



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

Scuola di Agraria

**Corso di Laurea Magistrale in
Scienze e tecnologie dei sistemi forestali**

Classe LM- 73 - Classe delle lauree in Scienze tecnologie forestali e ambientali

**Analisi della biodiversità microbica dei suoli di pinete di *Pinus nigra*
Arn. in due casi studio nell'Appennino centrale in seguito a
diradamento selettivo**

MATERIA DELLA TESI: FUNZIONALITÀ DEL SUOLO E STRESS AMBIENTALI

Relatore

Prof. Giacomo Pietramellara

Correlatore

Dott. Stefano Mocali

Candidato

Antonio Morabito

Anno Accademico 2016/2017

INDICE

1) Introduzione

1.1) Inquadramento storico delle pinete di pino nero	3
1.2) Gestione e rinaturalizzazione dei rimboschimenti	4
1.3) Biodiversità e gestione sostenibile degli ecosistemi forestali	7
1.4) L'importanza del suolo nei sistemi forestali.....	9
1.4.1 Caratteristiche chimico-fisici del suolo.....	11
1.4.2) La sostanza Organica.....	16
1.5) La componente biologica	18
1.6) Metodi di Next Generation Sequencing (NGS).....	22
2) Obiettivo	26
3) Materiali e metodi	27
3.1) Descrizione aree di studio	27
3.1.1) Descrizione particellare Amiata	29
3.1.2) Descrizione particellare Pratomagno.....	31
3.2) Dati meteorologici	33
3.3) Schema di campionamento	34
3.3.1) Campionamento del suolo	35
3.4) Analisi dei dati forestali	37
3.5) Analisi microbiologiche	40
3.5.1) Misura del C della biomassa microbica nel terreno.....	41
3.5.2) Determinazione della respirazione del suolo.....	42
3.5.3) Determinazione della struttura della comunità microbica.....	43
3.6) Analisi statistica.....	47
4) Risultati e discussione.....	52
4.1) Risultati dendrometrici.....	52
4.2) Risultati degli indici microbiologici della qualità dei suoli	
4.2.1) Risultati dell'analisi della respirazione	
4.2.2) Risultati dell'analisi della biomassa microbica.....	
4.3) Risultati analisi molecolari (NGS).....	

4.3.1) Diversità batterica.....
4.3.2) Diversità fungina.....
4.4) Analisi multivariata.....
5) Conclusioni.....
6) Bibliografia.....
7) Ringraziamenti.....

1 INTRODUZIONE

1.1 Inquadramento storico delle pinete di pino nero

La pianificazione forestale si è storicamente concentrata sulla produzione di legname, ma la globalizzazione del mercato del legno, nonché le preoccupazioni legate appunto alla protezione degli ecosistemi, hanno fatto aumentare l'importanza anche di altri organismi presenti nelle foreste (Bonet et al. 2010). Ed è per questo che oggi si cercano strumenti di gestione forestale atti a salvaguardare e implementare non solo la produzione del legno, intesa come risorsa da sfruttare, ma anche la presenza di tutti gli altri organismi. Il rimboschimento ha storicamente rappresentato il principale strumento della politica forestale e montana italiana. I rimboschimenti sono stati realizzati dapprima per la difesa del suolo, l'occupazione e, dalla seconda metà degli anni '70, per la produzione legnosa. I rimboschimenti con conifere realizzati in Italia dal 1877 al 1983 (dopodiché sono state preferite le latifoglie) occupano una superficie di circa 1.2 milioni di ettari (a cui bisogna sottrarre le parti bruciate). La preferenza per le conifere è stata motivata da un insieme di considerazioni: sicurezza di attecchimento e rapido sviluppo iniziale tale da consentire una pronta ed efficace copertura del suolo, maggiore capacità di adattamento all'eterogeneità dei suoli. Anche se non sono state eseguite indagini sistematiche sull'esito dei rimboschimenti (per specie, età, ecc.), si è potuto rilevare che a fronte di un risultato generale positivo (per l'attecchimento e lo sviluppo delle piantine nei primi anni, per i riflessi positivi sull'ambiente e sul piano economico-sociale), non hanno fatto seguito adeguate cure colturali, se non occasionali ripuliture, tagli fitosanitari e spalcatore. In particolare, l'assenza di razionali interventi di diradamento ha comportato una eccessiva densità dei soprassuoli e quindi fragilità strutturale, processi dinamici bloccati, precarie condizioni fitosanitarie, semplificazione strutturale e compositiva, bassa efficienza funzionale. Il trattamento delle pinete, come originariamente concepito, prevedeva generalmente il taglio raso alla scadenza del turno (in media 90 anni) e la rinnovazione artificiale posticipata con impianto di specie diverse dal pino e più esigenti dal punto di vista edafico (Pavari, 1961). La gestione delle pinete è caratterizzata dall'applicazione di un ciclo di diradamenti che non hanno la finalità principale di incrementare la produzione legnosa quanto di accrescere la funzionalità ecologica dei popolamenti. Soprassuoli stabili da un punto di vista meccanico sono il risultato di equilibri ecologici tra disponibilità ed uso delle risorse (acqua, luce, suolo) e garantiscono elevati valori di assolvimento delle loro funzioni (Hale et al. 2004). La stabilità del soprassuolo può essere intesa anche come la capacità di resistere e reagire alle perturbazioni esterne e di autoperpetuarsi, ovvero l'attitudine di

rinnovarsi naturalmente ed incrementare la complessità ecologica (Piussi 1986); Bertini 2001). Le foreste rivestono un importante ruolo sia dal punto di vista socio-economico che dal punto di vista ambientale, rientrando in un delicato equilibrio che coinvolge non solo la stessa componente vegetazionale ma anche i cicli biogeochimici e il clima al livello regionale nonché globale. Le foreste rappresentano inoltre un importante serbatoio di biodiversità per l'intero pianeta, partecipano attivamente al ciclo del carbonio e sono considerate un importante elemento di mitigazione dell'effetto serra. La conoscenza della quantità di anidride carbonica assorbita e convertita in biomassa dagli ecosistemi forestali rappresenta quindi una preziosa informazione per la loro gestione sostenibile anche e soprattutto nell'ambito dei cambiamenti climatici. Negli ultimi anni la modellistica in ambito forestale si è dimostrata essere un valido aiuto a tal proposito. La respirazione degli ecosistemi terrestri è il processo tramite il quale la CO₂, fissata dalle piante con la fotosintesi torna in atmosfera. La respirazione del suolo, fatta di processi autotrofi (respirazione radicale) ed eterotrofi (decomposizione sostanza organica e carbonio del suolo) rappresenta la parte più rilevante della respirazione degli ecosistemi forestali, ed è governata da diversi fattori, sia climatici e funzionali (temperatura, contenuto idrico del suolo, microorganismi) che stagionali (stadio evolutivo del bosco, disturbi). Nelle foreste mediterranee e temperate, uno dei principali fattori che può influenzare la respirazione è la gestione forestale.

1.2) Gestione e naturalizzazione dei rimboschimenti

Il termine rimboschimento presuppone che il sistema artificiale così creato porti alla costituzione di un vero e proprio bosco, cioè un sistema in grado di autorganizzarsi e di perpetuarsi autonomamente. L'attività di rimboschimento ha avuto una notevole rilevanza per la vastità delle opere realizzate, per le conseguenze positive sul piano della conservazione del suolo e per i riflessi su quello paesaggistico ed economico-sociale: ha contribuito a stabilizzare l'occupazione in aree svantaggiate, promuovere lo sviluppo di attività imprenditoriali collaterali e qualificare la manodopera. I rimboschimenti si possono suddividere in base alla finalità e al grado di evoluzione biostrutturale, ossia quegli elementi che possano indirizzare la scelta della gestione (Mercurio 2005, 2010):

Finalità - Conservazione e difesa del suolo. I rimboschimenti sono in genere suscettibili di interventi di rinaturalizzazione anche in rapporto a pendenze elevate e situazione geomorfologica critica. - Produttiva. Si può distinguere il caso dove, per lo scarso sviluppo o adattamento della specie alla stazione, i rimboschimenti non sono in grado di assumere un significato ai fini produttivi, per cui possono essere oggetto di interventi di rinaturalizzazione e, il caso che, per il

buon esito degli impianti e una situazione geomorfologica favorevole, consente invece il mantenimento della stessa specie. Grado di evoluzione bio-strutturale - Rimboschimenti dove sono presenti processi dinamici evolutivi. - Rimboschimenti dove non sono presenti tali processi.

La gestione dei sistemi selvicolturali è rappresentata da una serie di azioni, collocate nello spazio e nel tempo, determinate alla massimizzazione dei risultati attesi (nel lungo termine) ed alla minimizzazione degli impatti, preservando così la funzionalità (sostenibilità dell'azione) dei sistemi stessi; ne sono, inoltre, analizzate le regole fondamentali. I rimboschimenti attraverso l'integrazione di nuovi elementi modificano le relazioni del sistema al fine di ottenere un nuovo equilibrio, più idoneo all'insediamento ed allo sviluppo della vegetazione forestale.

Tuttavia, delle foreste (e perciò anche dei rimboschimenti) a causa della dinamicità del sistema e della imperfezione delle conoscenze umane, non è possibile conoscere tutti gli elementi e tutte le relazioni. La loro gestione pertanto deve trarre indicazioni dagli strumenti d'analisi disponibili, ma non può prescindere dalle capacità di conoscenza e dal giudizio discrezionale del tecnico forestale il quale, ad oggi, è l'unico in grado di comprendere le realtà forestali e, dopo aver compiuto un lavoro d'analisi, di sintetizzare un'ipotesi gestionale.

Le operazioni selvicolturali, hanno come obiettivo principale il mantenimento se non il miglioramento della funzionalità del sistema ritraendo la massima produzione possibile, sostenibile. Senza opportuni interventi selvicolturali, questi rimboschimenti vedono sempre più aumentare la concreta possibilità di essere interessati da incendi o da attacchi patogeni, determinando così anche la perdita di carbonio nell'ecosistema forestale.

Un selvicoltore che agisca tenendo conto dell'impatto delle proprie azioni nel lungo termine, cioè considerando i tempi dei cicli biogeochimici, è in grado di gestire il bosco ottimizzandone la produzione; in caso contrario si assiste:

- alla moria, per l'acidificazione del terreno, delle monocolture forestali d'altofusto del centro e del nord-europa, gestite con tagli a raso ed anche con rinnovazione artificiale
- al degrado dei cedui del sud-europa in cui la brevità dei cicli, unita alla pendenza del terreno, ha causato il forte degrado del suolo, e quindi della potenzialità produttiva, cui è seguito, nel nostro paese, il declino delle specie più significative di tali soprassuoli.

I rimboschimenti di pino nero appenninici sono stati realizzati con la finalità prioritaria di ricostituire la copertura forestale su suoli a scarsa fertilità intrinseca o indotta dall'uso eccessivo della risorsa (Amorini, 1983). In questi casi la scelta gestionale prioritaria, laddove è ammissibile, è

quella di tendere ad una progressiva “rinaturalizzazione” dei soprassuoli artificiali tramite trattamenti selvicolturali appropriati.

I diradamenti, se di tipo selettivo e di intensità adeguata inducono, infatti, ad un aumento della stabilità meccanica, favoriscono la diversità strutturale e concorrono a creare condizioni ecologiche idonee all’insediamento della rinnovazione di un piano successionale.

Il rimboschimento fa parte e interagisce strettamente con la realtà biologica, ecologica e, spesso, anche culturale ed economica che lo circonda. Una gestione basata sulla rinaturalizzazione, secondo le linee sopra esposte, provoca una serie di effetti positivi che incidono su questa complessa realtà.

Il pino nero è stato ampiamente utilizzato come pianta della «bonifica montana» ovvero come pianta utile per il riscatto, che si voleva anche produttivo, dei terreni nudi od abbandonati. I rimboschimenti di pino nero rappresentano un’eccezione del panorama vegetazionale dei rilievi dell’Italia peninsulare sia per la natura della loro presenza (impianto artificiale), sia perché realizzati con una specie, in genere, alloctona.

La specie *Pinus nigra* Arn. è suddivisa in quattro piccole specie e quattordici sottospecie, tre delle quali sono state utilizzate anche nel caso dei rimboschimenti toscani. La sottospecie austriaca (*Pinus austriaca* (Hoss) Novak), detta «pino nero d’Austria» è adattata a vivere sui terreni a matrice calcarea nelle stazioni più fredde tra quelle ritenute adatte all’impianto del pino. La sottospecie calabrica (*Pinus calabrica* Delamare), è adattata a vivere in stazioni non troppo fredde ma su terreni a matrice silicea.

La sottospecie italica (*Pinus italica* (Hochst)), è originaria di Villetta Barrea in Abruzzo ed è stata impiegata su suoli calcarei ma nelle stazioni meno fredde (Bernetti, 1995; Ciabatti et al., 2009)

Una gestione orientata alla rinaturalizzazione, affinché l’approccio colturale sia realmente coerente con l’obiettivo, non può prescindere dalla consapevolezza della complessità dei processi che sottendono la funzionalità degli ecosistemi forestali (NOCENTINI, 1995).

La rinaturalizzazione è uno degli orientamenti colturali di riferimento della gestione sostenibile di formazioni forestali semplificate nella composizione e nella struttura.

La pianificazione degli interventi su area vasta può essere utilmente supportata da informazioni georeferenziate sulle condizioni di suscettività alla rinaturalizzazione dei complessi boscati.

La rinaturalizzazione si deve basare sulle capacità del sistema di aumentare autonomamente la propria complessità e biodiversità, valorizzando così gli aspetti naturalistici (NOCENTINI, 1995, 2000).

Per i rimboschimenti, una gestione orientata alla rinaturalizzazione mira a favorire la reintroduzione, per via autonoma, delle specie locali. I tempi e i modi del processo di rinaturalizzazione dipendono da un insieme di fattori di varia natura (condizioni vegetative della specie del rimboschimento, vicinanza di nuclei di specie arboree autoctone in grado di disseminare, maggiore o minore facilità di intervento in relazione ai costi di utilizzazione, ecc.: vd. BOSCALERI et al., 2004). Altra parola chiave, quando si parla di rinaturalizzazione, è cautela.

Avendo a che fare con sistemi biologici complessi, caratterizzati da reazioni non totalmente predeterminabili, occorre adottare il metodo di prova ed eliminazione degli errori (Ciancio e Nocentini, 1994a e 1994b).

È importante che i cambiamenti operati dall'uomo avvengano in modo graduale non solo per permettere alle varie forme di vita di evolversi in modo autonomo (sostenibilità ambientale), ma anche perché le modifiche del paesaggio siano condivise dalle popolazioni locali (sostenibilità sociale).

1.3) Biodiversità e gestione sostenibile degli ecosistemi forestali

Secondo la definizione della FAO, il termine “foresta” indica le foreste dense, i boschi aperti e le savane che abbiano almeno il 10 per cento di copertura arborea.

L'estensione del concetto di biodiversità all'intero ecosistema porta con sé alcune importanti implicazioni che hanno mutato l'approccio operativo delle discipline tecniche in materia di gestione degli ambienti naturali. Lo studio della biodiversità, infatti, oltrepassa la mera enumerazione e valutazione delle singole specie presenti in una determinata biocenosi. Sono anche gli stessi ecosistemi, considerati in senso olistico, che, biologicamente diversi, per struttura e composizione, forniscono una nuova misura di biodiversità. La diversità biologica, quindi, può avere due differenti chiavi d'interpretazione a seconda della scala spaziale di riferimento. La prima, più piccola, è quella intra-ecosistema. È la più semplice da interpretare, in quanto collegata alla diversità specifica presente all'interno di un determinato ecosistema anche piccolo: biodiversità quale grado di complessità delle singole biocenosi.

La conservazione o, se possibile, l'incremento della biodiversità di un ecosistema, va oltre la mera difesa di particolari specie, anche rare o minacciate di estinzione presenti al suo interno. La perdita anche di una sola di esse diminuirebbe, evidentemente in misura variabile, la capacità dell'ecosistema di reagire ad eventuali elementi perturbativi sia interni sia esterni. La seconda, a scala spaziale più ampia, è quella inter-ecosistema. L'intero ecosistema, individuato in una determinata

scala spaziale, con le sue particolari caratteristiche biologiche ed ambientali, rappresenta l'elemento base rispetto al quale misurare la biodiversità.

La presenza di molti e differenti ecosistemi in una determinata area è la misura di una biodiversità su scala superiore. La conservazione della biodiversità non è, quindi, il mantenimento di una situazione, per quanto ottimale, di un particolare ecosistema o di un gruppo di ecosistemi, in una sorta di ibernazione, ma deve essere finalizzata ad assecondarne l'evoluzione nel tempo e nello spazio in risposta agli eventuali cambiamenti ambientali *latu sensu* che possono verificarsi.

Il bosco è un sistema biologico complesso indispensabile per rendere vivibile il presente e possibile il futuro (CIANCIO, 1998). Pertanto, per la salvaguardia della biodiversità il principio di responsabilità e quello di precauzione dovrebbero guidare la gestione forestale.

La copertura vegetale rappresenta uno dei principali fattori che influenzano la diversità della microflora edafica, poiché regola sia la qualità e la quantità delle risorse disponibili, compete con i microrganismi per i nutrienti e determina la formazione di microclimi (Wardle, 2002), quindi crea variabilità sia spaziale che temporale dei principali fattori che condizionano la struttura e la composizione delle comunità edafiche.

La copertura vegetale ha una enorme influenza sulla biodiversità del suolo, fondamentalmente perché rappresenta uno dei fattori che influenza maggiormente le comunità edafiche. Un'elevata diversità vegetale può comportare inoltre la presenza di una lettiera ampiamente diversificata, che a sua volta determina una maggiore diversità di decompositori e detritivori (Hansen, 2000), così come quella fungina (Widden, 1986). L'importanza della componente ecologica delle foreste ha assunto un ruolo sempre più rilevante in un'ottica di gestione forestale che esalta tutti gli aspetti multifunzionali e la sostenibilità degli ecosistemi forestali.

In tutto il mondo la conservazione della biodiversità è riconosciuta come un valore universale. Tale conservazione si rivela un'attività essenziale non solo per la difesa di interessi umani come l'alimentazione, la salute, l'energia, ma anche per il mantenimento della natura ai fini di uno sviluppo sostenibile.

In studi recenti si assume che caratterizzando la diversità si può comprendere e controllare il funzionamento degli ecosistemi e che la capacità di ripresa di un ecosistema in seguito ad un disturbo dipende in parte dal suo grado di diversità (Nannipieri et al., 2003). L'importanza della biodiversità per la funzionalità degli ecosistemi è stata messa in rilievo dal protocollo internazionale di intenti Agenda 21. Il documento ha avuto l'obiettivo di promuovere la cooperazione scientifica ed internazionale per una migliore comprensione dell'importanza della biodiversità e delle sue

funzioni negli ecosistemi. La biodiversità, intesa come varietà di specie, ma anche come variabilità genetica all'interno di ciascuna specie (Øvreås and Torsvik, 1998), è considerata una caratteristica positiva dei sistemi naturali; essa risulta spesso diminuita, infatti, in seguito ad interventi antropici devastanti, o comunque alterata in ecosistemi in avanzato stato di declino (Smit et al., 1997; Stephen et al., 1999).

1.4) L'importanza del suolo nei sistemi forestali

Il suolo è alla base di tutte le forme di vita terrestre ed ospita una parte considerevole della biodiversità biologica presente in natura. Eppure è uno degli elementi meno studiati e più sottoposti alle pressioni delle attività umane. Per porre un freno alla perdita di biodiversità e al crescente degrado dei terreni occorre impostare ex-novo una corretta azione di tutela dell'ecosistema suolo e di tutto il patrimonio biologico in esso contenuto.

I cambiamenti di uso del suolo, in particolare quelli legati alla trasformazione da ambiente naturale a semi-naturale ed antropico, ma soprattutto l'intensità delle modificazioni dell'uso del suolo influenzano le componenti dell'ecosistema nativo e spesso portano alla perdita o frammentazione dell'habitat (Skole et al., 1994; Cooperrider et al., 1999).

Congiuntamente con i suoli, le foreste svolgono un ruolo chiave nella fornitura di servizi ecosistemici fondamentali per la vita sulla Terra.

Negli ecosistemi e in particolare in quelli forestali, i rapporti evolutivi che si instaurano nel tempo fra suolo e vegetazione divengono così stretti da sfociare in una interdipendenza quasi assoluta che può essere osservata sia in termini di comunità vegetale che di pedofauna e di comunità microbiche (Buol et al., 1989; Fanning e Fanning, 1989; Ugolini e Spaltenstein, 1992).

La diversità della comunità vegetale può influenzare la comunità microbica del suolo in vari modi. In particolare, l'eterogeneità della copertura vegetale e la lettiera determinano la qualità, la quantità e la distribuzione temporale e spaziale delle risorse trofiche per i decompositori; inoltre, la copertura influenza anche la temperatura e l'umidità dello strato superficiale di suolo, dove l'attività biologica è maggiormente attiva. I composti solubili provenienti dai residui vegetali, quali acidi organici, zuccheri e amminoacidi, oltre ad essere fonti nutritive per i microrganismi, favoriscono la formazione di complessi cationici e di chelati, contribuendo dunque a modificare il regime termico ed idrico del suolo.

La presenza simultanea sul suolo di lettiere diverse comporta infatti una maggiore varietà di risorse nutritive biodisponibili ed una maggiore complessità di habitat, che si riflette in una più ampia diversità delle comunità microbiche (Bardgett, 2002).

La conservazione e il miglioramento della salute del suolo nelle foreste si basa sulla gestione sostenibile di queste ultime, le quali devono coesistere con le attività agricole, industriali e urbane. A tal proposito è noto come le foreste rappresentino l'ecosistema terrestre con la più alta capacità di sequestro di C, un vero e proprio "pozzo di carbonio".

Le piante, infatti, assorbono anidride carbonica nel processo di fotosintesi, fungono da mezzi per fissare il carbonio nella biomassa e nel suolo, sono a loro volta considerate delle vere e proprie riserve di carbonio.

Quindi la promozione di attività che aumentino o conservino queste riserve viene vista come un supporto alle strategie di contenimento e riduzione delle emissioni dei gas serra nei settori energetici e produttivi.

Come per le specie vegetali, la maggior parte dei taxa edafici (tra cui funghi e batteri), è strettamente legato alle caratteristiche del suolo in cui abita, data la mobilità estremamente ridotta che li caratterizza e che non permette loro rapide migrazioni in altre aree in cerca di condizioni maggiormente favorevoli. E' infatti ben noto che alcune caratteristiche del suolo (pH, tessitura, struttura, contenuto in nutrienti) influenzano sia il tipo di vegetazione, sia le comunità edafiche. Inoltre, è anche noto dalla letteratura che la composizione delle comunità edafiche è influenzata dalle caratteristiche ambientali e del suolo quali l'umidità (in particolare per la distribuzione della collembolofauna), la presenza di sostanza organica, il pH ed il tipo di humus (Hagvar 1982, Kuznetsova 2002).

Le funzioni biologiche di un suolo, garantite soprattutto dall'attività delle comunità microbiche, sono influenzate dall'interazione tra la copertura vegetale (morfologia della chioma, quantità e qualità della lettiera, apparato radicale e rizodeposizioni) e il tipo di suolo.

I composti solubili provenienti dai residui vegetali, quali acidi organici, zuccheri e amminoacidi, oltre ad essere fonti nutritive per i microrganismi, favoriscono anche la formazione di complessi cationici e di chelati, contribuendo dunque a modificare il regime termico ed idrico del suolo. L'elevata biodiversità vegetale può inoltre favorire l'incremento della produttività primaria netta NPP, (Schmid et al., 2002), che a sua volta può determinare un aumento dell'input di carbonio al suolo, sia accelerando il turnover della biomassa vegetale che incrementando l'essudazione radicale, e può in tal modo influenzare le comunità edafiche, che sono limitate dalle risorse di

carbonio (Zak et al., 2003). I decompositori veri e propri della materia organica sono i microrganismi appartenenti alla **microflora edafica**, in particolar modo **funghi** e **batteri** che operano la degradazione della materia organica. In genere i batteri sono più generalisti, attaccano prevalentemente la necromassa animale, mentre i funghi attaccano la materia organica di difficile degradazione come la necromassa vegetale, infatti si trovano sovente su di essa.

Ovviamente la materia organica che viene decomposta dai microrganismi non è persa ma immagazzinata e sarà resa disponibile ad altri organismi, in questo caso i microbivori.

I detritivori sono tutti quei microrganismi che degradano la microflora che si trova sul materiale organico morto, utilizzandola come fonte alimentare. Attraverso questo processo tendono a ridurre la materia organica in particelle sempre più piccole aumentando la superficie di attacco da parte dei microbi, inoltre durante il processo della decomposizione rilasciano nell'ambiente circostante proteine e altre sostanze che favoriscono la crescita microbica.

L'abbondanza, l'attività e la composizione delle comunità di decompositori potrebbe variare notevolmente in funzione non solo delle differenti specie vegetali, ma anche di specifici gruppi funzionali vegetali; i legumi, ad esempio, possono influenzare positivamente la biomassa microbica, migliorando la qualità della lettiera, cioè producendo lettiere con un basso rapporto C/N (Spehn et al., 2000). La presenza delle piante, oltre a fornire sostanza organica al suolo, è cruciale per la formazione della rizosfera.

Inoltre le diverse specie vegetali possono regolare lo sviluppo di rizobatteri tramite il rilascio di specifici zuccheri ed amminoacidi nella zona radicale (Kowalchuck et al., 2002).

Quindi una più elevata diversità vegetale può produrre una maggiore diversità biochimica di essudati radicali e quindi selezionare per comunità microbiche più diversificate (Lavelle et al., 1995).

1.4.1) Caratteristiche chimico-fisiche del suolo

Il suolo, che può essere considerato quasi un ecotono in cui si intersecano l'atmosfera, l'idrosfera e la litosfera, è un sistema integrato, con ogni componente calibrata e coordinata con le altre e in cui qualsiasi alterazione si ripercuote nel funzionamento di tutto l'insieme.

Si tratta di una struttura dinamica, che ha una sua origine, una sua vita ed una fase terminale (Bernini et al. 1984).

Nel 1911 Raman definiva il suolo come lo strato superiore della crosta terrestre sottoposto alle intemperie. Esso è costituito da frammenti della roccia madre sbriciolati e rimaneggiati chimicamente, e da detriti di piante e animali (Coineau, 1974).

Il suolo è formato da un insieme di strati sovrapposti e di diverso colore che prendono nome di orizzonti e che nel loro complesso costituiscono il profilo del suolo.

Gli strati del suolo non hanno sempre lo stesso spessore, ma possono variare a seconda del clima: in generale se il clima è molto piovoso, come nelle zone equatoriali, il suolo può avere spessori maggiori (anche di una decina di metri), con accumulo di ossidi insolubili di ferro e alluminio nell'orizzonte B che diventa così di colore rosso (suolo lateritico); al contrario, sia nei suoli desertici (a causa dell'aridità e della scarsità delle precipitazioni) che nei suoli ghiacciati delle zone subpolari (a causa della superficie ghiacciata), lo spessore degli strati è molto ridotto (solo pochi centimetri).

- **orizzonte 0** (zero). È la lettiera di foglie morte e di residui animali e vegetali in decomposizione

- **orizzonte A**. Si trova al di sotto della lettiera ed è ricco di humus e sostanze organiche di colore bruno-scuro. Ha consistenza abbastanza soffice e in esso si trovano numerosi organismi e gran parte delle radici delle piante.

- **orizzonte E** che hanno subito eluviazione: È un orizzonte caratterizzato da perdita di minerali per traslocazione verso il basso; è perciò spesso caratterizzato da colori chiari.

- **orizzonte B**. Si trova al di sotto dell'orizzonte A ed è più compatto del precedente, costituito soprattutto dall'accumulo di materiali provenienti dagli strati superiori, trascinati dall'acqua piovana. È povero di sostanza organica e contiene materiali argillosi e sali minerali provenienti dallo strato soprastante.

- **orizzonte C**. È formato dalla disgregazione del materiale roccioso sottostante ed è perciò suolo in via di formazione. In esso si ritrovano frammenti grossolani come ghiaia e pietre.

- **orizzonte D (o roccia madre)**. È la roccia inalterata su cui poggia il suolo e dalla cui alterazione esso prende origine; la natura e la composizione di un suolo dipendono dal tipo di roccia madre da cui si origina.

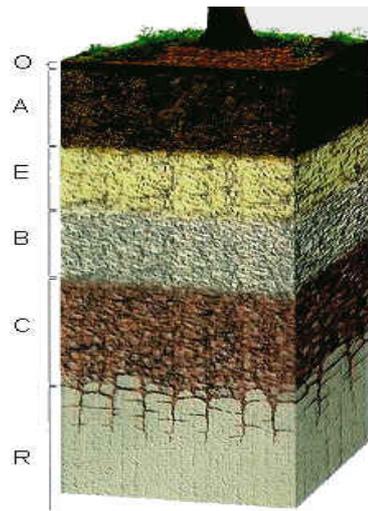


Fig. 1: diversi orizzonti, livelli sovrapposti distinguibili tra loro che vanno a costituire il profilo

Il suolo è quindi un'entità dinamica in continua evoluzione. Questo fenomeno è dato dall'interazione tra diversi aspetti: - aspetto fisico - aspetto chimico, - aspetto biologico

Aspetto fisico

Le due caratteristiche fisiche più importanti per definire un suolo sono la tessitura e la struttura.

Tessitura

Per definire meglio il termine tessitura conviene introdurre innanzitutto la definizione di granulometria.

Per granulometria di un suolo si intende la distribuzione delle singole particelle minerali.

Per convenzione internazionale l'indagine granulometrica si effettua separando le particelle in base al loro diametro.

La frazione di diametro superiore ai 2 mm costituisce lo "scheletro", mentre quella di diametro inferiore ai 2 mm viene denominata "terra fine".

In base al diametro delle sue particelle la terra fine viene classificata in ciascuna delle seguenti componenti:

- sabbia (diametro delle particelle comprese tra 2 mm e 0,05 mm);
- limo (diametro delle particelle comprese tra 0,05 mm e 0,002 mm);
- argilla (diametro delle particelle inferiori a 0,002 mm).

Dal valore percentuale delle diverse frazioni si definisce la tessitura di un suolo utilizzando il diagramma riportato in figura.

I tre grandi gruppi di classi di tessitura riconosciuti sono a loro volta suddivisi in classi al loro interno:

1. **Gruppo delle classi sabbiose** - In questo gruppo ci sono i suoli in cui la frazione sabbiosa è superiore al 70% del totale, e l'argilla inferiore al 15%; esso comprende due specifiche classi: "sabbioso franco" e "sabbioso".
2. **Gruppo delle classi argillose** - Per essere definito "argilloso" un suolo deve contenere più del 40% di argilla; i nomi delle tre classi sono: "argilloso", "limoso argilloso" e "sabbioso argilloso"; le ultime due classi possono contenere rispettivamente più limo o sabbia che argilla, ma quest'ultima condiziona tuttavia in modo determinante le proprietà tessiturali
3. **Gruppo delle classi franche** - E' il gruppo che contiene il maggior numero di suddivisioni. Idealmente un suolo franco è dato dalla mescolanza, equilibrata, di sabbia, limo e argilla; conseguentemente, anche le proprietà che condizionano l'uso del suolo, ad esempio la pesantezza o la leggerezza, sono presenti in proporzioni equilibrate. La maggior parte dei suoli di interesse agricolo sono in qualche modo "franchi", e c'è una classe tessiturale denominata, appunto, "franca", che sta in una posizione intermedia fra le tre componenti granulometriche sabbia, limo ed argilla.

Tuttavia, sovente, una debole prevalenza di una delle tre frazioni richiede l'uso di aggettivi che meglio completano e definiscono la classificazione tessiturale. Così, un suolo franco dove domina la sabbia viene chiamato "franco sabbioso"; allo stesso modo possiamo avere un suolo "franco limoso", "franco limoso argilloso", "franco sabbioso argilloso", "franco argilloso". Anche la classe "limosa", dominata dal limo, viene convenzionalmente inserita fra il gruppo delle classi franche.

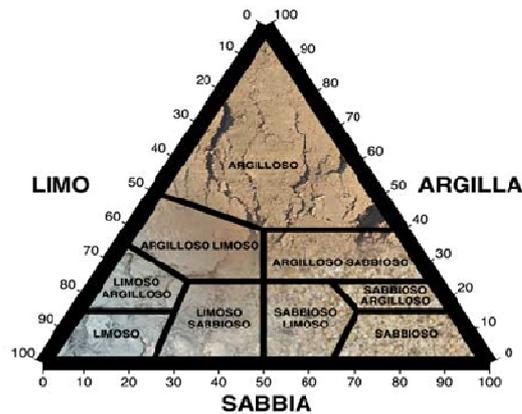


Figura 2: Triangolo della tessitura secondo USDA

- Struttura

E' la proprietà derivata dall'aggregazione delle particelle terrose e dalla reciproca disposizione spaziale sia degli aggregati sia delle singole particelle.

L'esistenza di una struttura del terreno può modificare o esaltare i pregi o i difetti della tessitura e avere pertanto riflessi sulle proprietà fisiche, meccaniche e chimiche del terreno e sulla tecnica agronomica.

La costituzione di una struttura si deve alla presenza significativa di particelle dotate di proprietà colloidali (minerali argillosi e humus) che hanno un'azione cementante responsabile della formazione di macro-aggregati glomerulari che inglobano particelle più grandi quali il limo e la sabbia.

Aspetti chimici

I parametri che caratterizzano chimicamente un suolo sono il pH, la sostanza organica e gli elementi nutritivi per la vita delle piante presenti nel terreno. Il pH è un parametro chimico che consente di determinare l'acidità o l'alcalinità della soluzione circolante del terreno.

Nel mondo esistono milioni di sostanze chimiche. Alcune di esse hanno proprietà acide ed altre basiche. Gli acidi sono sostanze che poste in acqua liberano ioni idrogeno (H⁺), chiamati anche idrogenioni. Le basi sono sostanze che poste in acqua liberano ioni idrossido (OH⁻).

In questo modo le sostanze basiche fanno diminuire la concentrazione degli ioni idrogeno. Una soluzione ricca di ioni idrogeno è acida, una sostanza povera di ioni idrogeno è basica. Nello stesso

modo anche le basi possono essere più o meno forti. Acidi e basi diluite sono meno concentrate e meno aggressive, mentre quelle concentrate sono molto corrosive e pericolose.

Conoscere il pH del terreno è molto importante poiché le piante presentano diversi gradi di tolleranza e poiché a diversi livelli di pH corrispondono diverse disponibilità di elementi nutritivi. I valori di pH variano da 1 a 14 e in base a questi si distinguono tre tipi di terreno:

- terreni acidi con valori da 1 a 6.8
- terreni neutri con valori tra 6.8 e 7.2
- terreni alcalini o basici con valori tra 7.2 e 14

1.4.2) La sostanza organica

La sostanza organica è una qualsiasi materia di origine biologica presente nel terreno (biomasse vegetali, resti animali...). Il contenuto di sostanza organica varia da meno dell'1% (0,5%) nei suoli desertici e in quelli minerali, a valori intorno al 40% nei suoli forestali soprattutto in ambiente montano, a più del 90% nelle torbe (Sanchez, 1998).

Quando la sostanza organica ha subito una notevole trasformazione, causata dall'attacco dei microrganismi, si presenta omogenea e di colore scuro e viene detta humus.

Le funzioni della sostanza organica sono molteplici e rivestono una grande importanza per il mantenimento della fertilità del suolo. In particolare la sostanza organica incrementa la capacità di acqua tra le particelle minerali, apporta sostanze nutritive in modo equilibrato, stimola l'attività radicale e più in generale lo sviluppo complessivo delle piante.

La sostanza organica del suolo, possiede in media il 58% di carbonio ed esiste in forma di foglie e radici morte, e in parte come prodotto intermedio di decomposizione come acidi poliuronici o in parte come sostanze umiche. Nel terreno si vanno a formare tre tipologie di sostanze differenti ma in continuo rapporto tra di loro, possiamo distinguere:

1. **Sostanza organica "indecomposta"**, cioè i residui organici provenienti dal mondo vegetale e animale che subiranno l'attacco dei microrganismi del terreno, andando così incontro a un'evoluzione che si differenzierà in funzione della natura del materiale di partenza e del clima in cui si opera;
2. **Sostanza organica detta "labile"**, formata da prodotti intermedi della decomposizione, destinata a subire un processo di mineralizzazione o a essere utilizzata come substrato di moltiplicazione da parte dei microrganismi del terreno;

3. **Sostanza organica** detta “**stabile**” o in maniera generica humus, la quale è una sostanza chimicamente complessa, derivata dai composti intermedi formatisi nella decomposizione dei residui organici.

L’humus è la materia organica in decomposizione presente nel suolo e derivata da piante, animali e altri organismi morti. All'inizio dei processi di degradazione delle sostanze organiche, parte di carbonio, idrogeno, ossigeno, azoto, nonché acqua, anidride carbonica, metano e ammoniaca, vengono rapidamente dispersi; gli altri componenti, invece, si decompongono più lentamente e permangono nel terreno sotto forma di humus.

La composizione chimica dell'humus varia, in quanto dipende dall'azione dei microrganismi decompositori presenti nel suolo, come i batteri, i protozoi e i funghi. Normalmente, tuttavia, contiene quantità variabili di proteine e acidi uronici, combinati con lignina e suoi derivati. L'humus è un materiale omogeneo, amorfo, di colore scuro e praticamente inodore, e i prodotti finali della sua decomposizione sono sali minerali, anidride carbonica e ammoniaca.

Via via che l'humus si decompone, i residui vegetali vengono trasformati in forme stabili, che si accumulano nel terreno e possono essere utilizzate come nutrimento dalle piante.

La quantità di humus presente influenza importanti proprietà fisiche del terreno, come la struttura, il colore, la consistenza e la capacità di conservare l'umidità.

Ad esempio, lo sviluppo ideale delle piante coltivate dipende ampiamente dal contenuto di humus del suolo. Nei terreni agricoli le colture esauriscono progressivamente l'humus presente, che pertanto deve essere reintegrato tramite l'aggiunta di compost o di letame. L’humus è l’insieme di numerose sostanze aventi struttura chimica complessa, con rapporto C/N variabile da 10 a 25.

Il ruolo dell’humus nel terreno è quello di creare e mantenere la struttura fisica del terreno, in modo che siano facilitati i movimenti idrici e gassosi; accrescere la capacità di scambio cationico, costituire e conservare una riserva di elementi fertilizzanti in forma assimilabile, alcune sue componenti svolgono poi direttamente un ruolo di stimolo sui metabolismi delle piante. L'umificazione avviene principalmente negli strati superficiali del terreno ad azione di fattori esogeni che agiscono sui microrganismi, quali la temperatura, l’umidità, la reazione basica o neutra del terreno. Questo è un processo di stabilizzazione della sostanza organica che porta all'accumulo di energia organica in composti poco degradabili ad elevato peso molecolare.

L'azione dell'humus è legata molto alla stabilità, la quale implica a sua volta una resistenza alla degradazione, che non sarà mai assoluta affinché esistano legami energetici e non si arrivi alla mineralizzazione completa della sostanza organica.

La stabilità dell'humus è legata soprattutto a delle caratteristiche intrinseche ed estrinseche, le prime riguardano le proprietà delle molecole stesse, ed includono la tossicità dei cataboliti e la resistenza ai metabolismi, mentre le seconde riguardano i fattori ambientali che ne possono rallentare la degradazione.

1.5) La componente biologica

Il suolo è un habitat estremamente vario, uno dei più ricchi di organismi di tutta la biosfera soprattutto dal punto di vista della fauna, detta pedofauna. La biodiversità viene definita dalla biodiversità ecosistemica, genetica e di specie. Nel caso delle comunità microbiche del suolo è importante definire unitamente alla biodiversità genetica quella funzionale, che indica l'insieme dei processi metabolici e funzionali legati all'attività delle comunità microbiche del suolo.

Inoltre, la diversità funzionale, nel caso dell'ecosistema suolo, è fortemente correlata ai servizi ecosistemici che vengono assolti dal suolo, quali ad esempio il turnover della sostanza organica, gli scambi gassosi ed il sequestro del carbonio, il disinquinamento, l'impollinazione, ecc..

Nel corso degli ultimi dieci anni si sono sviluppati molti studi rivolti all'individuazione di metodologie analitiche e protocolli di monitoraggio della biodiversità del suolo (Bloem et al., 2006; Lynch et al., 2004) che hanno ormai reso possibile la caratterizzazione delle popolazioni microbiche del suolo sia dal punto di vista genetico che funzionale. La diversità funzionale esprime le diverse funzioni metaboliche a carico della comunità microbica del suolo, rappresentate dall'insieme dei microrganismi che svolgono medesima funzione ma appartenenti a taxa diversi (Giller et al., 1995). Le diverse specie di microrganismi presenti nel suolo hanno ruoli prioritari nelle trasformazioni dell'energia e nei processi biogeochimici, intervenendo nella decomposizione del materiale organico attraverso processi biodegradativi e nel riciclo di elementi essenziali quali carbonio, fosforo, azoto ed altri; in tal modo portano a termine specifiche reazioni di ossido-riduzione che permettono agli elementi di rendersi così disponibili in forme utilizzabili soprattutto dalle piante (Alexander, 1977).

Il numero dei microrganismi presenti nel suolo e le relative biomasse variano enormemente sia all'interno di suoli differenti che in relazione alle specie vegetali e agli altri organismi presenti. La diversità dei microrganismi all'interno di un ecosistema è quindi un elemento chiave anche per il mantenimento in uno stato qualitativamente salutare del suolo agrario (Borneman et al., 1996).

Ai microrganismi del suolo è deputata la conservazione dei servizi ecosistemici che si svolgono nel suolo (Bunning e Jimenez, 2003). Tra i principali troviamo:

1. decomposizione e ciclo della sostanza organica ad opera dei decompositori primari: batteri, funghi ed attinomiceti;
2. regolazione della disponibilità degli elementi nutritivi e loro asportazione da parte delle colture, imputabile a funghi micorrizici, attinomiceti, batteri azoto fissatori, batteri e archaea ammonio-ossidanti, ecc.;
3. controllo dei patogeni e difesa, tra cui possiamo ricordare quali biopesticidi i Batteri (*Bacillus thuringensis*, *Pseudomonas fluorescens*, ecc.), funghi (*Trichoderma harzianum*, *Beauveria bassiana*, ecc.);
4. mantenimento della struttura del suolo e regolazione dei processi idrologici;
5. scambi gassosi e sequestro del carbonio;
6. disinquinamento;
7. sviluppo delle piante.

La maggior parte di tali organismi vive all'interno dei primi 30 cm di suolo, in quanto è proprio negli orizzonti più superficiali che è presente la maggior quantità di cibo, sottoforma di materia organica e altri organismi; anche se alcuni animali sono soliti vivere in profondità. Alcuni organismi edafici possono inoltre poi spostarsi a profondità maggiori quando le condizioni in superficie diventano sfavorevoli.

Gli organismi animali facenti parte della pedofauna compiono per intero o per un periodo di tempo più o meno cospicuo il loro ciclo vitale nel suolo; comprendono quindi sia specie edafobie, se permangono costantemente nel suolo, che edafoxene, soggiornanti nel suolo solo occasionalmente.

Il modo più semplice e più utilizzato per classificare la pedofauna è attuare una suddivisione basata sulle dimensioni degli organismi del suolo, che rispecchiano la capacità di penetrazione nel terreno e le attività metaboliche degli organismi, le quali a loro volta influenzano i processi di degradazione della sostanza organica. In base a questa classificazione si distinguono tre gruppi: microfauna, mesofauna e macrofauna.

Gli organismi della macrofauna sono invertebrati di dimensioni comprese tra 4 e 100mm; si tratta pertanto di Animali la cui osservazione non richiede l'ausilio di particolari strumenti, salvo la possibilità di utilizzare una semplice lente da ingrandimento, per rilevare alcuni particolari morfologici. Essi comprendono Lombricidi (Anellidi), Molluschi, e diversi Macroartropodi, tra cui Insetti pterigoti (Coleotteri, Ditteri, ecc.), Miriapodi (Diplopodi, Chilopodi) e Crostacei Isopodi.

Sono molto meno numerosi degli organismi della micro e mesofauna, a differenza dei quali sono presenti ad esempio in alcuni tipi di suolo (mull forestale) con solo alcune migliaia di individui per metro quadrato di superficie. Per quanto riguarda la nicchia ecologica, la macrofauna comprende organismi scavatori, come i Lombricidi, o altri rappresentanti che occupano invece i pori interstiziali del terreno, a diverse profondità. Il loro ruolo trofico è diversificato, sono infatti presenti nella macrofauna: carnivori, fitofagi, microfagi e saprofagi.

La mesofauna rappresenta la componente della zoocenosi del suolo costituita dagli organismi di dimensioni intermedie tra quelle della microfauna e della macrofauna, ovvero comprese tra 0,1 e 2 mm; per la loro osservazione è pertanto necessario l'uso di un binoculare (stereomicroscopio). Essa comprende vermi Enchitreidi, molti Artropodi, quali Acari, Pauropodi, Sinfili e Insetti, e tra quest'ultimi: Proturi, Dipluri e Collemboli. Dal punto di vista delle abitudini alimentari la mesofauna comprende organismi prevalentemente detritivori, che si ritrovano negli spazi interstiziali del terreno occupati dall'aria, da cui respirano direttamente ossigeno. Sono meno numerosi della microfauna; si calcola ad esempio che in alcuni tipi di suolo (mull forestale) ogni metro quadrato di superficie sia popolato da circa 0,5-1 milione di individui per una biomassa complessiva di circa 12-25 grammi. Gli organismi più rappresentati della mesofauna sono Acari e Collemboli.

La microfauna è composta dai componenti della zoocenosi del suolo di dimensioni più piccole, inferiori a 0,1mm, la cui osservazione richiede pertanto l'ausilio del microscopio. Essa comprende sia organismi molto semplici, unicellulari, appartenenti al gruppo dei Protozoi, che animali pluricellulari, quali Nematodi, Rotiferi e Tardigradi.

Gli organismi della microfauna vivono nell'acqua che si trova negli spazi interstiziali del terreno, da cui assorbono l'ossigeno in essa disciolto. Date le piccole dimensioni, rappresentano la componente più numerosa della pedofauna: si calcola ad esempio che nel caso di alcuni particolari tipi di suolo (mull forestale) il numero di individui della microfauna per metro quadrato di superficie sia compreso tra 200 e 250 milioni di unità, la cui biomassa si aggira intorno a 8-10 grammi per metro quadrato di superficie.

I microrganismi, infine, rappresentano la componente vivente della sostanza organica del suolo e hanno dimensioni microscopiche. Esistono quattro forme principali di microrganismi: batteri, alghe, funghi ed attinomiceti, estremamente abbondanti e diffusi in tutti i tipi di suolo e con funzioni specifiche che dipendono dalle loro esigenze nutritive. Per quanto concerne i batteri del suolo, è possibile raggrupparli per gruppi funzionali e per esigenze nutritive. La classificazione nutrizionale prende come parametro la fonte di energia utilizzata e in funzione di questo prevede due gruppi fondamentali: batteri eterotrofi (che utilizzano come fonte di energia la sostanza organica) e

autotrofi (che utilizzano come fonte di energia molecole inorganiche semplici). Questi ultimi si possono ancora suddividere in fotoautotrofi (utilizzano l'energia luminosa) e chemioautotrofi (traggono l'energia dai processi di ossidazione di sostanze inorganiche). I funghi, presenti nel suolo in quantità molto rilevante, sono organismi eterotrofi, caratterizzati dalla formazione di miceli, formati da filamenti chiamati ife che possono avere estensione ridotta o forma ramificata e molto estesa. L'azione svolta dai funghi nel suolo è abbastanza variegata; importante è il ruolo da essi svolto nei processi di degradazione della sostanza organica, caratterizzata da rapporto molto alto tra carbonio e azoto, anche in condizioni di suoli acidi, poco favorevoli allo sviluppo di batteri. Le diverse esigenze nutrizionali e le diverse modalità di utilizzo dei substrati organici e dei nutrienti come donatori e accettori finali di elettroni spiegano la grande biodiversità caratteristica del suolo. La microflora edafica svolge funzioni fondamentali per il funzionamento dell'ecosistema. Attraverso la produzione di enzimi i microrganismi sono in grado di demolire la sostanza organica morta liberando i nutrienti in forma minerale. Solo batteri e funghi posseggono complessivamente il corredo enzimatico necessario a degradare tutte le molecole organiche naturali. Gli organismi del suolo, infatti, regolano e provvedono alla trasformazione della sostanza organica e al ciclo del carbonio e dei nutrienti, negli ecosistemi terrestri (Swift et al. 1979). Essi contribuiscono in modo diretto ed indiretto alla degradazione dei residui, alla pedogenesi, alla formazione e all'alterazione struttura del suolo ed, infine, alla regimazione delle acque (Lavelle et al., 2006). Molti di questi processi, come ad esempio il ciclo dell'azoto, sono svolti da organismi estremamente specifici, mentre altri, come la degradazione della sostanza organica, sono promossi da insiemi di organismi differenti, come batteri, protozoi, funghi ed invertebrati. Tuttavia un ruolo importante nella decomposizione della sostanza organica, sebbene indiretto, è svolto dalla pedofauna..

La scomparsa di tali specie dall'ecosistema potrebbe indurre importanti cambiamenti nella struttura stessa, con effetti a cascata sulla diversità specifica e sul funzionamento dell'ecosistema edafico. L'analisi della biodiversità in ambienti estremi risulta particolarmente importante in quanto consente la separazione delle interazioni climatiche, pedologiche e biologiche che influenzano fortemente la diversità delle specie e la struttura delle comunità. Lo studio della biodiversità edafica in tali ambiente può infatti contribuire a comprendere il funzionamento di ecosistemi più complessi, oltre che a studiare la risposta della biodiversità edafiche nei confronti dei predetti cambiamenti climatici (Wall et al., 1999).

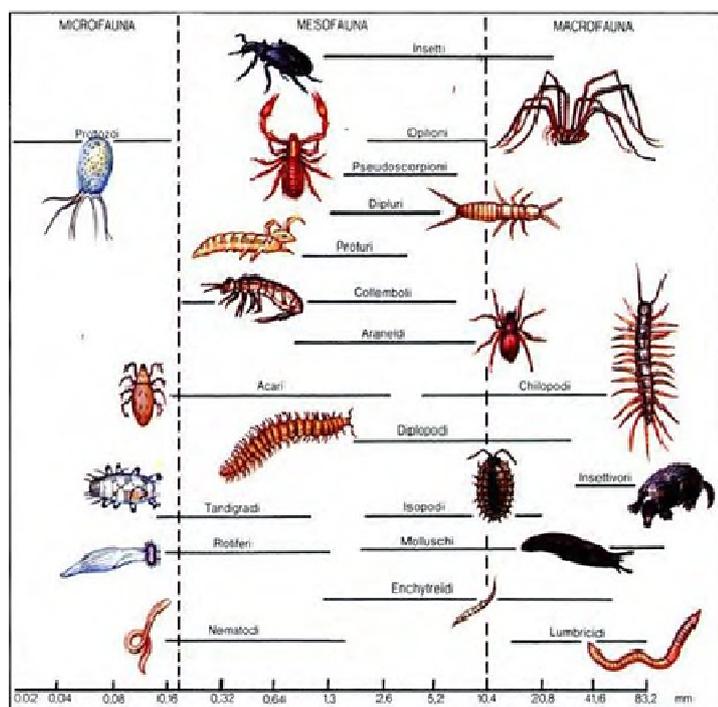


Figura 3. Classificazione della macro-meso e micro fauna del suolo

La biologia del suolo risulta quindi inscindibilmente legata alla sostanza organica in esso contenuta; per uno studio approfondito del suolo è importante quindi analizzare i rapporti di dipendenza tra le sue caratteristiche biologiche, chimiche e fisiche mediante un approccio interdisciplinare (Giordano, 1999).

La relazione tra biodiversità e suolo è un tema di rinnovato interesse, indagato grazie all'integrazione tra pedologia ed ecologia. È stato dimostrato recentemente che attività simili svolte dai diversi organismi possono influenzare le funzioni del suolo a diversa scala.

L'attività biologica ha un'importanza primaria nella pedogenesi in quanto le radici delle piante e gli animali scavatori frantumano la roccia madre già alterata dai fattori abiotici, creando residui di dimensioni più piccole e aumentandone la superficie specifica, predisponendoli così ad una successiva alterazione (Meysaman et al., 2006)

1.6) Metodi di Next Generation Sequencing

Fino a pochi anni fa i metodi utilizzati per il sequenziamento si basavano sul metodo di Sanger, il quale però risulta avere notevoli svantaggi soprattutto per quanto riguarda la necessità di utilizzare gel per la corsa elettroforetica dei frammenti, il basso numero di campioni analizzabile in parallelo e la difficoltà di automatizzazione del processo. Numerosi sforzi sono stati fatti per risolvere queste problematiche. Oggi le tre piattaforme di sequenziamento di nuova generazione che stanno avendo maggiore impatto sul mondo scientifico sono il 454 della Roche, il Solexa dell'Illumina ed il Solid dell'AppliedBiosystem. Rispetto alle tecniche basate sul metodo di Sanger, queste nuove tecniche di sequenziamento sono caratterizzate da una più alta velocità ed elevate prestazioni che permettono di ridurre drasticamente i tempi ed i costi di sequenziamento. Inoltre, con questi nuovi sistemi è possibile ottenere sequenze da singoli frammenti di DNA o da frammenti amplificati mediante PCR aggirando la necessità di effettuare il clonaggio in sistemi batterici, un procedimento che sarebbe più lungo e problematico. Nonostante la minore lunghezza dei frammenti analizzati, la possibilità di effettuare un gran numero di letture in parallelo permette di ottenere in poco tempo una grande mole di dati; è infatti necessario il ricorso ad avanzati sistemi bioinformatica per la gestione dell'informazione ottenuta dal sequenziamento. Con i metodi di sequenziamento di nuova generazione (NGS) il throughput si è alzato considerevolmente e i costi sono crollati, rendendo accessibile una vasta gamma di studi che sfruttano queste tecnologie. Il principale svantaggio delle nuove tecniche è la ridotta lunghezza dei reads; ciò comporta, nella fase di allineamento e assemblaggio, la generazione di errori, dei quali, seppur presenti in numero piuttosto basso, bisogna tener conto. Anche se le prestazioni delle varie tecnologie sono in continua evoluzione, e i dati a disposizione sono perciò molto spesso discordanti, è possibile fare comunque un confronto tra esse. Si notano infatti differenze di costo, accuratezza, lunghezza dei reads. Ciò indica che un metodo può essere più indicato per una determinata applicazione rispetto ad un altro. Tuttavia studi fatti con diverse tecnologie per lo stesso esperimento (per esempio nel caso di microbiomi) indicano che i risultati ottenuti sono gli stessi, entro il limite di errori statistici. In figura 2.11 è riportato un riassunto delle prestazioni dei diversi metodi.

Technology	Sanger Sequencing	Next Generation Sequencing			
Manufacturer	Applied Biosystems	Roche 454	Illumina	Life Technologies	
Model	ABI 3730XL	GS FLX Titanium XL+	HiSeq 2000 dual flow cell	SOLiD 4 System	Ion PGM
Bases per RUN	~ 96 Kb	700 Mb	600 Gb	100 Gb	1 Gb
Time per RUN	2 h	~1 day	~11 days	~14 days	4.5 h
Reads per RUN	96	1 million	6 billions (paired-end)	1.4 billions	5 millions
Reads length	up to 1000 bp	up to 1000 bp (mode 700 bp)	2* 100 bp	2* 50 bp	up to 400 bp

Figura 4: tabella di confronto fra le varie tecnologie NGS

Diversi metodi NGS utilizzano diversi processi biochimici, esistono tuttavia delle linee guida comuni. Il primo passo consiste nella preparazione della libreria da andare poi a sequenziare; dopodiché si opera un meccanismo amplificazione, in modo da aumentare di parecchio il numero di copie, con la generazione di cluster. È proprio questa operazione a imporre delle limitazioni riguardo alla lunghezza dei reads: infatti ciascuna copia dello stesso frammento deve crescere alla stessa velocità delle altre, in modo tale che non ci siano disparità di lunghezza tra esse, fatto che ne comporterebbe una diversificazione, introducendo un errore nel sequencing. Infine c'è il processo di sequenziamento vero e proprio, il quale è fatto solitamente via sintesi, e il conseguente immagazzinamento dei dati.

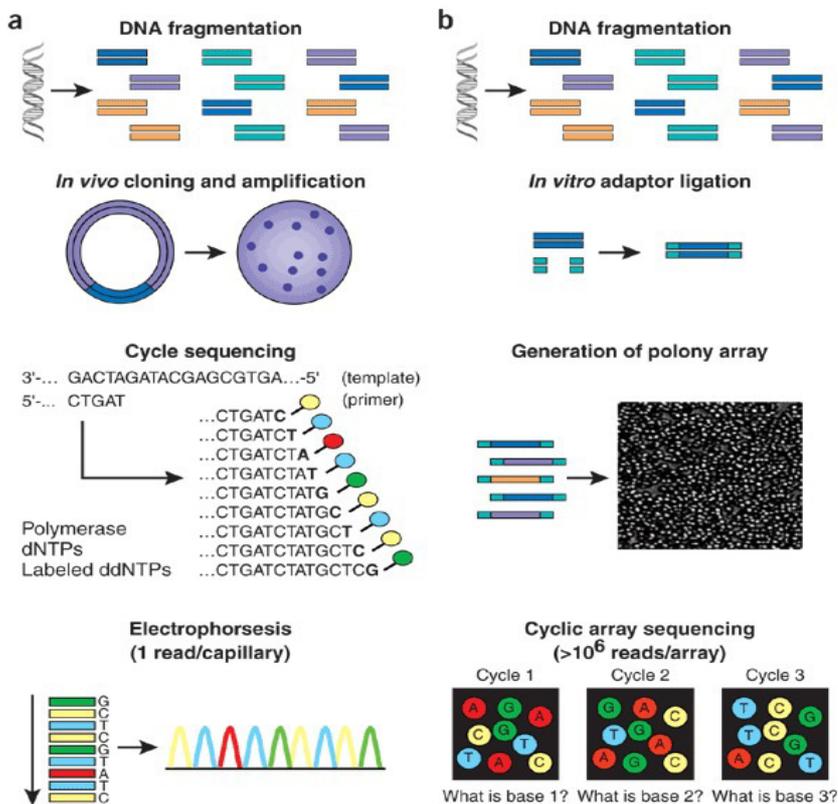


Figura 5: flusso di lavoro tipico dei metodi NGS (b) rapportato al metodo Sanger (a). È possibile notare il processo di creazione di cluster, o polony (polymerase colony).

1.6.1) Genome Analyzer di Illumina

Questo sequenziatore è stato per la prima volta messo sul mercato nel 2006 da Solexa, acquisita un anno dopo da Illumina. Il metodo su cui si basa è quello a terminazione di catena reversibile e il processo generale può essere suddiviso, come appena visto, in tre fasi: generazione della libreria, preparazione dei cluster e sequencing.

Il MySeq System Illumina, come tutte le tecnologie NGS, utilizza una cella a flusso consistente in una “slide” otticamente trasparente costituita, sulla superficie, da 8 compartimenti a cui sono legati degli oligonucleotidi di ancoraggio. Il DNA da sottoporre a sequenziamento, derivante da ciascun campione, viene modificato per l'aggiunta di oligonucleotidi adattatori, i quali sono complementari agli oligonucleotidi ancorati alla cella di flusso. In condizioni di diluizione limite, il DNA a singolo filamento legato agli adattatori è aggiunto alla cella a flusso e immobilizzato mediante ibridazione agli oligonucleotidi di ancoraggio. Illumina e altre tecnologie NGS hanno elaborato strategie per sequenziare entrambe le estremità delle molecole di DNA stampo. Tale possibilità fornisce informazioni che facilitano l'allineamento e l'assemblaggio specialmente di “short reads” (Korbel et al., 2007; Campbell et al., 2008). Con la piattaforma Illumina l'accuratezza nell'identificazione delle basi (“base calling”) diminuisce con l'aumentare della lunghezza del “read” (Dohm et al., 2008). Questo fenomeno è dovuto principalmente all'aumento di segnali d'interferenza (“dephasing noise”), costituendo un problema tecnico per il processo di sequenziamento. Durante un dato ciclo di sequenziamento, i nucleotidi possono essere incorporati in eccesso o in difetto o la rimozione del blocco può fallire. Con i cicli successivi, questi segnali di errore si accumulano producendo una popolazione eterogenea di filamenti di varia lunghezza all'interno di un “cluster”. Di seguito è riportata una schematizzazione di sequenziamento NGS secondo la tecnologia Illumina

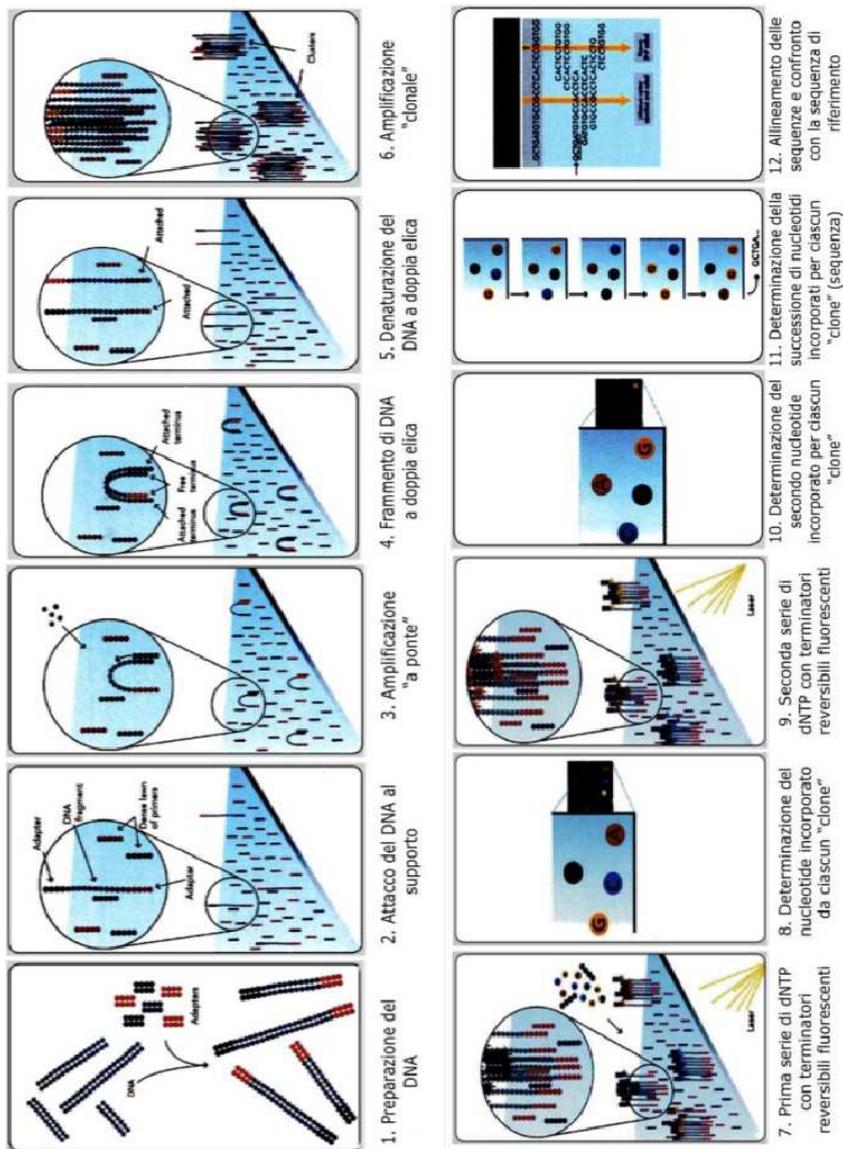


Figura 6. Rappresentazione schematica del sequenziamento mediante piattaforma Illumina

I sistemi di sequenziamento di nuova generazione hanno le potenzialità di accelerare notevolmente la ricerca biologica e biomedica, rendendo possibile una più approfondita analisi di genomi, trascrittomi e delle sequenze di interazione tra DNA e proteine. Queste nuove tecniche hanno il vantaggio di ridurre costi e tempi, ma soprattutto di ottenere grandi quantità di informazioni con un unico ciclo di sequenziamento. A

questo, però, segue la necessità di sviluppare algoritmi bioinformatica avanzati per gestire la grande mole di dati e permetterne una più immediata analisi ed interpretazione biologica.

2) OBIETTIVO

Durante la stagione vegetativa 2014/2015 nelle due aree dimostrative del Progetto SelPiBioLife sono stati rilevati i parametri utili per “fotografare” lo stato della diversità floristica, micologica e della meso e microfauna del suolo prima dei trattamenti selvicolturali.

L’obiettivo di questa tesi consiste nel monitorare e nel determinare degli effetti dei diradamenti selettivi sulle varie componenti della biodiversità del suolo dopo un anno.

Queste attività si inseriscono all’interno del progetto SelPiBio Life (LIFE13 BIO/IT/000282), un progetto LIFE finanziato in parte dall’Unione Europea, che si propone come obiettivo quello di accrescere la biodiversità dei suoli nei popolamenti forestali di pino nero. Nello specifico, vengono valutati gli effetti della differente gestione del territorio sulla componente microbica del suolo, definita, attraverso indicatori biologici (biomassa microbica, respirazione potenziale e analisi molecolare) e gli effetti sulla struttura di popolamenti di pino nero da impianto soggetti a tre trattamenti sperimentali: (i) diradamento dal basso (classico per le pinete toscane); (ii) diradamento selettivo (trattamento innovativo per le pinete); (iii) nessun trattamento, nei confronti degli equilibri ecologici.

Il diradamento di tipo selettivo è finalizzato ad accrescere la stabilità meccanica complessiva (funzione protettiva), la capacità di crescita delle piante (funzione produttiva) e la differenziazione strutturale (funzione di aumento di biodiversità). Questa tecnica gestionale, modificando la diversità strutturale orizzontale e verticale del popolamento forestale determina un diverso regime di luce, acqua e temperatura a livello del suolo favorendo l’accrescimento della biodiversità e la funzionalità complessiva dell’ecosistema (con conseguente incremento del valore economico, turistico e di protezione idrogeologica). I trattamenti applicati incidono infatti con diverso grado sulla copertura delle chiome; in particolare il diradamento dal basso, anche se di forte intensità, determina aperture nel piano delle chiome uniformemente distribuite nello spazio, mentre il diradamento selettivo agisce con aperture di gaps nella copertura.

Questa analisi rappresenta un’evoluzione del normale studio sulle foreste, dato che in ambito scientifico sono presenti pochi studi di come i diradamenti, in particolare in popolamenti di pino nero, influenzino la comunità microbica ed altre componenti del sistema.

3) Materiali e metodi

3.1) Descrizione delle aree di studio

Le aree di studio in cui è stato concretizzato l'obiettivo di questa tesi sono state scelte per le loro caratteristiche e rilevanza storica e sono state individuate in due complessi forestali, all'interno dei quali sono state poi designate le aree di intervento.

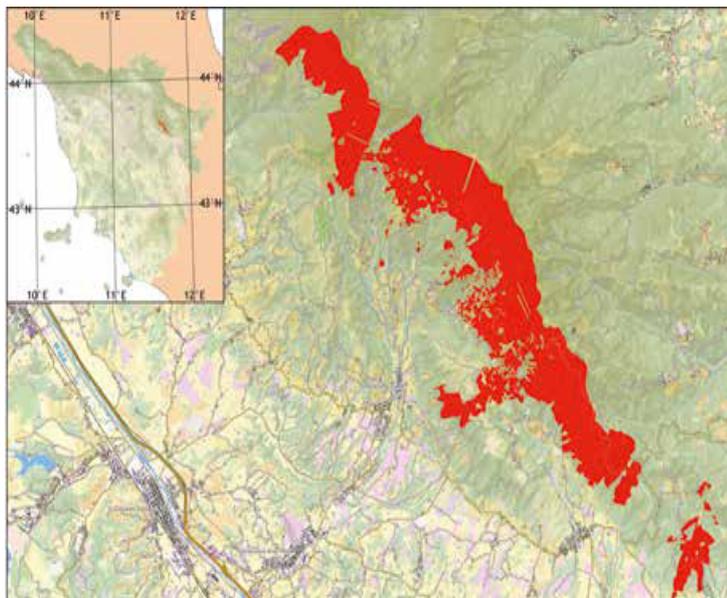


Figura 7: Area di studio Pratomagno

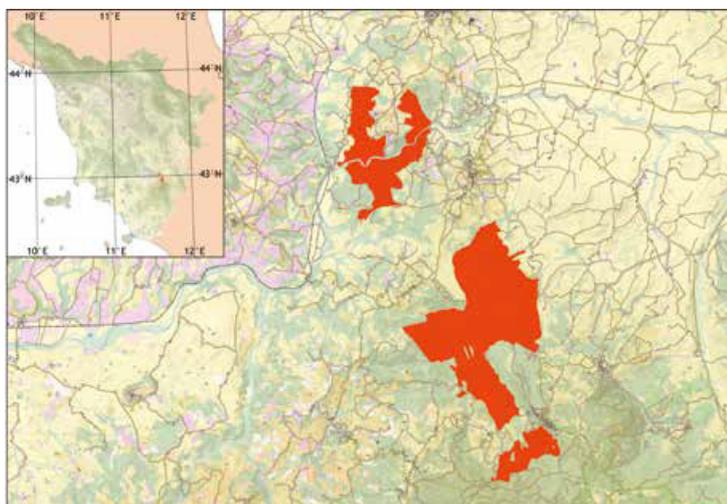


Figura 8: Area di studio Amiata

Le due aree prese in esame sono localizzate una nel complesso forestale regionale del “Pratomagno- Valdarno (Arezzo)” gestito in delega dall’Unione dei comuni del Pratomagno (UCP), che interessa una superficie catastale di 3.300,14 ettari e l’altra nel complesso forestale Madonna delle Querce (Siena e Grosseto) gestito dall’Unione dei comuni Amiata-Val d’Orcia (UCAVO), anch’esso in delega, con una superficie catastale di 2168,60 ettari,

All’interno del complesso UCP un totale di 487 ettari sono caratterizzati da pinete di pino nero con età diverse, appartenenti a differenti rimboschimenti; la superficie è sostanzialmente inferiore invece per il complesso localizzato UCAVO, all’interno del quale sono presenti 106 ettari dello stesso popolamento forestale.

Nel complesso “Pratomagno- Valdarno”, l’area d’interesse del progetto è localizzata nella zona geografica di “Pian della Cucina” nel comune di Loro Ciuffenna, caratterizzata da rimboschimenti di pino nero realizzati nel secondo dopo guerra (all’incirca negli anni 1954-1955).

Per quanto riguarda invece il complesso di Madonna delle Querce, la zona presa in analisi è quella de’ “Il Lago”, limitata nel comune di Castiglione d’Orcia, nella quale la realizzazione degli impianti artificiali risale ai primi anni del decennio 1960-1970.

Le due aree sono state selezionate per la loro rappresentatività della situazione che interessa al progetto ovvero due soprassuoli, tendenzialmente avviliti, per la mancanza del tutto o in parte dei necessari trattamenti e dove perciò la stabilità, sia meccanica che ecologica, è compromessa.

Inoltre i due soprassuoli risultano particolarmente omogenei al loro interno, anche grazie all’origine artificiale, ma differenti tra loro per le varie condizioni edafico -stazionali strettamente legate alla morfologia del territorio nel quale si trovano. Per tale motivazione le varie aree, ed i vari plots, in ciascuna area non si differenziano particolarmente gli uni dagli altri dal punto di vista selvicolturale e di conseguenza le differenze intra-complesso non sono influenti, se non per variazioni puntuali.

Viceversa acquisiscono maggiore importanza le differenze stazionali tra i due complessi, influenzando marcatamente sia sull’esito dei diradamenti che sull’evoluzione del soprassuolo. Sebbene per la catalogazione fitoclimatica elaborata da Pavari nel 1916 le due zone rientrino entrambe nel Castanetum, esse appartengono a due sottozone differenti, una calda ed una fredda, basate sul regime idrico; di conseguenza le differenze che sussistono tra le due aree sono principalmente dovute a fattori quali l’altitudine, l’esposizione, il substrato geologico, il clima ecc..

Importanti differenze si possono evidenziare, infatti, anche dai rilievi eseguiti con il metodo di Braun- Blanquet, sulla vegetazione erbacea; all’interno del soprassuolo dell’Amiata è presente una

maggior diversità di specie erbacee, come ad esempio specie appartenenti alla famiglia di leguminose, probabilmente dovuta alle minori condizioni di rigidità invernale e quindi un clima più mite

3.1.2 Descrizione Particolare Amiata

L'area campione è situata su un versante lungo è ondulato, esposto a Nord-Est, avente una pendenza variabile da debole e forte. Non sono presenti affioramenti rocciosi, la pietrosità superficiale di piccole dimensioni è comune, scarsa o assente la pietrosità di medie dimensioni. Non sono evidenti fenomeni erosivi di significativi importanza.

I suoli presenti nell'area di studio sono profondi, a profilo O-A-Bw-(Bg)-C, ben dotati di sostanza organica nell'orizzonte superficiale A, da scarsamente ghiaiosi a ghiaiosi in profondità, a tessitura prevalentemente franco limoso argillosa e argillosa, da debolmente a moderatamente calcarei, debolmente alcalini, con saturazione in basi molto alta, da ben drenati a piuttosto mal drenati. Per quanto riguarda il clima, facendo riferimento alla stazione meteo di Castiglione d' Orcia (516 m s.l.m.), è caldo temperato. L'inverno ha molta più piovosità dell'estate. Secondo Köpper e Geinger il clima è stato classificato come Csb. Castiglione d'Orcia ha una temperatura media di 12,5°C è una piovosità media annuale di 687 mm.

Per quanto riguarda il popolamento forestale dal 1978 al 2015 la superficie boscata aumenta notevolmente, soprattutto a causa dell'opera di rimboschimento avvenuto sia sui cedui degradati che su terreno nudo (ex pascolivi e seminativi).

La pineta ha un'età media di 44 anni e una struttura verticale monoplana. La composizione specifica è a maggioranza assoluta di pino laricio (più del 90% in numero). Le altre piante dello strato arboreo sono costituite in maggioranza da cerro, roverella ed altre specie tipiche del querceto deciduo.

Lo strato erbaceo e arbustivo è molto abbondante, caratterizzato da *Brachypodium rupestre* L. (13,7%), *Rubus* sp. (7,3%), *Carex* sp.(5,3%) e *Hedera elix* L. (4,5%). Inoltre anche la presenza di necromassa è notevole, che rappresenta uno degli elementi fondamentali per quanto riguarda la ricchezza della componente microbica e della macro e meso-fauna.

Le seguenti immagini rappresentano la carta geografica scala 1:45000 che inquadra la zona delle aree di studio (Figura) e la suddivisione della parcella (particella B52) (Figura 4) nelle 9 aree di campionamento con le 3 ripetizioni per ogni area, distinte per ogni trattamento a essa associato



Figura 9: Carta geografica zona “il Lago” scala 1:45000

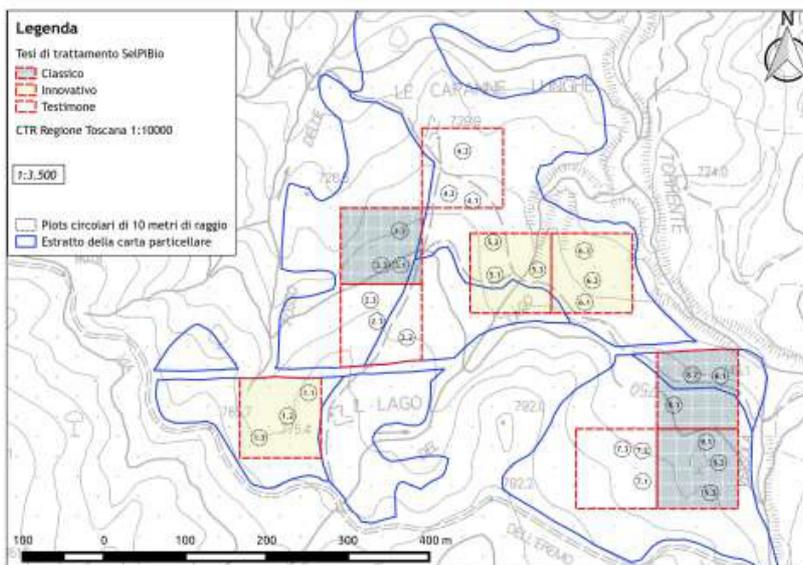


Figura 10: Suddivisione delle aree di campionamento e relativi plots (area Amiata)

La particella B52 in cui sono localizzate le aree di campionamento è costituita da una fustaia pura di origine artificiale, ottenuta da rimboschimento di pino nero, con una copertura della chioma colma (85% circa) e all'interno della quale è distinguibile, solo in alcuni casi il sesto di impianto esso risulta essere elevato e di conseguenza la densità del soprassuolo è comunque elevata.

3.1.3) Descrizione particolare Pratomagno

L'area del Pratomagno è situata su un versante a "v" ad una quota media di 1.150 m s.l.m., con esposizione prevalente sud-ovest e pendenza media del 40%.

Litologicamente è caratterizzata da un'alternanza di arenarie e la pietrosità può essere localmente abbondante.

I suoli sono da poco a moderatamente profondi, con contenuto elevato di sostanza organica nell'orizzonte superficiale A, non calcarei, da estremamente a moderatamente acidi, con saturazione in basi moderatamente bassa, talvolta eccessivamente drenati.

La piovosità media è di 997 mm, con valore massimo assoluto in autunno. La temperatura media annua è di 10,5°C.

La pineta ha un'età medi di 59-60 anni è una struttura verticale monoplana. La composizione specifica è a maggioranza di Pino laricio (più del 82% in numero) consociato localmente a gruppi con abete bianco (15%). La restante composizione è costituita da specie tipiche della faggeta appenninica. Lo strato erbaceo è arbustivo sono caratterizzati da una scarsa presenza tra cui le specie *Brachypodium rupestre* L. (24,0%), *Viola reichenbachiana* Jordan ex Boreau (9,2%), *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn (8,6%) e

Rubus sp. (5,8%), mentre anche in quest'area la necromassa è molto abbondante



Figura 11: Carta geografica della zona “Pian della cucina” scala 1:45000

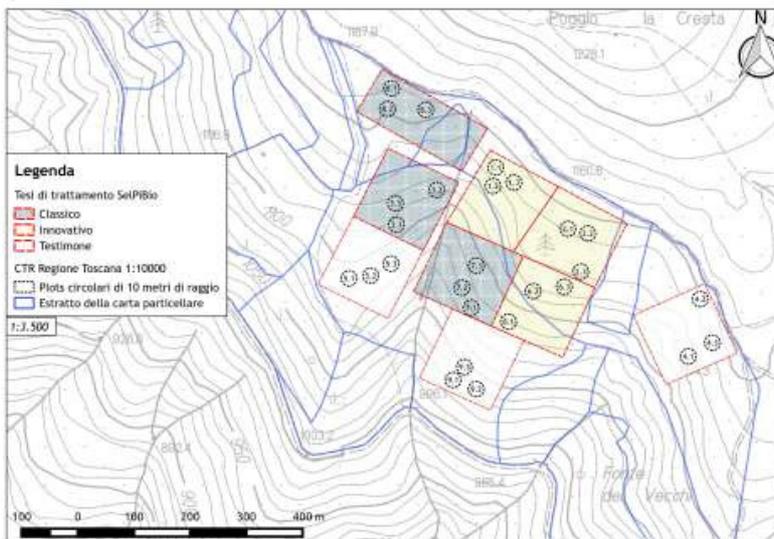


Figura 12: Suddivisione delle aree di campionamento e relativi plots

La particella 22 è costituita da fustaia pura di origine artificiale ottenuta da rimboscimento di pino nero con una copertura della chioma colma (85% circa) e all'interno della quale è distinguibile.

3.2) Dati meteorologici

L'analisi meteorologiche in ciascuna area sono state determinate attraverso l'installazione di una stazione meteorologica con sensori "Vantage Pro 2" (Davis Instruments) (figura) per l'acquisizione di dati relativi a:

- Temperatura/umidità
- Pluviometro (risoluzione 0,2 mm)
- Anemometro (velocità/direzione vento)
- Radiazione solare globale
- Radiazione ultravioletta (UV)



Figura 13: stazione meteorologica Davis vantage Pro 2

I dati sono forniti in tempo reale sul sito del progetto Selpibiolife ([www.selpibiolife.eu /il-progetto.html#dati-meteo](http://www.selpibiolife.eu/il-progetto.html#dati-meteo)) e aggiornati ogni ora. Lo scopo è quello di confrontare, una volta acquisiti, i dati meteo completi con i dati di umidità e temperatura del suolo nelle aree sperimentali, per poter stimare con buona affidabilità il bilancio idrico del suolo e correlarlo con gli effetti delle differenti tecniche di diradamento sulla componente biotica.

Le due aree non presentano inoltre particolari vincoli, se non quello idrogeologico previsto dal R.D.L. 3267/23 e non rientrano in zone di particolare interesse naturalistico, come ad esempio SIC o ZPS previste per la Rete Natura 2000.

Successivamente viene riportata una carta topografica che identifica le due zone (complessi) interessate dall'attuale studio e la sua disposizione all'interno della Regione Toscana.

3.3) Schema di campionamento

Il protocollo sperimentale del Progetto SelPiBioLife prevede, in entrambe le aree di studio la delimitazione di 9 aree di monitoraggio della superficie topografica di 1 ha ciascuna.

I trattamenti del bosco sono stati: controllo (nessun trattamento); diradamento classico (diradamento dal basso di moderata intensità); diradamento selettivo.

Il disegno di monitoraggio come illustrato nella figura seguente ha previsto l'estrazione a sorte delle tesi di trattamento per ciascuna area di monitoraggio: 3 ripetizioni per ciascuna tesi di trattamento.

In ognuna delle 9 aree di monitoraggio sono stati collocati con criterio random 3 plot circolari di superficie variabile tra 10 m di raggio per le analisi di biodiversità e di 13 m di raggio per le analisi dendrometriche e strutturali dei popolamenti forestali.

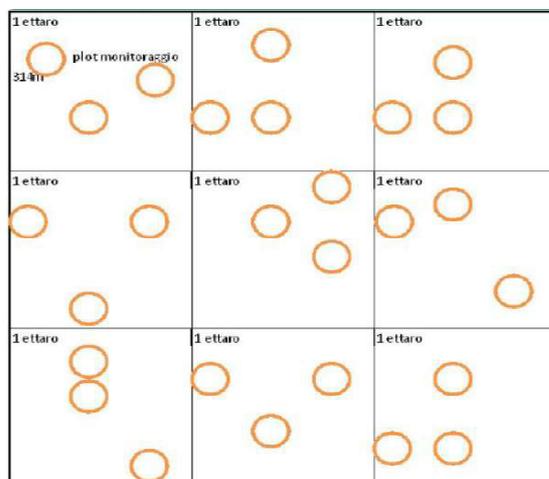


Figura 14: Schema di campionamento con nove aree (tre per ogni trattamento) e i tre plot all'interno di ogni area.

In seguito al rilevamento e all'analisi dei parametri dendrometrico-strutturali sono stati selezionati gli individui che sarebbero stati successivamente oggetto di diradamento.

Da un punto di vista strutturale con l'intervento selettivo si propone ad aumentare la diversità sia in senso orizzontale (apertura di micro gap nell'intorno delle piante candidate) sia verticale (rottura della monotonia del piano delle chiome). Il diradamento ha la finalità di lasciare spazio libero alle chiome delle piante candidate.

Un nuovo intervento di diradamento dovrà essere effettuato al momento in cui le piante candidate abbiano la chioma nuovamente a contatto con nuove piante competitive

Per la scelta delle piante candidate si è valutata:

- la composizione specifica;
- la vigoria;
- il grado di stabilità meccanica;
- i danni meccanici e/o patologici (eventuali);
- i nuclei di stabilità.

Mentre per il diradamento tradizionale si è proceduto con un normale diradamento dal basso asportando delle piante del popolamento di minor sviluppo.

3.3.1) Campionamento del suolo

Per il campionamento del suolo è stato eseguito con un campionamento standard a croce all'interno dell'area, scegliendo il punto centrale (punto 5) in modo che coincidesse, con buona approssimazione, con il centro dell'area di saggio (Figura 12). In ogni punto è stato estratto un campione di suolo (carotaggio) di circa 30 cm di profondità, privo di lettiera.

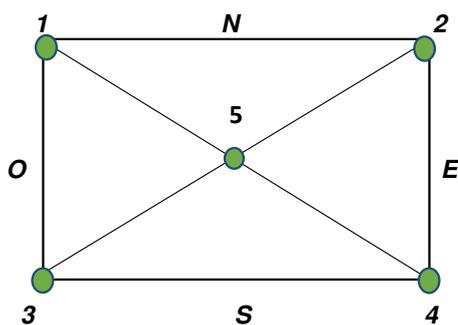


Figura 15: Schema di campionamento del suolo con punti cardinali

In seguito tutti i campioni sono stati uniti e mescolati in modo da rendere il campione totale il più omogeneo possibile. Inoltre i campioni sono stati conservati in campo ad una temperatura ambiente per un breve periodo, evitando di deterioramento degli stessi.

Successivamente alla fase di campo, i campioni sono stati asciugati all'aria e setacciati a 2 mm; dai campioni così processati ne è stata estratta un'aliquota per ognuno, utilizzata in un secondo tempo per le analisi molecolari e conservata in un refrigeratore alla temperatura di -30 °C.

La restante parte dei campioni, utilizzata per le analisi respirometriche e della biomassa microbica, è stata conservata, a temperatura ambiente evitando il contatto con agenti contaminanti esterni, collocandoli all'interno di contenitori sigillati.

3.4) Analisi dei dati forestali

In ambito forestale si è provveduto al censimento e alla numerazione di tutti gli individui, in modo da poter avere dei valori di riferimento per quanto concerne il prelievo effettuato in seguito ai diradamenti e quindi dei cambiamenti apportati ai soprassuoli.

Le variabili dendrometriche inserite nel database prodotto dal progetto sono le seguenti:

- codice identificativo dell'albero;
- specie;
- diametro ad 1,30 m (soglia di cavallettamento 5 cm);
- altezza totale della pianta;
- altezza di massima larghezza della chioma;
- altezza (da terra) di inserzione della chioma;
- rango sociale della pianta suddiviso in tre classi (dominante - intermedia -dominata);
- stato di salute della pianta (viva - morta - stroncata);
- numero di palchi verdi;

- coordinate polari (azimut in gradi sessagesimali rispetto al Nord e distanza in metri) della posizione del fusto della pianta relativo al centro del plot;
- coordinate polari (azimut in gradi sessagesimali rispetto al Nord e distanza in metri) della posizione di 8 punti di proiezione a terra della chioma e anch'essi relativi al centro del plot.

Come riportato nelle immagini seguenti (Figura 13) la martellata nel diradamento selettivo prevede le seguenti fasi:

- A) individuazione delle piante candidate (pianta con anello blu);
- B) individuazione delle dirette competitori (piante con croce rossa);
- C) diradamento localizzato a favore delle candidate.

In seguito al rilevamento di tali parametri sono stati selezionati gli individui che sarebbero stati successivamente oggetto di diradamento.

Per il diradamento di tipo "selettivo" sono state scelte le piante candidate appartenenti al piano principale, intorno alle quali è stato realizzato il taglio, al fine di utilizzare in modo efficiente, ma sostenibile, la potenzialità produttiva del popolamento in termini di massa legnosa, conservando e migliorando la fertilità del suolo e creando un ambiente migliore e assicurare la stabilità del bosco con un opportuno portamento degli alberi ed una adatta struttura d'insieme, al fine di ricreare una struttura verticale coerente con la tipologia forestale presente o che si intende perseguire (rinaturalizzazione). L'obiettivo si raggiunge favorendo la crescita di determinati alberi nel piano dominante sui quali si concentra l'intervento e si articola la struttura, mantenendo un soprassuolo accessorio il cui compito è quello di assicurare favorevoli condizioni ambientali.

Mentre con il diradamento tradizionale si è proceduto con un normale diradamento dal basso eliminando tutte le piante dominate più basse. Vengono eliminate più della metà delle piante, ma viene eliminata poca biomassa, asportando intorno al 30/40% dell'area basimetrica.



Figure 16: Modalità d'intervento per scelta delle piante candidate

3.5) Analisi microbiologiche

La qualità ambientale di un'area o di un territorio può essere stimata mediante l'uso di opportuni indicatori. Questi possono essere definiti come strumenti in grado di rappresentare, con differenti livelli di approssimazione, particolari condizioni (eventi, processi, stati complessivi di qualità o criticità) dell'ambiente.

I parametri per la valutazione della qualità del suolo possono essere suddivisi in fisici, chimici e biologici; nel nostro caso studio sono stati esaminati i parametri biologici. I microrganismi possono essere utilizzati come indicatori della qualità del suolo perché svolgono delle funzioni chiave nella degradazione e nel riciclo della sostanza organica e dei nutrienti o rispondono prontamente ai cambiamenti dell'ambiente suolo. Inoltre l'attività microbica nel suolo rispecchia la somma di tutti i fattori che regolano la degradazione e la trasformazione dei nutrienti. E' comunque estremamente difficile utilizzare i valori forniti dai parametri microbiologici poiché i microrganismi del suolo reagiscono molto rapidamente anche a variazioni stagionali e si adattano alle diverse necessità ambientali. Molti studi sono stati condotti circa la possibilità di utilizzare i parametri microbiologici e biochimici del suolo per caratterizzare la diversità microbica sia in termini genetici che funzionali definendo innanzi tutto se c'è vita nel suolo oppure no ed il suo ordine di grandezza.

Quindi, è di fondamentale importanza capire quanto la popolazione vivente sia attiva e quali funzioni svolga. Infine, sarà importante caratterizzare la struttura della comunità microbica e le relazioni che essa instaura con la pianta.

Un set di indicatori base per valutare la salute e la qualità del suolo non è stato ancora ben definito, nonostante le diverse proposte avanzate sia dall'American Soil Science Society (ASSS), che da altri organismi internazionali. Molte definizioni di qualità del suolo sono state date in questi ultimi anni, ma quella che sembra meglio riassumere il concetto è stata proposta da Doran e Parkin (1994) "La capacità del suolo di interagire con l'ecosistema per mantenere la produttività biologica, la qualità ambientale e promuovere la salute animale e vegetale".

Attualmente disponiamo di numerose metodologie in grado di fornire un set di indicazioni. Bloem e co-autori (2006) hanno proposto la seguente classificazione in quattro gruppi di metodi a seconda del tipo di informazione che riescono a dare:

1. Biomassa e carica microbica del suolo
2. Attività microbica del suolo
3. Diversità microbica nel suolo e struttura della comunità

4. Relazioni pianta-microrganismi

Per questo lavoro sono stati utilizzate metodologie appartenenti ai primi tre gruppi:

3.5.1) Misura del C della biomassa microbica nel terreno

La biomassa microbica del suolo (determinata come carbonio microbico mediante analizzatore elementale N, C, S), che include batteri, funghi, actinomiceti, alghe e protozoi, rappresenta un buon indicatore di qualità del suolo poiché i microrganismi sono coinvolti nel ciclo dei nutrienti e quindi nel funzionamento del suolo. Essi infatti hanno un ruolo chiave nel processo di decomposizione della sostanza organica morta, che porta, da una parte, alla mineralizzazione rapida dei nutrienti, che vengono così resi disponibili per le piante, dall'altra, alla produzione di humus, che costituisce una riserva di nutrienti a lento rilascio. D'altra parte i microrganismi stessi rappresentano una riserva di elementi minerali che vengono rilasciati dopo la loro morte.

La biomassa microbica (C_{mic}), che esprime la quantità di carbonio microbico presente nel suolo in mg C kg⁻¹ suolo, è stata determinata secondo il metodo della fumigazione-estrazione con cloroformio (Vance et al., 1987) su campioni di suolo secco ricondizionati per 10 giorni alla capacità di campo e incubati al buio a 30°C. Sui campioni fumigati e non fumigati si estrae il materiale cellulare con una soluzione di K₂SO₄. Sugli estratti così ottenuti si procede alla determinazione del carbonio organico totale della biomassa mediante ossidazione con bicromato di potassio in ambiente acido.

La biomassa microbica è data dalla differenza tra la quantità di C nei campioni fumigati e non fumigati. Il metodo della fumigazione-estrazione si basa sul fatto che la fumigazione del suolo con cloroformio induce la morte e la lisi delle cellule batteriche con il conseguente rilascio del citoplasma nel suolo; il materiale cellulare può quindi venir estratto dal suolo con una soluzione salina di K₂SO₄ (Vance et al., 1987; Alef e Nannipieri, 1995).

Per la preparazione dei campioni, sono stati pesati 20g di suolo in replica doppia, uno da sottoporre a fumigazione mentre l'altro no. Ad ogni campione è stata aggiunta acqua fino al raggiungimento della capacità di ritenzione capillare. I campioni così costituiti sono stati posti in una stufa a 30 °C per 24 ore. I campioni da sottoporre a fumigazione sono stati successivamente posti in una giara con all'interno del cloroformio, creando inoltre il vuoto per permettere al cloroformio di permeare meglio all'interno dei campioni.

Entrambe le repliche per ciascuna area (fumigato e non fumigato), sono state sottoposte al processo di estrazione mediante K_2SO_4 0,5M con rapporto 1:4 (g suolo su ml di estraente) e successivamente, tramite processo di mineralizzazione e titolazione, ne è stato calcolato il contenuto di C. I risultati si esprimono in μg di C per g di peso secco del suolo.

3.5.2) Determinazione della respirazione del suolo

La respirazione sia aerobica che anaerobica, produce energia a partire da composti organici ed inorganici ridotti che fungono da donatori primari di elettroni mentre composti ossidati servono da accettori terminali di elettroni. L'energia contenuta nei composti ridotti si sposta attraverso una catena di reazioni redox a cascata facenti parte di importanti vie metaboliche quali la glicolisi, il ciclo di Krebs e la catena di trasporto degli elettroni.

La respirazione basale del suolo, misurata come evoluzione di CO_2 , rappresenta una stima del metabolismo degli organismi edafici; più ricca e più attiva è la comunità edafica, maggiore è l'evoluzione di anidride carbonica. Secondo Parker e Doxtader, (1983) l'attività microbica è responsabile del 71% dell'evoluzione totale di CO_2 dal suolo e può essere considerato come una misura dell'attività di decomposizione microbica. Il naturale utilizzo di substrati organici da parte della comunità microbica del suolo produce anidride carbonica (CO_2), che viene stoccata nei pori del suolo ed emessa in atmosfera tramite processo diffusivo dovuto al gradiente di concentrazione. Data l'immensa variabilità della risposta degli indici microbici ad una moltitudine di ambientali, potrebbe essere complicato mettere in relazione queste misure con la qualità del suolo. Valori più elevati di quoziente metabolico (qCO_2) implicano un'attività microbica maggiore, in pratica i microrganismi richiedono più carbonio e spendono più energia per la respirazione piuttosto che aumentare la biomassa. Il quoziente metabolico (qCO_2) rappresenta l'attività dei microrganismi del suolo, precisamente il tasso di respirazione specifica su base oraria espresso dal rapporto tra respirazione basale e biomassa microbica ($mg\ C-CO_2/mg\ C_{mic}$)/24*100, dove 24 sono le ore di un giorno (Anderson and Domsch, 1990; 1993). Il quoziente di mineralizzazione (qM) esprime su base percentuale la quantità di C respirato (ovvero mineralizzato) rispetto a quello iniziale nel suolo, si calcola quindi come $(C_{cum}/TOC)*100$ (Dommergues, 1960). Il qM indica l'efficienza con cui i microrganismi metabolizzano la sostanza organica del suolo, espressa in % dal rapporto tra respirazione cumulativa e carbonio organico totale.

La determinazione della concentrazione della CO₂ prodotta dalla biomassa microbica presente nel campione è stata effettuata per titolazione partendo dall'assunto che la biomassa microbica, respirando produce CO₂.

La CO₂ prodotta dalla biomassa microbica è intrappolata da una soluzione di idrossido di sodio presente nel contenitore, trasformandosi quindi in carbonato di sodio.

La misurazione della CO₂ è stata effettuata tramite la precipitazione del carbonato per aggiunta di cloruro di bario 1M (reazione immediata); tutto l'idrossido di sodio che non è entrato nella reazione può essere titolato con una certa quantità di acido cloridrico 0,1 M. Da tale quantità, attraverso l'equazione sottostante, è possibile ottenere i mg di C, sviluppati in forma di CO₂, emessi durante il processo.

Da tale quantità, attraverso l'equazione sottostante, è possibile ottenere i mg di C, sviluppati in forma di CO₂, emessi durante il processo.

Il metodo consiste nel pesare 25g di suolo per ogni campione, aggiungere acqua distillata fino al raggiungimento della capacità di ritenzione capillare e porre così i campioni all'interno di un contenitore ermetico. Nello stesso contenitore è stato posizionato un recipiente contenente 10ml di NaOH (0,5 N). Il contenitore è stato ubicato in stufa a 30 °C e successivamente estratto nei giorni prestabiliti per effettuare le misurazioni (1, 3, 7, 10, 14, 21, 28 giorni).

Per le metrature sono stati aggiunti al NaOH 5 ml di cloruro di bario 1N al fine di interrompere la reazione con la formazione di carbonato di bario. Successivamente è stato eseguito il processo di titolazione con acido cloridrico, ottenendo il valore da utilizzare nella formula sovrastante. Per i riferimenti e i dettagli di tale metodo si rimanda agli articoli scientifici di Anderson (1982) e di Isermeyer (1952).

3.5.3) Determinazione della struttura della comunità microbica

I metodi molecolari basati sull'analisi del DNA estratto dal suolo hanno rivelato una diversità microbica inattesa nel suolo (Torsvik et al., 1990; Insam, 2000; Nannipieri et al., 2003), ed in particolare essi hanno rivelato la presenza di circa 6000 genomi diversi per grammo di suolo (Torsvik et al., 1996). Alcuni geni, definiti orologi molecolari, vengono utilizzati per stabilire la relazione filogenetica tra gli organismi del suolo e i principali regni del mondo biologico (Miller, 1998; Pietramellara et al., 2002, a). I geni più idonei sono quelli ribosomiali in particolare quelli del rDNA 16S (Pace et al., 1986; Head et al., 1998; O'Donnel et al., 1999) e 23S (Brim et al., 1999),

nonché gli spaziatori ribosomiali trascritti (ITS, Intergenic Transcribed Spacers) tra l'rDNA 16S e 23S (De Oliveira et al., 1999). Questi geni sono un misto di zone ipervariabili e zone più conservate, per cui studiando zone diverse dello stesso gene, si possono ottenere informazioni a diverso livello tassonomico. L'amplificazione mediante Polymerase Chain Reaction (PCR) del 16S o ITS, o di loro porzioni, il sequenziamento di tutti gli ampliconi ed il loro confronto con le sequenze di microrganismi già classificati e presenti in apposite banche dati, permette la caratterizzazione delle comunità microbiche oggetto di studio.

Nel seguente studio è stato utilizzato un approccio di Next Generation Sequencing (NGS) per lo studio del microbiota presente. Il DNA totale presente nel terreno è stato estratto e amplificato utilizzando primer universali per il gene 16S dei batteri e ITS dei funghi, e sequenziato mediante NGS dopo opportuni trattamenti.

In tutti i batteri la regione V4 del 16S è costituita da 254 nucleotidi e si discosta solo di poche paia di basi da questa lunghezza. Secondo il protocollo Illumina la regione V4 viene amplificata usando il forward primer 515F (5'GTGCCAGCMGCCGCGTAA-3') ed il reverse primer 806R (5'GGACTACVSGGGTATCTAAT-3') a cui sono ancorati degli adattatori unici per ogni campione. Il modello di amplificazione è rappresentato nella **Fig. 17**

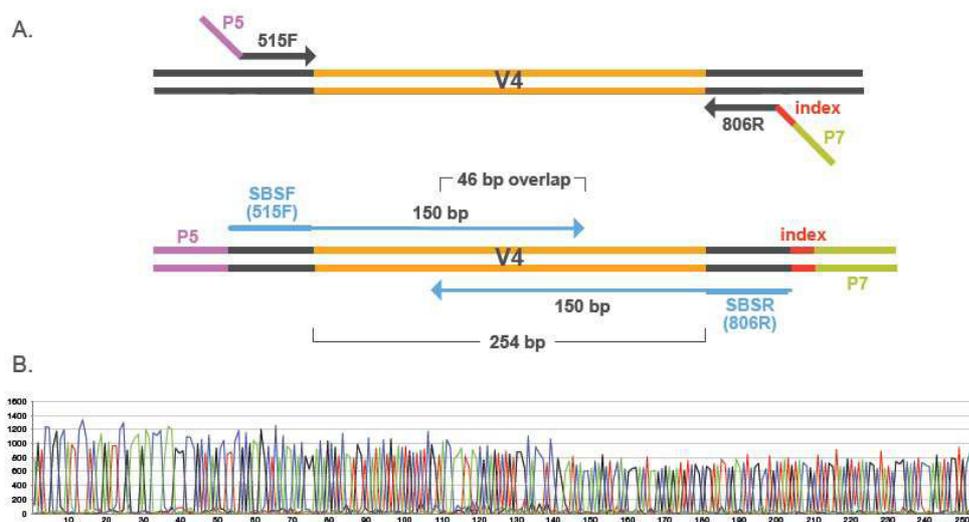


Figura 17: Rappresentazione schematica della regione V4 del 16S ribosomiale batterico. A) Schema di amplificazione. B) Esempio di frammento sequenziato

I protocolli esistenti per l'estrazione del DNA dal suolo si basano su due principali tipi di procedure:

- la lisi indiretta o frazionamento microbico, che prevede un'iniziale separazione delle cellule microbiche dalla matrice suolo mediante centrifugazione e la loro successiva lisi con trattamenti chimici, termici o enzimatici per rilasciare gli acidi nucleici che verranno in seguito sottoposti a procedure di purificazione (Holben et al., 1988; Hopkins et al., 1991; Van Elsas et al., 1997; Duarte et al., 1998; Gabor et al., 2003).

- la lisi diretta, che prevede la lisi delle cellule microbiche direttamente nella matrice suolo con successiva estrazione e purificazione del DNA (Trevors, 1992; Ceccherini et al., 2000). Tale tecnica è meno selettiva della lisi indiretta ma, consentendo l'estrazione del DNA totale dal suolo, permette una stima più rappresentativa delle popolazioni microbiche presenti nel suolo. Questo metodo è inoltre meno laborioso. Per contro presenta difficoltà legate alla natura dei colloidi del suolo, alla presenza di composti polifenolici ed alla resistenza di alcune cellule batteriche e fungine alla lisi (Ceccherini et al., 2000). La prima difficoltà è quella della scelta del metodo di campionamento che condiziona l'intero esperimento. Risultati validi possono essere ottenuti se la quantità di suolo prelevata è rappresentativa dell'intero suolo (O'Donnel e Görres, 1999; Ellingsøe e Johnsen, 2003; Nannipieri et al., 2003; Pietramellara et al., 2002, a). Poi occorre manipolare il campione in modo da non alterare la composizione della microflora. Infine occorre procedere all'estrazione del DNA, che costituisce una fase particolarmente critica della tecnica molecolare. Durante l'estrazione del DNA si può avere infatti la coestrazione di sostanze organiche (acidi umici, acidi fulvici, detriti cellulari, polisaccaridi, proteine, solventi organici) ed inorganiche (xenobiotici, metalli pesanti, minerali argillosi), che possono contaminare il campione, compromettendo le successive fasi analitiche.

L'estrazione diretta del DNA totale dal suolo, basato sulla lisi meccanica, è stata effettuata mediante Sistema di Fast Prep, che prevede un'estrazione rapida di DNA utilizzando solventi organici come il fenolo ed il cloroformio. In particolare il sistema Fast Prep comprende sia lo strumento Fast Prep_ che il Fast DNA_ Kit for SOIL (BIO101 Inc., USA) ed è in grado non solo di lisare le cellule, anche le più resistenti all'azione enzimatica, ma anche di evitare la frammentazione degli acidi nucleici. In questa ricerca per l'estrazione del DNA dal suolo è stato utilizzato il kit "FastDNA™ SPIN Kit for Soil" dell'azienda MP Biomedicals che prevede l'estrazione del DNA da 0,5 g di suolo; tale metodo di estrazione prevede l'utilizzo del FastPrep®. La risospensione finale è effettuata in TE (0,1 mM EDTA).

Il DNA totale estratto dal suolo è stato caratterizzato per il peso molecolare, caricando quantità di DNA di 15 microlitri e trattati con blu di bromofenolo 1x, rispettivamente, su gel d'agarosio allo 0.8% in un tampone di corsa 1x (Tris acetato- EDTA, TAE), contenente bromuro di etidio 1x. L'immagine è stata ottenuta con una Polaroid Gel Cam, Elect (Polaroid Type 667 Film ISO 3000) su UV-trans-illuminatore (Genenco) (Figure 18 e 19).

Amiata

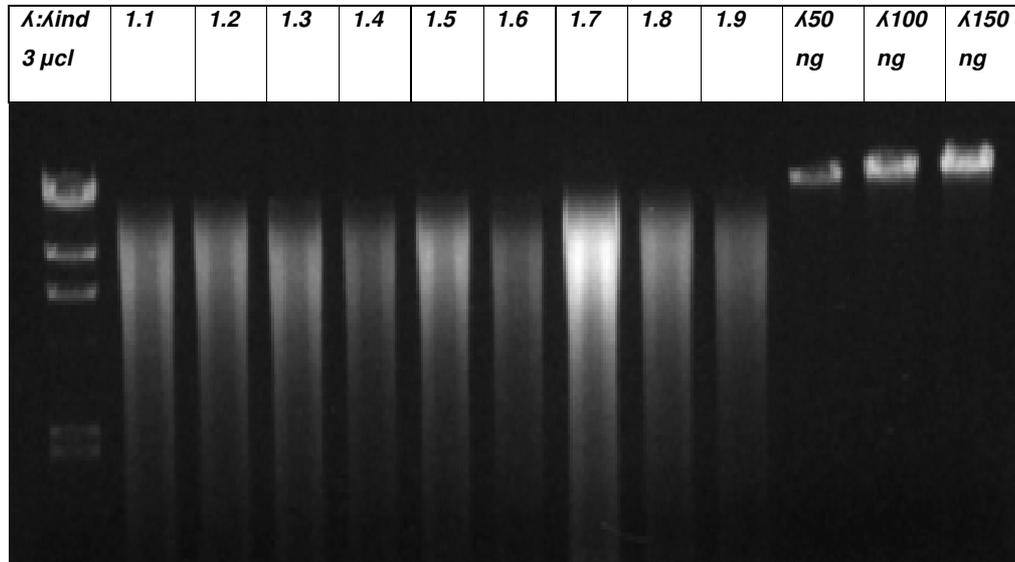


Figura 18: Estrazione dna per i campioni dell'area UCAVO 2016 (M= *λ*:*hind* 3 μ cl)

Pratomagno

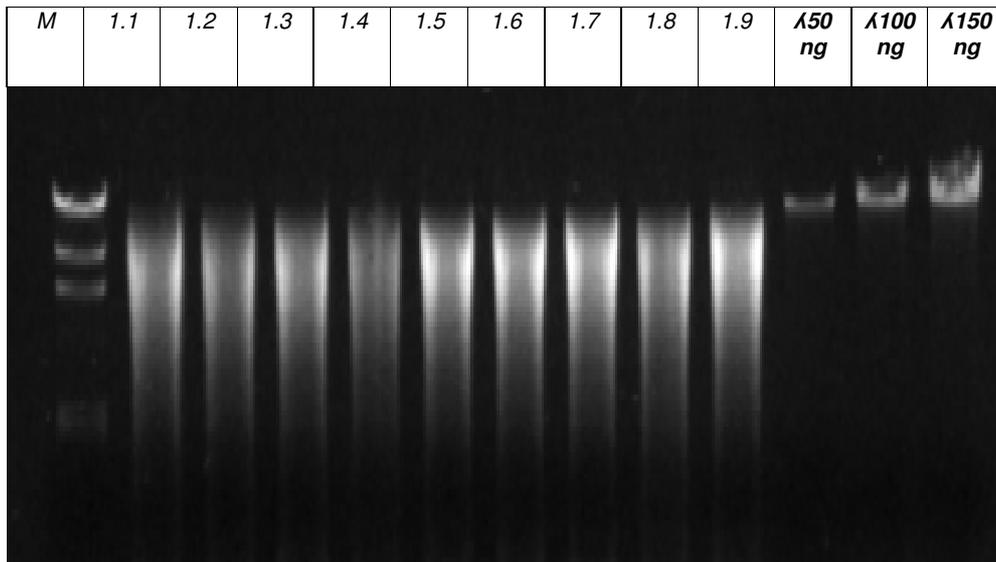


Figura 19: Estrazione dna per i campioni dell'area UCP 2016 (M= λ:hind 3 μcl)

3.6) Analisi statistica

L'analisi statistica dei dati è indispensabile per studiare e capire gli organismi viventi nel loro habitat naturale e per interpretare i risultati delle sperimentazioni. L'enorme variabilità biologica che ci circonda deve essere analizzata con un metodo quantitativo e oggettivo che permetta di giungere a conclusioni e non solo a "impressioni" o "idee"; tali conclusioni devono poi convincerci che un'ipotesi è (o non è) da preferire a un'altra, o aiutarci a stimare una caratteristica osservata e a definire la precisione della stima. Per verificare contemporaneamente se i differenti trattamenti hanno avuto un'influenza significativa sulle variabili studiate è stata applicata l'Analisi delle Componenti Principali (PCA), mentre l'analisi dei dati NGS è stata effettuata mediante analisi della alfa-diversità e beta-diversità:

- 1) L'alfa-biodiversità rappresenta il livello di diversità presente in un campione, ovvero la somma del numero di specie in una regione caratterizzata attraverso la lettura di diverse unità spaziali. Per quantificare le variazioni di alfa-biodiversità è stato utilizzato l'indice di diversità di Chao1 che tiene conto anche dei taxa poco rappresentati (Harper, 1999).
- 2) La beta-diversità considera la differenza di composizione della comunità batterica tra differenti ambienti (Whittaker, 1972). Per stimare le variazioni di beta-diversità in termini di

dissimilarità è stato utilizzato l'approccio di Bray-Curtis (1957) e visualizzate attraverso tecniche di ordinamento come la non-metric multidimensional scaling (NMDS).

Tutti i test statistici ripostati di seguito sono stati eseguiti mediante l'utilizzo del software PAST 3.06 (PAleontological STatistic, Hammer et al., 2001); per ogni riferimento, è consigliato consultare il manuale del software, disponibile al link <http://folk.uio.no/ohammer/past/>.

Principal component analysis (PCA)

La PCA è una tecnica di statistica multivariata, utilizzata per la semplificazione dei dati, con lo scopo di permettere la riduzione di un numero più o meno elevato di variabili (rappresentanti altrettante caratteristiche del fenomeno analizzato) in alcune variabili latenti.

Tramite quest'analisi statistica si possono osservare le correlazioni che i campioni analizzati hanno con determinate variabili e come essi si dispongono in relazione ad esse.

Per la PCA è stata realizzata una matrice, inserita ed analizzata con il programma Past, all'interno della quale sono state considerate le seguenti variabili:

1. Trattamento
2. Respirazione basale
3. Respirazione cumulativa
4. Numero di OTU batteriche
5. Numero di OTU fungine
6. Indice di alfa-diversità (Chao-1) batterica
7. Indice di alfa-diversità (Chao-1) fungina
8. Biomassa microbica
9. Quoziente metabolico (qCO₂)

Di seguito, nella figura 35, è riportata la percentuale della varianza espressa dalle componenti principali. Entrambi i valori sono consistentemente alti, il che sta a significare che le due componenti "spiegano" e rappresentano in modo accurato la varianza all'interno dei campioni.

PC	% variance
1	62,27
2	23,73

Figura 20: Percentuale di varianza delle due componenti principali

Commento [B1]: Modificare con i valori giusti (vedi PCA in fig.41)

NON-metric Multidimensional Scaling (NMDS)

L'analisi non-metric multidimensional scaling (Taguchi and Oono, 2005), è stata eseguita sui dati NGS (OTU) basandoci sulla distanza di Bray-Curtis. L'algoritmo pone i campioni all'interno di un plot bi- o tridimensionale, dove vengono visualizzate le differenze tra i vari campioni.

Se ci vuoi aggiungere qualcosa...

4) Risultati e discussione

In questo capitolo vengono esposti, i risultati ottenuti dai rilievi eseguiti nel 2016.

Le foreste sono sistemi complessi con capacità adattative in continuo cambiamento, rinnovamento e auto-organizzazione; sono inoltre in costante relazione con i sistemi socio-economici, a loro volta caratterizzati da elevata complessità (Parrot e Lange, 2013).

Riassumendo, le analisi effettuate sono servite ad una caratterizzazione di base delle due aree e a sottolinearne le differenze sostanziali sia dal punto di vista strutturale della foresta che della comunità microbica del suolo.

4.1) Risultati dendrometrici

I diradamenti sono l'azione selvicolturale fondamentale del trattamento delle fustaie coetanee.

Di seguito vengono riportate le figure (20 e 21) in cui si evidenzia la struttura del piano delle chiome in funzione alle due tesi di diradamento eseguiti.

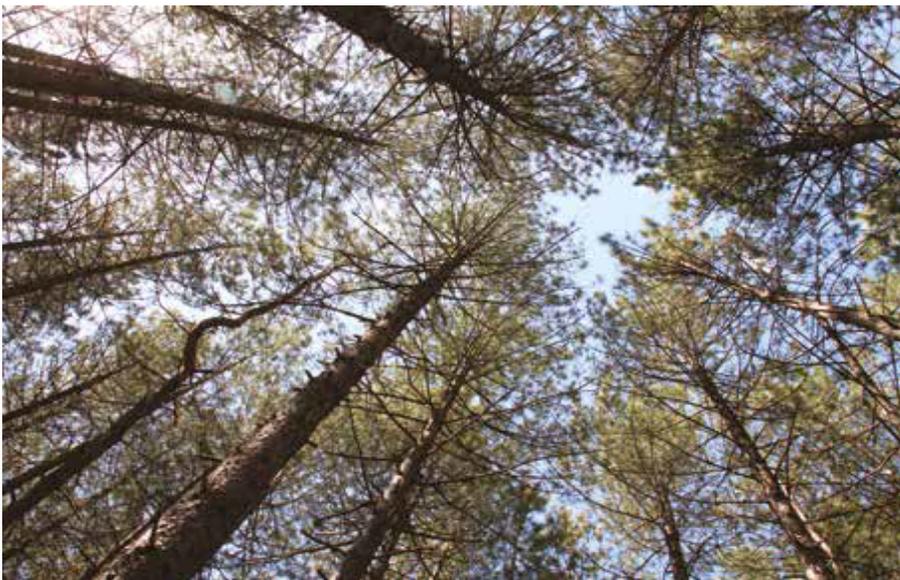


Figura 20: Struttura del piano delle chiome dopo il diradamento dal basso di moderata intensità. La copertura non subisce sensibili mutazioni dopo l'intervento.



Figura 21: Struttura del piano delle chiome dopo il diradamento selettivo. Evidente l'apertura intorno alla candidata.

Di seguito, nelle tabelle sottostanti, sono descritti sinteticamente i principali parametri dendrometrici. Si tratta di una pineta coetanea e monoplana ad assoluta prevalenza di pino laricio, consociato localmente a gruppi di abete bianco (soprattutto alle quote superiori dell'area) più un contributo marginale delle sporadiche latifoglie. Nel complesso, le altre specie contribuiscono per il 13,8% in termini di area basimetrica sul totale. La densità della pineta è eccessiva per l'età del popolamento rispetto al modello alsometrico, che prevederebbe circa 800 piante ad ettaro. Le piante di pino laricio di caratteristiche medie hanno il rapporto ipsodiametrico pari a 65, a testimonianza di un buon grado di stabilità medio del popolamento.

Specie	Pianta n ha ⁻¹	Diametro medio di area basimetrica cm	Altezza media m	Area basimetrica m ² ha ⁻¹	Volume m ³ ha ⁻¹	Rapporto ipsodiametrico HD
Pino nero	889	29,5	19,2	59,1	538,4	65,0
Altro	188	20,5	15,5	9,5	–	–
Totale	1.077	28,7	18,8	68,6	632,6	68,0

Tabella 1 - Principali parametri dendrometrici del popolamento di studio Pratomagno (valori medi per tutti i plots).



Figura 22 - Fustaia di pino nero in buone condizioni di fertilità (Pratomagno). È necessario un intervento di diradamento per regolare l'eccessiva densità.

I diradamenti effettuati secondo le due tesi di trattamento previste (diradamento dal basso e diradamento selettivo) sono sintetizzati secondo i principali parametri dendrometrici relativi al pino laricio.

Nella seguente tabella vengono riportati le percentuali di prelievo in termini di area basimetrica e di volume tra le due tesi di diradamento.

	<i>Prima del diradamento</i>					<i>Dopo del diradamento</i>					<i>Percentuale rilievo</i>		
	<i>N ha⁻¹</i>	<i>G ha⁻¹</i>	<i>V ha⁻¹</i>	<i>dgm</i>	<i>Hm</i>	<i>N ha⁻¹</i>	<i>G ha⁻¹</i>	<i>V ha⁻¹</i>	<i>dgm</i>	<i>Hm</i>	<i>N ha⁻¹</i>	<i>G ha⁻¹</i>	<i>V ha⁻¹</i>
		<i>m²</i>	<i>m³</i>	<i>cm</i>	<i>m</i>		<i>m²</i>	<i>m³</i>	<i>cm</i>	<i>m</i>			
Classico	1.085	72,8	722,3	29,3	19,1	695	56,1	582,9	32,1	19,9	35,9	22,6	19,3
Selettivo	1.056	66,6	586,6	28,6	18,9	781	47,0	412,6	28,6	19,0	30,8	29,4	29,7

Tabella 2 - Caratteristiche dendrometriche dei diradamenti (Pratomagno)

Dalla **tabella 2** si evidenzia in maniera irrilevanti come il diradamento selettivo ha una maggiore efficienza sulla superficie della chioma riducendola del 18%, garantendo una maggiore quantità di luce al suolo, rispetto a quello tradizionale che la riduce del 7%.

Le due modalità di intervento trasformano sensibilmente la struttura selvicolturale della pineta. In particolare il diradamento selettivo, pur asportando un minor numero di piante rispetto a quello dal basso, agisce però anche su piante di grandi dimensioni. Scopo dell'intervento infatti è quello di liberare le candidate dalle loro competitori, per la qual cosa è necessario eliminare piante nel piano codominante e dominante.

Inoltre, le piante candidate sono disposte tra loro ad una distanza di circa 10 metri. Sono tutte piante che dimostrano una particolare vigoria e stabilità. I parametri diametro medio, altezza dendrometrica sono superiori a quelli medi del popolamento. Il rapporto ipsodiametrico è invece sensibilmente inferiore a quello medio del popolamento e ben al di sotto di quello limite per la stabilità meccanica del pino nero.

Nella seguente tabella vengono riportate le percentuali di prelievo dell'area studio UCAVO in termini di area basimetrica e di volume effettuati secondo le due tesi di trattamento previste (diradamento dal basso e diradamento selettivo) sono sintetizzati secondo i principali parametri dendrometrici relativi al pino laricio.

Specie	Pianta n ha ⁻¹	Diametro medio di area basimetrica cm	Altezza media m	Area basimetrica m ² ha ⁻¹	Volume m ³ ha ⁻¹	Rapporto ipsodiametrico HD
Pino nero	959	24,3	18,1	43,6	386,4	76,0
Altro	91	16,7	12,8	1,2	–	–
Totale	1.050	23,6	17,8	44,8	394,1	78,0

Tabella 3 - Principali parametri dendrometrici del popolamento di studio Amiata (valori medi per tutti i plots).

	<i>prima del diradamento</i>					<i>dopo del diradamento</i>					<i>percentuale rilievo</i>		
	N ha ⁻¹	G ha ⁻¹	V ha ⁻¹	dgm	Hm	N ha ⁻¹	G ha ⁻¹	V ha ⁻¹	dgm	Hm	N ha ⁻¹	G ha ⁻¹	V ha ⁻¹
		m ²	m ³	cm	m		m ²	m ³	cm	m			
Classico	971	42,3	367,6	23,7	17,9	675,7	34,0	290,8	25,3	18,3	30,4	19,7	18,7
Selettivo	971	47,8	446,4	24,9	18,2	638,3	32,3	309,2	25,4	18,4	34,3	31,9	30,7
Testimone	935	41,2	354,8	23,9	17,9	935,3	41,2	354,8	23,9	17,9			

Tabella 4 - Caratteristiche dendrometriche dei diradamenti (UCAVO)

Dalle percentuali riportate nelle tabelle precedenti, risulta che, in Amiata sia maggiore il numero delle competitori asportate per singola candidata in termini numerici, e nella tesi diradamento selettivo, il prelievo supera quello effettuato nella tesi diradamento dal basso.

Dai dati riportati nella tabella precedente, si può osservare che dopo l'intervento la struttura dei popolamenti tra i due tipi di trattamento è diversa per tutti i parametri dendrometrici. Il diradamento

classico ha asportato il 13% della copertura delle chiome mentre quello selettivo il 20%. In termini numerici, con il diradamento selettivo, il prelievo supera quello effettuato secondo la modalità di diradamento dal basso.

Le due modalità d'intervento cambiano in maniera marcata la struttura selvicolturale della pineta. I tassi di prelievo in termini di area basimetrica e di volume tra le due modalità di diradamento hanno forte differenze a favore del diradamento selettivo.

4.2) Risultati degli indici microbiologici della qualità dei suoli

Valutare la qualità del suolo attraverso bioindicatori significa quindi andare a valutare gli organismi che nella loro quantità (biomassa) e varietà (biodiversità) garantiscono il funzionamento dell'ecosistema. Essi forniscono informazioni sullo stato di salute dell'ecosistema, ma mette in evidenza anche situazioni di stress pregresse. L'analisi di queste proprietà microbiche, attraverso l'uso di bioindicatori microbici, mettono in luce la struttura e l'adattamento della comunità microbica in una determinata situazione ambientale, ma anche le alterazioni della biodiversità in seguito a perturbazioni esogene.

I parametri che rappresentano, direttamente o indirettamente, la biomassa microbica edafica sono: Carbonio della biomassa microbica, Carbonio della biomassa/TOC, la respirazione del suolo e qCO_2 . L'indicatore ottenuto misurando la respirazione del suolo è una stima quantitativa della CO_2 prodotta dal processo di ossidazione della sostanza organica, ad opera della popolazione microbica. Stimare la produzione di CO_2 equivale a valutare l'attività microbica totale, cioè la loro capacità di decomporre la sostanza organica del suolo (Sparling, 1997).

Ogni scostamento di valori respirometrici sono da imputare allo stato fisiologico in cui si trovano i microrganismi. Fattori antropici e alterazioni ambientali possono inibire l'attività microbica, riducendo la decomposizione della sostanza organica e quindi la produzione di CO_2 . Tali osservazioni permettono di individuare l'attività di respirazione dei microrganismi in suoli a diversa copertura, riportando valori di emissione giornaliera di CO_2 iniziale - al primo giorno - e basale - al ventottesimo- e valori di emissione cumulativa al ventottesimo giorno.

Nelle prime 24 ore dell'analisi la curva presenta valori maggiori rispetto a quelli riscontrabili generalmente nella restante parte della curva; tali valori difatti tendono progressivamente a diminuire nelle analisi successive. Questo alto valore iniziale è dovuto alla ripresa dell'attività microbica del campione di suolo asciugato all'aria, stimolata dall'aggiunta di acqua per la preparazione dei campioni. Tale valore diminuisce all'aumentare del tempo t , fino al

raggiungimento di una condizione di parziale equilibrio. Il tasso di respirazione è una misura della respirazione microbica essenziale ed è comunemente considerata come decomposizione complessiva della sostanza organica (Anderson 1982). Dalla misura del tasso di respirazione è possibile costruire le curve di respirazione basate sia su dati cumulativi che giornalieri, che sono relativi alla decomposizione della sostanza organica del suolo.

Commento [B2]: rivedere

4.2.1) Risultati dell'analisi della respirazione giornaliera

I risultati relativi alla respirazione microbica del suolo sono riportati sia come respirazione giornaliera che cumulativa.

La respirazione basale (C_{bas} , mg C-CO₂ kg⁻¹ suolo d⁻¹) e la respirazione cumulativa (C_{cum} , mg C-CO₂ kg⁻¹ suolo) rappresentano rispettivamente l'emissione oraria di CO₂ in assenza di substrato organico all'ultimo giorno di incubazione e quella totale emessa durante tutto l'arco di incubazione (Isermayer, 1952). I campioni di suolo secco sono riportati alla capacità di campo e incubati al buio a 30°C in contenitori di vetro a chiusura ermetica, insieme a un becker contenente una soluzione di idrossido di sodio. Durante l'incubazione si determina la CO₂ emessa mediante titolazione con acido cloridrico dopo l'aggiunta di cloruro di bario e di un indicatore per titolazione acido-base (fenolftaleina) ad intervalli di tempo prefissati (1, 2, 4, 7, 10, 14, 17, 21 e 28 giorni), da cui si ricava la curva di respirazione potenziale mediante la formula $C_t = C_0(1 - e^{-kt})$, dove t è il tempo di incubazione, C_t è la CO₂ emessa al tempo t e k la costante cinetica della respirazione (Riffaldi et al., 1996). Ad ogni intervallo di tempo fissato il campione di terreno va lasciato aerare per ripristinare l'ossigeno e viene introdotto un nuovo becker di idrossido di sodio. In contemporanea si preparano anche dei bianchi (stesso trattamento senza terreno), per poter determinare con precisione la CO₂ prodotta dai microrganismi presenti nel suolo.

Il dato ottenuto ad ogni titolazione, suddiviso per i giorni di incubazione, fornisce la respirazione giornaliera. Dall'analisi si possono ottenere due dati: la respirazione cumulativa (somma cumulata dei valori giornalieri) e la respirazione basale (la respirazione a fine ciclo, quando va ad assumere valori costanti)

Di seguito sono riportati i grafici relativi alla respirazione giornaliera e cumulativa analizzata nelle due aree di studio.

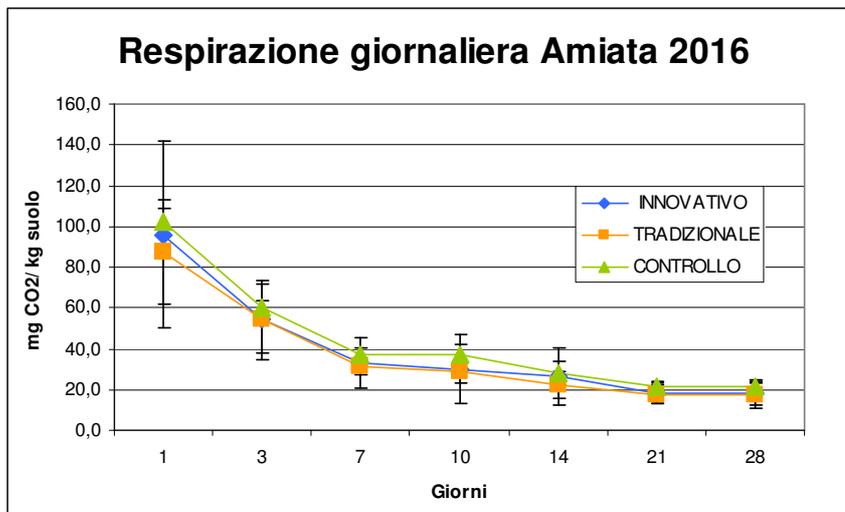


Figura 23: Respirazione giornaliera per trattamento (UCAVO)

Dal confronto di queste curve non compaiono sostanziali differenze tra i tre trattamenti.

Si può esaminare il normale sviluppo della curva della respirazione giornaliera, costituita da un picco iniziale nelle prime ventiquattro ore, fino al raggiungimento della condizione di equilibrio nel periodo 21-28 giorni.

Di seguito è riportato il grafico della respirazione giornaliera ottenuto dall'analisi effettuate nell'anno 2016

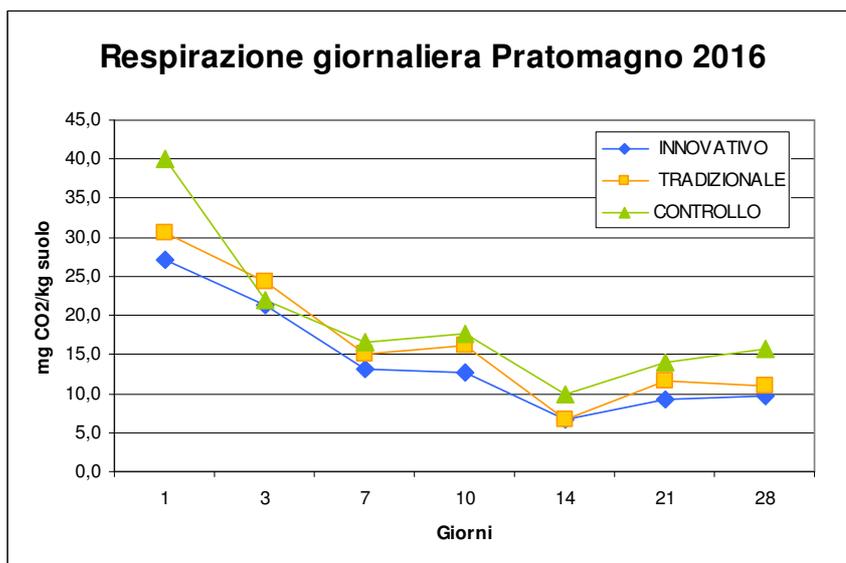


Figura 24 : Respirazione giornaliera per trattamento (UCP)

Dalla figura, rispetto alla precedente, è possibile osservare nel periodo 10-14 giorni la deviazione dal tipico andamento della curva (parziale aumento della respirazione microbica), probabilmente dovuta ad una diversa frazione di sostanza organica da decomporre da parte degli organismi. Tale fenomeno, come già esplicitato nell'introduzione del paragrafo, è dovuto alla minor "appetibilità", e quindi alla maggior difficoltà nel decomporre la sostanza organica. Si nota che la curva giornaliera dei campioni di suolo del plot sottoposto al controllo è maggiore nel periodo iniziale rispetto alle curve giornaliere sei campioni dei plot sottoposti ai vari tipi di trattamento (innovativo e controllo).

Di seguito è riportato il grafico dove vengono confrontate le curve di respirazione giornaliera, ottenute dall'analisi effettuate nel 2015

Dal seguente grafico si nota, come la curva di respirazione giornaliera nel periodo iniziale è maggiore nei campioni di suolo dell'area UCAVO rispetto a quelli dell'area UCP.

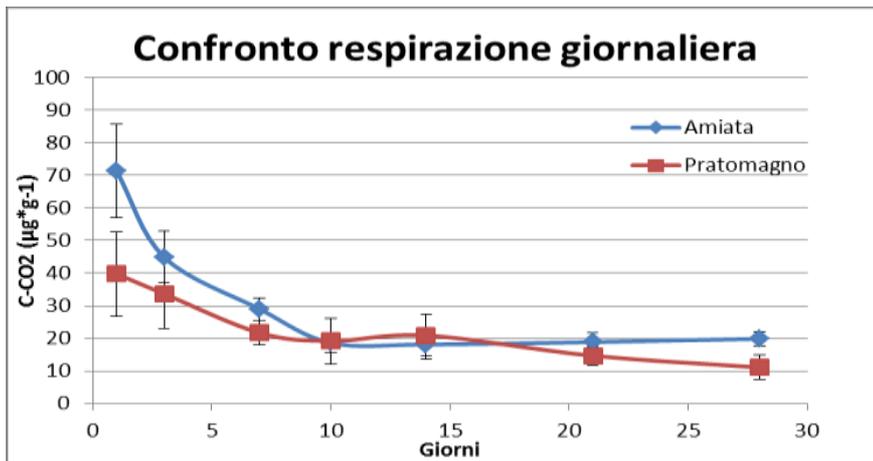


Figura 25: Confronto della respirazione giornaliera espressa in ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) per i suoli dei due differenti complessi (UCAVO e UCP 2015)

4.1.2) Risultati dell'analisi della respirazione cumulativa

La respirazione può essere anche definita come il consumo di O_2 o il rilascio di CO_2 da parte di entità viventi e metabolizzante (J.P.Anderson1982).

Dalle curve di respirazione oltre al calcolo del valore di **respirazione basale (C28)** come media del carbonio respirato da 14 a 28 gg, si è provveduto a stimare la **respirazione cumulativa (Ct)** come valore cumulativo del carbonio mineralizzato durante il periodo di 28 giorni di respirazione.

Entrambi i parametri espressi come $\text{mg C/giorno}\cdot\text{kg}$.

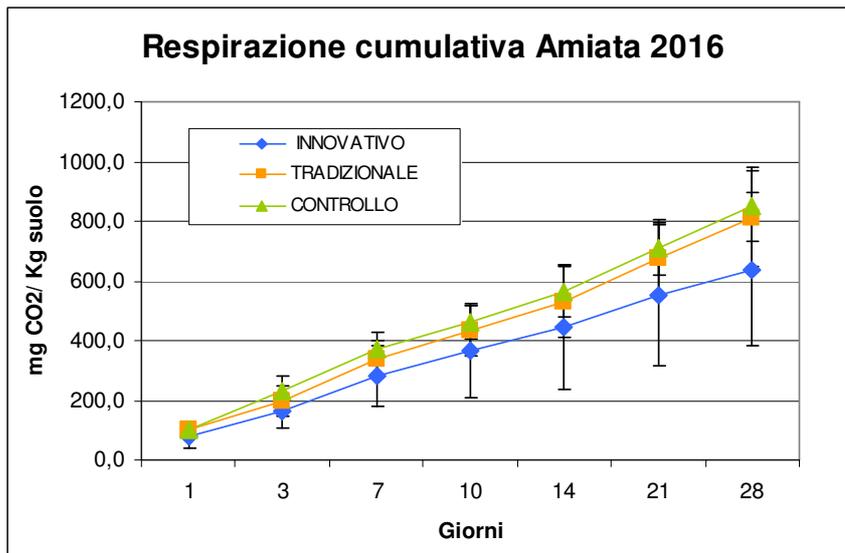


Figura 26: Respirazione cumulativa UCAVO 2016 espressa in ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) per i suoli delle parcelle destinate ai differenti trattamenti (innovativo, tradizionale e controllo)

Dalla seguente grafico si può osservare l'andamento delle curve di respirazione cumulativa dei diversi campioni dell'area oggetto di studio. Si nota che inizialmente le curve hanno lo stesso andamento, a partire dal 10 giorno, la curva di respirazione cumulativa per campioni del plot sottoposto al trattamento innovativo, tende a diminuire.

Di seguito è riportato il grafico ottenuto dall'analisi effettuate nel 2016

Come si può osservare dal seguente grafico, anche in questo caso si può dire che le curve di respirazione cumulativa dell'area UCP nel periodo iniziale hanno lo stesso andamento, a partire dal 7 giorno la curva dei campioni di suolo per il plot sottoposto al controllo inizia ad avere un progressivo innalzamento.

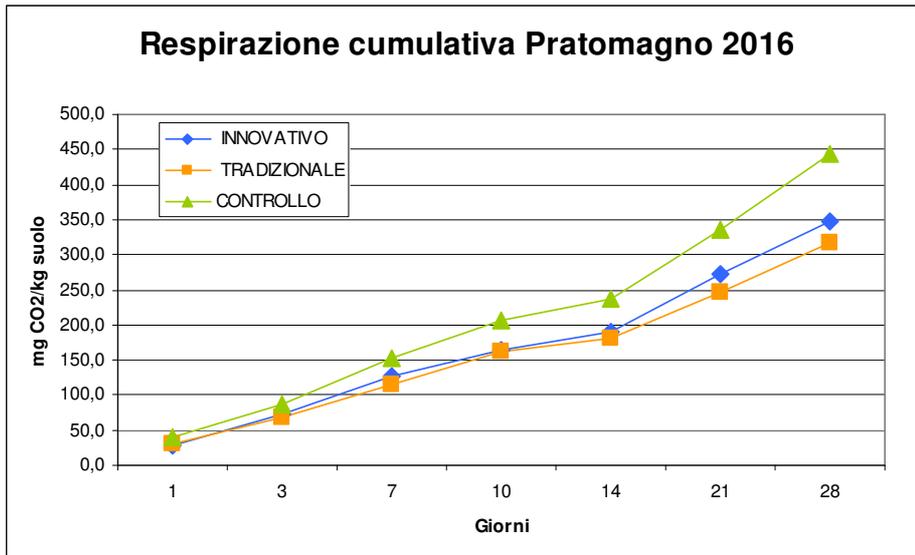


Figura 27: Respirazione cumulativa UCP 2016 espressa in ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) per i suoli delle parcelle destinate ai differenti trattamenti (innovativo, classico e controllo)

Di seguito è riportato il grafico del confronto tra la curve cumulative ottenute dall' analisi effettuate nel 2015

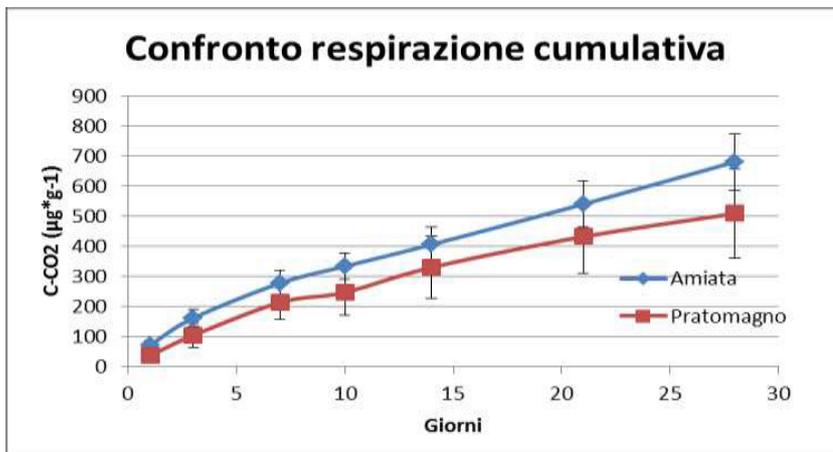


Figura 28: Confronto respirazione cumulativa espressa in ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) per i suoli dei due differenti complessi (UCAVO e UCP 2015)

Per quanto riportato nel grafico si nota come i campioni di suoli prelevati nel complesso OCAVO siano maggiormente attivi nei processi di degradazione della sostanza organica e di conseguenza respirino di più.

Gli istogrammi sottostanti (**figura 29**) riportano i principali valori medi di respirazione basale e di respirazione cumulativa per ogni trattamento del complesso e, inoltre, la media per ogni complesso.

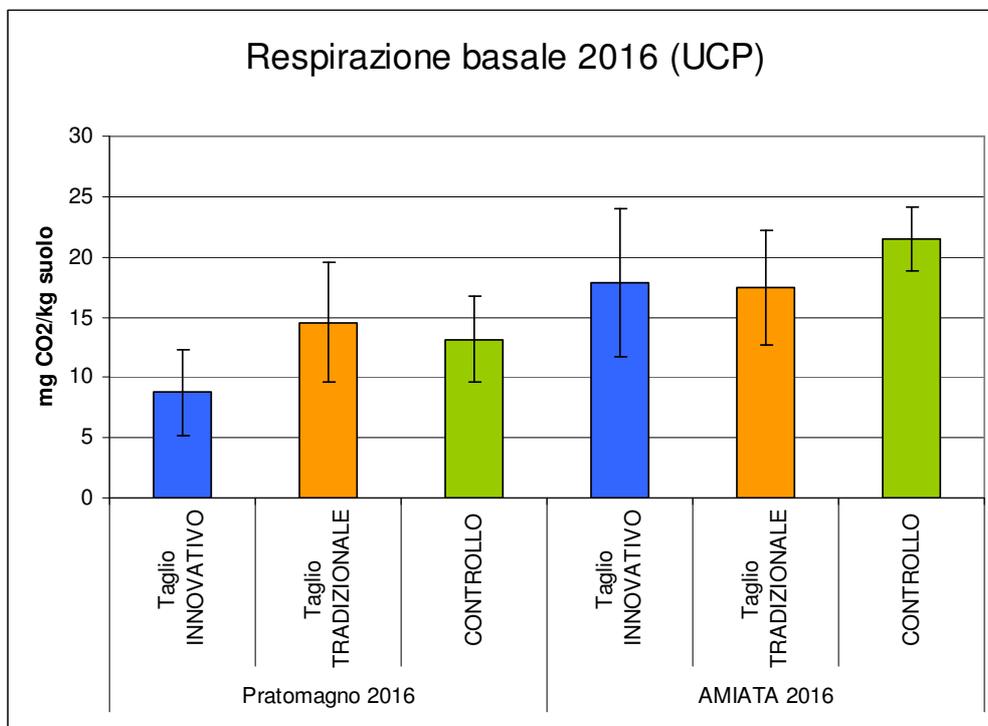


Figura 29: Confronto respirazione basale tra il complesso UCAVO e UCP

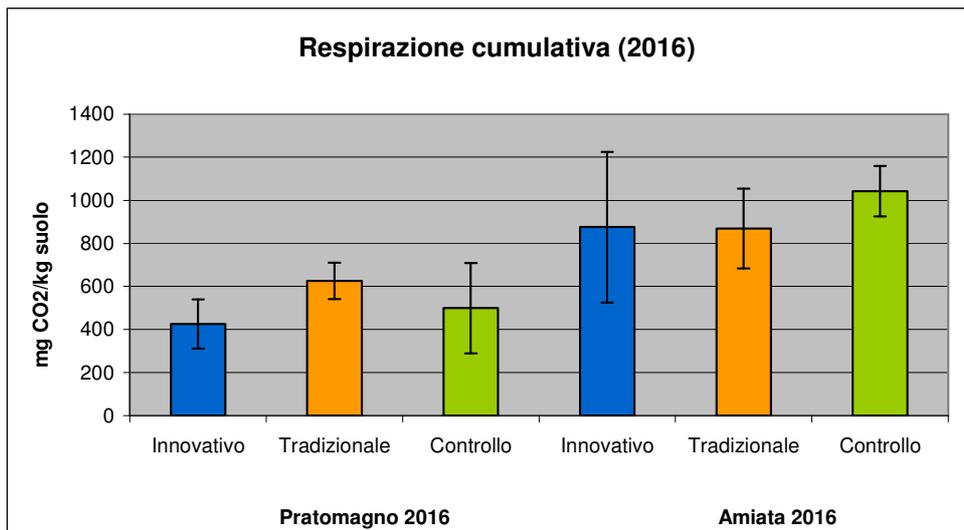


Figura 30: Confronto respirazione cumulativa tra il complesso UCAVO e UCP

Rispetto alle analisi effettuate nell'anno precedente senza alcun tipo di trattamento, si nota anche se non in maniera del tutto marcata un aumento della respirazione cumulativa nel complesso Amiata dopo il trattamento.

Queste differenze probabilmente sono legate a condizioni di elevata eterogeneità nel complesso Pratomagno, inclusa la geomorfologia della stazione, probabilmente uno dei fenomeni principali la quale il suolo non riesce a trattenere i nutrienti.

Nonostante sia comunque necessario discutere questi dati in seguito al confronto con i valori ottenuti dalle analisi delle biomasse dei vari campioni.

Si nota anche in maniera firmata come il trattamento innovativo ha avuto un maggiore effetto nell'Amiata rispetto al complesso Pratomagno.

Le tabelle sottostanti (**tabella 5**) restituiscono i principali valori di respirazione basale e di respirazione cumulativa per ogni trattamento del complesso e, inoltre, la media per ogni complesso.

	<i>Trattamenti</i>	<i>Cbas ($\mu\text{g}^*\text{g}^{-1}$)</i>	<i>Ccum ($\mu\text{g}^*\text{g}^{-1}$)</i>
Pratomagno 2016	Innovativo	8,74	424,84
	Tradizionale	14,56	625,85
	Controllo	13,18	499,46

	<i>Trattamenti</i>	<i>Cbas ($\mu\text{g}^*\text{g}^{-1}$)</i>	<i>Ccum ($\mu\text{g}^*\text{g}^{-1}$)</i>
Amiata 2016	Innovativo	17,8	875,6
	Tradizionale	21,5	868,5
	Controllo	17,5	1042,5

Tabella 5: Valori medi di respirazione basale e di respirazione cumulativa 2016 riportati per i trattamenti di ciascun complesso (Amiata e Pratomagno) ed il valore medio dei complessi stessi

I seguenti valori dimostrano i cambiamenti all'interno del sistema dovuti all'esecuzione dei vari trattamenti effettuati nelle seguenti aree oggetto studio.

Si nota come riportato nei grafici precedenti che i suoli dell'Amiata respirano di più stabilendo quindi un'elevata attività nella degradazione della sostanza organica.

Dalla comparazione con i dati ottenuti dai rilievi effettuati nell'anno 2015 si evidenzia un minimo aumento della respirazione cumulativa nelle consecutivi aree.

Da ciò si può evincere che l'attuazione del trattamento innovativo ha avuto un'incidenza positiva sulle parcelle oggetto di studio.

4.3) Risultati dell'analisi della biomassa microbica

I risultati relativi all'analisi del C della biomassa microbica sono riportati in Figura 31. Come si può osservare, in termini assoluti non si osservano significative differenze tra le due aree di studio. Infatti, nonostante i suoli del complesso dell'Amiata presentino i valori più alti di Cmic (234,6 mg C/kg suolo), tuttavia tali differenze non risultano essere statisticamente significative. Inoltre, i campioni di suolo delle parcelle di controllo risultano avere un minor contenuto di biomassa microbica rispetto alle tesi sottoposte a diradamento (soprattutto in Amiata). Da notare, invece, come gli effetti dovuti alla tipologia di intervento (diradamento) siano estremamente lievi in Amiata e del tutto assenti in Pratomagno.

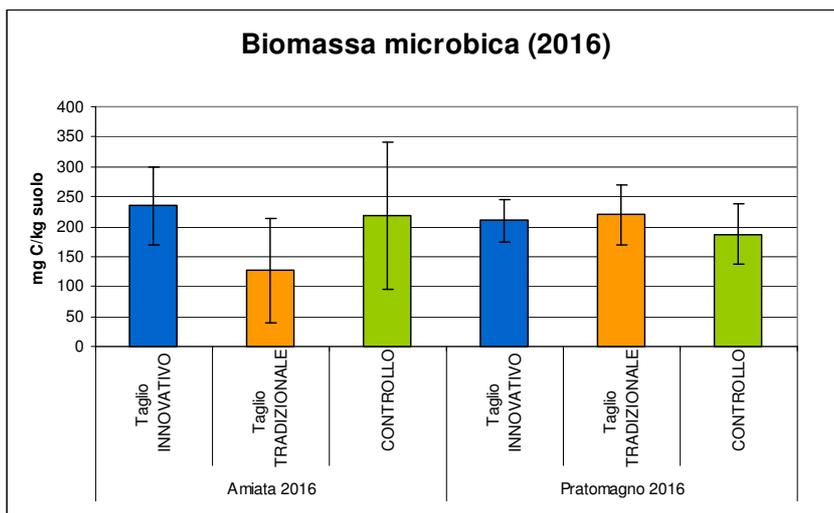


Figura 31: Confronto tra i valori di C della biomassa microbica (Cmic) tra i diversi trattamenti realizzati nei complessi UCAVO e UCP.

I risultati ottenuti indicano che le condizioni pedoclimatiche del complesso dell'Amiata favoriscono sia una maggiore attività microbica che un maggior contenuto di biomassa microbica nei campioni sottoposti a diradamento, rispetto al controllo non trattato. Le condizioni più rigide dal Pratomagno, invece, non consentono di rilevare tali differenze in maniera così netta. Nel complesso dell'Amiata il diradamento classico ha determinato una netta diminuzione della biomassa microbica che potrebbe essere dettata dal maggior apporto di legno morto accumulato sul suolo in seguito al trattamento (effetto pacciamante).

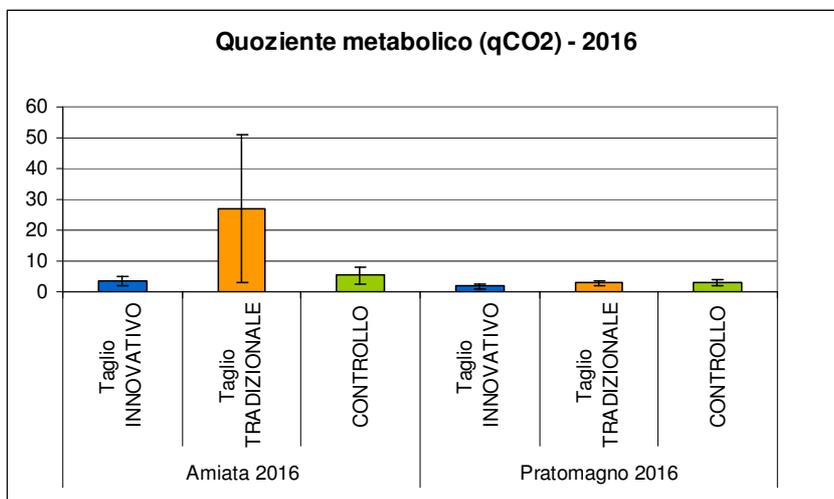


Figura 32: Confronto tra i valori del quoziente metabolico (qCO₂) tra i diversi trattamenti realizzati nei complessi UCAVO e UCP.

La determinazione del quoziente metabolico (qCO_2) consente di valutare il livello di “stress” metabolico a cui sono sottoposte le comunità microbiche del suolo. In particolare, si osserva che i valori più elevati in assoluto si riscontrano nei campioni sottoposto a diradamento tradizionale del complesso Amiata, rispetto a tutti gli altri. Questo, in generale, suggerisce un contributo positivo del diradamento innovativo nei confronti dell’equilibrio ecologico del suolo, soprattutto in Amiata, contribuendo al mantenimento delle funzioni del suolo in termini di resilienza e resistenza. I campioni di suolo con maggiori valori di qCO_2 , invece, indicano un sistema più lontano dall’equilibrio e ecologicamente più fragile dovuto probabilmente alla presenza di residui legnosi e di legno morto accumulati in seguito al trattamento tradizionale.

4.4) Risultati analisi molecolari (NGS)

L’analisi molecolare della comunità microbica del suolo fornisce informazioni sulla biodiversità del suolo e, di conseguenza, sulla sua possibile diversità funzionale. Al fine di analizzare la comunità microbica totale, è necessario utilizzare tecniche molecolari coltura indipendenti, in modo da includere nelle valutazioni anche la comunità microbica che non è coltivabile nelle normali condizioni di laboratorio. A tale proposito, è stato scelto di utilizzare la tecnica del sequenziamento di nuova generazione, (NGS, Next Generation Sequencing), in dettaglio, la tecnologia Illumina MiSeq (<http://www.illumina.com/systems/miseq/technology.html>) (vedi anche Materiali e Metodi).

A tale scopo le tre sottorepliche campionate in ciascuno dei 9 plot di ogni area, sono state unite in un unico pool, il quale è stato accuratamente omogeneizzato. Il numero di pool ottenuti alla fine è stato 18, ovvero 9 per l’area Amiata e 9 per l’area Pratomagno. Da ciascun pool, è stato estratto il DNA totale. L’estrazione del DNA dal suolo è stata eseguita utilizzando il kit “FastDNA™ SPIN Kit for Soil” dell’azienda MP Biomedicals secondo il procedimento riportato nei Materiali e Metodi. Tutti i campioni di DNA estratto sono stati purificati e spediti alla ditta IGA (<http://www.igatechnology.com/>), la quale, con un servizio a pagamento, ha eseguito le reazioni di amplificazione su ciascun campione, sia per l’analisi della comunità batterica (regione V3+V4 del gene codificante per il 16S rRNA), sia per la comunità fungina (amplificazione dello spaziatore ITS, marcatore utilizzato comunemente per i funghi).

Una volta ricevuti i risultati (file.sff) è stato calcolato il numero di letture (reads) di ciascun campione, ovvero la quantità di sequenze relative a batteri e relative a funghi, prodotte dal servizio di NGS per ciascun campione; di seguito sono riportati i dati del 2016 per le comunità batteriche e fungine e messe a confronto con i dati del 2015.

Per quantificare le variazioni di biodiversità delle comunità microbiche individuate mediante analisi NGS, è stato selezionato l'indice di diversità di Chao1 (Harper D.A.T., 1999) che indica il livello di alfa-biodiversità presente in un campione, ovvero la (la somma del numero di specie in una regione caratterizzata attraverso la lettura di diverse unità spaziali).

Di seguito sono riportati gli istogrammi (figure 33 e 34) dove vengono i principali valori medi di OTU (Funghi) e OTU (batteri) per ogni trattamento del complesso e, inoltre, la media per ogni complesso.

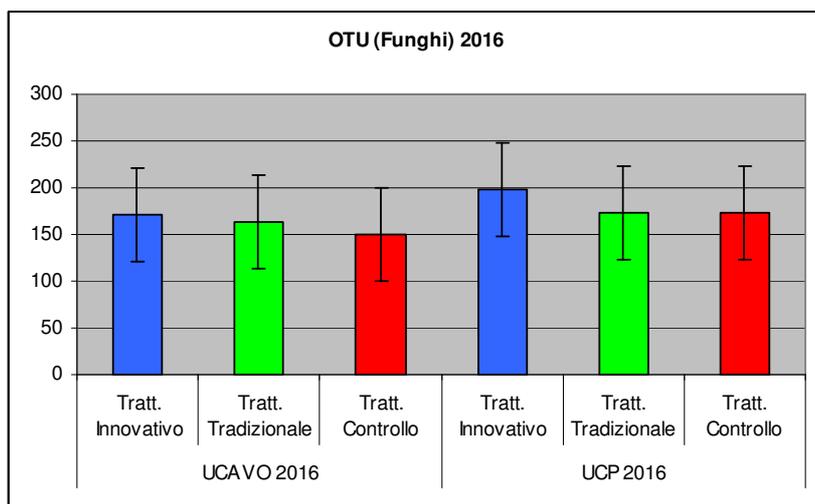


Figura 33: Confronto del numero di OTU (funghi) 2016 , nelle aree UCAVO e UCP

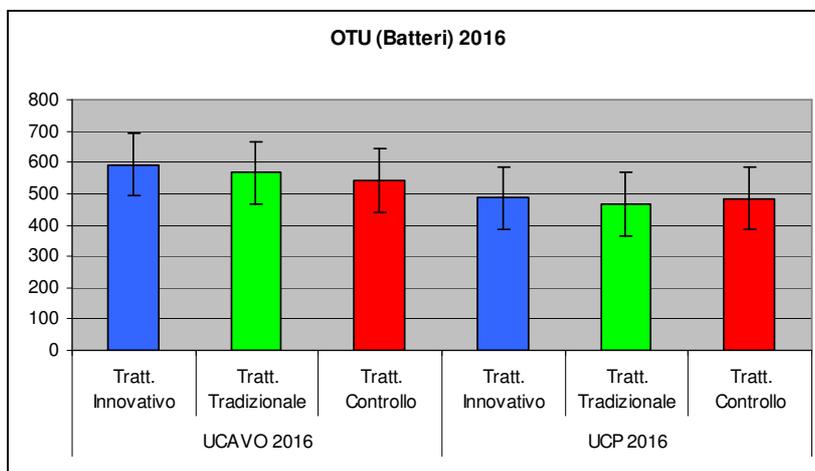


Figura 34: Confronto del numero di OTU (Batteri) 2016 , nelle aree UCAVO e UCP

4.3.1) Analisi delle comunità batteriche

Come si può osservare in figura 35, i phyla batterici più rappresentati in entrambe le aree di studio sono i Proteobacteria, Actinobacteria e Acidobacteria che costituiscono circa il 60% dell'intera comunità batterica. da notare che gli Actinobacteria presentano una rilevanza minore abbondanza relativa nei campioni UCP rispetto a quelli di UCAVO. Al contrario, gli Acidobatteri sono maggiormente presenti in UCP che in UCAVO.

Altre differenze che si riscontrano nel grafico sottostante sono legati a batteri appartenenti ai gruppi Verrucomicrobia e Chloroflexi caratterizzati da una maggiore abbondanza nell'area del Pratomagno (soprattutto nei campioni 2 e 5) rispetto all'Amiata.

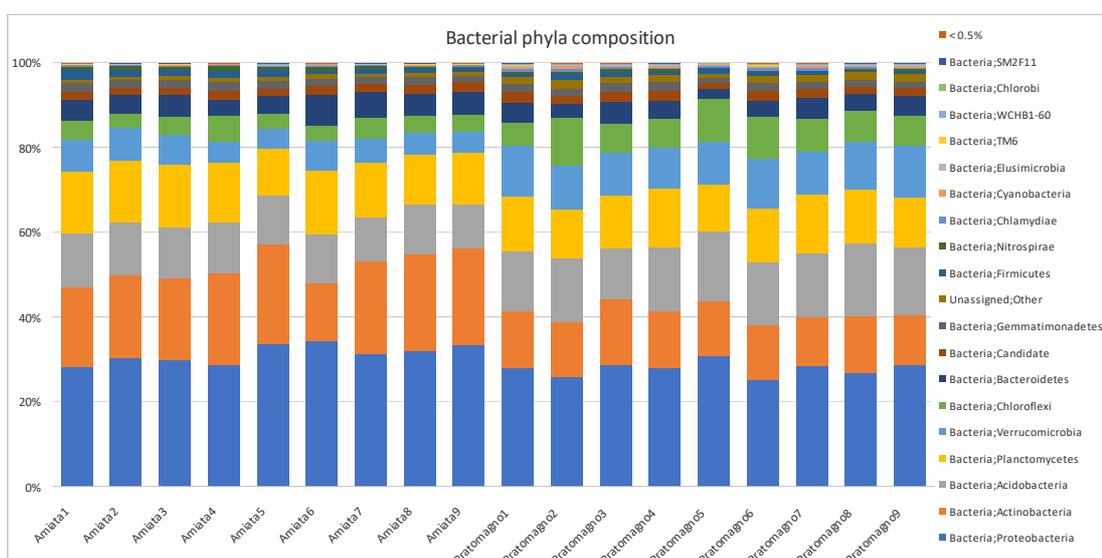


Figura 35: Abbondanze relative dei Phyla batterici ottenuti dalle analisi NGS effettuate nel 2016 sui campioni di suolo di UCAVO (1, 5, 6: innovativo; 3,8,9: tradizionale; 2,4,7: controllo) e UCP (1,2,6: innovativo; 3,7,8: tradizionale; 4,5,9: controllo).

In **figura 36** sono riportate le abbondanze relative dei batteri (phyla) ottenuti dai campioni UCP e UCAVO nel 2015, prima degli interventi selvicolturali. Poiché l'effetto dei trattamenti non era ancora presente, le eventuali differenze riscontrate sono da attribuire esclusivamente alla variabilità naturale delle aree di studio.

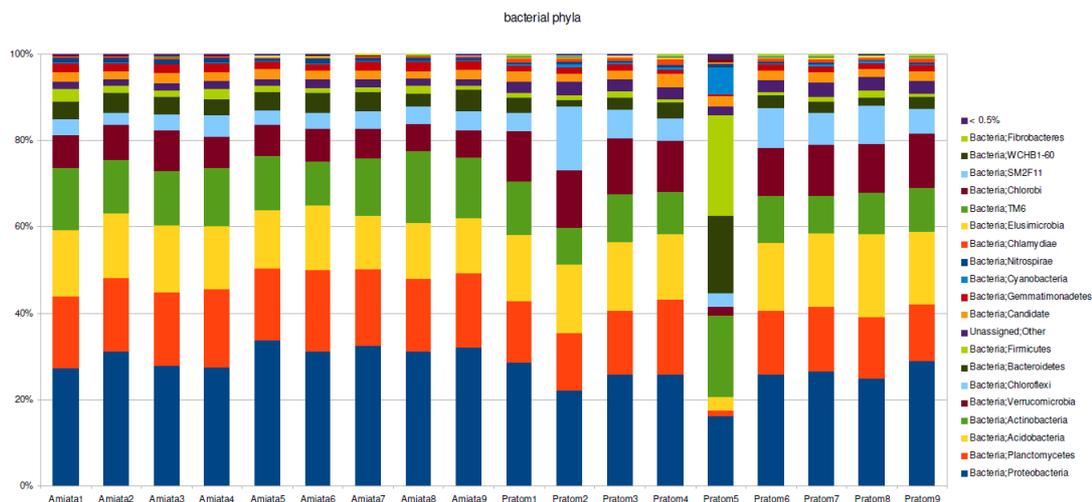


Figura 36: Abbonanze relative dei Phyla batterici ottenuti dalle analisi NGS effettuate nel 2015 sui campioni di suolo di UCAVO (1, 5, 6: innovativo; 3,8,9: tradizionale; 2,4,7: controllo) e UCP (1,2,6: innovativo; 3,7,8: tradizionale; 4,5,9: controllo).

Dal confronto dei grafici delle figure (35 e 36), si nota che i batteri più dominanti appartengono in entrambi i casi al gruppo dei Proteobacteria. Tuttavia, una sostanziale differenza si ha per il gruppo dei Actinobacteria che nel 2015, prima dell'intervento di diradamento, erano meno rappresentati nell'area UCAVO mentre nel 2016 sono stati sostituiti dai Planctomycetes che, dopo il trattamento, sono emersi come uno dei gruppi più rappresentativi con un tasso percentuale di circa del 18-25% dopo quello dei Proteobacteria, e mostrando la medesima percentuale (20-30%) anche dopo il trattamento. Rispetto alle analisi eseguite nell'anno 2015 si evidenzia come i phyla batteri appartenenti al gruppo Chloreflexi hanno subito una piccola diminuzione nei campioni del Pratomagno. Il campione numero 5 di UCP ha dato dei risultati anomali, a causa di problemi tecnici non è stato possibile analizzare il seguente dato.

A livello di α -biodiversità, si rilevano almeno tre componenti: 1) la varietà (o ricchezza specifica), cioè il numero di specie presenti in un popolamento, in un suo sotto-insieme o in un campione; 2) l'abbondanza assoluta delle specie, cioè il numero totale di individui presenti in un popolamento o in un suo sottoinsieme; questa non va confusa con l'abbondanza relativa, cioè il numero di individui con il quale una singola specie è presente nel popolamento; 3) l'equipartizione, o *evenness* (detta anche uniformità o *equitability*), che descrive quanto siano uguali le abbondanze specifiche tra loro, cioè quanto uniformemente gli individui di un popolamento si ripartiscano tra le specie.

Tabella 6: Chao-1 index calcolato mediante l'utilizzo del software PAST-dataset BATTERI

UCAVO	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	230	230	228	222	231	231	231	231	232
UCP	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	218	217	227	219	201	222	220	210	222

L'analisi complessiva della biodiversità della comunità batterica di UCAVO rispetto a UCP (Beta-diversità) è stata effettuata attraverso l'analisi multivariata NMDS, i cui risultati sono riportati in **figura 37**.

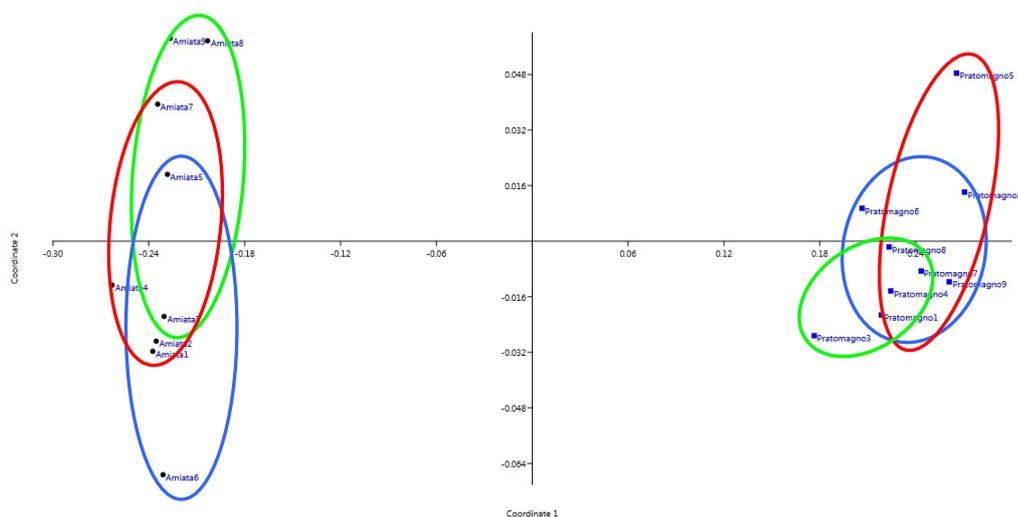


Figura 37 – Analisi NMDS (Non Metric Dimensional Scaling) delle comunità batteriche delle aree UCAVO (1, 5, 6: innovativo-blu; 3,8,9: tradizionale-verde; 2,4,7: controllo-rosso) e UCP (1,2,6: innovativo-blu; 3,7,8: tradizionale-verde; 4,5,9: controllo-rosso) nel 2016.

Dalla disposizione dei vari campioni sui due assi (coordinata 1- e coordinata 2), si può dedurre che nelle due aree oggetto di tesi sono presenti gruppi (phyla) di batteri diversi. Innanzitutto si osservi

come vi sia una netta separazione tra i campioni del Pratomagno (a destra) e quelli dell'Amiata (a sinistra) ciò a conferma che comunque i due complessi sono diversi non solo per gli sviluppi storici che hanno avuto ma anche per altri caratteri, in particolare quello microbiologico.

Dalla **figura 37** si evidenzia come i campioni dell'area UCAVO e UCP siano caratterizzati da una distribuzione opposta lungo l'asse delle coordinate 1. Inoltre, si nota come i campioni di UCAVO presentino una distribuzione meno densa tra di loro, a differenza di quelli del Pratomagno che mostrano una maggiore similarità. Questo potrebbe essere dovuto, sostanzialmente a diverse condizioni di umidità e temperatura che si manifestano nelle seguenti aree oggetto di studio.

Queste differenze probabilmente sono legate a condizioni di elevata eterogeneità nel complesso Pratomagno, compresa la geomorfologia della stazione, probabilmente uno dei fenomeni principali la quale il suolo non riesce a trattenere i nutrienti.

Commento [B3]: Da rivedere

Infatti, come noto dalla letteratura, il numero dei microrganismi presenti nel suolo e le relative biomasse variano enormemente sia all'interno di suoli differenti che in relazione alle specie vegetali e agli altri organismi presenti. Un importante fattore di regolazione della comunità microbica è, per esempio, rappresentato dal contenuto idrico del suolo che a sua volta è determinato sia dal clima che dalla tessitura del suolo e dal contenuto di sostanza organica. L'acqua, con le sostanze minerali, organiche ed i gas in essa contenuti, costituisce un mezzo nutritivo liquido per i microrganismi. La temperatura del suolo agisce sull'attività metabolica della microflora, in quanto le attività microbiche aumentano con l'aumentare della temperatura, sebbene temperature troppo elevate possano diventare limitanti. Per la grande maggioranza dei microrganismi del suolo l'intervallo ottimale di temperatura è compreso tra i 25 ed i 37 °C (Florenzano, 1983). D'altra parte, le basse temperature determinano una riduzione dell'attività dei microrganismi, ma non ne influenzano la sopravvivenza. Gli estremi di temperatura ai quali sono soggetti i microrganismi del suolo dipendono dalla loro posizione lungo il profilo del suolo e dalle condizioni climatiche dell'area considerata.

I campioni 1, 5 e 6 dell'area UCAVO, su cui è stato applicato il trattamento innovativo, sono ampiamente distribuiti lungo l'asse della coordinata 2, e presentano un cluster che si differenzia – seppur di poco – dai campioni provenienti da plot sottoposti a diradamento tradizionale o al controllo. Questo potrebbe indicare un processo di cambiamento della struttura della comunità batterica ancora in corso che si presume possa essere confermato il prossimo anno.

4.3.2) Analisi delle comunità fungine

Per quanto riguarda l'analisi della compagine fungina, i risultati sono riportati in **figura 38**.

Dal grafico si evidenzia in maniera netta come il gruppo più rappresentativo sia costituito dagli Ascomycota presentando un elevatissimo tasso percentuale in entrambe le aree oggetto di studio. I valori maggiori (non significativi) si hanno nei campioni 4,5 e 8 dell'area Amiata, mentre quelli più bassi si osservano (1,2,3). Altre differenze che si notano nel seguente grafico, legati al gruppo degli Ascomycota, sono dovute ad una maggiore abbondanza dell'area di studio UCAVO rispetto all'area UCP.

Inoltre dalle (**figura 38**) si può evidenziare come il gruppo dei Basidiomycota ha una maggiore percentuale (15-20%) nei campioni rilevati nell'area UCAVO rispetto a quella rilevati nell'area UCP (9-10%).

Inoltre, come si nota dal grafico, un altro gruppo con un'elevata importanza e con una percentuale di abbondanza relativa pari a meno di un terzo rispetto a quello degli Ascomycota, è quello dei Basidiomycota. Questi si evidenziano maggiormente nei campioni dell'area del Pratomagno, mentre per quanto riguarda l'area dell'Amiata si limita ad avere un aumento nei campioni 1 e 2.

Altri gruppi, tra cui quello dei Rozzellomycota, sono presenti con tassi percentuali poco considerevoli (es.0,1-0,2 %) nei campioni del Pratomagno, e quasi assenti in quelli dell'Amiata.

Rispetto alla situazione del 2015 (**Figura 39**), si può osservare dal grafico come i gruppi più rappresentativi in entrambe le aree oggetto di ricerca fossero sempre gli Ascomycota e Basidiomycota, mostrando variazioni poco considerevoli nei vari campioni di UCAVO e UCP.

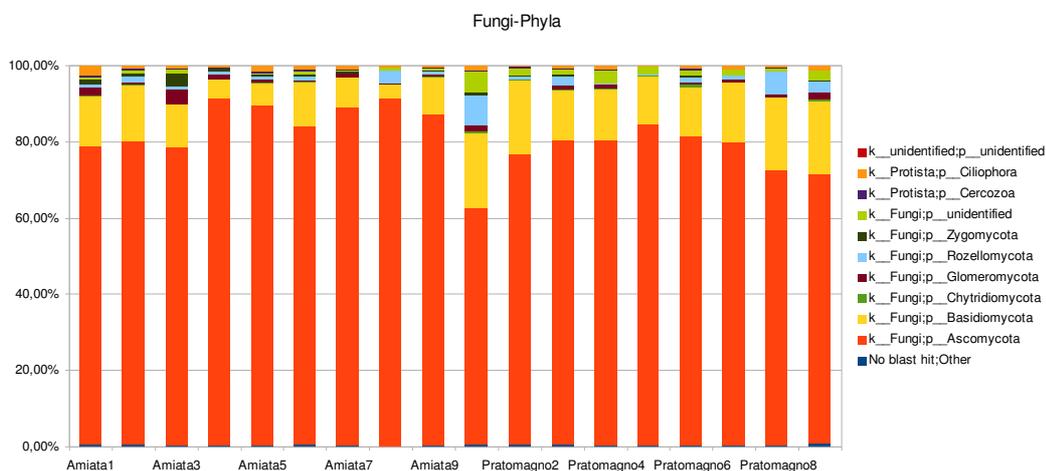


Figura 38 : Abbondanze relative dei Phyla fungini dalle analisi NGS dei campioni 2016 di suolo di UCAVO (1, 5, 6: innovativo; 3,8,9: tradizionale; 2,4,7: controllo) e UCP (1,2,6: innovativo; 3,7,8: tradizionale; 4,5,9: controllo).

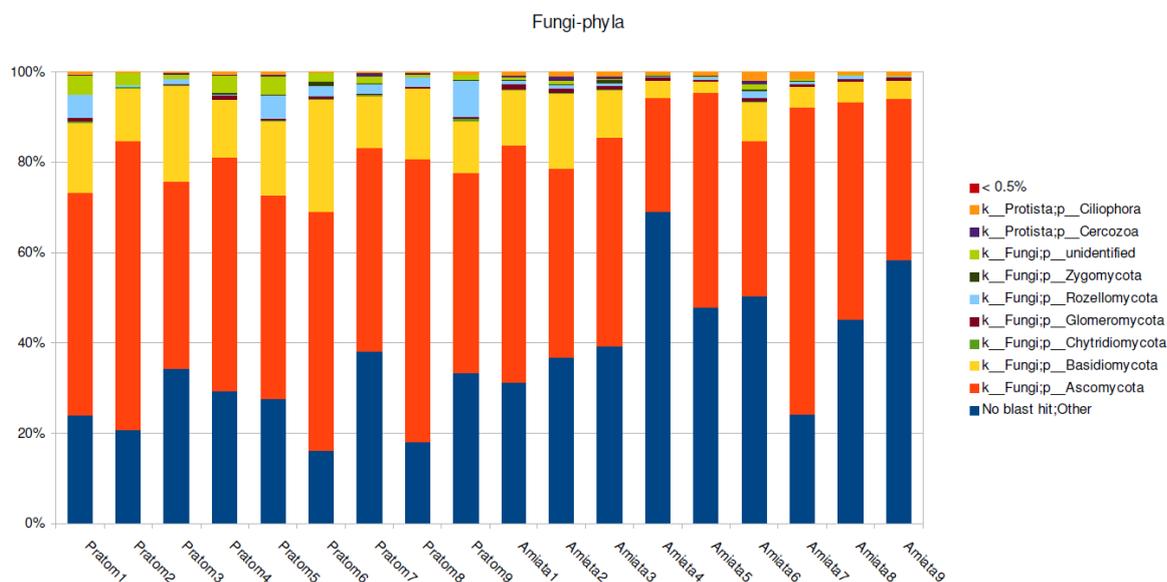


Figura 39: Abbondanze relative dei Phyla fungini dalle analisi NGS dei campioni 2015 di suolo di UCAVO (1, 5, 6: innovativo; 3,8,9: tradizionale; 2,4,7: controllo) e UCP (1,2,6: innovativo; 3,7,8: tradizionale; 4,5,9: controllo).

Dal confronto dei due grafici il gruppo Basidiomycota, sulla base dall'analisi effettuate prima dell'intervento nell'anno 2015 rispetto a quelle eseguite dopo l'intervento nell'anno 2016, ha una maggiore percentuale nei campioni 3,6 del Pratomagno rispetto agli altri.

Invece, si nota bene dai due grafici come il gruppo Ascomycota dopo l'intervento selvicolturale abbia aumentato il suo tasso percentuale in entrambe le aree, costituendo il gruppo più rappresentativo appartenente al regno dei Funghi.

In **tabella 6** sono illustrati gli indici di diversità di Chao-1 calcolati per tutti i campioni analizzati, per quanto riguarda la diversità FUNGINA. In rosso sono indicati i valori minori, in blu quelli maggiori.

Tabella 7: Chao-1 index calcolato mediante l'utilizzo del software PAST-dataset FUNGHI

UCAVO	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	86	84	85	84	87	79	88	87	82
UCP	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	95	88	91	93	92	91	91	94	89

Per quanto riguarda l'analisi dei campioni dell'Amiata, la diversità batterica è maggiore nel campione Amiata 9, e minore in Amiata 4; la diversità fungina è maggiore in Amiata 5 e minore in Amiata 6. L'elevata diversità batterica del campione Amiata 9 può essere associata al fatto che questo campione presenta il più elevato numero di reads batteriche (**Tabella 7**). Lo stesso può essere detto per il campione Amiata 5, il quale presenta allo stesso tempo sia il maggior numero di reads relative ai funghi e la maggior diversità fungina. Nei campioni del Pratomagno invece, il maggior livello di biodiversità batterica è dato dal campione Pratomagno 3, il minore nel campione Pratomagno 5. Per i funghi invece, il campione con minor biodiversità è il Pratomagno 2, mentre Pratomagno 1 ha maggiore biodiversità.

L'analisi complessiva della biodiversità della comunità fungina di UCAVO rispetto a UCP (Beta-diversità) è stata effettuata attraverso l'analisi multivariata NMDS, i cui risultati sono riportati in figura 40.

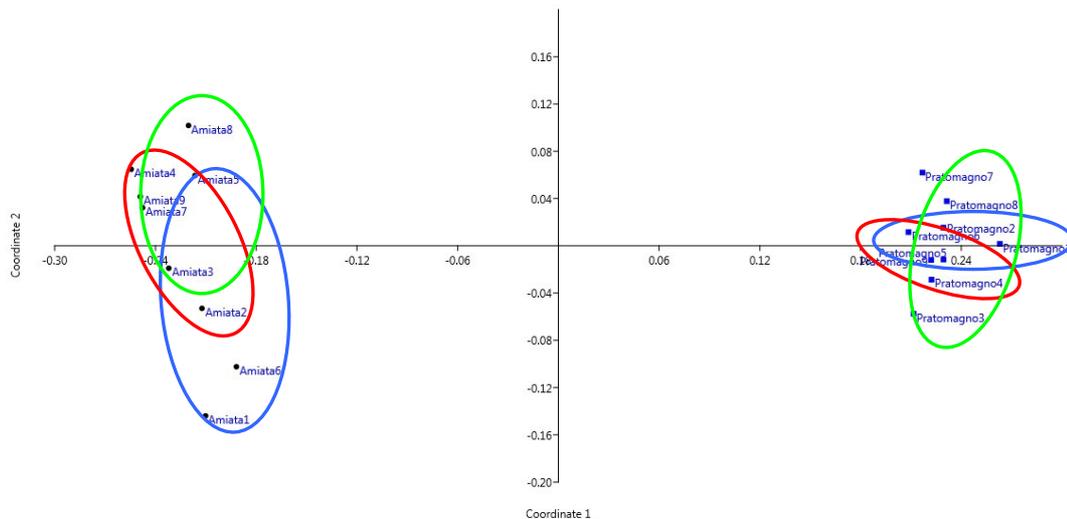


Figura 40 – Analisi NMDS (Non Metric Dimensional Scaling) delle comunità fungine delle aree UCAVO (1, 5, 6: innovativo- blu; 3,8,9: tradizionale- verde; 2,4,7: controllo-rosso) e UCP (1,2,6: innovativo-blu; 3,7,8: tradizionale- verde; 4,5,9: controllo- rosso) nel 2016.

Dalla precedente figura si evidenzia in maniera marcata la netta differenza di disposizione dei vari cluster di campioni lungo l’asse della coordinata 1. In particolare, si nota come i campioni nel complesso Amiata siano ampiamente distribuiti lungo l’asse delle coordinate 2, rispetto a quelli del Pratomagno che sono più raggruppati, denotando una maggiore similarità. Questa netta differenza come citato precedentemente per la Figura 39 , potrebbe essere dovuta sostanzialmente alle condizioni ambientali diverse delle due aree.

Anche in questo caso possiamo dire che i campioni di suolo dell’area UCAVO sono caratterizzati da una maggiore ricchezza di biodiversità (fungina in questo caso), rispetto a campioni di UCP.

Da questa immagine si può dedurre che l’area UCAVO rispetto a l’area UCP presenta delle condizioni ambientali favorevoli per alcuni microrganismi di fondamentale importanza per lo svolgimento delle proprie funzioni biologiche.

Analisi delle componenti principali (PCA)

L'insieme dei dati ottenuta è stata sottoposta ad analisi multivariata mediante la PCA (Principal Component Analysis), prendendo in considerazione l'insieme dei dati della respirazione microbica (basale e cumulativa), numero di OTU batteriche, numero di OTU fungine, indice di alfa-diversità (Chao-1) batterica, Indice di alfa-diversità (Chao-1) fungina, Biomassa microbica e Quoziente metabolico (qCO_2)

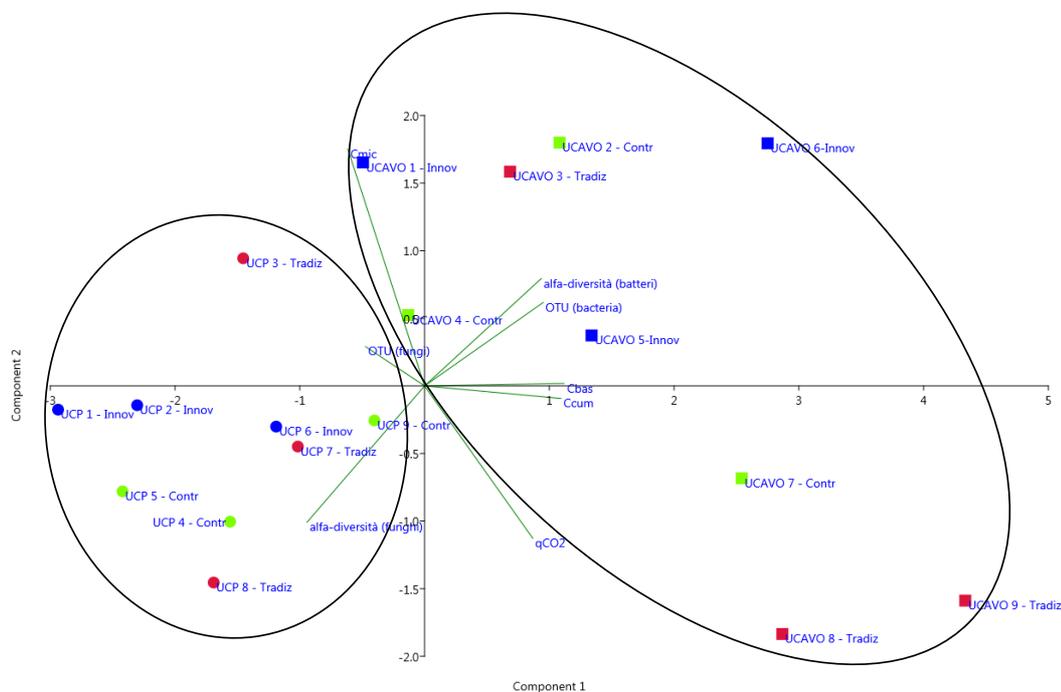


Figura 41: Analisi delle Componenti Principali (PCA) (Varianza spiegata: Componente 1=54,8%, Componente 2=17,3%)

In primo luogo dalla figura 41 dell'analisi delle componenti principali si mette in evidenza una marcata separazione dei campioni UCAVO (a destra) e quelli del UCP (a sinistra) rispetto alla componente principale 1 (CP1), provando come i due complessi manifestano caratteristiche differenti.

Come si può osservare viene confermato tutto ciò che è stato citato nei paragrafi precedenti, ovvero che l'area di studio UCAVO presenta condizioni ambientali e morfologiche favorevoli allo sviluppo e allo svolgimento delle attività biologiche da parte dei microorganismi, rispetto all'area UCP. Tuttavia, in ciascuna area, i valori di tali attività non permettono di distinguere i vari campioni in funzione del trattamento.

Dalla figura 41 si nota anche che l'alfa-diversità batterica è ben rappresentata nei campioni di suolo dell'area UCAVO, caratterizzati da una maggiore abbondanza di specie batteriche rispetto a UCP. D'altra parte, la diversità fungina è maggiore nei campioni UCP, non tanto come numero di OTU, quanto in termini di alfa-diversità.

La maggiore presenza della diversità fungina nei campioni dell'area UCP, è probabilmente legata ad una maggiore acidità che caratterizza il suolo di quest'area e a un maggiore grado di umidità.

Dalla letteratura, è noto, come il tipo di suolo rappresenta un altro importante fattore determinante la diversità microbica, infatti, sulla base della diversa tessitura, del pH, della capacità di scambio cationico e il contenuto di sostanza organica, può influenzare la struttura della comunità microbica direttamente (fornendo un habitat specifico che seleziona determinati microrganismi) o indirettamente (regolando il funzionamento delle radici e l'essudazione). Il pH del suolo influisce sulla possibilità di azione degli esoenzimi che i funghi riversano nell'ambiente per demolire le sostanze organiche, e perciò, preferiscono ambienti acidi per questo sono molto diffusi nei terreni boscosi e nelle brughiere. Inoltre, la comunità fungina, oltre all'acidità del suolo prediligono elevati gradi di umidità, quindi la diffusione e la crescita sono favorite in ambienti con elevata umidità. Questa spiega la maggiore abbondanza in termini di specie della comunità fungine rilevate nell'area UCP.

Sulla componente principale 2 (CP2), ovvero quella che rappresenta maggiormente le differenze tra i vari campioni, le variabili che incidono in maniera preponderante sono i valori di biomassa microbica e quoziente metabolico (C_{mic} e qCO_2). In particolare i valori maggiori di qCO_2 sono associati ai campioni delle parcelle 7, 8 e 9 di UCAVO, che corrispondono ad una zona espascolativa e seminativa. In questo caso gli effetti di cambiamento d'uso del suolo sembrano prevalere sugli effetti dei trattamenti selvicolturali, almeno a livello di attività biologica del suolo.

5) Conclusioni

Questo lavoro ha inteso addentrarsi nello studio dei parametri biologici che possono essere utilizzati per definire le caratteristiche e la qualità di suoli provenienti da ecosistemi forestali, e come, queste vengono condizionate da fattori ambientali, e selvicolturali. L'attenzione si è focalizzata sull'aspetto microbiologico del suolo, utilizzando tecniche molecolari Next Generation Sequencing (NGS), analisi di respirazione del suolo (basale e cumulativa) e misura del C della biomassa microbica nel terreno per lo studio del microbiota, e applicate allo studio degli ecosistemi.

È noto che le condizioni pedoclimatiche influenzino in maniera significativa la biodiversità genetica ma soprattutto quella funzionale del suolo. È infatti stato osservato come l'attività microbica decresca sia con le basse temperature che con la carenza di acqua. Un diradamento selettivo comporta un maggior afflusso di luce e pioggia al suolo, incrementando così il livello generale di biodiversità e attività biologica.

Le analisi preliminari effettuate in questa tesi hanno fornito informazioni fondamentali sullo stato dei due sistemi ad un anno dal diradamento, permettendone il confronto su molteplici scale con la situazione ante-trattamento (2015). Tutti i fattori che sono stati analizzati concorrono allo sviluppo del suolo e soprassuolo. Con i risultati ottenuti è stato possibile effettuare delle prime ipotesi sul potenziale sviluppo dei due complessi UCAVO ed UCP, e confrontarli con i dati ottenuti all'anno 2015.

I campioni di suolo nelle due aree studiate hanno mostrato una minima variazione dei parametri biologici misurati rispetto all'anno 2015. I parametri riconosciuti quali indici della struttura e dell'attività delle comunità microbiche del suolo hanno evidenziato, mediante PCA, una chiara separazione delle due aree oggetto di studio attribuibile verosimilmente a fattori climatici e pedologici. Inoltre da tali analisi si è evidenziato come il complesso UCAVO sia caratterizzato da una maggiore biodiversità microbica in termini di suolo e soprassuolo, anche grazie a condizioni climatiche più miti, che garantiscono condizioni più ottimali per lo sviluppo e lo svolgimento delle proprie funzioni.

Questa differenza riscontrata dal confronto dei dati ottenuti nell'anno 2015 e quelli ottenuti nel 2016, potrebbe essere dovuta anche all'esecuzione dell'intervento selvicolturale, che come citato dalla letteratura, e da una minore copertura delle chiome della pineta che comporterà un aumento di luce (e quindi temperatura) e acqua a livello del suolo. Di conseguenza, la biodiversità microbica dovrebbe trarne un generale beneficio, aumentando sia in termini assoluti che di attività metabolica.

Dopo un anno dal diradamento le differenze sono ancora lievi. In certe aree si rilevano ancora gli effetti dei differenti usi del suolo del passato piuttosto che differenze dovute agli interventi. Tuttavia, sia i dati di attività biologica che di biodiversità sembrano evidenziare piccole differenze (statisticamente non significative) tra diversi trattamenti. Questo potrebbe indicare un processo di cambiamento della struttura ancora in corso che si presume possa essere confermato il prossimo anno.

6) Ringraziamenti

7) Bibliografia

Alef e Nannipieri, 1995). Methods in applied soil microbiology and biochemistry.

Alexander M 1977. Introduction to Soil Microbiology. 2nd ed. John Wiley and Sons, New York, NY.

Amorini E. et al.,(1986) - Studio auxometrico in un ceduo invecchiato e in una fustaia da polloni di faggio, sull'Appennino toscano: Primo contributo. Ann. Ist. Sper. Selv. Arezzo, XIV (1983): 283-328.

Anderson J.P.E. (1982), Soil respiration. In: Page, A.L. (ed.) methods of soil analysis, Part2. Chemical and microbiological properties. Vol, 9, 2nd edition. ASA_SSSA. Madison,WI, pp.831.871.

Anderson, Domsch (1990). Application of eco-physiological quotients (qCO_2 and qD) on microbial biomasses from soils of different cropping histories Soil Biology & Biochemistry, 22, pp. 251–255.

Anderson, Domsch (1993). The metabolic quotient for CO_2 (qCO_2) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soilsv Soil Biology & Biochemistry, 25 (1993), pp. 393–395

Bardgett RD (2002) Causes and consequences of biological diversity in soil. Zoology 105:367–374.

Bernetti G., 1995 – Selvicoltura speciale. UTET, Torino:1-415.

Bertini. 2001. Population structure and breeding period of *Pachycheles monilifer* (Dana) (Anomura, Porcellanidae) inhabiting sabellariid sand reefs from the littoral coast of Sao Paulo State, Brazil.*Revista Bras. Zool.* 18 (1):197–203.

Bernini et al., 1984. Conoscere il suolo. Introduzione alla pedologia. ETAS Libri s.p.a, pp. 106

Bloem, J., et al. 2006 (Eds.), Microbiological Methods for Assessing Soil Quality. CABI, Wallingford, UK.

Borneman et al., 1996. Molecular Microbial Diversity of an Agricultural Soil in Wisconsin. Appl. Environ. Microbiol. 62:1935-1943

Brim et al., (1999). Amplified rDNA restriction analysis and further genotypic characterisation of metal-resistant soil bacteria and related facultative hydrogenotrophs. *Systematic and Applied Microbiology* Volume 22, Issue 2, 1999, Pages 258-268.

Boscaleri F., et al.,(2004) – Valutazione dell'attitudine alla rinaturalizzazione dei rimboschimenti. *EM-Linea Ecologica*, 1: 13-18.

Bunning and Jiménez 2003. Indicators and Assessment of Soil Biodiversity/Soil Ecosystem Functioning for Farmers and Governments

Buol et al., 1989; Expression of andic and spodic properties in tephra-influenced soils of northern Idaho, USA

Bonet et al. (2010). Metal - Free Catalytic Boration at the β - Position of α , β - Unsaturated Compounds: A Challenging Asymmetric Induction. *Angewandte Chemie International Edition*, 49(30), 5130-5134.

Campbell, et al. (2008). Identification of somatically acquired rearrangements in cancer using genome-wide massively parallel paired-end sequencing *Nat. Genet.*, 40 , pp. 722–729

Ciabatti G., et al., (2009) - I rimboschimenti in Toscana e la loro gestione. Regione Toscana. ARSIA. 167 p.

Ciancio O. (1998). Gestione forestale e sviluppo sostenibile. In “Secondo Congresso Nazionale di Selvicoltura Per il miglioramento e la conservazione dei boschi italiani” Consulta Nazionale per le Foreste ed il Legno – Direzione Generale per le Risorse Forestali, Montane ed Idriche –Accademia Italiana di Scienze Forestali. Venezia, 24-27 giugno 1998: 131-187.

Ciancio, O. e Nocentini S. (1994). Problems and perspectives of forest management. Problemi e prospettive della gestione forestale. *L'ITALIA FORESTALE E MONTANA*, vol. 49, pp. 550-566, ISSN:0021-2776.

Ciancio O. e Nocentini S. (1994). Gurnaund's control method and silviculture on natural basis: a forest management and silvicultural question. Il metodo del controllo del controllo e la selvicoltura su basi naturali: un problema culturale e di gestione forestale. *L'ITALIA FORESTALE E MONTANA*, vol. 49, pp. 336-356, ISSN:0021-2776

Coineau Y., 1974. Introduction a l'etude des microarthropodes du sol et de ses annexes. Doin ed.

Cooperrider, A. Y., Day, S., & Jacoby, C. (1999). The bioreserve strategy for conserving biodiversity. *Practical approaches to the conservation of biological diversity*, 35-53.

- Dommergues, 1960.** La notion de coefficient de minéralisation du carbone dans les sols. Journal article: Agron. trop. 1960 Vol.15 pp.54-60.
- Dohm et al., (2008).** SHARCGS, a fast and highly accurate short-read assembly algorithm for de novo genomic sequencing.
- Duarte CM, et al., 1998.** The CO₂ balance of unproductive aquatic ecosystems. Science 281:234–6
- Ellingsøe, P., and K. Johnsen. 2003.** Influence of soil sample sizes on the assessment of bacterial community structure. Soil Biol. Biochem. 34:1701-1707.
- Fanning DS and Fanning MCB (1989).** Soil morphology, genesis, and classification. New York: John Wiley & Sons.
- Florenzano G. (1983).** Fondamenti di microbiologia del terreno, REDA, Roma
- Giller et al., 1995).** K.E. Future benefits from biological nitrogen fixation: an ecological approach to agriculture. Plant Soil, 174 (1995), pp. 255-277.
- Hagvar S., 1982 -** Collembola in Norwegian coniferous forest soils. 1. Relations to plant communities and soil fertility, Pedobiologia, 24, 255-296.
- Hale, J. A., Frazer, T. K., Tomasko, D. A., & Hall, M. O. (2004).** Changes in the distribution of seagrass species along Florida's Central Gulf Coast: Iverson and Bittaker revisited. Estuaries and Coasts, 27(1), 36-43.
- Hansen, J.E., 2000.** The Sun's role in long-term climate change. Space Sci. Rev., **94**, 349-356doi:10.1023/A:1026748129347
- Harper, D.A.T. (ed.). 1999.** Numerical Palaeobiology. John Wiley & Sons.
- Head et al., (1998).** Microbial evolution, diversity and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms Microb. Ecol., 35 (1998), pp. 1–21
- Holben et al., (1988).** DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community -Appl. Environ. Microbiol.54, 703–711.
- Hopkin et al., (1991)** A dispersion and differential centrifugation technique for representatively sampling microorganisms from soil-Soil. Biol. Biochem.23, 217–225.
- Isermeyer H (1952).** Eine einfache Methode zur Bestimmung der Bodenatmung und der Carbonate im Boden. Z Pflanzenernaehr Bodenkd 56:26–38.

Lavelle P et al., 1995. Priming effects of macroorganisms on microflora: a key process of soil function? In *Beyond the Biomass*. Eds. K Ritz, J Dighton and K Giller, p 6. Wiley-Sayce, UK.

Lynch et al., 2004. Microbial diversity in soil: Ecological theories, the contribution of molecular techniques and the impact of transgenic plants and transgenic microorganisms *Biology and Fertilizes Soils*, 40 (2004), pp. 363-385.

Korbel, et al. (2007). Paired-end mapping reveals extensive structural variation in the human genome *Science*, 318 (2007), pp. 420–426.

Kowalchu et al., 2000. Composition of communities of ammonium-oxidising bacteria in wet, slightly acid grassland soils using 16S rDNA-analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31: 207–215

Kuznestova N.A., 2002 - Classification of collembola communities in the east-european Taiga, *Pedobiologia* 46, 373-384.

H. Insam et al., (2000). Medium-term effects of a single application of mustard residues on soil microbiota and C content of vertisols *Biol. Fertil. Soils*, 31, pp. 108–113.

Miller et al., (1998). Climate response to mineral dust aerosol, *J. Clim.*,

Nannipieri, P. & Badalucco, L. 2003. Biological processes. In: *Processes in the Soil–Plant System: Modelling Concepts and Applications* (eds D.K.Bembi & R.Nieder). The Haworth Press, Binghamton, NY, in press.

Nocentini (1995). Gli "impianti pilota" nella sperimentazione forestale. *L'ITALIA FORESTALE E MONTANA*, vol. 50, pp. 38-43, ISSN:0021-2776

O'Donnell et al., (1999). Measurement of symptoms, lung hyperinflation and endurance during exercise in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 158:1557-1565.

O'Donnell, Goerres (1999). 16S rDNA methods in soil microbiology *Current Opinion in Biotechnology*, 10 (1999), pp. 225–229

Oliveira et al., (1999). Glucose induces an acute increase of superoxide dismutase activity in incubated rat pancreatic islets. *Am J Physiol* 276:C507–C510

Øvreås and Torsvik, 1998. Microbial Diversity and Community Structure in Two Different Agricultural Soil Communities. *Microbial Ecology* November 1998, Volume 36, [Issue 3](#), pp 303-315.

Pace et al., (1986). The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences
Adv. Microbial Ecol., 9 (1986), pp. 1–55.

Parrot L., Lange H., 2013 – An introduction to complexity science. In: Messier C., Puettmann
K.J., Coates K.D. (a cura di), “Managing forests as complex adaptive systems”. Routledge, Oxon

Pavari A. (1961). I rimboschimenti nella catena appenninica. Atti del Congresso Nazionale sui
rimboschimenti e sulla ricostruzione dei boschi degradati. Accademia Italia di Scienze Forestali,
Firenze.

Pietramellara G, et al., (2000) Effect of molecular characteristics of DNA on its adsorption and
binding on homoionic montmorillonite and kaolinite. Biol Fertil Soils 33:402–409.

Pietramellara G, et al., (2002). Soil as a biological system. Ann Microbiol 52:119–131

Piussi 1986, Diradamenti e stabilità dei soprassuoli. Monti e Boschi Vol. 4: 9-13

Riffaldi et al., (1996). Carbon mineralization kinetics as influenced by soil properties. Biology and
Fertility of Soils

June 1996, Volume 22, Issue 4, pp 293–298

Schmidt A, et al. (2002). Changes in Soil Microbial Community Structure and Function in an
Alpine Dry Meadow Following Spring Snow Melt. Mol Microbiol 45(5):1433-41.

Skole D.L., Chomentowski W.H., Salas W.A. and Nobre A.D.1994. Physical and human
dimensions of deforestation in Amazonia. BioScience 44: 314–322.

Spehn EM, Joshi J, Schmid B, Alphei J, Korner C (2000). Plant diversity effects on soil
heterotrophic activity in experimental grassland ecosystems. Plant Soil 224:217–230.

Swift et al., (1979). Decomposition in Terrestrial Ecosystems. *Blackwell, Oxford*

Taguchi, Y.-H., Oono, Y. 2005. Relational patterns of gene expression via non-metric
multidimensional scaling analysis. Bioinformatics 21:730-40.

Torsvik V, Goksøyr J, Daae FL (1990) High diversity in DNA of soil bacteria. Appl Environ
Microbiol 56:782 – 787.

Trevors JT (1992) Extraction of DNA from soil Microbial Releases.1: 3–9.

Ugolini FC and Spaltenstein H (1992). Pedosphere. In: Butcher SS, Charlson RJ, Orians GH and
Wolfe GV (Eds) Global Biogeochemical Cycles (pp 123–153). Academic Press, San Diego

Van Elsas J.D. (1997). Extraction of ribosomal RNA and genomic DNA from soil for studying the diversity of the indigenous bacterial community *J. Microbiol. Methods* 32, 21–29.

Vance et al., (1987). An extraction method for measuring soil microbial biomass carbon *Soil Biology and Biochemistry*, 19 (1987), pp. 703–707.

Wall et al.,(1999). Interactions underground: soil biodiversity, mutualism and ecosystem processes. *BioScience*, 49 (2) (1999), pp. 109–119

Wardle, 2002. *Communities and Ecosystems: Linking the Aboveground and Belowground Components* (MPB-34)

Whittaker, R.H. (1972). Evolution and measurement of diversity. *Taxon*, 21, 213–251.

Widden, 1986. Competition between *Trichoderma* species: Effects of temperature and litter type.

Zak, D. R., Holmes, W. E., White, D. C., Peacock, A. D., & Tilman, D. (2003). Plant diversity, soil microbial communities, and ecosystem function: are there any links?. *Ecology*, 84(8), 2042-2050.