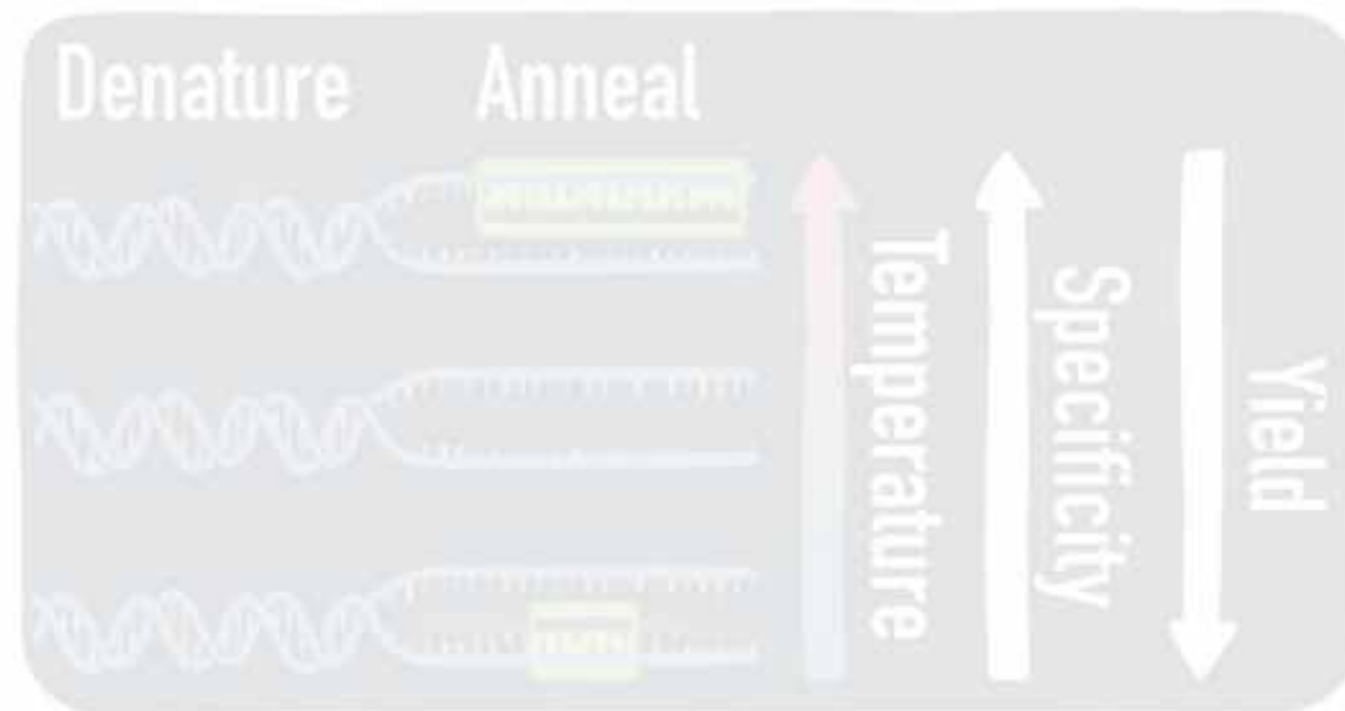
**PRE-PROCESSING**



**DNA EXTRACTION**



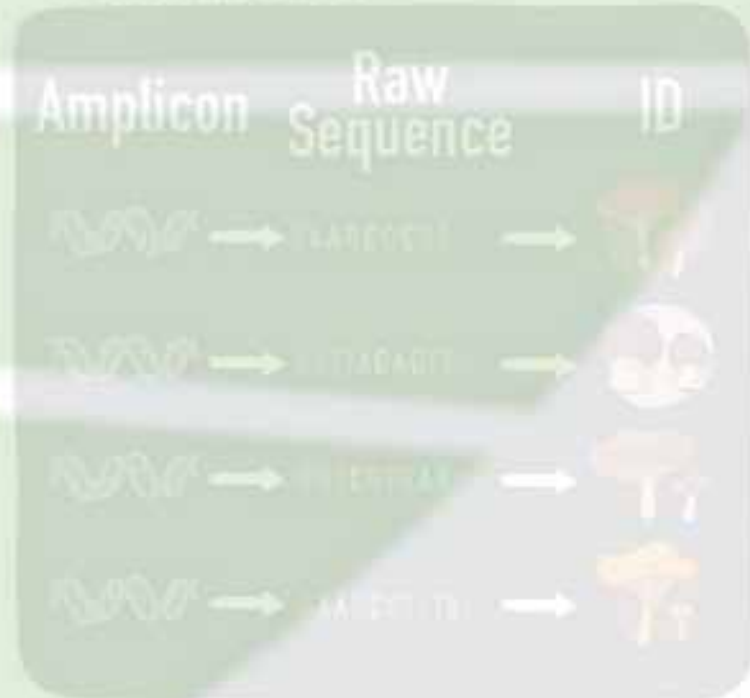
**PCR AMPLIFICATION**



**MARKER SELECTION**



**SEQUENCING**

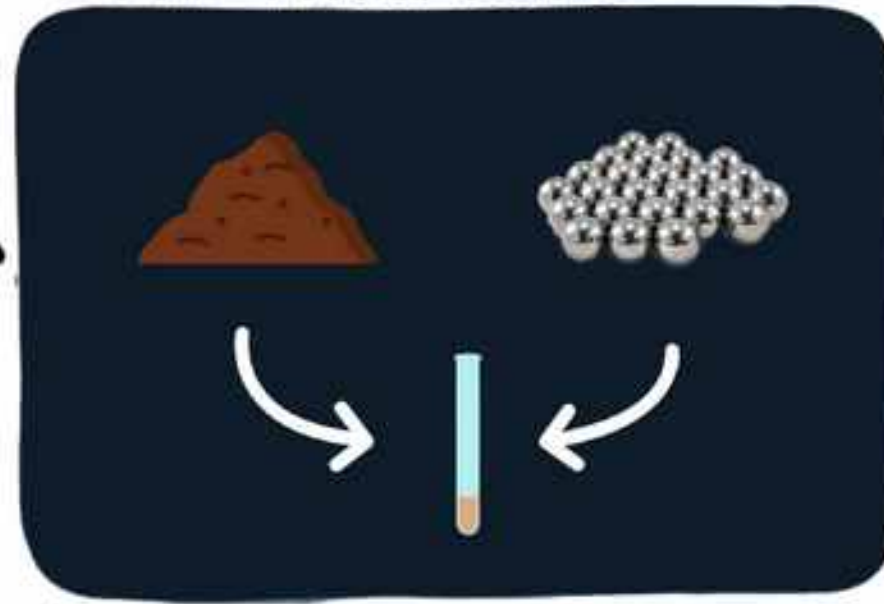




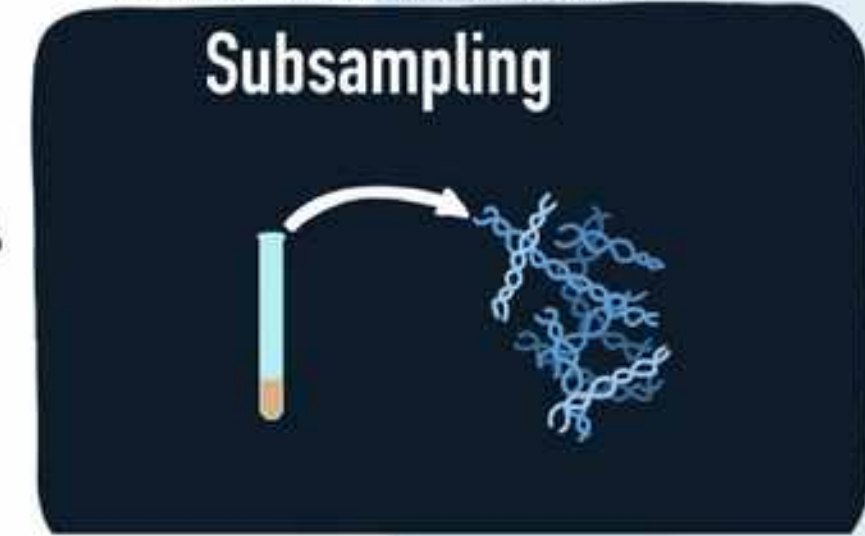
**SAMPLE TYPE**



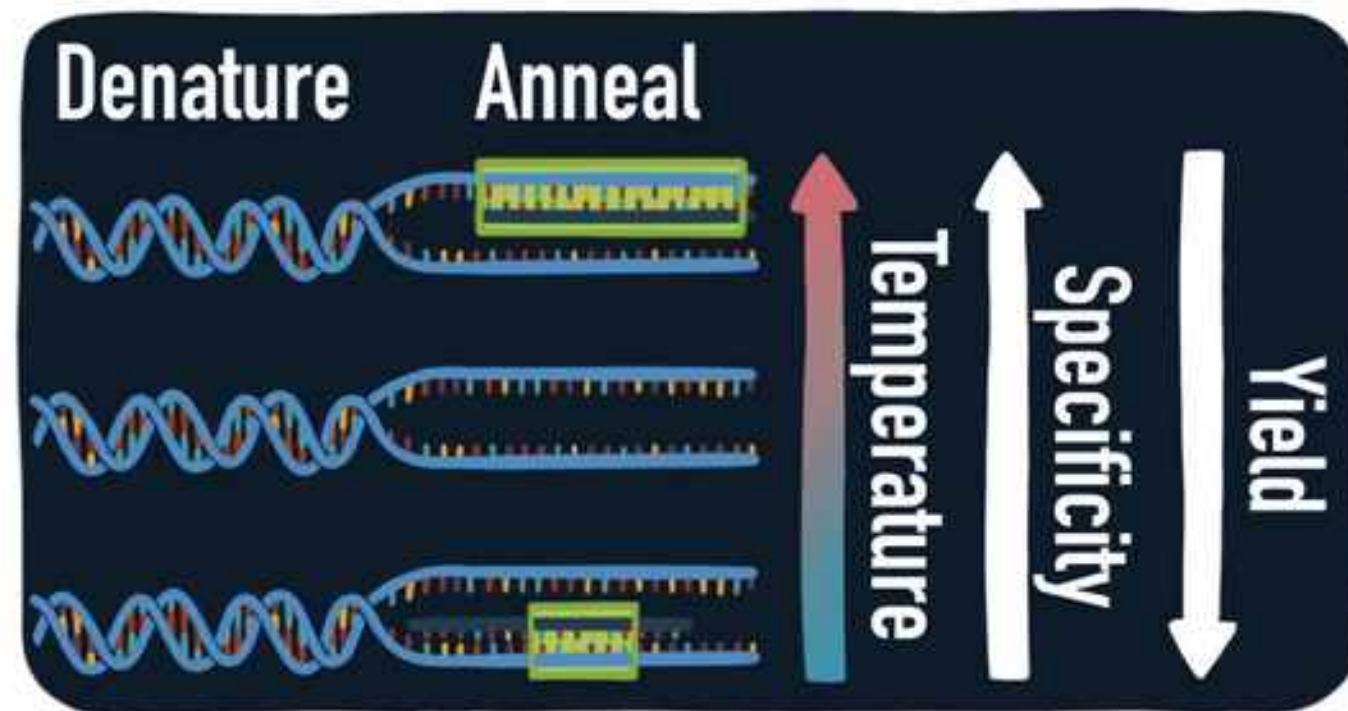
**PRE-PROCESSING**



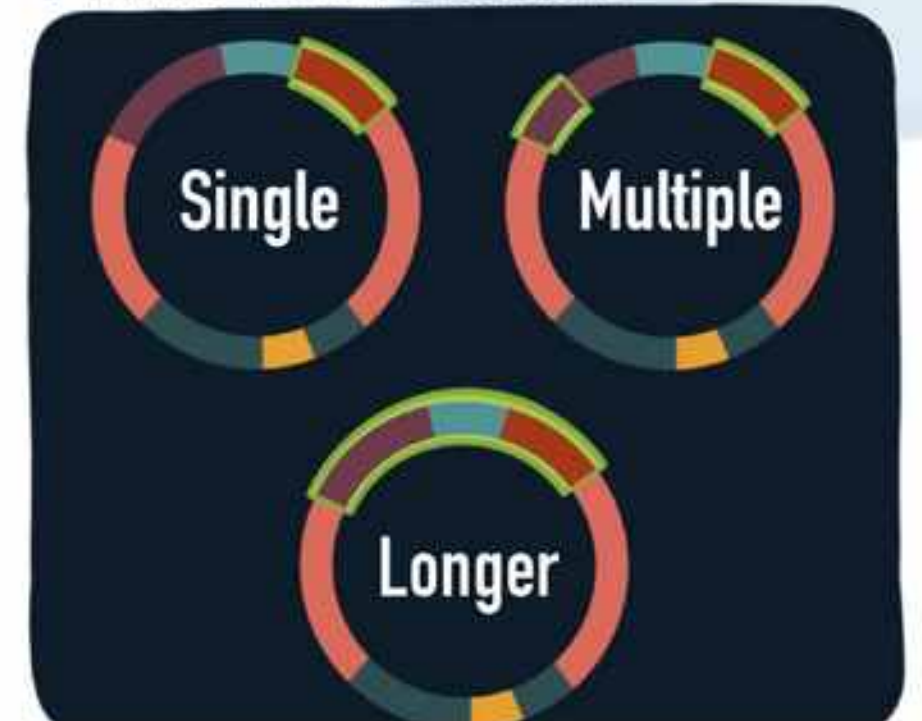
**DNA EXTRACTION**



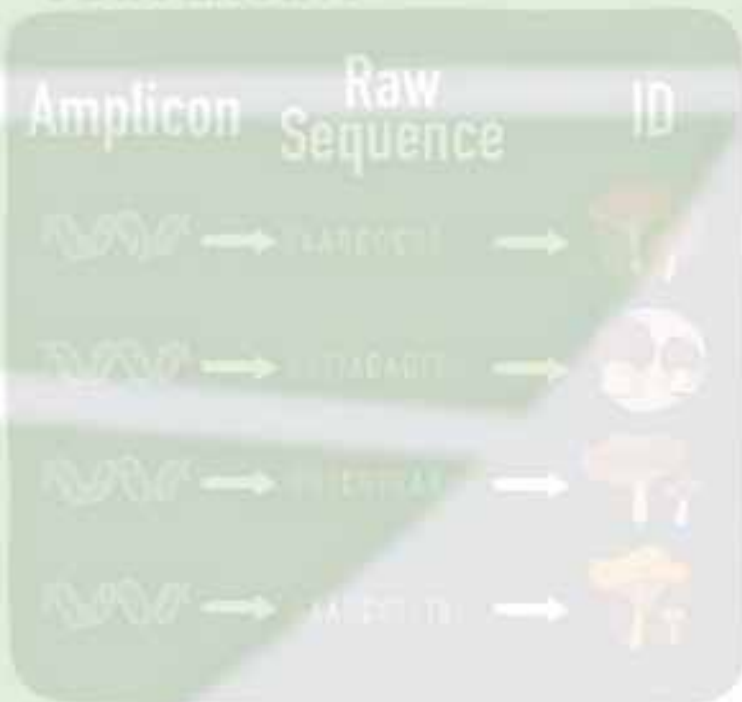
**PCR AMPLIFICATION**



**MARKER SELECTION**



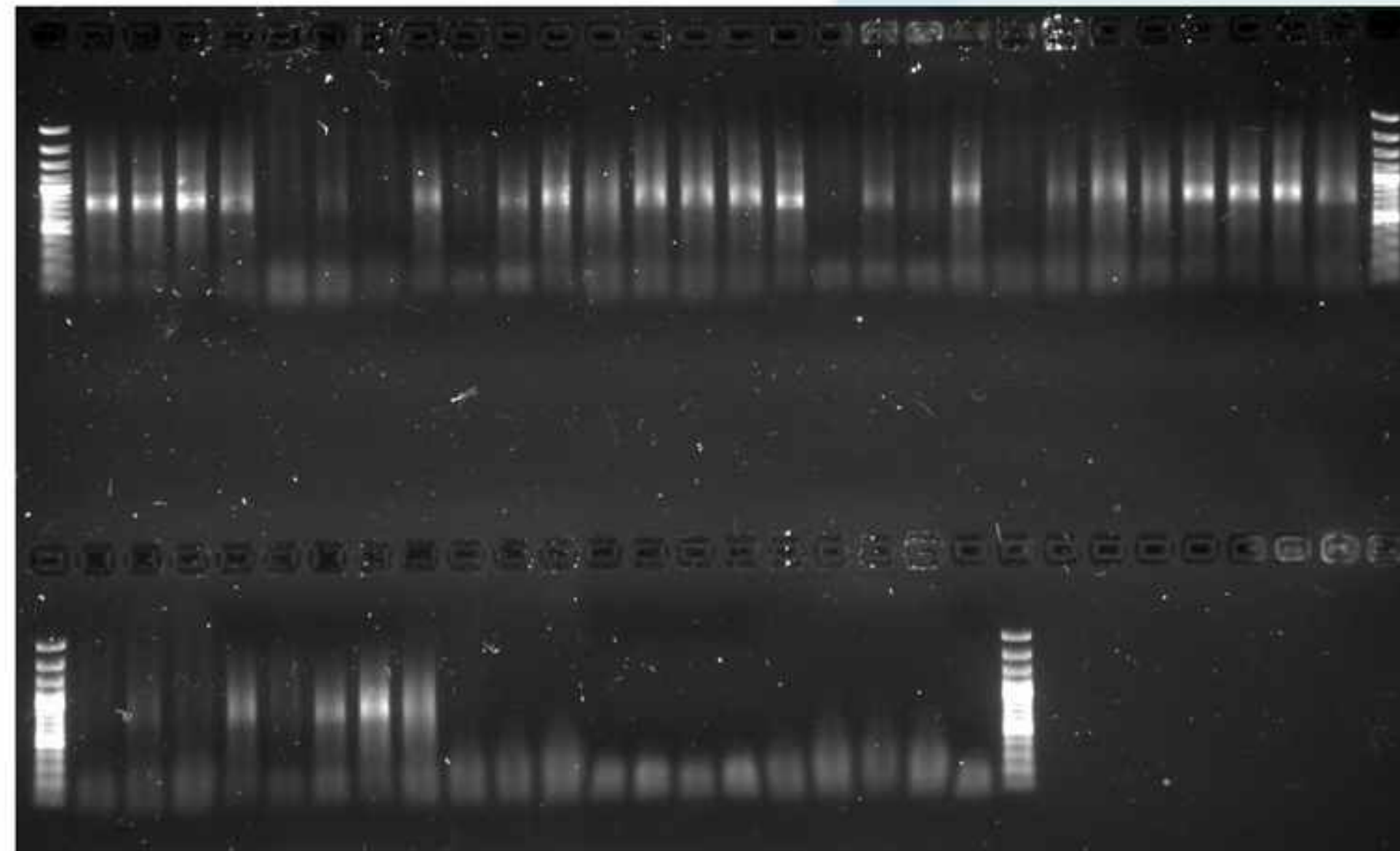
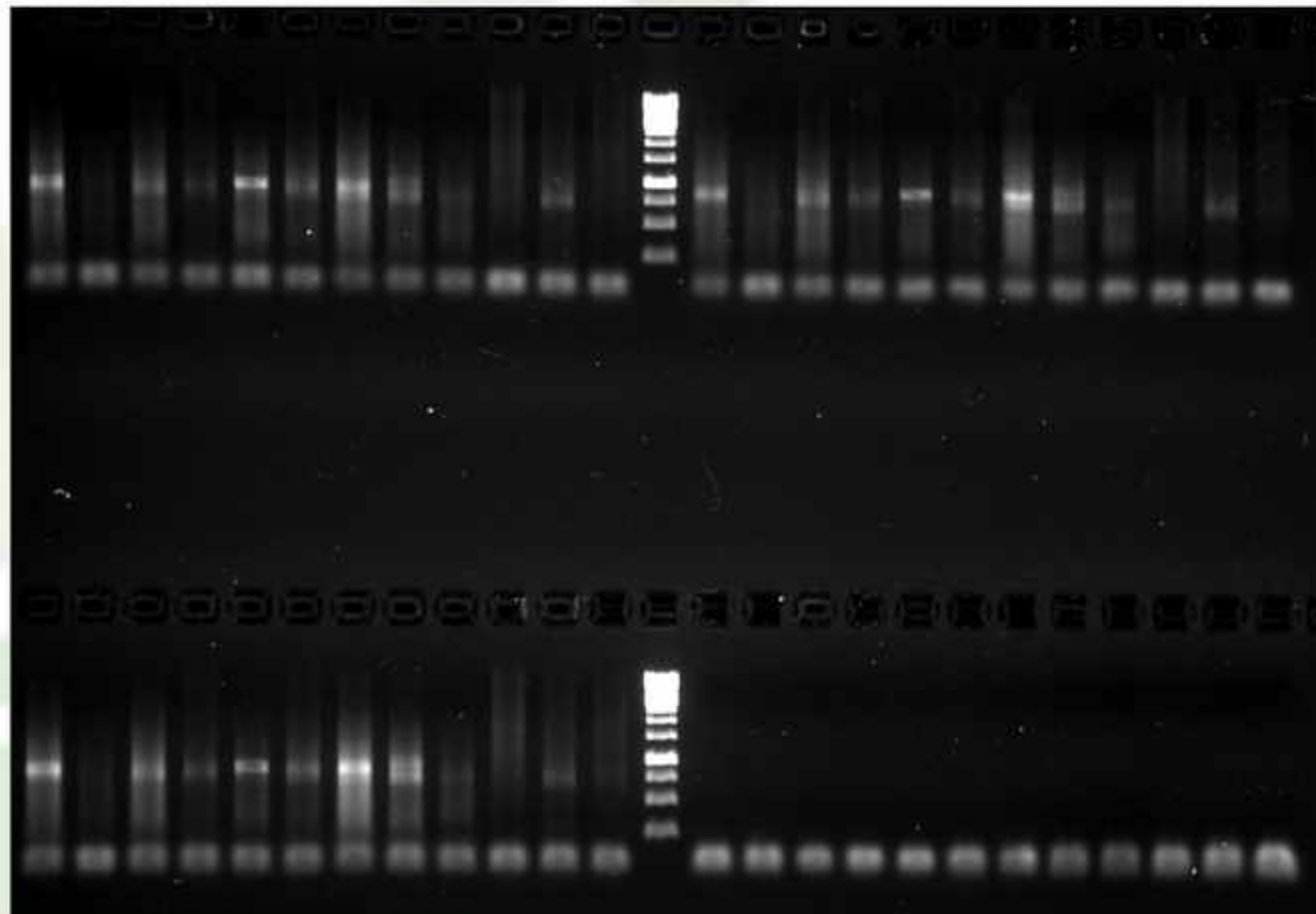
**SEQUENCING**



## Amplificazione dell'eDNA

Sono state utilizzate 3 diverse temperature di annealing per permettere una maggiore eterogeneità dell'amplificazione, permettendo un più ampio range di specie amplificate

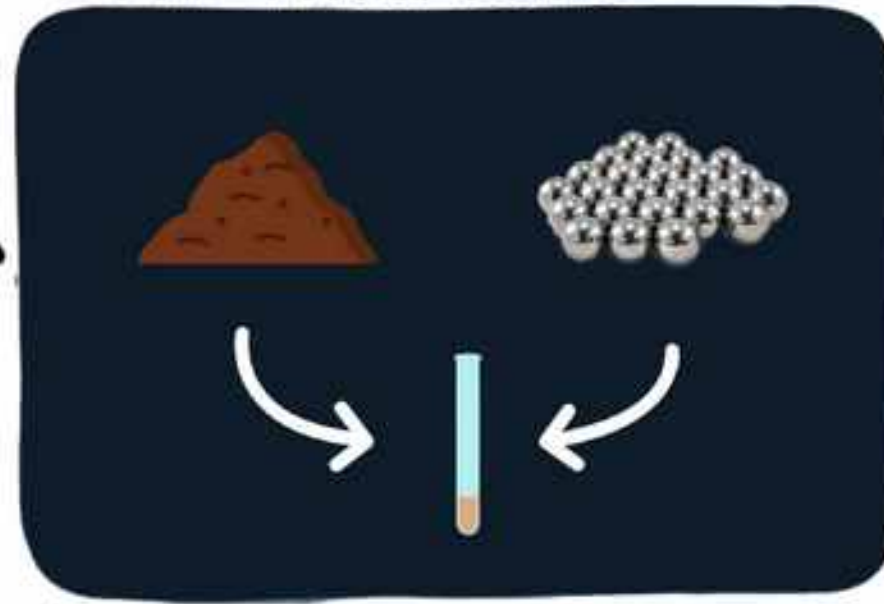




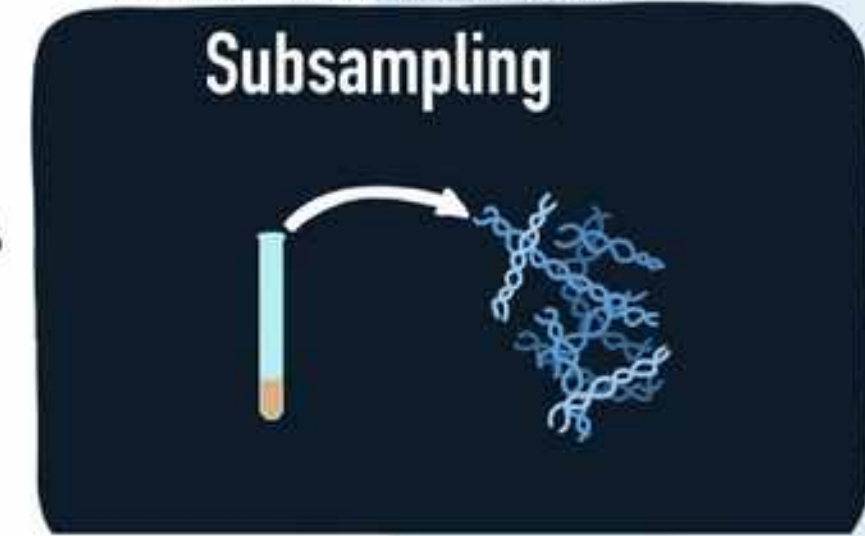
**SAMPLE TYPE**



**PRE-PROCESSING**



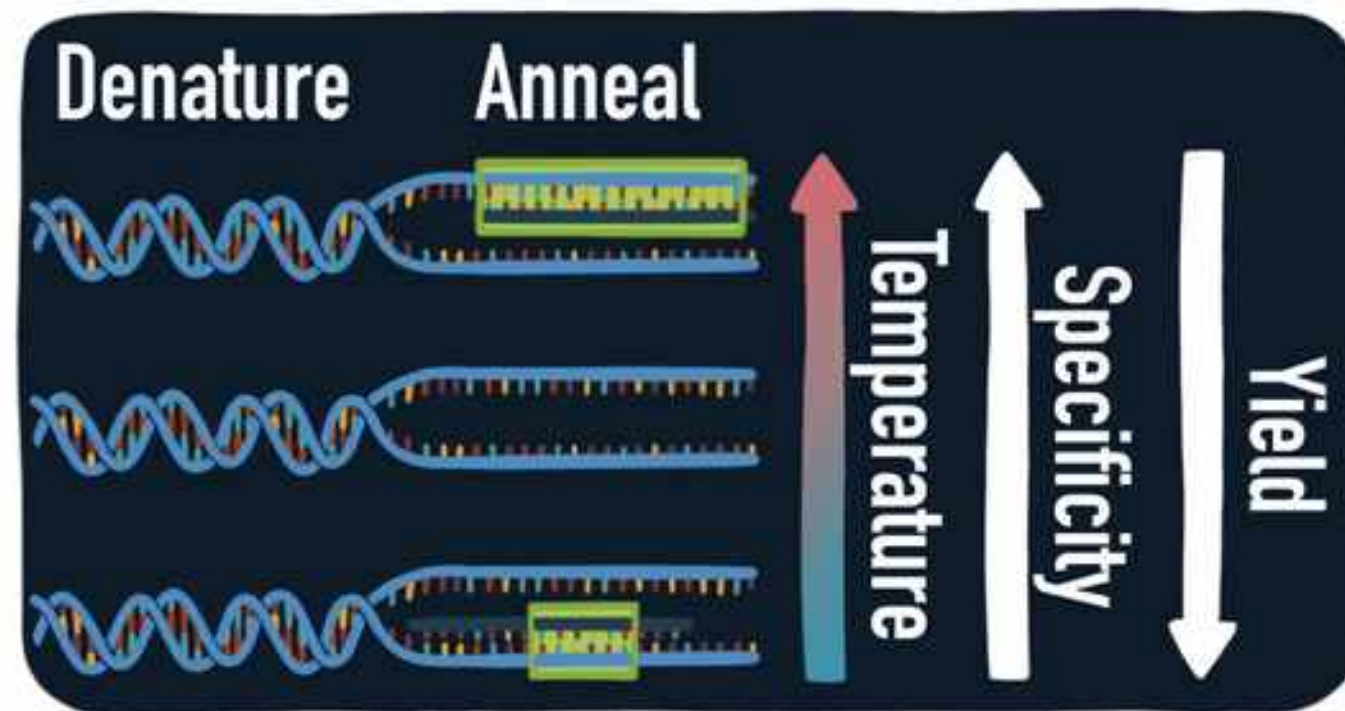
**DNA EXTRACTION**



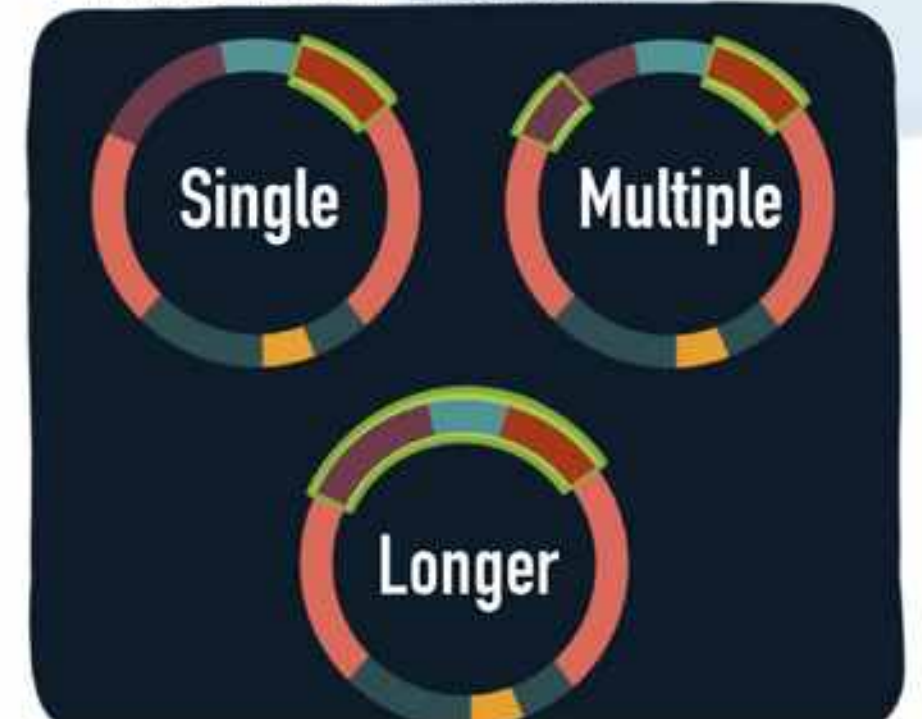
**SEQUENCING**

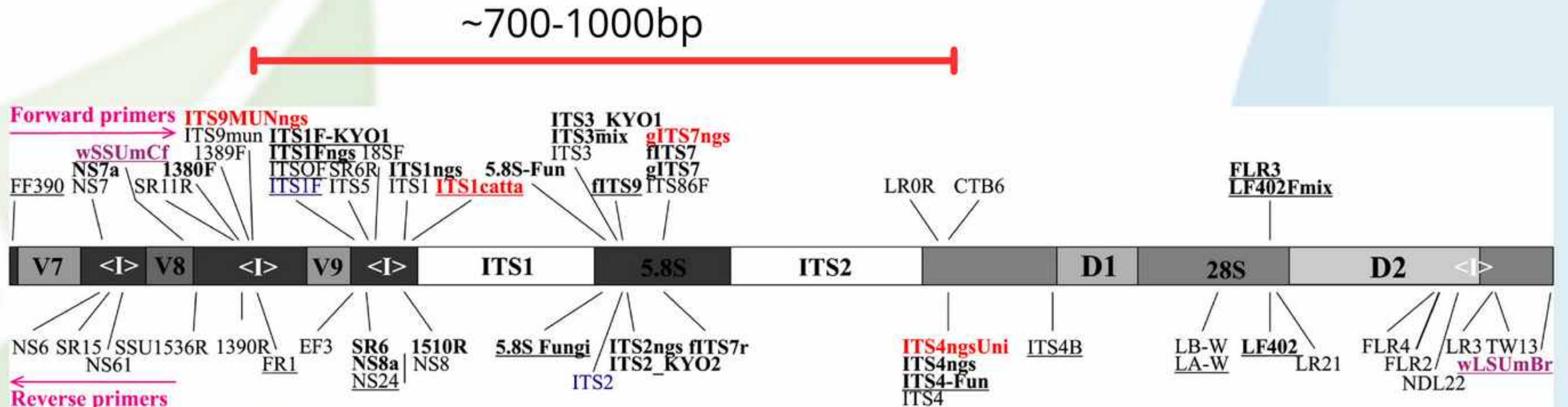
Amplicon	Raw Sequence	ID
	GAAGCGCGTTI	
	GTTTACTGA	
	GGTCGTGAAG	
	GAAGCGTTAI	

**PCR AMPLIFICATION**



**MARKER SELECTION**





Best practices in metabarcoding of fungi: From experimental design to results (Tedersoo et al, 2022)



**Long reads**  
up to 100kbp



**illumina**

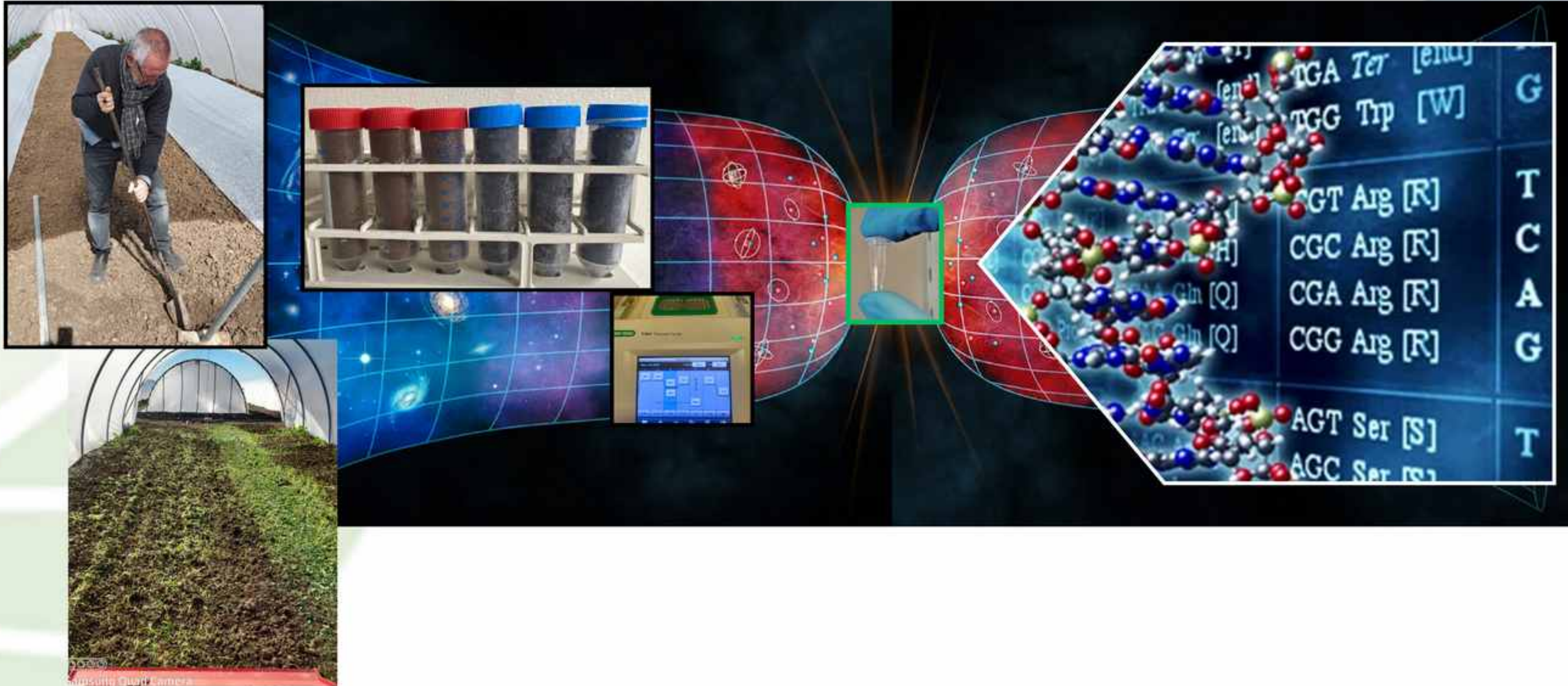


**Short reads**  
300bp

**Long reads**  
up to 25kbp

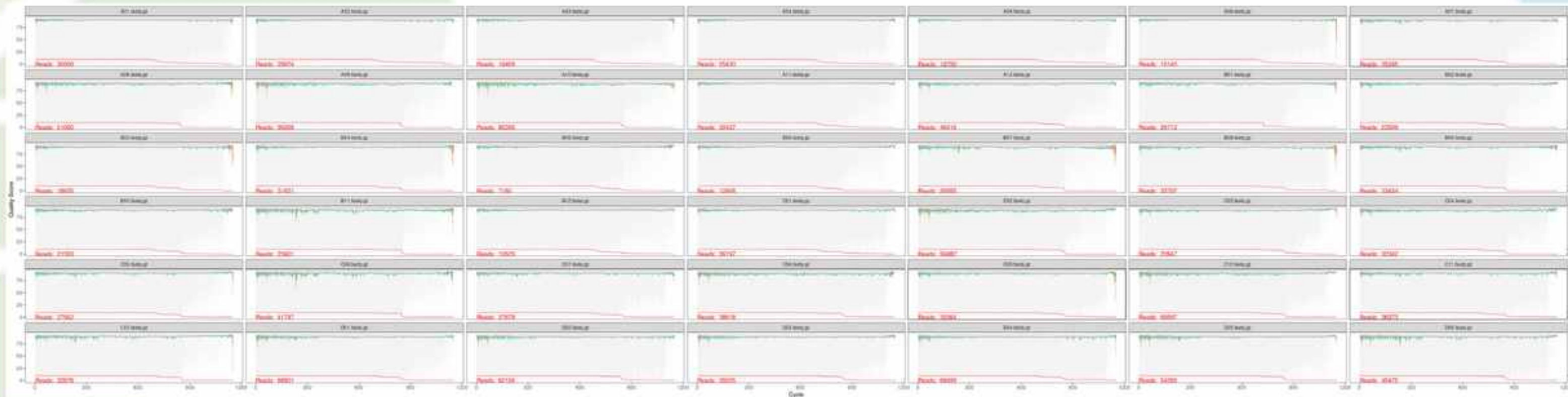
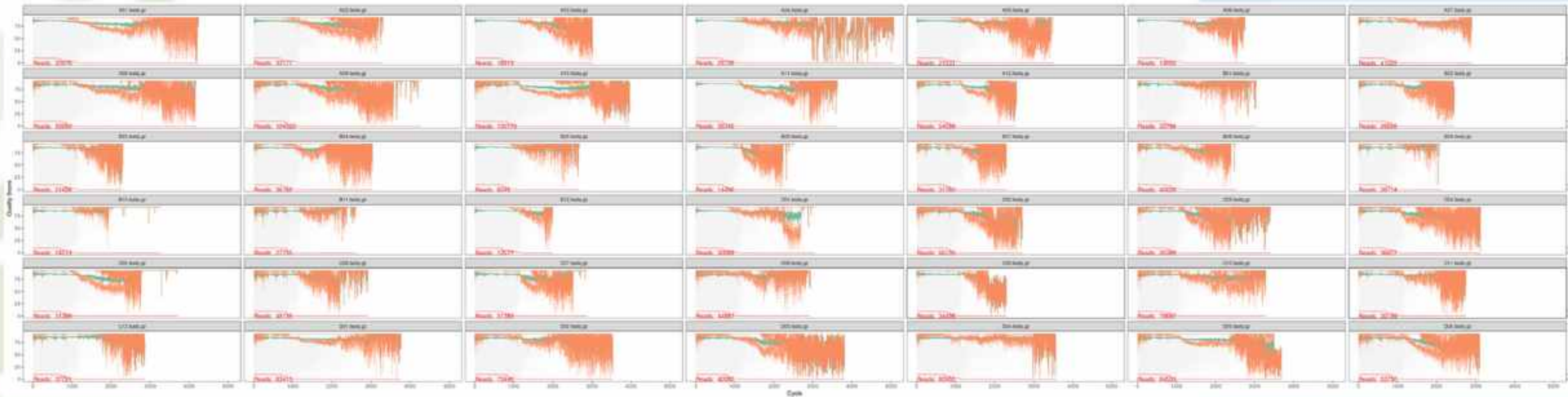


**PacBio**



	<b>input</b>	<b>filtered</b>	<b>denoised</b>	<b>nonchim</b>
<b>Reads Totali</b>	1751625	1504677	1276926	1194962
<b>Media per campione</b>	41705	35825	30403	28451
<b>Numero minimo</b>	8246	7180	4912	4897
<b>Numero massimo</b>	104323	90268	82871	74258
<b>Lunghezza media</b>	850 bp			

**Non  
Filtrate**



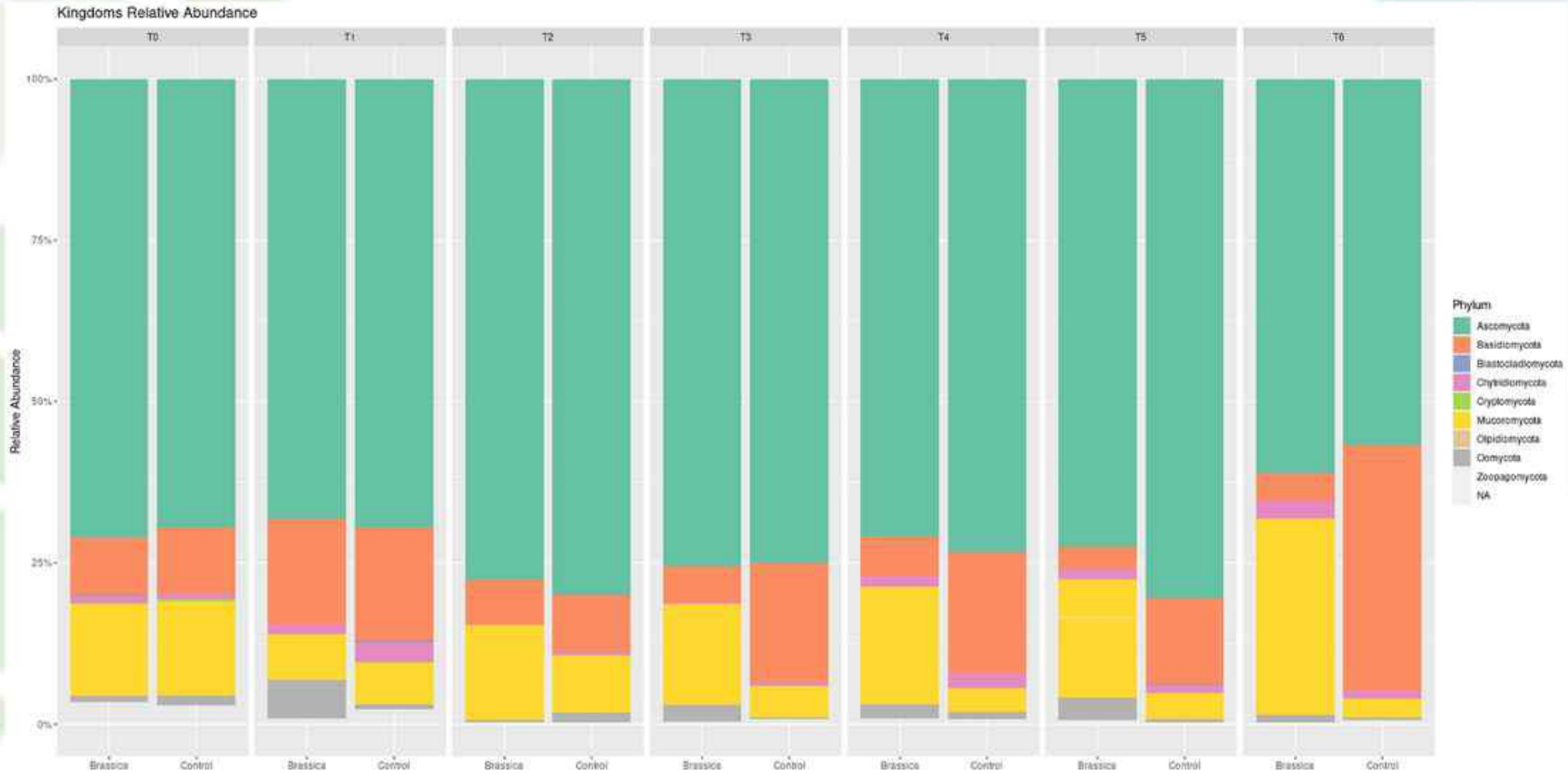
**Filtrate**

## Classificazione delle ASV:

La classificazione delle ASV (Amplicon Sequence Variants) è stata eseguita mediante l'allineatore blastn utilizzando due diversi database: **nt** di NCBI e **UNITE**.

Un corretto allineamento e una corretta assegnazione tassonomica utilizzando un *database* contenente informazioni corrette, aggiornate e accurate è un punto cruciale per le analisi successive.





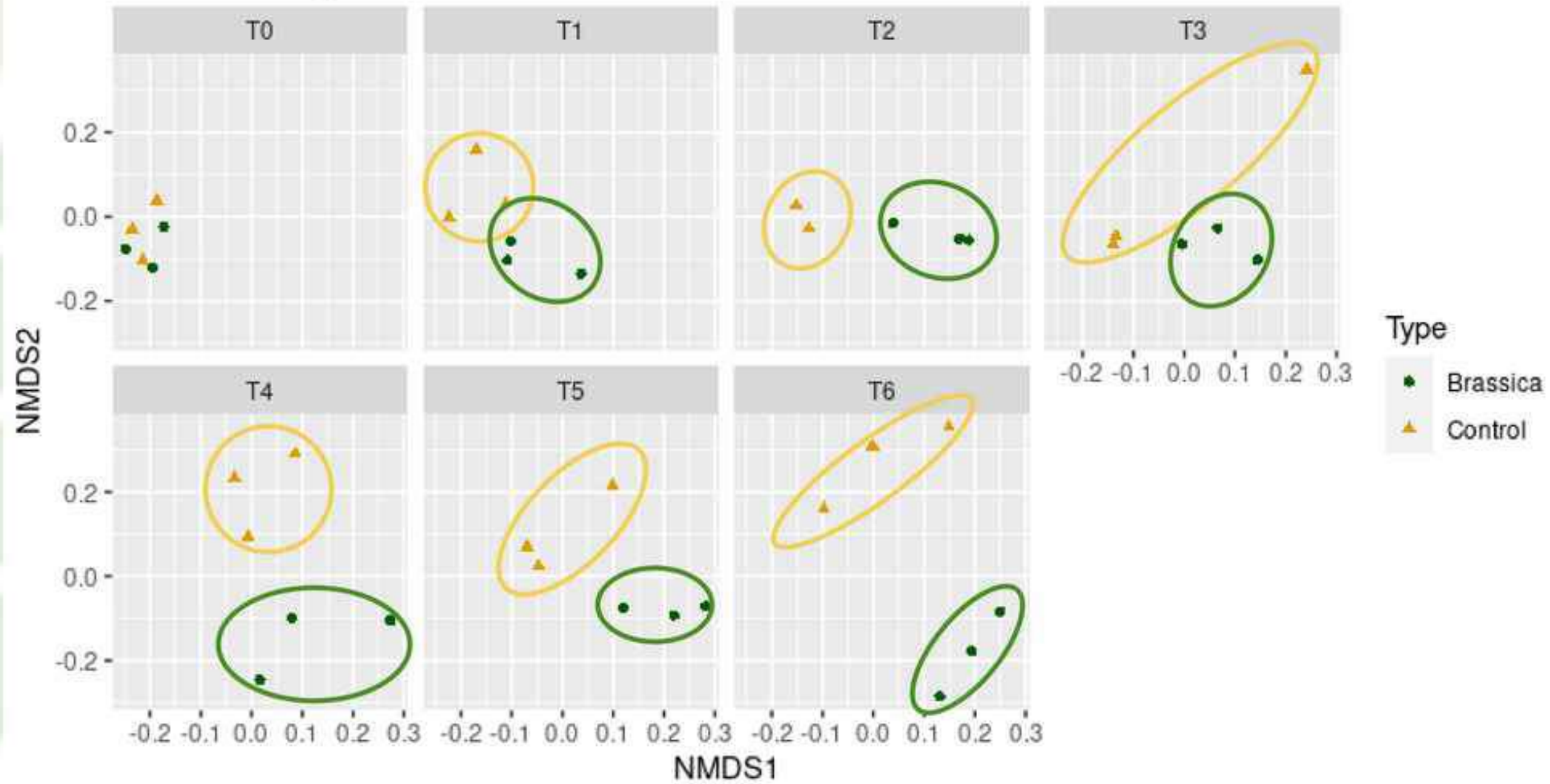
La biodiversità microbica del suolo si riferisce alla varietà e all'abbondanza di microrganismi, come batteri, funghi, archaea e virus, presenti nel suolo.

Può essere misurata in vari livelli, tra cui **alfa diversità** e **beta diversità**.

L'**alfa diversità** si riferisce alla diversità delle specie all'interno di un ambiente specifico (intraspecifica). Spiega la diversità osservata tra le specie, ad esempio, di un dato suolo.

La **beta diversità** rappresenta le differenze nella composizione delle specie tra diversi habitat (interspecifica). Aiuta a comprendere come la composizione delle specie varia tra ecosistemi diversi, fornendo informazioni sulla eterogeneità della biodiversità in un contesto più ampio. Spiega le differenze osservate tra specie presenti, ad esempio, in suoli distinti.

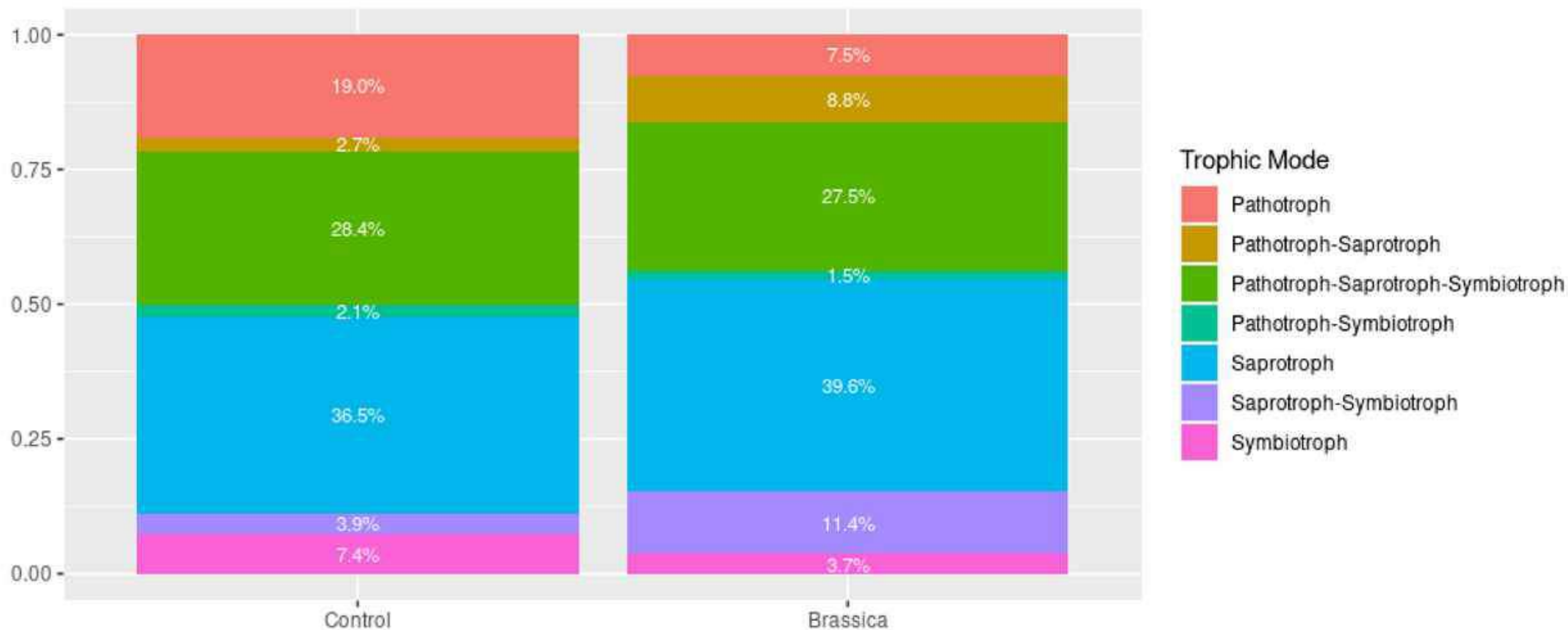
Beta Diversity

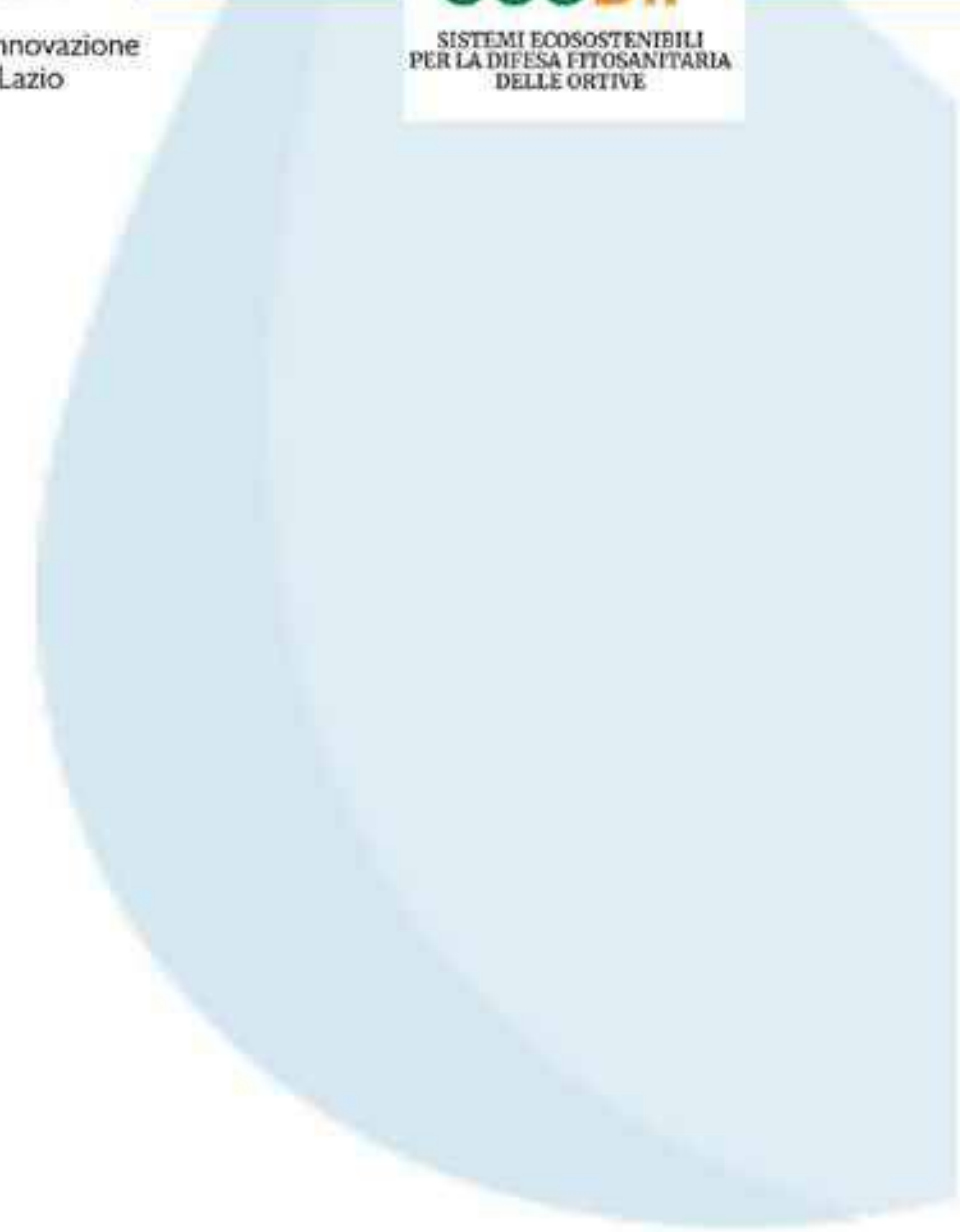


Sebbene il sequenziamento abbia aumentato notevolmente la capacità di conoscere la diversità dei funghi nei campioni ambientali, attualmente non è presente un modo semplice per ordinare grandi pool di sequenze in categorie funzionali.

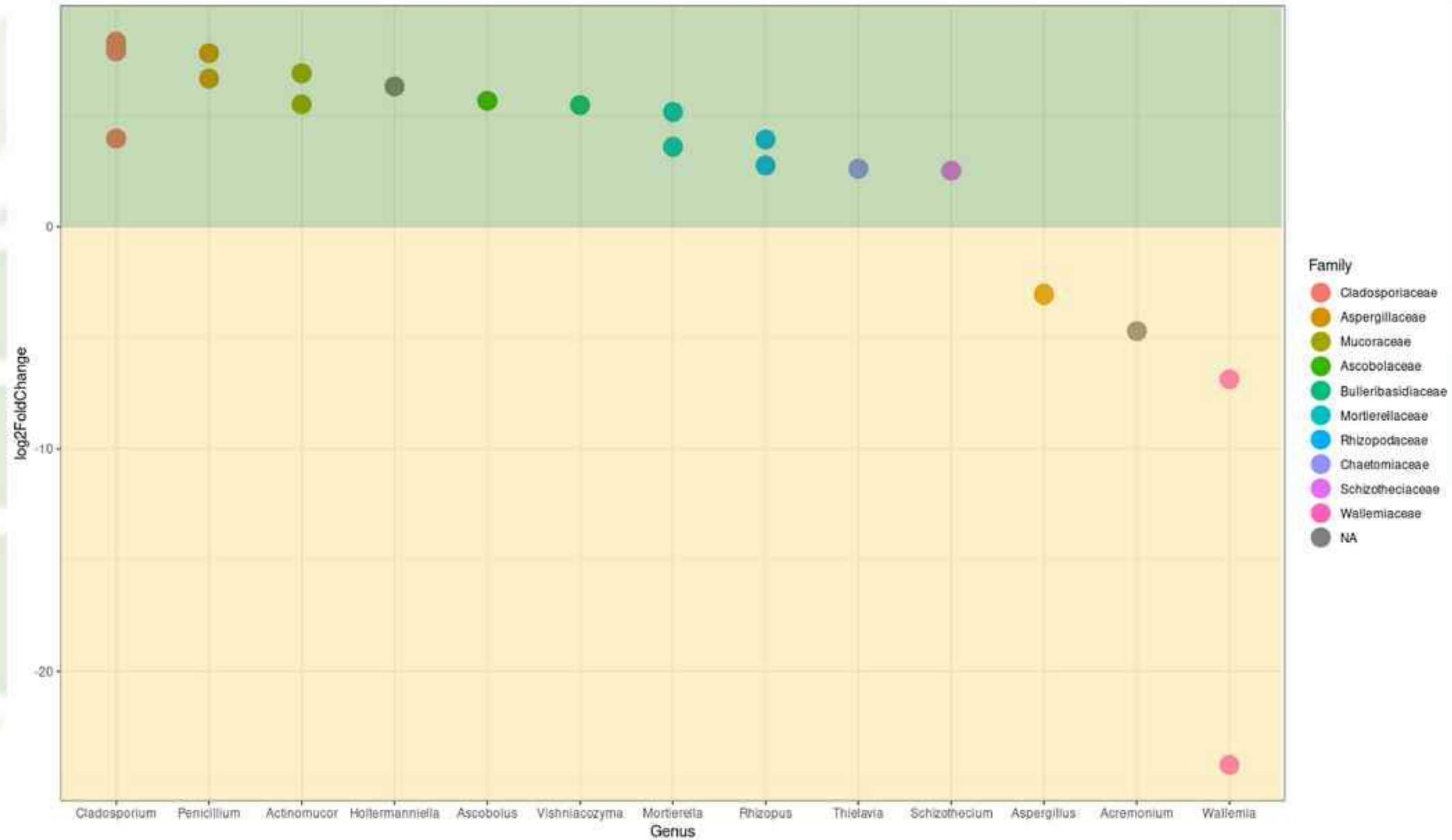
**FUNGuild**, è uno strumento che può essere utilizzato per classificare in trofismi funzionali taxon fungini associati ad uno studio di metagenomica.

FUNGuild





## Tutti i campioni



## Solo Tempo Finale



# In conclusione...

- Gli indici di **alfa diversità** mostrano un cambio significativo tra il *Controllo* e la **Brassica**, ma indicano anche una riduzione della diversità nei terreni trattati con **Brassica**. Questo effetto è stato anche riscontrato da altri studi ma ancora deve essere approfondito sotto un punto di vista funzionale.
- L'indice di **beta diversità** sottolinea, in maniera netta, una diversificazione **graduale e crescente** nel tempo della diversità del suolo trattato con **Brassica** rispetto al controllo.

- **FUNGuild** ha mostrato una riduzione delle ASV classificate come funghi dal trofismo **Patotrofo** e un'aumento delle ASV classificate come **Saprotrofe**. Nonostante in campo non ci sia stata una condizione di malattia, la diminuzione del gruppo dei **Patotrofi** risulta essere incoraggiante mentre l'aumento del gruppo dei **Saprotrofi** era previsto, vista l'introduzione nel suolo di materiale organico (**Brassica**)
- Sebbene ci sia una presenza differenziale di pochi generi nel corso del tempo, la funzione dei singoli *generi* e delle singole *specie* è ancora da studiare e approfondire.



**Grazie per l'attenzione**