



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 e tecnologie forestali e ambientali

Materia della tesi: Funzionalità del suolo e stress ambientali

**Monitoraggio della biodiversità microbica dei
suoli di due pinete di *Pinus nigra Arn.* in seguito a
diradamento innovativo nell'Appennino centrale**

Relatore

Chiar.mo Prof. Giacomo Pietramellara

Correlatore

Dott. Stefano Mocali

Candidato

Fabrizio Butti

Sommario

1) Introduzione.....	8
1.1) Introduzione generale	8
1.2) Inquadramento storico delle pinete di pino nero.....	9
1.3) Stato attuale delle pinete di pino nero	10
1.4) L'evoluzione e la tendenza dei soprassuoli: possibile rinaturalizzazione	12
1.5) L'importanza della componente microbiologica	13
1.6) Attività microbica e diversità funzionale.....	15
2) Materiali e metodi.....	17
2.1) Descrizione delle aree di studio	17
2.2) Descrizione particellare	20
2.2.1) Amiata	20
2.2.2) Pratomagno	23
2.3) Tipologie pedologiche	25
2.3.1) Amiata	26
2.3.2) Pratomagno	27
2.4) Schema di campionamento	28
2.5) Rilievi a carattere forestale	29
2.6) Il campionamento del suolo	30
2.7) Determinazione della respirazione del terreno.....	31
2.8) Misura del C della biomassa microbica nel terreno	32
2.9) Analisi molecolare della comunità batterica.....	33
2.10) Il funzionamento della tecnica DGGE.....	35

3) Risultati e discussione	38
3.1) Risultati analisi molecolare	39
3.1.1) Amiata	39
3.1.2) Pratomagno	42
3.2) Discussione analisi molecolare	45
3.3) Risultati degli indici microbiologici della qualità dei suoli	46
3.3.1) Risultati dell'analisi della respirazione giornaliera	47
3.3.2) Risultati dell'analisi della respirazione cumulativa	49
3.3.3) Discussioni dei risultati sulle analisi delle respirazioni	51
3.3.4) Risultati della biomassa microbica nel terreno	53
3.3.5) Quoziente metabolico (qCO ₂)	55
3.4) Risultati dendrometrici	57
3.5) Analisi statistica	59
3.5.1) <i>Principal component analysis</i> (PCA)	59
3.5.2) Analisi della varianza (ANOVA)	64
4) Conclusioni	71
5) Bibliografia	72
6) Ringraziamenti	77

Abstract

Gli impianti artificiali di *Pinus nigra* sono stati spesso utilizzati per la ricolonizzazione in zone soggette in passato ad un utilizzo intensivo. I diradamenti necessari al regolare sviluppo del soprassuolo, a causa della scarsa retribuzione degli assortimenti retraibili, sono stati disattesi compromettendone perciò la funzionalità.

In risposta alle attuali tematiche in ambito di tutela della biodiversità, nella presente tesi è stato valutato l'effetto di un diradamento innovativo sulla biodiversità nel suolo ed sul miglioramento della struttura del bosco. Tale diradamento consiste in un diradamento selettivo con la scelta di piante candidate e la rimozione delle dirette competitori. Le stesse misure sono state effettuate anche all'interno di aree di controllo non trattate ed aree sottoposte ad un diradamento classico dal basso di moderata intensità.

Come attività di monitoraggio sono stati presi in considerazione molteplici indicatori di qualità del suolo: la respirazione e la biomassa microbica del suolo, in aggiunta all'analisi molecolare mediante Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) per stabilire la diversità e l'attività della componente batterica; inoltre sono state rilevate variazioni di misure dendrometriche come diametro ed altezza medie del soprassuolo, in seguito all'applicazione del trattamento.

La presente tesi rappresenta uno studio del momento zero, ovvero antecedente all'attuazione dei differenti trattamenti, in modo tale da poter stabilire le differenze tra le varie aree campionate ed effettuare una caratterizzazione dei suoli e dei soprassuoli. Il monitoraggio degli sviluppi futuri verrà effettuato nell'ambito del progetto SelPiBioLife (LIFE13 BIO/IT/000282), del quale la presente tesi è parte integrante.

Dai primi risultati ottenuti è stato possibile determinare sostanziali differenze tra le zone prese in esame, Amiata e Pratomagno, anche a causa di differenti caratteri climatologici e stagionali. Sulla base di tali risultati è stato possibile definire le condizioni naturali ante-trattamento e, al contempo, di effettuare delle ipotesi sui futuri risultati e di come le risposte delle due zone possano essere differenti in virtù di quanto ottenuto dal presente studio.

I valori di biomassa microbica sono risultati essere simili tra le due aree, a differenza della respirazione microbica che invece ha mostrato valori superiori nei suoli dell'Amiata rispetto al Pratomagno che presenta anche una maggiore eterogeneità. Pertanto, i suoli del Pratomagno sono risultati essere meno sottoposti a stress (quoziente metabolico minore). L'analisi molecolare (DGGE) ha invece evidenziato una minore diversità batterica nel Pratomagno rispetto all'Amiata.

L'entità dei diradamenti è stata differente, anche in funzione della struttura iniziale dei popolamenti. Per tali ragioni si suppone che la risposta ai diradamenti potrebbe essere differente nei due complessi, anche in termini di successione ecologica.

Abstract:

The planting of *Pinus nigra* were often used for the re-colonization of areas exposed, in the past, to exploitation. The thinning needed to regulate the development of the stand were missed, because of the poor remuneration of assortments retractable, compromising the functionality of the systems.

In response to current issues for biodiversity protection, in this thesis we analyzed how an innovative thinning can promote the development of soil biodiversity and improve forest structure; this thinning corresponds to a selective treatment, acting by the selection of more suitable plants and removing the competitors.

Several indicators for soil quality have taken in account in this work: soil microbial respiration and biomass, the molecular analysis with Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) technique to determine bacterial diversity; we have also monitored the variation of dendrometric measures after the treatment was accomplished, e.g. the quadratic mean (QM) diameter and average height.

The same measurements were also realized in untreated control areas and other areas subjected to a normal thinning from the bottom of moderate intensity.

This thesis is a study of the “moment zero” before the implementation of the different treatments, so as to determine the differences between the various sampled areas and to make a characterization of soils and tree stands.

The monitoring of future developments will be carried out in the project SelPiBioLife (LIFE13 BIO/IT/000282), of which this thesis is an integral part.

The first results highlighted significant differences between the examined areas, Amiata and Pratomagno, partly due to differences in both climatic and geographic features. With these results it was possible to make some hypothesis concerning the development and changes of the stands and how the responses of the two areas can be different on the basis of what has been analyzed in this study.

Microbial biomasses results to be similar between the two areas, differently from microbial respiration that was higher in Amiata than Pratomagno; this area showed also an high heterogeneity of respiration values. Therefore, Pratomagno's areas appeared to be less biologically stressed (less microbial metabolic quotient values) but with a lower bacterial diversity than in Amiata. The thinning's intensity was different between the two areas also related to starting structure of the

stands. For this reason we suppose that the response to thinning may not be the same in the two areas, also in terms of ecological succession.

1) Introduzione

1.1) Introduzione generale

Lo studio e gli obiettivi della presente tesi si inseriscono all'interno del progetto SelPiBioLife (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. Tali soprassuoli, verranno monitorati per una durata di 5 anni, in seguito ad un trattamento innovativo, per studiarne gli effetti sull'intero ecosistema.

Tale progetto, e in parte la presente tesi, analizza nella sua totalità e multifunzionalità l'ecosistema bosco, focalizzandosi non soltanto sull'aumento della produzione legnosa (che rimane comunque un aspetto rilevante) ma specialmente sull'incremento generale di biodiversità del suolo all'interno del popolamento.

Nel dettaglio, in questa tesi verrà analizzata sia la componente microbica del suolo che la componente arborea per quanto riguarda la variazione di area basimetrica, diametro medio ed altezza media prima e dopo l'applicazione dei trattamenti.

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

Negli ultimi tempi, infatti, è diventata di fondamentale importanza l'attenzione con cui vengono studiati tutti i componenti del sistema bosco, con interesse particolare rivolto alla biodiversità, sia essa di elementi vegetali, animali o di microrganismi.

A livello mondiale queste tematiche sono diventate focali ed attuali in seguito anche alla Convenzione sulla Diversità Biologica (CBD) svoltasi a Rio de Janeiro nel 1992 e alla Strategia EU 2020 sulla Biodiversità, oltre ovviamente all'impegno e agli studi scientifici in materia, che hanno reso la tematica sempre più diffusa.

Va inoltre considerato che è ormai ampiamente studiata e confermata la inter-relazione che vi è all'interno del "sistema bosco", ovverosia la stretta relazione tra i cambiamenti del soprassuolo e il sistema suolo, (radiazione solare e regolazione del regime idrico)(Prescott e Grayston, 2013).

1.2) Inquadramento storico delle pinete di pino nero

In Italia l'impiego degli impianti artificiali di pino nero è perdurato negli anni grazie soprattutto alle capacità di attecchimento di questa specie utilizzata in rimboschimenti, alla sua eliofilia (Gellini e Grossoni, 1996) oltre alle sue spiccate doti frugali tipiche di specie pioniera (Bussotti, 2002).

L'affermazione di questa specie per gli impianti artificiali è perciò dovuta soprattutto alla sua capacità pioniera di ricolonizzazione, essendo anche in grado di accrescersi velocemente specialmente nelle fasi giovanili.

I rimboschimenti, realizzati con la specie *Pinus nigra* sp. (generalmente la subspecie *Nigra* o la subspecie *Laricio*), hanno interessato aree che, nel passato, erano state intensamente sfruttate a causa dell'agricoltura montana, del pascolo e dalla castanicoltura, ed in seguito abbandonate; in generale comunque tale specie è stata utilizzata nelle zone montane deteriorate in seguito all'eccessivo utilizzo (Amorini, 1983).

Inoltre tale specie è stata ugualmente utilizzata nelle zone in cui il fenomeno erosivo del suolo rappresentava un impedimento importante per il mancato sviluppo dello strato arboreo (Piermattei et al., 2012).

Proprio per questi presupposti storici in Italia la specie *Pinus Nigra* si trova per la maggior parte in popolamenti puri coetanei (con un'età media di circa 50 anni). Tali foreste coprono un'area di 236.465 ettari (circa il 23% del totale di boschi di conifere) e in particolare in Toscana circa 20.500 ettari (INFC, 2005).

La creazione di questi soprassuoli di origine artificiale rappresentava negli anni passati una chiara intenzione dei gestori di costituire un soprassuolo in grado di migliorare la stabilità e la fertilità del terreno, impiegando tale specie dove altre avevano fallito o delle quali era sconsigliato l'impiego.

I rimboschimenti di pino nero sono sempre stati considerati soprassuoli a carattere transitorio, ovvero susseguiti, in modo più o meno artificiale, dalla sostituzione con sistemi maggiormente in equilibrio con l'ambiente, impiegando specie autoctone o comunque tipiche ed adattate al paesaggio circostante.

Tradizionalmente i rimboschimenti di pino nero venivano costituiti con densità molto elevata ed erano previsti sfolli in giovane età e successivi interventi di diradamento a cadenza circa decennale. Malgrado queste disposizioni, si sono inseriti molti fattori socio-economici (spopolamento delle

montagne e scarsa retribuzione degli assortimenti ottenibili) ad allungare i tempi intercorsi tra due diradamenti. I primi interventi previsti per tali soprassuoli erano da effettuarsi non oltre il 15esimo anno dalla messa a dimora, ma sono stati frequentemente disattesi o ritardati fino ad un'età media di circa 30 anni, portando inoltre ad una dilatazione dei tempi intercorsi tra due interventi (Cantiani, 2012).

Tali ritardi hanno portato i soprassuoli ad un progressivo deterioramento, dovuto ad un'eccessiva densità, e ad una notevole riduzione del potenziale sviluppo, non solo degli individui arborei, ma anche della rinnovazione e delle piante erbacee presenti nello strato erbaceo-arbustivo

Al termine del turno, circa 90-100 anni, il soprassuolo doveva essere sottoposto a taglio raso e successivamente, se le condizioni ecologiche lo permettevano, sostituito da specie autoctone, in caso contrario con reimpianto della specie *Pinus* prescelta (Pavari, 1961). Attualmente, per molteplici motivazioni, principalmente di tipo economico ed ecologico, si preferisce favorire la rinnovazione delle specie che riescono ad affermarsi sotto la copertura (Mercurio, 2010; Cantiani e Plutino, 2009).

1.3) Stato attuale delle pinete di pino nero

La situazione di molte pinete di pino nero, ad oggi, risulta essere alterata principalmente poiché gli interventi realizzati sono stati spesso tardivi e cauti, anche a causa dell'incertezza dei risultati; inoltre hanno operato su popolamenti eccessivamente densi e con struttura delle chiome disequilibrata.

In aggiunta, essendo gli interventi previsti dal Regolamento Forestale della Toscana (asportazione individui non superiore al 40%) diradamenti dal basso di intensità moderata, si è modificato principalmente il piano sottoposto, non andando ad incidere eccessivamente sul piano dominante. Per tale ragione l'effetto di stimolo della crescita delle chiome non risulta essere così rimarcabile (De Meo, 2015).

In ambito di diradamenti in impianti di *Pinus nigra sp.*, uno studio è stato realizzato da Cantiani e Piovosi (2009), i quali hanno proposto dei diradamenti di maggiore intensità (rimozione del 47% degli individui), osservando come, nonostante le compromesse condizioni di partenza del soprassuolo, il diradamento dal basso abbia portato a dei marcati effetti incrementali sulla crescita

diametrica. In tal modo hanno dimostrando come tale specie risulti essere molto duttile e reattiva agli interventi; di seguito si riporta una parte del riassunto dell'articolo:

“In un popolamento di circa 30 anni di buona fertilità si dimostra come il diradamento “forte” (prelievo di poco meno della metà delle piante, pari a circa il 35% di area basimetrica) provochi una reazione positiva in termini di stabilità e soprattutto un forte stimolo allo sviluppo dell'apparato fogliare.”

Per quanto ne concerne si è ampiamente dibattuto sui benefici che i diradamenti possano apportare alla componente arborea delle pinete, ma prefiggendosi l'obiettivo di analizzare l'intero sistema (in particolare il suolo) e come esso sia influenzato dai diradamenti, è necessario analizzare i molteplici effetti dei diradamenti trascendendo dall'esclusiva valutazione degli incrementi degli individui arborei.

In teoria il senso dei diradamenti, infatti, può essere quello di aumentare l'efficienza funzionale del popolamento, predisponendolo alla futura evoluzione (Mercurio, 2003) e perciò avendo una visione che va oltre l'analisi economica attuale.

Lo studio di Piovanelli et al. (2004), in una situazione analoga (popolamenti di pino nero), ha dimostrato come i diradamenti abbiano un impatto positivo sulle caratteristiche chimiche e microbiologiche del suolo, con un incremento della massa microbica e della sua attività respiratoria.

Proprio per la capacità di migliorare strutturalmente e chimicamente il terreno, quando si studia l'efficacia di questi popolamenti, risulta essere di fondamentale importanza considerare non esclusivamente l'aspetto strutturale e fitosanitario degli individui arborei ma bensì tutte le componenti del sistema bosco.

Nella presente tesi ci si prefigge di considerare una molteplicità di aspetti, ovverosia integrare ed unire gli obiettivi e i risultati dei precedenti studi sopra citati, approcciandosi a tale studio con un metodo multidisciplinare.

Le risposte positive del diradamento dal basso di media-forte intensità nello studio di Cantiani e Piovosi (op. cit.) hanno fornito uno spunto per intraprendere nelle pinete un nuovo tipo di sperimentazione, integrando al diradamento classico dal basso anche un diradamento selettivo.

Tale diradamento ha come obiettivo principale la selezione di un insieme di piante “candidate” particolarmente vigorose e strutturalmente stabili ed in seguito l'asportazione delle loro dirette competitori, permettendo perciò un maggiore e migliore sviluppo della pianta rilasciata.

Per i dettagli sul metodo e le modalità di diradamento si rimanda al capitolo dei materiali e metodi.

1.4) L'evoluzione e la tendenza dei soprassuoli: possibile rinaturalizzazione

È importante considerare che, per il ruolo che questi soprassuoli hanno svolto e tutt'ora svolgono, risulta essenziale la loro conservazione e lo studio del loro sviluppo, anche in seguito ai cambiamenti climatici in atto.

Proprio a causa dei cambiamenti climatici e alle mancate cure colturali, spesso questi soprassuoli sono andati incontro a degradamenti e semplificazioni strutturali, con la progressiva perdita di funzionalità e resilienza (Nocentini, 2001). Tale fenomeno sottolinea l'importanza di ripristinare appieno le funzionalità degli stessi tentando di renderli il più possibile indipendenti dall'intervento dell'uomo e andando ad agire specialmente sull'efficienza del sistema suolo.

Inoltre come sottolineano Martin-Benito et al. (2010), i diradamenti possono favorire una certa resistenza alla siccità, una delle problematiche principali nei popolamenti di Pino (Bottolico et al., 2012), andando a migliorare l'efficienza del soprassuolo e contribuendo allo sviluppo dello stesso (Cantiani op. cit., 2012).

La ricchezza in biodiversità del suolo, proprio per la storia e le problematiche legate ai rimboschimenti con *Pinus Nigra sp.*, risulta essere una tematica importante da analizzare, in particolare se si desidera studiare l'evoluzione del soprassuolo con il passare degli anni.

I meccanismi che all'interno di un bosco possono provocare il mutare di queste componenti sono molteplici e risulta perciò particolarmente complicato studiarne gli effetti. Tuttavia è altrettanto comprovato che l'utilizzo di diradamenti, come sottolineato precedentemente, possa indurre complessi cambiamenti non solo a livello della struttura del bosco ma anche biochimici. Mercurio et al. (2009) sottolineano come la determinazione della sostanza organica possa essere un sensibile indicatore degli effetti della gestione forestale a breve e medio periodo, proprio perché hanno osservato importanti cambiamenti, in seguito all'apertura di *gaps*, nella velocità di decomposizione della sostanza organica.

Studiando perciò parametri diversi dagli accrescimenti degli individui arborei si possono comunque trarre rimarchevoli informazioni sull'efficacia di determinati tipi di gestione e sui complessi cambiamenti ecologici e biochimici che essi instaurano.

Gli stessi autori Cantiani e Piovosi (op. cit.) che hanno studiato l'effetto dei diradamenti su queste pinete sostengono che la maggior parte dei sistemi abbiano raggiunto l'obiettivo originario di ricostituzione del soprassuolo.

In seguito a ciò, la scelta gestionale prioritaria, dove è ammissibile, risulta essere quella di tendere verso una progressiva "rinaturalizzazione" dei soprassuoli, dove con "rinaturalizzazione" si intende un intervento volto a favorire il ripristino dei processi naturali e l'aumento della resistenza e resilienza del sistema (Ciancio et al., 2002) nonché la capacità dello stesso di autopertuarsi nel tempo (Nocentini e Puletti, 2009).

Dai risultati degli studi condotti da parte di Nocentini e Puletti (op. cit.) in popolamenti analoghi, è possibile osservare come l'intervento di diradamento ha avuto effetti positivi sia sugli individui di pino sia sui processi di diffusione spontanea delle latifoglie naturalmente presenti nella zona. Inoltre, nell'ottica dei cambiamenti climatici, un intervento di rinaturalizzazione con graduali diradamenti può aumentare la capacità adattativa del sistema (Bottolico et al. op.cit).

1.5) L'importanza della componente microbiologica

Il suolo, all'interno di un sistema ecologico, è uno dei più complessi elementi da analizzare, sia per le sue componenti chimico-fisiche che per quelle microbiologiche. L'insieme di relazioni e connessioni tra i vari elementi che lo compongono rendono la comprensione dei meccanismi notevolmente complessa.

Il suolo, infatti, oltre a essere una componente fondamentale per un qualsiasi soprassuolo, sia esso erbaceo, arbustivo o arboreo, è anche la maggior fonte di biodiversità del pianeta ed è contraddistinto da una molteplicità di tratti funzionali, spesso ridondanti (Nannipieri et al., 2003); proprio questa ridondanza permette al sistema di mantenersi in equilibrio, e quindi efficiente, anche in seguito ad azioni perturbative.

La microflora rappresenta la parte più rilevante della biomassa del suolo, ed è quella che maggiormente influisce sulle sue proprietà biologiche, regolando tutti i processi biochimici che ne determinano le proprietà nutrizionali (Bloem et al., 2004). Le diverse specie di microrganismi presenti nel suolo hanno, infatti, 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).

Nonostante i numerosi studi in materia, questa enorme fonte di biodiversità non è ancora completamente stata studiata; difatti, per quanto riguarda i batteri, al momento meno dell'1% (Torsvik et al., 1990, Bakken et al., 1997, Amann, 1995) sono coltivabili su terreno di coltura a causa delle scarse conoscenze sulle condizioni di crescita.

Riuscire a identificare e, eventualmente, ad utilizzare tali batteri è da considerarsi un obiettivo prioritario per implementare le conoscenze di tale biodiversità di microrganismi, data anche la molteplicità di geni che codificano nuove proteine ed enzimi sconosciuti (Mocali e Benedetti, 2010).

Come precedentemente sottolineato, vi è un'enormità di microrganismi all'interno del suolo, ma difficilmente essi interagiscono negativamente tra di loro creando fenomeni di competizione per le risorse (Tiedje et al., 2001). Gli stessi autori suggeriscono che la competizione delle comunità microbiche nella loro attività è assente negli strati superficiali, poiché le varie specie che occupano il suolo sono spazialmente separate.

Da ciò si deduce che il sistema suolo risulta essere perfettamente organizzato al suo interno ma altrettanto complesso proprio a causa delle molte variabili operanti nel sistema e dell'articolazione dei meccanismi operanti.

1.6) Attività microbica e diversità funzionale

Il termine *attività microbica* è un termine usato per indicare un vasto *range* di attività compiute dai microrganismi nel suolo; basti pensare che il 90% del flusso energetico in un sistema suolo passa attraverso i microrganismi decompositori (Nannipieri et al. op. cit.). Generalmente i processi mediati dai microbi sono i più sensibili alle perturbazioni nel suolo e i cambiamenti nella composizione microbica sono un punto cruciale per il mantenimento delle funzioni vitali (Nannipieri et al. op. cit.). I microrganismi possono essere utilizzati come indicatori della qualità del suolo perché svolgono delle funzioni chiave nella degradazione della sostanza organica e dei nutrienti nonché nel loro riciclo e rispondono prontamente ai cambiamenti del sistema suolo adattandosi alle diverse necessità ambientali (Benedetti e Mocali, 2008).

Per tale ragione la capacità di un suolo di recuperare le condizioni ottimali di equilibrio in seguito a delle perturbazioni può essere valutata monitorando l'attività microbica (Pankurst et al., 1997; Seybol et al., 1999).

Il monitoraggio del suolo tuttavia risulta essere complesso sia per la composizione e le interazioni al suo interno sia per le relazioni che esso ha con la restante parte dell'ecosistema (Prescott e Grayston op. cit.). Ciò sottolinea ulteriormente come sia importante lo studio di questo sistema, basato su complesse reti trofiche, e come esso possa essere utilizzato nell'attività di monitoraggio degli ecosistemi.

Come precedentemente sottolineato, l'ecosistema suolo influenza ed è influenzato, in modo più o meno marcato, dalle componenti esterne. Gli autori Prescott e Grayston (2013) sottolineano come una variazione della comunità delle piante presenti in un ecosistema comporti cambiamenti nei cicli di C ed N, agendo principalmente su alterazioni del microclima (ombreggiamento, protezione dal gelo, precipitazioni e traspirazione e prelievo di acqua), produzione di lettiera, interazione con gli erbivori, produzione di essudati radicali e interazione con gli organismi simbiotici.

Si prenda ad esempio la variazione di pH del suolo che è uno dei fattori che influiscono maggiormente sulla diversità biotica (Fierer e Jackson, 2006); tale variazione è spesso indotta, in modo indiretto, da particolari tratti posseduti dalle piante come ad esempio la composizione e la qualità della lettiera (Thoms et al., 2010).

Da quanto descritto finora si può presumere che la diversità dei microrganismi all'interno del suolo influisca positivamente sul funzionamento degli ecosistemi terrestri in modo determinante e, di

conseguenza, anche sulle piante; tuttavia, tale assunto non è incondizionatamente vero poiché dallo studio di Loreau et al. (2001) si intuisce che la relazione tra aumento di diversità e produzione degli organismi vegetali segue un andamento di tipo gaussiano. Questa relazione positiva raggiunge un picco, dopo il quale all'aumentare di biodiversità microbica del suolo non corrisponde un aumento della produzione vegetale e, proseguendo lungo la curva (aumentando quindi la biodiversità), tale interazione diventa persino negativa, diventando deleteria per la produzione vegetale.

Gans et al. (2005) sostengono infatti che la diversità batterica del suolo (ovvero il numero di *taxa* presenti), diminuisce esponenzialmente all'aumentare dell'abbondanza batterica e viceversa. I batteri che riusciamo ad osservare e misurare sono quelli numericamente più rappresentati nel suolo, mentre gran parte della diversità microbica del suolo è determinata da tutti quei microrganismi quantitativamente meno rappresentati e suddivisi in molti *taxa*.

In seguito a quanto espresso fino ad adesso si rende particolarmente necessario, quando ci si avvicina allo studio del suolo e del suo funzionamento, l'utilizzo di indicatori relativi alla componente microbiologica e quindi anche della qualità del suolo.

Di seguito, come esempio, sono riportati alcuni indicatori utilizzati da Bloem et al. (2005), basati su varie caratteristiche fisiche e biologiche, per lo studio di molteplici aspetti relativi al suolo:

- Biomassa e carica microbica del suolo (quantità e numero dei microrganismi nel suolo)
- Attività microbica del suolo (studio dei processi metabolici e delle popolazioni attive e attività potenziale delle stesse)
- Diversità microbica nel suolo e struttura della comunità (uso di tecniche molecolari)
- Relazione pianta- microrganismi (Studio rizosfera)

2) Materiali e metodi

2.1) Descrizione delle aree di studio

Le aree di studio in cui è stata realizzata la presente tesi sono state scelte per le loro peculiarità e rilevanza storica e sono state individuate in due complessi forestali, all'interno dei quali sono state poi delimitate le aree di intervento.

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, 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, anch’esso in delega, con una superficie catastale di 2168,60 ettari,.

All’interno del complesso “Pratomagno- Valdarno” un totale di 487 ettari sono interessati da pinete di pino nero con età diverse, appartenenti a differenti rimboschimenti; la superficie è sostanzialmente inferiore invece per il complesso localizzato nel complesso Madonna delle Querce, 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, costituita 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 esame è quella de” Il Lago”, localizzata 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 scelte per la loro rappresentatività della situazione che interessa al progetto ovvero due soprassuoli, tendenzialmente degradati, dove sono mancati del tutto o in parte i dovuti trattamenti e dove perciò la stabilità, sia meccanica che ecologica, è compromessa.

Inoltre i due complessi 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 classificazione 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 notare, infatti, anche dai rilievi effettuati con il metodo di Braun-Blanquet, sulla flora erbacea; nel complesso dell'Amiata è presente una maggior diversità di specie erbacee, come ad esempio esemplari di leguminose, probabilmente dovuta alle minori condizioni di rigidità invernale e quindi un clima più mite.

Per osservare e analizzare al meglio l'aspetto meteorologico è stata installata, in ciascuna area, una stazione meteorologica con sensori "Vantage Pro 2" (Davis Instruments) (figura 1) 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 1: 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. La finalità è quella 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 attendibilità 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.

Di seguito si riporta una carta topografica che mostra le due zone (complessi) interessate dal presente studio ed il loro inquadramento all'interno della Regione Toscana.

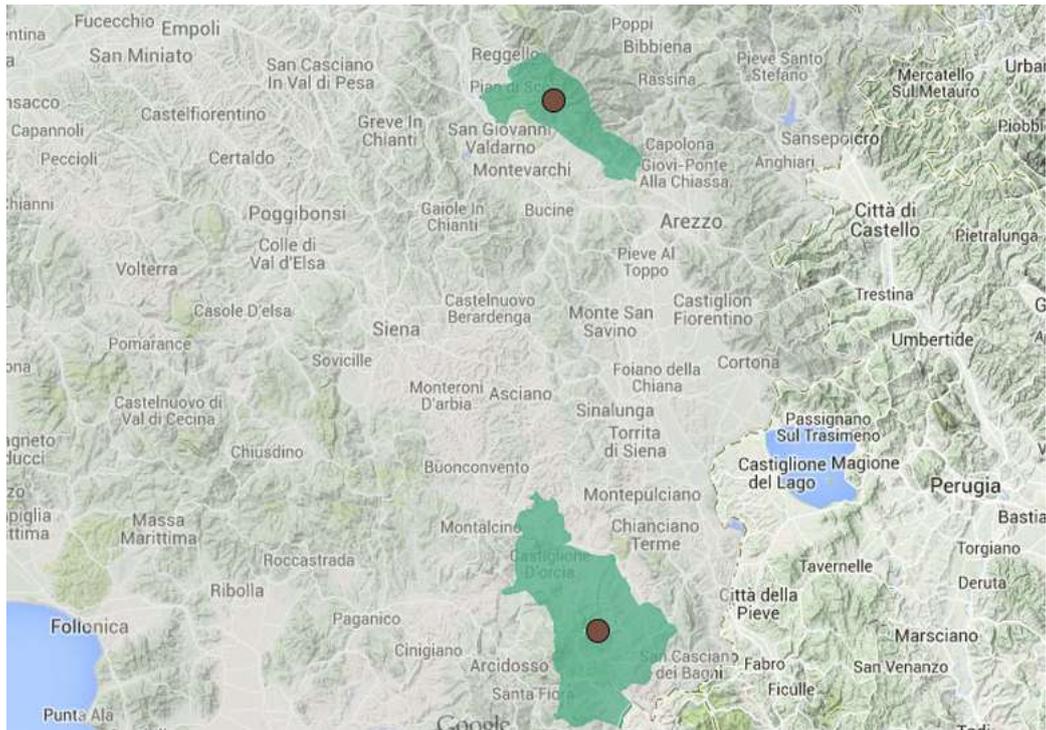


Figura 2: Inquadramento delle due aree interessate dallo studio

2.2) Descrizione particellare

2.2.1) Amiata

Le successive immagini rappresentano la carta geografica scala 1:45000 che inquadra la zona delle aree di studio (Figura 3) 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.

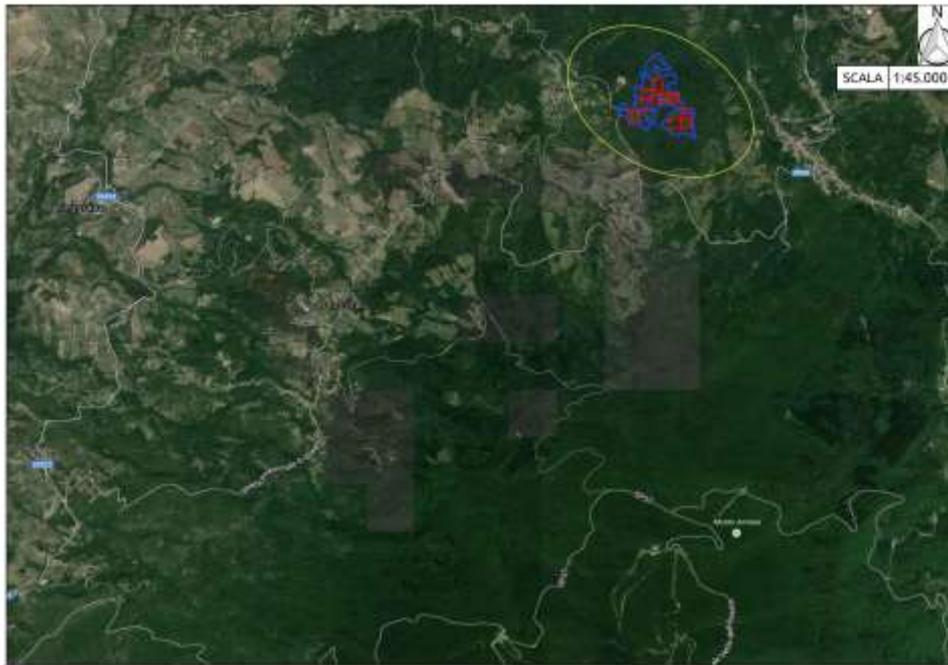


Figura 3: Carta geografica zona “il Lago” scala 1:45000

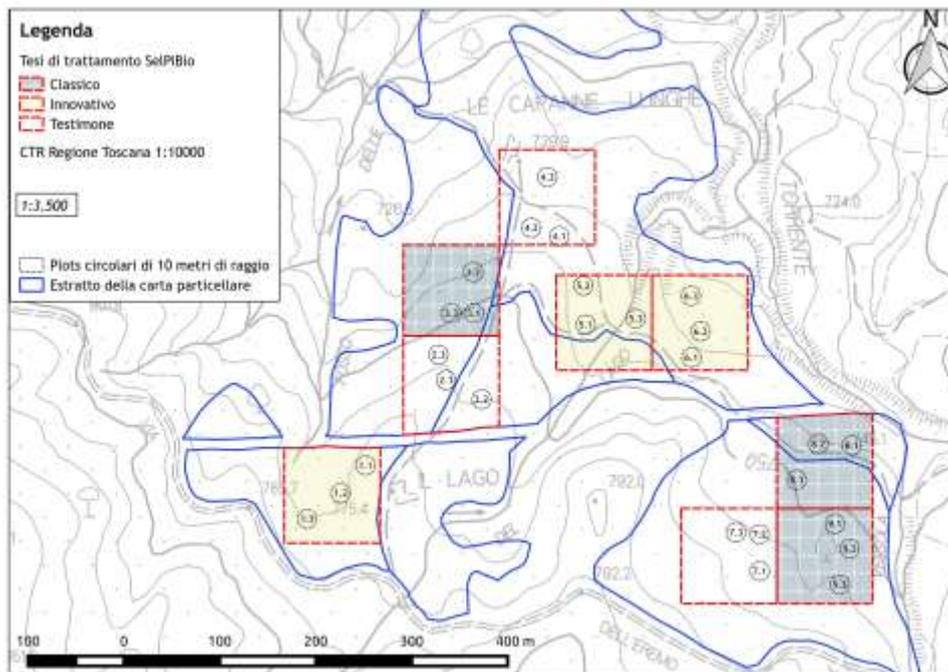


Figura 4: Suddivisione delle aree di campionamento e relativi *plots* (area Amiata)

La particella B52 in cui sono localizzate le aree di campionamento è costituita da una fustaia pura di origine artificiale, ottenuta da rimboscimento 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; come

precedentemente accennato, esso risulta essere elevato e di conseguenza la densità del soprassuolo è comunque elevata.

La distribuzione del piano delle chiome è tendenzialmente monopiana, fatto salvo alcuni individui che possono variare in altezza.

Di seguito sono riportate in modo sintetico alcune caratteristiche principali dell'area:

- Quota: circa 800 m s.l.m.
- Esposizione: Nord-Nord-Ovest
- Il substrato litologico è composto da argilloscisti siltosi ("galestri") con calcari silicei ("palombini") ed in subordine arenarie calcaree.
- Il terreno presenta una scarsa pendenza, che oscilla dal 3% al 6%.
- Scarsa presenza di brucamenti da ungulati.
- Presenza di abbondante vegetazione erbacea ed arbustiva, tra cui le specie *Brachypodium rupestre* L. (13,7%), *Rubus* sp. (7,3), *Carex* sp.(5,3%) e *Hedera elix* L. (4,5%).
- Presenza abbondante di necromassa (figura 6), uno degli elementi fondamentali per quanto riguarda la ricchezza della componente microbica e della macro e meso-fauna.



Figura 5: Struttura orizzontale del soprassuolo



Figura 6: Dettaglio di necromassa

2.2.2) Pratomagno

Le successive immagini rappresentano la carta geografica scala 1:45000 che inquadra la zona delle aree di studio (Figura 7) e la suddivisione della parcella (particella 22) (Figura 8) nelle 9 aree di campionamento con le 3 ripetizioni per ogni area, distinte per ogni trattamento a essa associato.



Figura 7: Carta geografica della zona “Pian della cucina” scala 1:45000

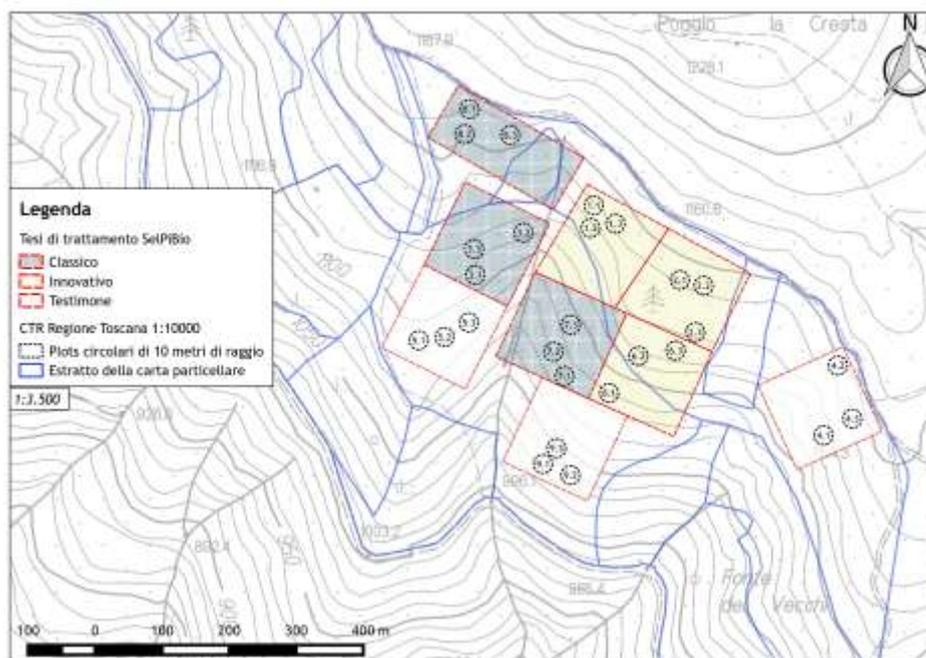


Figura 8: Suddivisione delle aree di campionamento e relativi plots

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, solo in alcuni casi il sesto di impianto; come precedentemente accennato esso, risulta essere elevato e di conseguenza la densità del soprassuolo è comunque elevata.

La distribuzione del piano delle chiome è tendenzialmente monopiana, fatto salvo alcuni individui che possono variare in altezza.

Di seguito sono riportate alcune caratteristiche principali dell'area:

- Quota: circa 1100 m s.l.m.
- Esposizione: Sud- Ovest
- Il substrato litologico è composto da arenarie quarzoso feldspatiche spesso turbiditiche con intercalazioni di marne e argilliti.
- Il terreno presenta una pendenza rilevante, che oscilla tra il 20% e il 25%, fino a picchi del 35%.
- Scarsa presenza di brucamenti da ungulati.

- Scarsa presenza vegetazione erbacea ed arbustiva 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%)
- Presenza abbondante di necromassa che è uno degli elementi fondamentali per quanto riguarda la ricchezza della componente microbica e della macro e meso-fauna.



Figura 9: struttura orizzontale del soprassuolo

Rispetto al complesso dell'Amiata, quello del Pratomagno, è stato maggiormente soggetto a stroncamenti in seguito specialmente agli eventi meteorici del 5 marzo 2015 e, di conseguenza, la necromassa a terra risulta maggiore all'interno della particella presa in esame.



Figura 10: Dettaglio di abbondante necromassa; tronco integro per quasi tutta la sua lunghezza.

2.3) *Tipologie pedologiche*

Per il riconoscimento delle tipologie pedologiche si è fatto riferimento alla carta dei suoli della Regione Toscana, all'interno del progetto "Carta dei Suoli in scala 1:250.000 Regione Toscana".

2.3.1) **Amiata**

I suoli di questo complesso risultano essere da moderatamente profondi a profondi, a profilo Ap-Bw-C-Cr, scarsamente ghiaiosi, a tessitura franco argillosa, scarsamente calcarei, ben drenati. Sono riscontrabili su versanti lineari, a pendenza da debole a moderata, soggetti a forme erosive contenute.

Il pH medio del complesso è circa 6,9 e il contenuto di carbonio organico (TOC), ottenuto dalla media dei valori relativi agli strati pedologici Ap-Bw-C-Cr, è di 1,73%, con un massimo di 3,50% raggiunto dallo strato più superficiale.



Figura 11: Profilo del suolo Amiata

2.3.2) Pratomagno

I suoli di questo complesso sono poco profondi, a profilo A-Bw-BC-R, ghiaiosi e ciottolosi, a tessitura franco sabbiosa e franca, non calcarei, da fortemente a moderatamente calcarei. Hanno una saturazione molto bassa, da ben drenati a talvolta eccessivamente drenati e si trovano di regola su versanti con vallecole da fortemente pendenti a molto scoscesi, su tutte le esposizioni; sono soggetti ad erosione idrica diffusa ed incanalata forte. La rocciosità è da moderata ad elevata con presenza di affioramenti rocciosi. Questi tipi di suoli sono poco frequenti e spesso occupati da formazioni forestali spesso rade e degradate.

Il pH medio del complesso è circa 5,5 e di conseguenza è maggiormente acido rispetto al suolo del complesso dell'Amiata.

Il contenuto di carbonio organico (TOC), ottenuto dalla media dei valori relativi agli strati pedologici A, Bw e BC, è di 1,76%, con un massimo di 3,48% raggiunto dallo strato più superficiale.

La percentuale di carbonio organico, rispetto al complesso dell'Amiata, è lievemente superiore ma non in modo così marcato da poter rappresentare la causa di sostanziali differenze.



Figura 12: Profilo del suolo Pratomagno

2.4) Schema di campionamento

In entrambe le zone è stato utilizzato lo schema di campionamento illustrato nella figura sottostante (figura 13) delimitando preliminarmente un'area di 1 ha per ciascun tipo di ipotesi, rispettivamente l'assenza di trattamento (T0), il trattamento innovativo (TI) e il trattamento tradizionale (TT).

Per ogni tesi sono state individuate tre aree onde poter avere una maggior rappresentatività dell'intero sistema e ridurre al minimo un possibile errore di campionamento dovuto all'esiguità delle dimensioni del numero di campioni, ottenendo quindi 3 ettari totali di superficie per ogni tipo di trattamento.

Per le modalità di campionamento e le differenze tra le varie ipotesi si rimanda al paragrafo sui rilievi effettuati in ambito forestale.

In generale potremmo dire che il trattamento tradizionale corrisponde ad un diradamento dal basso con asportazione del numero di piante <40 %, come previsto a norma di Regolamento forestale.

Il trattamento innovativo coincide sostanzialmente con un diradamento selettivo, con la selezione appunto di circa 100 piante candidate ad ettaro, intorno alle quali saranno asportati gli individui competitori o comunque individui che ne riducano lo sviluppo; la rimozione di piante di scarse dimensioni o comunque sottomesse non è necessariamente effettuata come invece accade per il diradamento da basso.

Le piante candidate sono scelte in base alla loro migliore stabilità e struttura della chioma.

All'interno di ogni area sono stati individuati 3 *plots* con un'estensione di 314 m² (raggio 10m), delimitando aree che fossero rappresentative delle condizioni medie del popolamento.

In ogni *plot* sono stati effettuati i rilievi che verranno poi descritti nei successivi paragrafi.

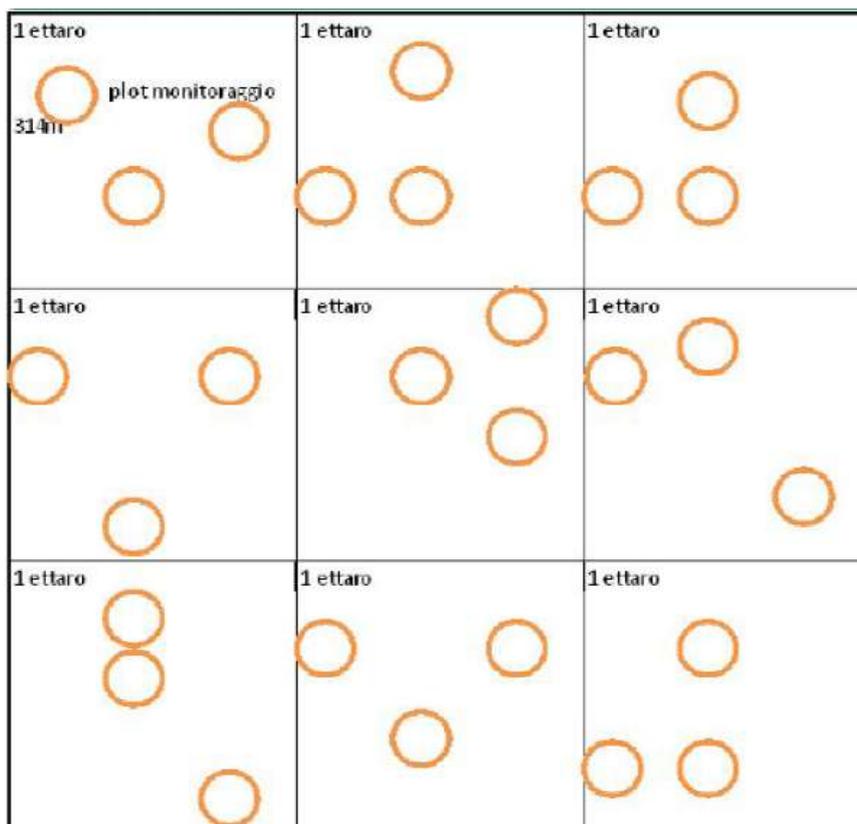


Figura 13: Schema di campionamento con nove aree (tre per ogni trattamento) e i tre plots all'interno di ogni area.

2.5) Rilievi a carattere forestale

In ambito forestale si è provveduto al censimento e alla numerazione di tutti gli individui, al rilevamento del diametro a 1,30 m da terra e di quello dell'altezza, 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.

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

Per il diradamento classico si è proceduto con un normale diradamento dal basso, come previsto a norma di regolamento, con l'asportazione di non più del 40% in biomassa; sono stati asportati gli individui di minori dimensioni diametriche, appartenenti al piano dominato del soprassuolo, rimuovendo inoltre gli individui morti o deperenti.

Per quanto riguarda il diradamento innovativo, o selettivo, sono state scelte le piante candidate appartenenti al piano principale, intorno alle quali è stato realizzato il taglio, al fine di favorirne lo sviluppo ed incrementare la stabilità meccanica del popolamento.

La scelta di tali candidate è stata effettuata anche in seguito ad ulteriori rilevamenti effettuati dai ricercatori del CREA-Centro di Ricerca per la Selvicoltura qui sotto riportati, particolarmente rilevanti nello stabilire la stabilità di ciascun individuo:

- altezza di massima larghezza della chioma
- altezza di inserzione della chioma
- posizione sociale: dominante, codominante, dominata
- posizione spaziale relativa al centro del plot
- proiezione della chioma a terra

Per dati integrali di carattere forestale sulla struttura completa del soprassuolo, come ad esempio l'inserzione e la struttura della chioma, l'indice di aggregazione di struttura orizzontale CE e l'indice di struttura VE (Vertical Evenness) si rimanda alla future pubblicazioni in ambito del progetto SelPiBioLife, del quale la presente tesi è parte integrante.

2.6) Il campionamento del suolo

Per il campionamento del suolo si è proceduto con un campionamento standard all'interno dell'area secondo lo schema a destra (figura 14), scegliendo il punto centrale (punto 5) in modo che coincidesse, con buona approssimazione, con il centro dell'area di saggio.

In ogni punto è stato estratto un campione di suolo (carotaggio) di circa 30 cm di

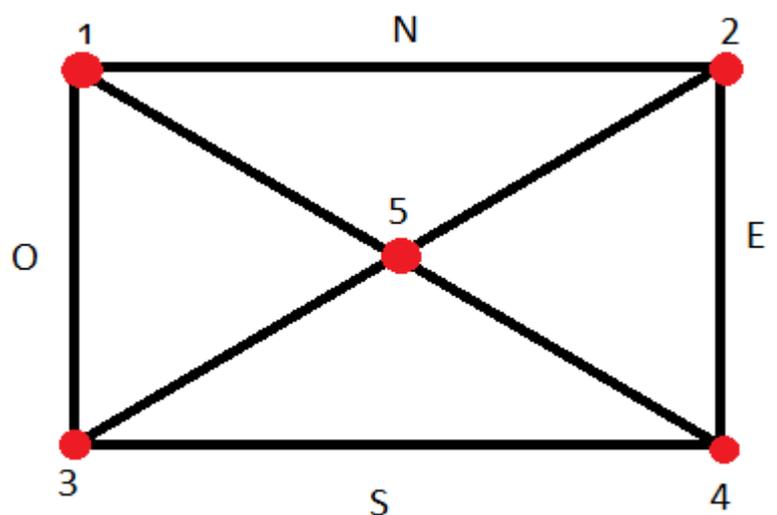


Figura 14: Schema di campionamento del suolo con punti cardinali

profondità, privo di lettiera.

Successivamente 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.

In seguito alla fase di campo, i campioni sono stati asciugati all'aria, vagliati con un setaccio con maglia 2 mm di diametro e, dai campioni così processati, ne è stata estratta un'aliquota per ognuno, utilizzata successivamente 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, ponendoli all'interno di contenitori sigillati.

2.7) Determinazione della respirazione del terreno

Per poter fornire indicazioni preliminari sulla comunità microbica e sulla sua attività metabolica viene spesso quantificata la CO₂ prodotta dalla comunità durante la mineralizzazione, e di conseguenza la degradazione, della sostanza organica, processo fondamentale per l'apporto di nutrienti ed energia alle piante.

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.

La determinazione della concentrazione della CO₂ prodotta dalla biomassa microbica presente nel campione viene 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. Il dosaggio della CO₂ viene quindi effettuato 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.

$$\frac{CO_2 \text{ (mg)}}{kg \text{ terreno}} = \frac{(V \text{ bianco} - V \text{ camp}) * N_{HCl} * 22 * 1000 * A}{Ps}$$

Il procedimento 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 verrà anche posto un recipiente contenente 10ml di NaOH (0,5 N). Il contenitore viene posto 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 misurazioni vengono aggiunti al NaOH 5 ml di cloruro di bario 1N al fine di bloccare la reazione con la formazione di carbonato di bario. Successivamente verrà effettuato 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).

2.8) Misura del C della biomassa microbica nel terreno

La determinazione della biomassa nel suolo è di focale importanza per lo studio della qualità del suolo, soprattutto per approfondire come i microrganismi al suo interno agiscano in termini di rilascio degli elementi nutritivi, di turnover della sostanza organica, di miglioramento e di mantenimento della struttura dei suoli.

Tale parametro, interpolato e analizzato con i valori ottenuti dal monitoraggio della respirazione microbica, è in grado di fornire importanti informazioni che concernono lo “stato di salute” del suolo (per esempio, se esso sia o meno sottoposto a stress) e delle sue capacità e potenzialità.

Con questo metodo basato sulla fumigazione con cloroformio, in seguito alla lisi cellulare ed il rilascio del citoplasma nell'ambiente, è possibile estrarre il materiale cellulare con una soluzione di K₂SO₄ 0,5M, secondo il metodo di fumigazione-estrazione di Vance et al. (1987).

Il valore di biomassa microbica è stato ottenuto per differenza tra i campioni non sottoposti a fumigazione e quelli sottoposti a fumigazione con il cloroformio.

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.

2.9) Analisi molecolare della comunità batterica

L'analisi molecolare della comunità batterica del suolo è un importante processo poiché essa permette di ottenere informazioni sulla composizione specifica del campione stesso, potendo perciò definire la biodiversità intrinseca del suolo e di conseguenza la sua possibile diversità funzionale.

La componente batterica all'interno del suolo è la maggior fonte di biodiversità ed è perciò necessario, se si vuole analizzare il sistema nel complesso, ottenere indicazioni sulla sua composizione.

Per quanto riguarda 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 risospesione finale è effettuata in TE (0,1 mM EDTA).

In seguito all'estrazione i campioni di DNA sono stati conservati in frigorifero alla temperatura di 4°C fino al loro utilizzo per il processo di amplificazione.

I campioni di DNA così estratti sono stati diluiti in TE 0,1 mM EDTA e successivamente amplificati utilizzando la reazione a catena della polimerasi (in inglese Polymerase Chain Reaction abbreviata in PCR).

Per quanto concerne la scelta della regione genica da amplificare si è deciso di analizzare le sequenze nucleotidiche localizzate all'interno del gene codificante le molecole di RNA ribosomiale (rRNA) 16S.

Questa scelta si basa principalmente sull'importanza dei geni dell'rRNA per la costruzione di alberi filogenetici e per riconoscere quindi le relazioni evolutive tra microrganismi (Olsen e Woese, 1993); molte tecniche per l'analisi delle sequenze nucleotidiche dei procarioti (DGGE, TGGE ecc..) analizzano proprio il 16S rRNA (Gelsomino, 2010).

Per l'amplificazione è stata utilizzata la seguente miscela di reazione:

- DNA (5 ng/ μ l) 2,5 μ l
- H₂O 13,925 μ l
- Primer 1401R (10 pmoli/ μ l) 0,625 μ l; sequenza : 5'- gCg TgT CAA gAC CC
- Primer GC986F (10 pmoli/ μ l) 0,625 μ l; sequenza : 5'- CgC CCg ggg gCC CCg ggC ggg gCg ggg
gCA cGG ggg gAA GcG gAA gAA CCT TA
- MgCl₂ (25mM) 2,5 μ l
- Buffer (5x) 5 μ l
- Taq* (5U/ μ l) 2,5 μ l

*Taq Promega G2 Flexi

Il ciclo utilizzato per l'amplificazione è il seguente:

Step	Temperatura °C	Tempo	Numero di cicli
1	94	1'30"	
2	56	30"	
3	72	45"	
4	95	20"	
5	56	30"	
6	72	45"	
7	Al punto 4		33
8	72	2'	
9	60	5'	
10	4	Continuo	
11	Fine		

L'articolo di riferimento per il protocollo utilizzato è: Felske et al. (1998). Il termociclatore utilizzato per la procedura di amplificazione è il BIORAD T100.

Successivamente all'amplificazione i campioni sono stati analizzati con la tecnica della DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) dalla quale si può ottenere un profilo elettroforetico caratteristico per ogni campione; per il funzionamento di questa tecnica si rimanda al paragrafo successivo.

2.10) Il funzionamento della tecnica DGGE

La tecnica DGGE si basa sulla generazione di impronte molecolari (*fingerprinting*), derivate dalla mobilità elettroforetica dei frammenti di DNA di un campione in un gel di poliacrilammide con un gradiente lineare di agenti denaturanti di tipo chimico, la soluzione di agente denaturante al 100% contiene Urea 7M e formammide 40%.

Tale mobilità dipende dalla composizione in basi dei frammenti di DNA (Muyzer e Smalla, 1998) e con la tecnica DGGE essi vengono separati in base a tale composizione (Castaldini, 2010).

Per poter meglio comprendere il meccanismo della tecnica DGGE si osservi l'immagine sottostante che rappresenta una corsa all'interno del gel con il gradiente denaturante posto perpendicolarmente alla direzione dell'elettroforesi; in tal modo è possibile individuare in modo più accurato quale sia l'intervallo di gradiente utile per la denaturazione del DNA.

Dalla stessa immagine si osserva come il DNA all'interno del gel subisca, a seconda della sua composizione in basi, una progressiva denaturazione, passando da una struttura a doppia elica, con elevata capacità di movimento all'interno del gel, fino ad una condizione di singola elica che ne rallenta la corsa fino al completo arresto una volta che la molecola è del tutto denaturata, ad eccezione del GC clamp.

Tale GC clamp viene inserito durante il processo di amplificazione ed è costituito da una sequenza di 40-50 bp (paia di basi) ricca in basi G e C, creando un legame G-C o C-G, maggiormente resistente alla denaturazione.

Tali frammenti del GC clamp sono legati all'estremità 5' di uno dei due *primer* e fanno sì che la molecola, durante il processo di denaturazione, non si denaturi del tutto, creando così un effetto "paracadute" che consente la separazione sul gel delle diverse molecole e la creazione delle caratteristiche bande.

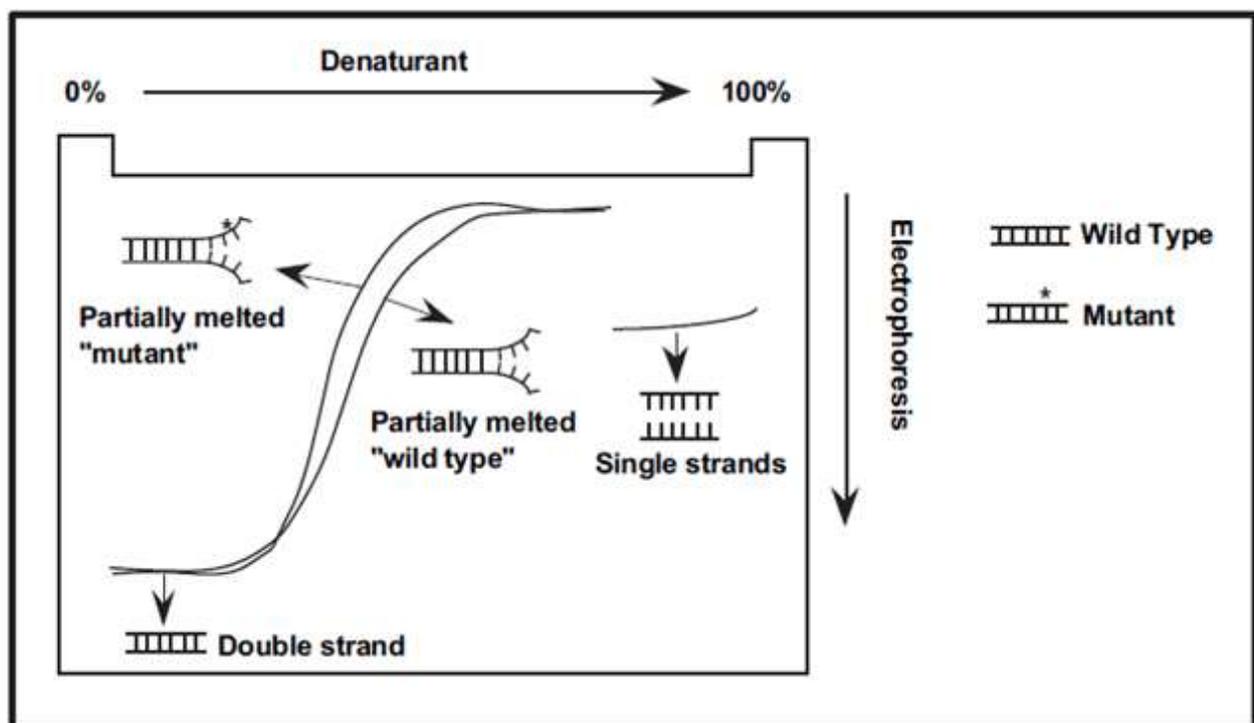


Figura 15: Immagine tratta dal sito internet dell'azienda BIORAD: <http://www.bio-rad.com/it-it/applications-technologies/mutational-analysis> rappresentante il funzionamento della tecnica DGGE con il processo di denaturazione.

Per l'utilizzo della tecnica DGGE è spesso utilizzato il gene 16S rDNA, come nel caso del presente studio, poiché in esso sono registrate nel tempo le mutazioni che intervengono come frutto del processo evolutivo e perciò dalla sua analisi si è in grado di cogliere le varie relazioni filogenetiche (Gelsomino, 2010 op. cit.). Tale gene infatti è costituito da due zone, una conservata ed una ipervariabile; la prima è indispensabile per poter "disegnare" e collocare il primer, la seconda invece è capace di accumulare un numero di mutazioni sufficiente ad evidenziare le differenze filogenetiche.

Dall'analisi dei profili è possibile fornire una valutazione della complessità della componente batterica in termini di ricchezza delle specie (*richness*= numero di bande), di composizione specifica (presenza/assenza delle bande) e di distribuzione relativa delle specie (*eveness*= diversa intensità delle bande) (Castaldini, 2010 op. cit.), delineando le sostanziali differenze che sussistono tra le comunità dei diversi campioni.

La DGGE, difatti, è una tecnica utilizzata per un'analisi comparativa tra i campioni, poiché essa non permette, a differenza delle tecniche di sequenziamento, di identificare i vari componenti della comunità batterica.

I risultati della DGGE sono stati analizzati utilizzando il software Gel Compare II (Applied Maths, V. 4.601), il quale permette di individuare le bande all'interno del gel, confrontando le varie *lanes* per la presenza/assenza delle stesse, ed eventualmente evidenziarne l'intensità.

Con lo stesso software inoltre sono stati realizzati, tramite la *cluster analysis*, dei dendrogrammi che evidenziano la similarità tra i vari campioni; i parametri utilizzati per tale analisi sono il "Dice" come coefficiente di similarità e l'UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) come tipo di dendrogramma.

Sono stati calcolati inoltre gli indici di Shannon-Wiener e di Simpson per ogni campione, in modo tale da avere un valore che rappresentasse la diversità all'interno dei vari campioni.

Gli indici di diversità, in generale, forniscono una misura quantitativa dei differenti tipi (ad esempio specie) presenti in un *dataset*, tenendo anche in considerazione come essi siano equiripartiti (*eveness*).

Successivamente sono stati utilizzati i software Past versione 2.17c (<http://nhm2.uio.no/norlex/past/download.html>) per l'analisi PCA (*principal component analysis*) e il software SPSS versione 17 (<http://www-01.ibm.com/software/it/analytics/spss/>) per l'analisi della varianza ad una via (ANOVA) per valutare la significatività delle differenze riscontrate tra i

campioni. Prima di procedere con l'ANOVA è stato effettuato un test per l'omogeneità della varianza (Levene's test).

3) Risultati e discussione

Come premessa è necessario sottolineare che i risultati ottenuti in questa tesi non siano al momento sufficienti per poter trarre conclusioni esaustive e definitive. L'ottenimento di risultati significativi, soprattutto quando si opera in campo forestale, richiede tempistiche più lunghe poiché il sistema impiega molto tempo a modificarsi; inoltre le variazioni all'interno degli ecosistemi non possono essere osservate immediatamente ma necessitano di un determinato tempo di reazione che può variare in base all'entità delle sue componenti e ad altre variabili difficilmente determinabili e prevedibili.

Da ciò ne deriva che questa tesi può essere vista come uno studio preliminare che, come precedentemente sottolineato, s'inserisce all'interno di un progetto più ampio, sia dal punto di vista della durata che degli aspetti presi in considerazione. Tuttavia già dai risultati ottenuti in questa tesi si possono trarre importanti deduzioni sulla natura attuale dei sistemi considerati e poter ipotizzare variazioni ed impatti futuri diversi, data la diversità osservata tra i due sistemi.

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.

Inoltre, essendo questa tesi effettuata su dati rilevati al tempo 0 del progetto Selpibiolife, permette di osservare le varie differenze esistenti tra le diverse aree in modo tale da evitare, nei risultati futuri, di attribuire modificazioni non dovute ai differenti trattamenti ma soltanto a differenze iniziali già esistenti e precedentemente osservate.

3.1) Risultati analisi molecolare

Di seguito sono riportate le immagini dei gel ottenuti con l'analisi DGGE e acquisite mediante l'utilizzo dello strumento ChemiDoc™ della BIORAD dalle quali, attraverso l'utilizzo del software Gel Compare II, è stata effettuata un'analisi del profilo elettroforetico.

Quest'analisi prende in considerazione la presenza/assenza delle bande e la posizione all'interno del profilo e di conseguenza evidenzia le varie differenze tra i campioni.

3.1.1) Amiata

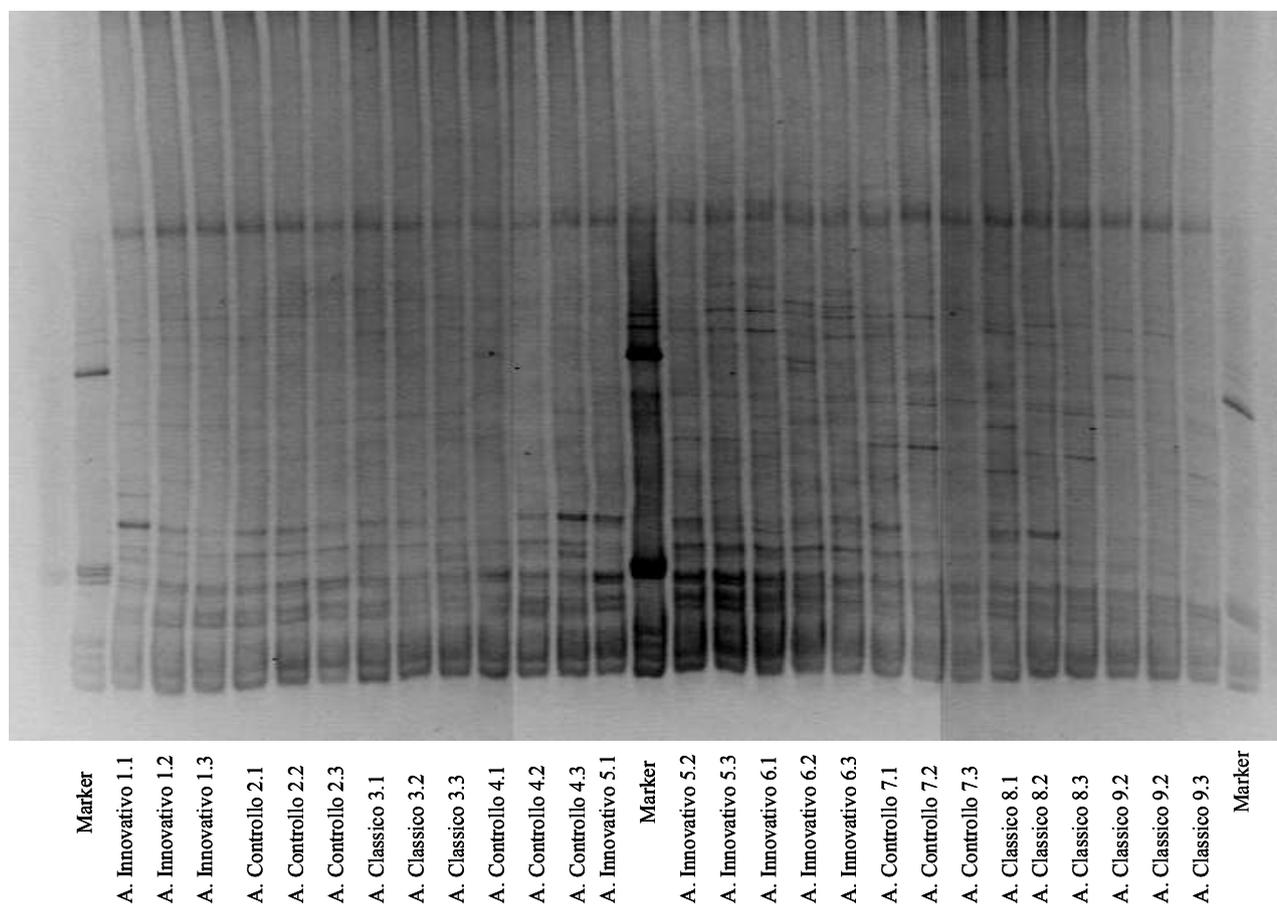


Figura 16: Profilo elettroforetico campioni Amiata

L'immagine successiva rappresenta lo stesso profilo elettroforetico ma con in aggiunta l'evidenziazione, in verde, delle varie bande che il software riconosce e prende in considerazione per l'analisi di diversità e la costruzione del dendrogramma. La curva a destra delle lane rappresenta

la curva densitometrica, la quale mette in evidenza in quali punti del profilo elettroforetico sia maggiormente concentrata la presenza di DNA.

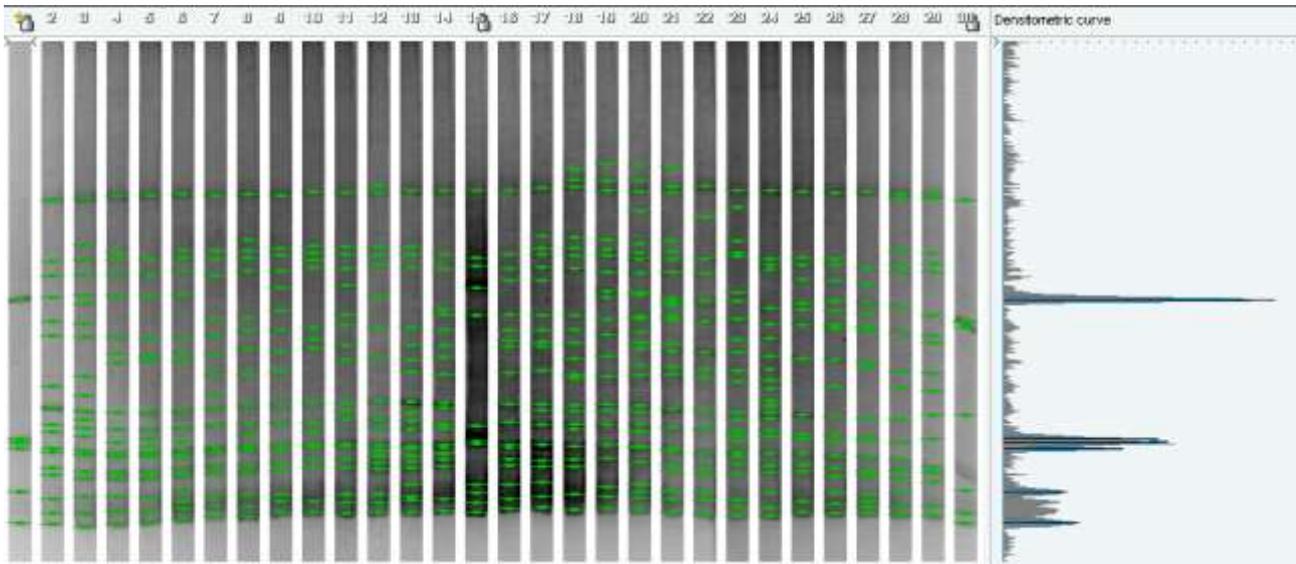


Figura 17: Individuazione bande dei profili DGGE nei campioni Amiata

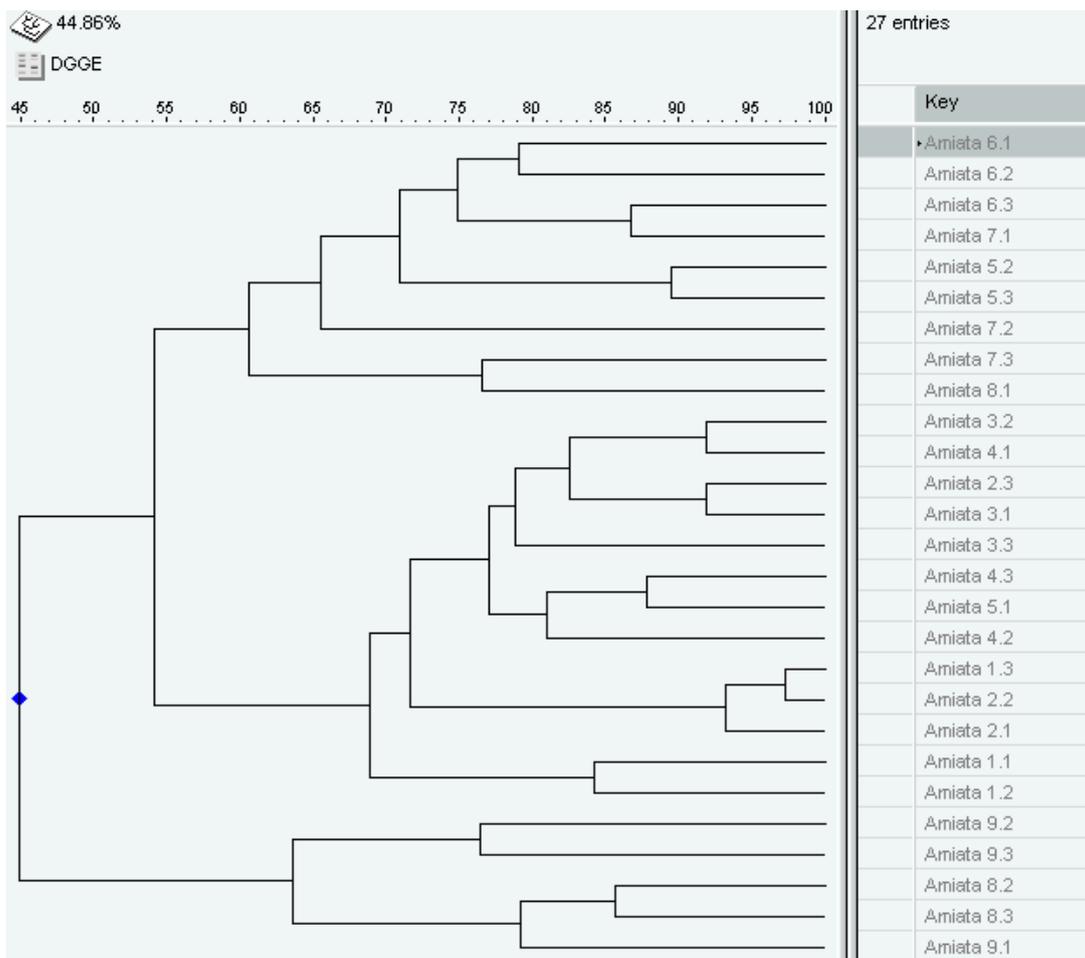


Figura 18: Dendrogramma UPGMA dei campioni Amiata effettuata sui profili DGGE

Nella seguente tabella sono riportati gli indici di diversità (Shannon-Wiener, Simpson e numero di bande) ottenuti per i campioni dell'Amiata:

Campione	Indici di diversità		
	Shannon- Wiener	Simpson	Numero di bande
Amiata 1.1	2,59	0,09	17
Amiata 1.2	2,86	0,07	21
Amiata 1.3	2,64	0,08	18
Amiata 2.1	2,69	0,08	18
Amiata 2.2	2,72	0,08	19
Amiata 2.3	2,67	0,08	18
Amiata 3.1	2,67	0,09	19
Amiata 3.2	2,55	0,10	18
Amiata 3.3	2,57	0,10	17
Amiata 4.1	2,65	0,09	19
Amiata 4.2	2,77	0,07	19
Amiata 4.3	2,82	0,07	21
Amiata 5.1	2,69	0,08	20
Amiata 5.2	2,68	0,08	18
Amiata 5.3	2,72	0,08	20
Amiata 6.1	2,88	0,07	22
Amiata 6.2	2,86	0,07	21
Amiata 6.3	3,21	0,04	28
Amiata 7.1	3,08	0,05	25
Amiata 7.2	2,70	0,08	17
Amiata 7.3	3,00	0,06	24
Amiata 8.1	2,96	0,06	23
Amiata 8.2	2,59	0,09	16
Amiata 8.3	2,69	0,08	19
Amiata 9.1	2,72	0,08	19
Amiata 9.2	2,61	0,09	17
Amiata 9.3	2,61	0,09	17
Media	2,75	0,08	20

3.1.2) Pratomagno

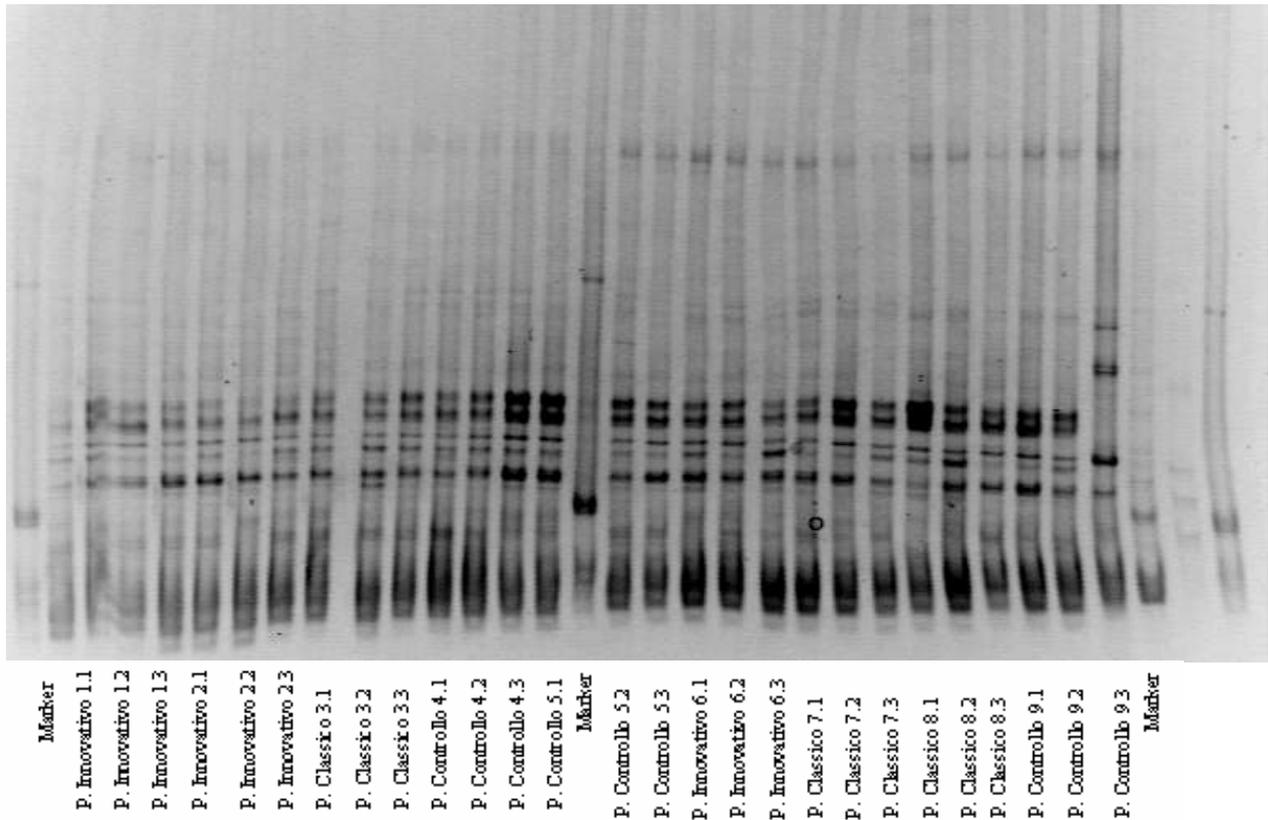


Figura 19: profilo elettroforetico campioni Pratomagno

L'immagine successiva rappresenta lo stesso profilo elettroforetico ma con, in aggiunta, l'evidenziazione in verde delle varie bande che il software riconosce e prende in considerazione per l'analisi di diversità e la costruzione del dendrogramma; la curva a destra delle *lane* rappresenta la curva densometrica, la quale mette in evidenza in quali punti del profilo elettroforetico sia maggiormente concentrata la presenza di DNA.

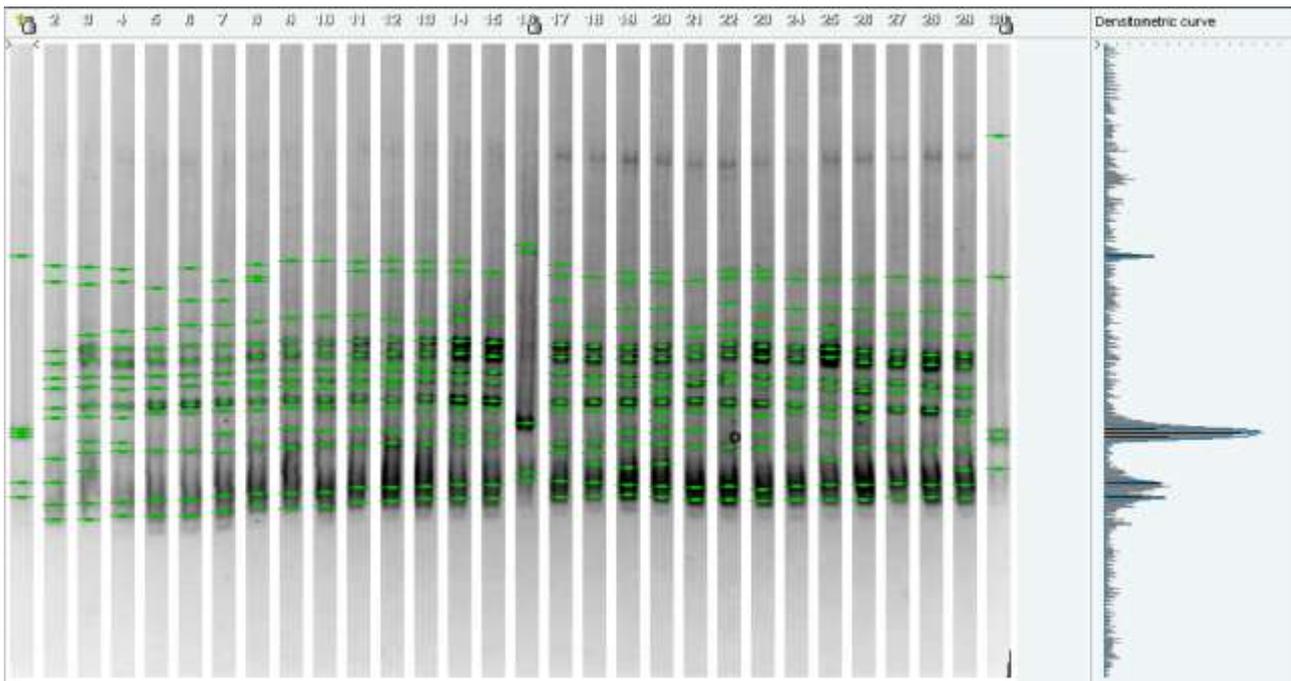


Figura 20: Individuazione bande dei profili DGGE nei campioni Pratomagno

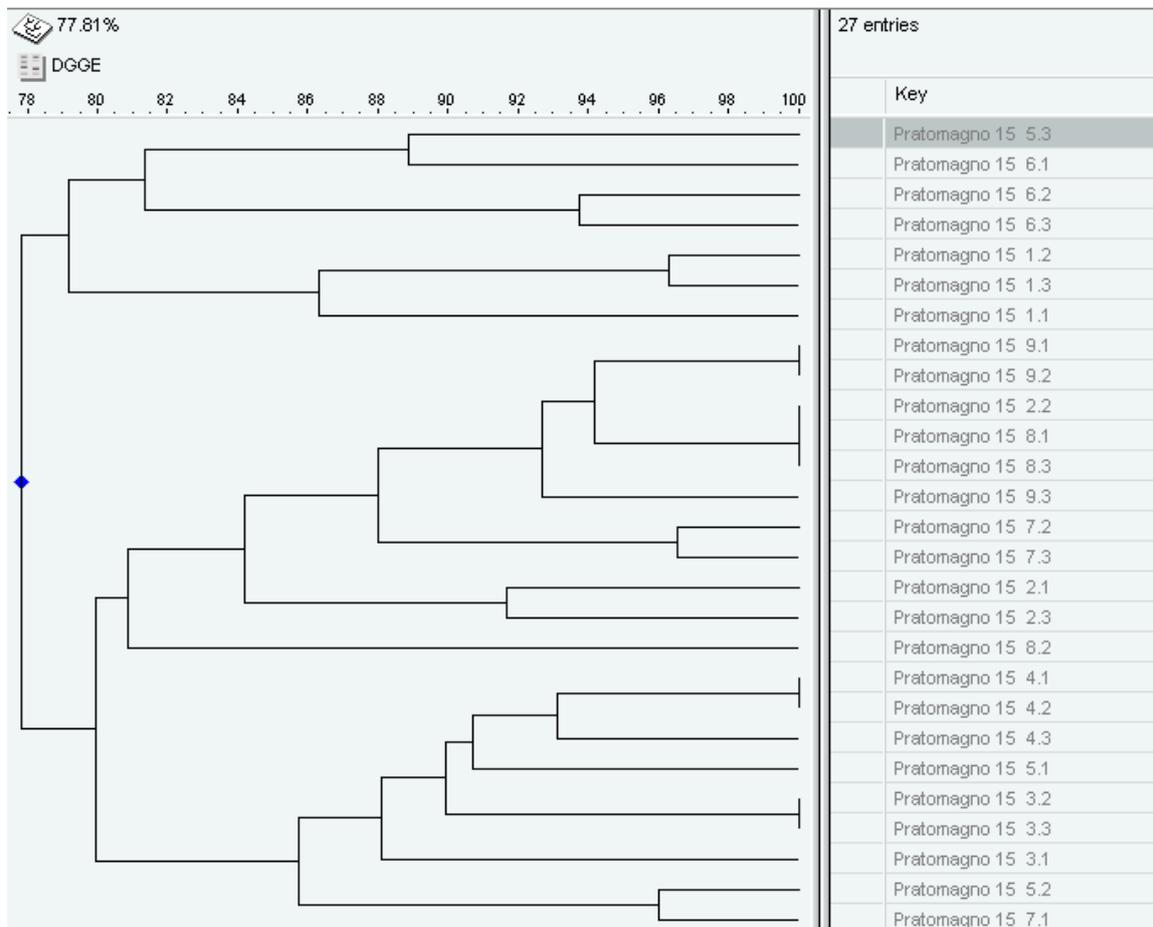


Figura 21: Dendrogramma UPGMA dei campioni Pratomagno effettuata sui profili DGGE

Nella seguente tabella sono riportati gli indici di diversità (Shannon- Wiener, Simpson e numero di bande) ottenuti per i campioni del Pratomagno:

Campione	Indici di diversità		
	Shannon- Wiener	Simpson	Numero di bande
Pratomagno 1.1	2,38	0,10	12
Pratomagno 1.2	2,45	0,10	14
Pratomagno 1.3	2,21	0,13	13
Pratomagno 2.1	2,14	0,15	11
Pratomagno 2.2	2,16	0,15	12
Pratomagno 2.3	2,21	0,14	13
Pratomagno 3.1	2,43	0,10	14
Pratomagno 3.2	2,35	0,11	13
Pratomagno 3.3	2,31	0,11	13
Pratomagno 4.1	2,40	0,11	15
Pratomagno 4.2	2,49	0,10	15
Pratomagno 4.3	2,33	0,11	14
Pratomagno 5.1	2,39	0,11	14
Pratomagno 5.2	2,24	0,12	12
Pratomagno 5.3	2,40	0,11	14
Pratomagno 6.1	2,29	0,12	13
Pratomagno 6.2	2,44	0,10	15
Pratomagno 6.3	2,48	0,10	17
Pratomagno 7.1	2,21	0,13	13
Pratomagno 7.2	2,34	0,11	14
Pratomagno 7.3	2,25	0,12	15
Pratomagno 8.1	2,20	0,12	12
Pratomagno 8.2	2,41	0,11	14
Pratomagno 8.3	2,23	0,12	12
Pratomagno 9.1	2,18	0,13	11
Pratomagno 9.2	2,13	0,13	11
Pratomagno 9.3	2,32	0,11	13
Media	2,31	0,12	13

3.2) Discussione analisi molecolare

Per un corretto confronto dei due soprassuoli risulta di sostanziale importanza trarre deduzione sulla comunità microbica (nel nostro caso esclusivamente batterica) dei due sistemi attraverso i dati DGGE riportati nel capitolo precedente.

Da quanto ottenuto si può innanzi tutto sostenere che la diversità microbica sia tendenzialmente superiore nei campioni dell'Amiata, poiché il numero delle bande e degli indici di diversità risulta superiore.

Nonostante ciò, si può osservare come non vi sia una netta dominanza di una specie rispetto ad altre, cosa che invece si può osservare nei campioni del Pratomagno (figure 15 e 18). In essi infatti, nonostante un minor numero di bande e minor valore degli indici di biodiversità, si osserva che, specialmente nella parte inferiore del gel DGGE le bande risultano notevolmente più nette, con spessore maggiore.

Da ciò appunto si può dedurre che nel Pratomagno è presente un maggior numero di specie dominanti, rispetto all'Amiata dove tali differenze sono meno marcate.

Dalla *cluster analysis* dei campioni del Pratomagno (figura 20), inoltre, si può osservare come essi siano maggiormente omogenei rispetto a quelli dell'Amiata, in alcuni casi non presentando alcuna differenza come ad esempio i campioni Pratomagno 8.1 e 8.3. In molti casi tale omogeneità è particolarmente rimarcata tra i campioni ottenuti dai *plots* della stessa area

La percentuale di similarità (indicata in alto nell'immagine del dendrogramma) ha valori minimi del 70% per il Pratomagno e del 45% nell'Amiata. Tali valori non risultano particolarmente elevati, nonostante ciò si può comunque sottolineare come il Pratomagno, dal punto di vista della diversità batterica risulti maggiormente omogeneo, a testimonianza di quanto delineato nel presente paragrafo.

I campioni dell'Amiata infatti risultano essere, dal punto di vista molecolare, molto diversi tra loro; verrà perciò tenuto conto, nelle future analisi molecolari, che le differenze possono non essere dovute ai differenti trattamenti ma bensì a condizioni eterogenee di partenza.

3.3) Risultati degli indici microbiologici della qualità dei suoli

Le analisi respirometriche e della biomassa nel suolo forniscono indicazioni sull'attività metabolica della componente microbica totale presente all'interno del suolo, non distinguendo tra batteri, funghi, protozoi ecc. .

Con i dati delle respirazioni sono state costruite delle curve rappresentanti la respirazione giornaliera, dove i valori minimi di respirazione, raggiunti all'incirca nel periodo tra i 21 e i 28 giorni, rappresentano la respirazione basale (C_{bas}).

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. Lo studio di questa condizione, detta respirazione basale (C_{bas}), riflette sia la quantità che la qualità delle fonti di carbonio disponibili. Indica pertanto il potenziale dei microrganismi del suolo di degradare la sostanza organica nelle condizioni ambientali stabilite.

Dall'osservazione di tale valore rispetto ad un altro campione è possibile definire all'interno di quale dei due sistemi sia presente, in condizioni standard, una sostanza organica maggiormente disponibile o una comunità microbica più attiva. Dalla curva della respirazione giornaliera inoltre si può osservare la presenza di alcuni sbalzi nella normale tendenza della curva; in questo caso è possibile sostenere che i microrganismi abbiano variato il tipo di sostanza organica disponibile, attingendo, e quindi decomponendo, una frazione maggiormente recalcitrante alla degradazione.

In modo analogo si è costruito la curva della respirazione cumulativa, i cui valori sono costituiti dalla somma del dato rilevato al giorno x aggiunto a quello della misurazione precedente.

Dal confronto delle curve di respirazione cumulativa si può osservare in quale dei due sistemi l'attività metabolica sia maggiore. Tale fenomeno non coincide necessariamente con una migliore qualità del suolo o dell'ecosistema in generale, bensì il fattore fondamentale utilizzato per verificare lo stato di stress di un suolo è la quantità di microrganismi, e quindi la biomassa, necessaria per raggiungere tali valori di respirazione.

Per tali ragioni, viene spesso utilizzato il quoziente metabolico (qCO_2) o tasso di respirazione specifica, dato dal rapporto tra respirazione basale e biomassa microbica.

In tal modo si può verificare quale sia il sistema maggiormente sottoposto a stress, ovvero quello dove, a parità di biomassa, vi è una maggiore attività.

Inoltre è necessario verificare quale sia il contenuto di TOC (*total organic carbon*) per i complessi analizzati, onde verificare se le differenze ottenute per i valori di respirazione siano dovuti ad un differente valore di TOC o se realmente esistano differenze nell'attività metabolica dei microrganismi.

3.3.1) Risultati dell'analisi della respirazione giornaliera

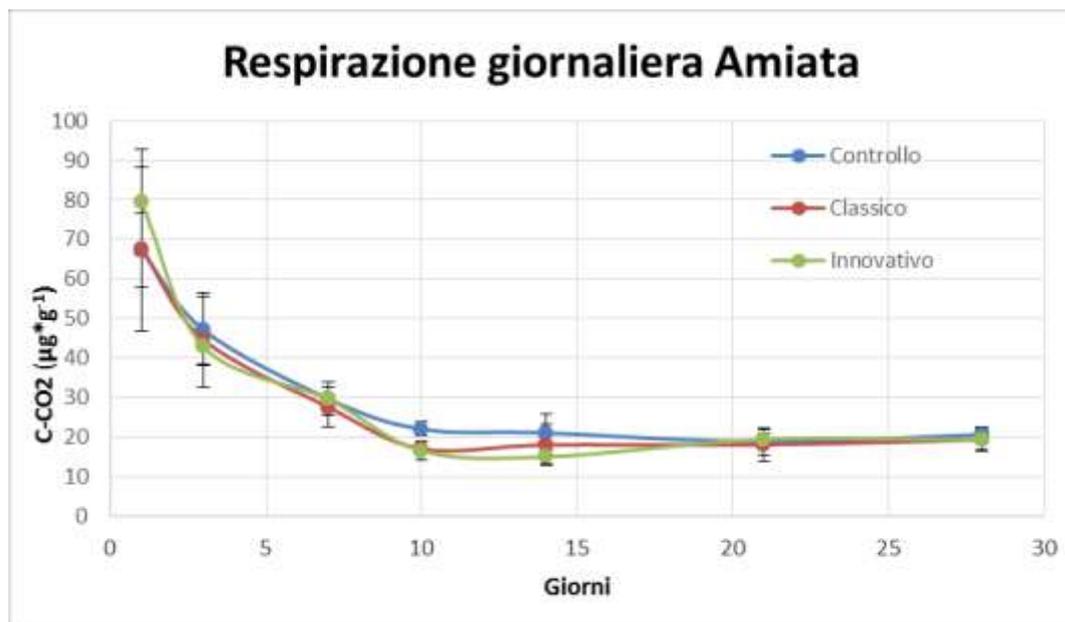


Figura 22: Respirazione giornaliera per trattamento (Amiata)

Dal confronto di queste curve non emergono sostanziali differenze tra i tre trattamenti, proprio per le motivazioni descritte nell'introduzione del paragrafo 3.3.

In ogni caso si può osservare 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.

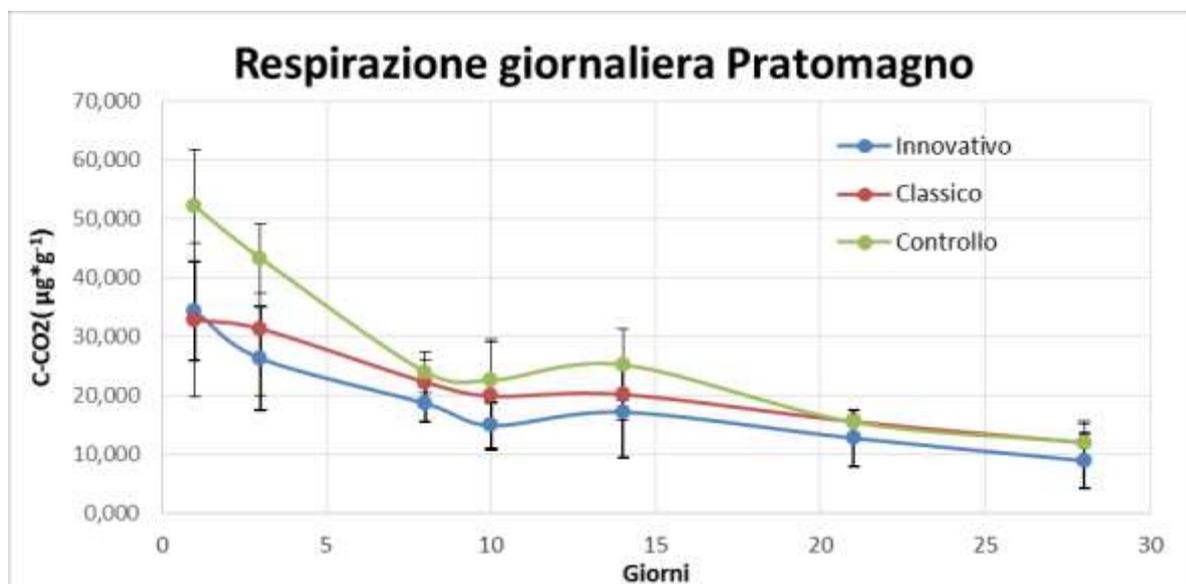


Figura 23: Respirazione giornaliera per trattamento (Pratomagno)

Dalla figura 23, 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. Tuttavia non è possibile stabilire quale sia la frazione di sostanza organica che i microrganismi iniziano ad utilizzare a partire da quell'intervallo di tempo, in quanto non è stato misurato in questo lavoro.

Per garantire una miglior confrontabilità tra i due complessi è stata costruita un'unica curva per ogni complesso, dove i valori utilizzati per la sua costruzione sono dati dalla media dei valori di tutti e tre i trattamenti. Tale confronto è stato possibile poiché i valori all'interno delle due zone non differiscono eccessivamente gli uni dagli altri; difatti, essendo i rilievi stati effettuati prima della realizzazione dei trattamenti, è comprensibile che non vi siano sostanziali differenze nelle tre tesi presentate.

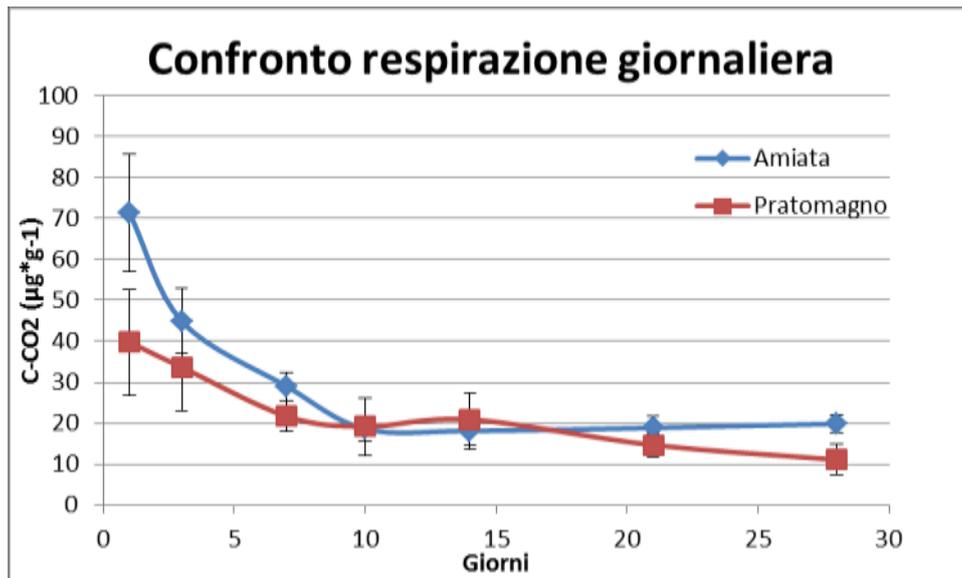


Figura 24: Confronto della respirazione giornaliera espressa in ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) per i suoli dei due differenti complessi (Amiata e Pratomagno)

In figura 24 è possibile confrontare le curve della respirazione giornaliera delle due aree di studio. Le considerazioni che si possono fare riguardano principalmente la predominante superiorità di respirazione, e quindi di attività microbica, nei campioni dell'Amiata rispetto al Pratomagno. Già dal valore della respirazione delle 24 ore, (primo valore della curva) si nota come il valore dell'Amiata ($71 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) è circa il doppio rispetto a quello del Pratomagno ($39 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$).

Tendenzialmente la curva dell'Amiata è sempre superiore rispetto a quella del Pratomagno, fatta eccezione per il periodo compreso tra i 10 e i 15 giorni, per le motivazioni riportate precedentemente.

Tale superiore attività si riscontra infine anche nel valore di respirazione basale (C_{bas}) delle due curve; difatti anche durante lo sfruttamento della frazione più stabile, l'attività microbica dell'Amiata risulta essere superiore.

3.3.2) Risultati dell'analisi della respirazione cumulativa

In accordo con quanto ottenuto per la respirazione giornaliera, con i grafici sottostanti si conferma ulteriormente l'ipotesi che i suoli dell'Amiata presentino un'attività microbica nettamente superiore.

Vi sono però maggiori differenze tra i *plots* del complesso del Pratomagno ed anche la deviazione standard dei valori è risultata essere superiore. Come motivazione a questa eterogeneità di valori potremmo addurre ovviamente, come già rimarcato in precedenza, una maggior eterogeneità del suolo e del bosco unita ad una pendenza maggiore, la quale ha probabilmente innescato maggiori fenomeni di dilavamento di nutrienti e componenti nel suolo maggiormente dilavabili.

Inoltre si osservi che, nel complesso del Pratomagno, le aree maggiormente attive dal punto di vista microbiologico sono quelle scelte come *controllo*, ovvero quelle maggiormente a valle dell'area; ciò testimonia una possibile maggior ricchezza e fertilità del suolo proprio a causa dei fenomeni precedentemente descritti.

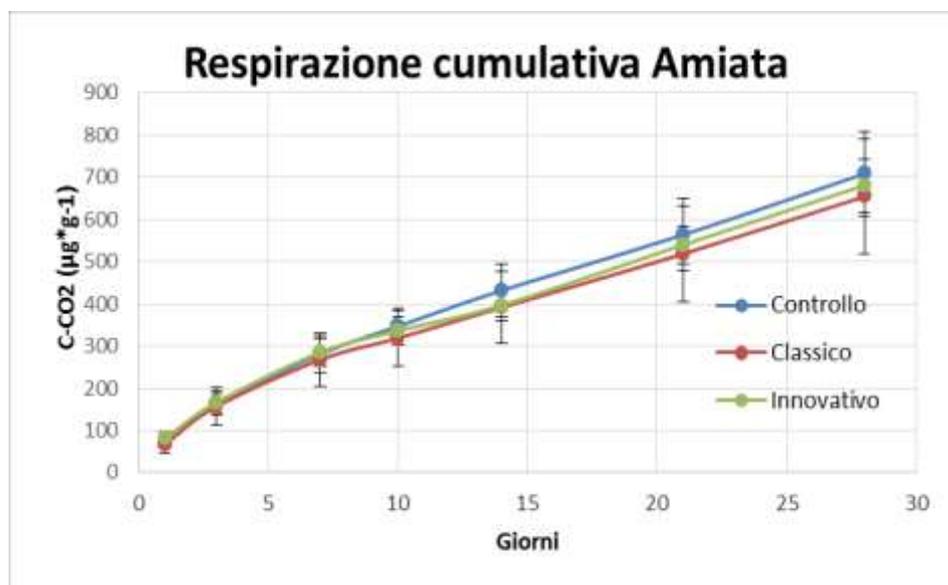


Figura 25: Respirazione cumulativa Amiata espressa in ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) per i suoli delle parcelle destinate ai differenti trattamenti (innovativo, classico e controllo)

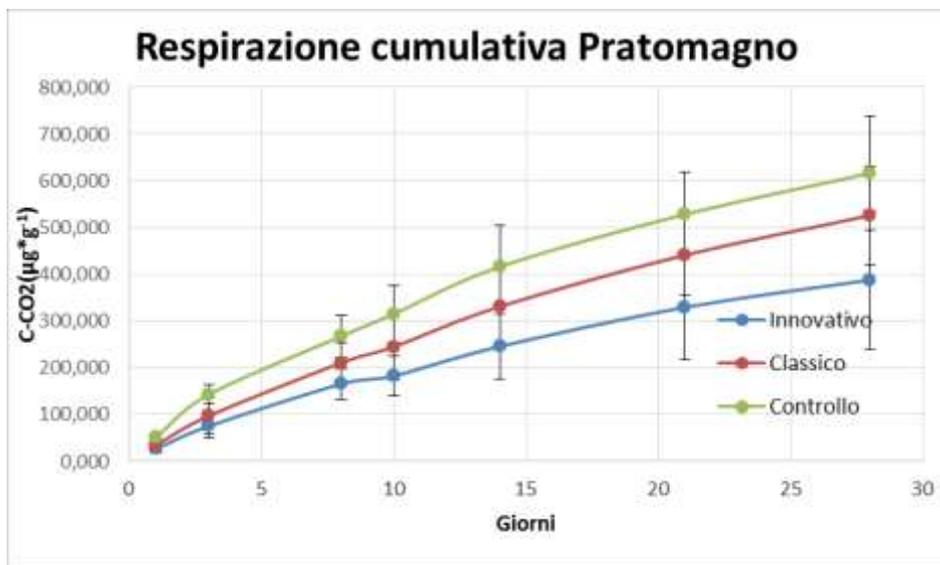


Figura 24: Respirazione cumulativa Pratomagno espressa in ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) per i suoli delle parcelle destinate ai differenti trattamenti (innovativo, classico e controllo)

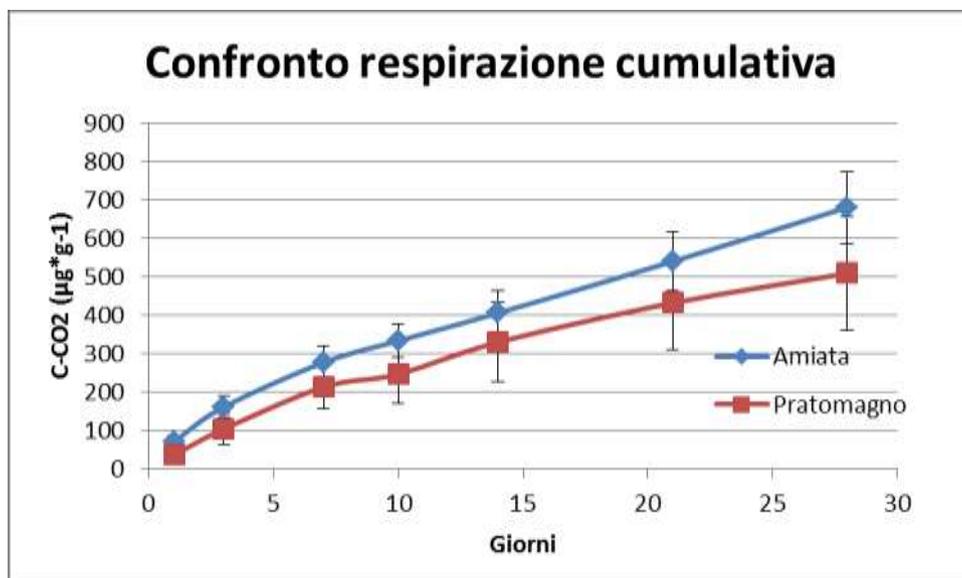


Figura 26: Confronto respirazione cumulativa espressa in ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) per i suoli dei due differenti complessi (Amiata e Pratomagno)

3.3.3) Discussioni dei risultati sulle analisi delle respirazioni

Le tabelle sottostanti (figura 27) riportano i principali valori di respirazione basale e di respirazione cumulativa per ogni trattamento del complesso e, inoltre, la media per ogni complesso. In tal modo si possono rimarcare differenti considerazioni, nonostante sia comunque necessario discutere questi dati in seguito al confronto con i valori ottenuti dall'analisi delle biomasse dei vari campioni.

Tendenzialmente ad una C_{bas} e a C_{cum} maggiore corrisponde una maggior fertilità e attività del suolo ed indica pertanto il potenziale dei microrganismi del suolo di degradare la sostanza organica.

Per quanto riportato nei grafici si nota come i suoli presenti nel complesso Amiata siano maggiormente attivi nei processi di degradazione della sostanza organica e di conseguenza respirino di più. Tale valore andrà poi confrontato con il quoziente metabolico (qCO_2) per verificare se effettivamente i suoli dell'Amiata sono più attivi perché maggiormente fertili oppure perché sottoposti a stress.

Inoltre è importante evidenziare che all'interno dell'Amiata non esistono sostanziali differenze tra i valori di respirazione dei vari trattamenti, ciò è probabilmente dovuto alla maggior omogeneità del territorio.

Si ricordi che i cambiamenti all'interno del sistema dovuti ai trattamenti non siano ancora in atto, essendo i rilievi stati effettuati prima dei tagli e che quindi le differenze riscontrate siano da imputarsi a condizioni di partenza differenti.

Amiata

Trattamento	C_{bas} ($\mu g \cdot g^{-1}$)	C_{cum} ($\mu g \cdot g^{-1}$)
Innovativo	19,5	680,7
Classico	18,8	654,3
Controllo	19,8	708,5

Pratomagno

Trattamento	C_{bas} ($\mu g \cdot g^{-1}$)	C_{cum} ($\mu g \cdot g^{-1}$)
Innovativo	10,9	387,5
Classico	13,8	525,6
Controllo	13,8	615,9

Complesso	C_{bas} ($\mu g \cdot g^{-1}$)	C_{cum} ($\mu g \cdot g^{-1}$)
Amiata	19,3	681,1
Pratomagno	12,9	509,7

Figura 27: Valori medi di respirazione basale e di respirazione cumulativa riportati per i trattamenti di ciascun complesso (Amiata e Pratomagno) ed il valore medio dei complessi stessi

3.3.4) Risultati della biomassa microbica nel terreno

Gli istogrammi riportati in figura 28 e 29 rappresentano la biomassa microbica calcolata per ogni trattamento, all'interno due complessi.

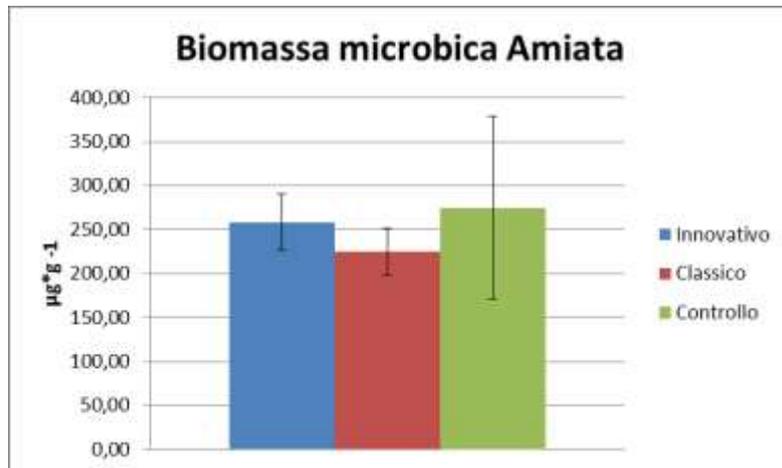


Figura 28: Biomassa microbica Amiata

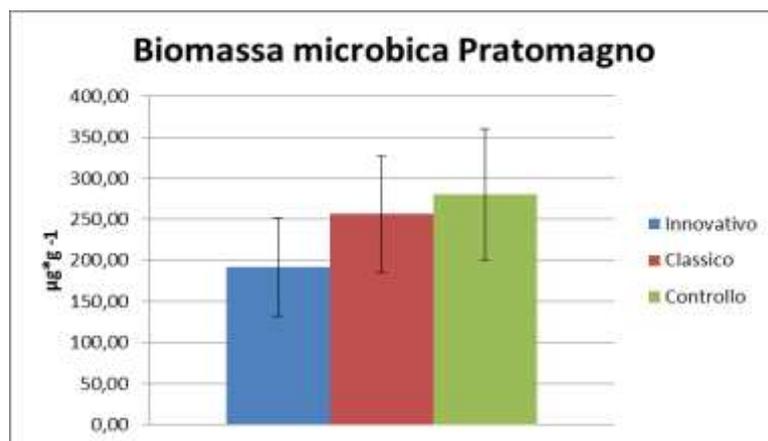


Figura 29: Biomassa microbica Pratomagno

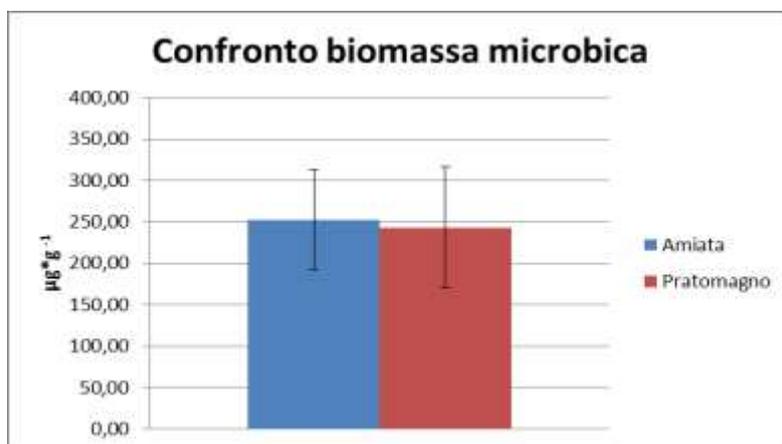


Figura 30: Confronto biomassa microbica

Da tali grafici è possibile osservare che i valori di biomassa, divisi per trattamento, presentino alcune differenze tra di loro, specialmente per il complesso del Pratomagno che appare essere più disomogeneo dell'Amiata.

La motivazione che si può addurre a tali differenze è la maggior eterogeneità dei suoli del Pratomagno e, analogamente a come osservato per la respirazione, il valore superiore è stato riscontrato per le aree predisposte per il controllo, ovvero quelle maggiormente a valle dell'area.

Si ricorda nuovamente che al momento delle analisi (tempo 0) non erano ancora stati effettuati i trattamenti e che quindi le differenze sono date da condizioni insite nei suoli e non a differenti trattamenti.

Nonostante l'eterogeneità di valori all'interno dei due complessi, dal confronto dei valori medi (figura 30) di entrambi si denota come non sussistano sostanziali differenze tra i due, poiché vi è poca differenza tra i valori ottenuti per la biomassa microbica.

3.3.5) Quoziente metabolico (qCO₂)

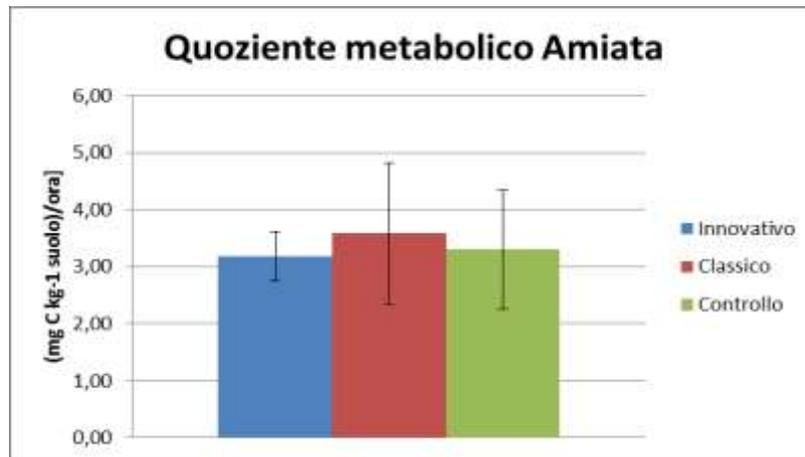


Figura 31: Quoziente metabolico Amiata

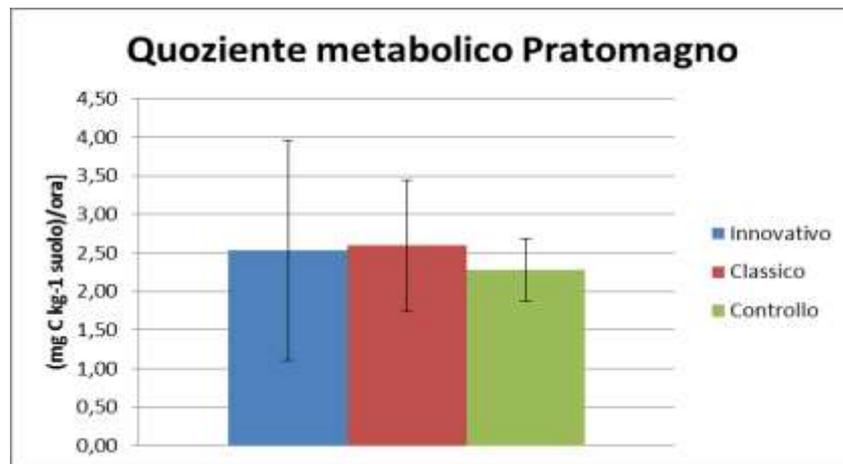


Figura 32: Quoziente metabolico Pratomagno

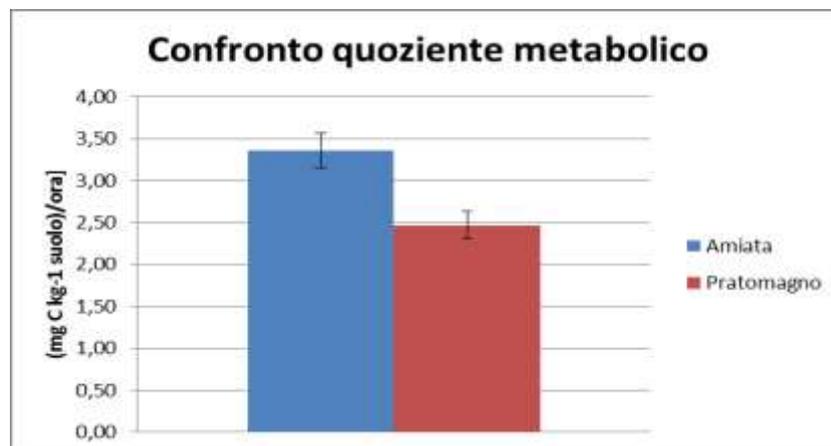


Figura 33: confronto dei quoziente metabolici

A seguito di tutte le analisi e dei risultati ottenuti per studiare la comunità microbica e la sua attività, si possono esprimere alcune deduzioni e conclusioni.

I suoli dell'Amiata mostrano valori di respirazione maggiori, come precedentemente descritto, rispetto a quelli del Pratomagno, nonostante la biomassa microbica non presenti sostanziali differenze tra i due complessi. Tale maggiore attività non può essere neppure attribuita a un maggior valore di TOC all'interno dei suoli poiché, come riportato nel paragrafo 2.4, tale valore risulta essere molto simile, se non addirittura superiore per il complesso del Pratomagno.

Grazie a queste informazioni e al calcolo del quoziente metabolico si possono fare alcune riflessioni per ciò che concerne lo stato di stress dei suoli dei due complessi, sostenendo che i suoli dell'Amiata risultino essere maggiormente *stressati* rispetto a quelli del Pratomagno.

A parità di microrganismi presenti, infatti, i suoli dell'Amiata presentano una maggiore attività microbica e, di conseguenza, respirano maggiormente denotando una condizione di maggiore stress metabolico e una minore efficienza energetica.

3.4) Risultati dendrometrici

Per fornire al lettore un'idea dell'entità dei diradamenti effettuati e di come può risultare la struttura del bosco in seguito a tale processo si riportano le immagini raffiguranti le condizioni di copertura della chioma nelle tre tesi proposte.



Figura 34a: Controllo; assenza di diradamento



Figura 34b: Trattamento classico; diradamento dal basso



Figura 34c: Trattamento innovativo; diradamento selettivo

Con i dati rilevati in bosco, vale a dire diametro ad 1,30m e altezza di ogni individuo, sono stati calcolati i parametri presentati nelle tabelle sottostanti.

PRATOMAGNO						
	Prima del diradamento				Diradamento	
Trattamento	N / ha	G / ha	QMD (cm)	Altezza media (m)	N / ha	G / ha
Selettivo	1045	66,80	28,5	19,7	39,8%	35,9%
Classico (dal basso)	1081	72,50	29,4	20,0	36,9%	23,4%
	Dopo il diradamento					
Trattamento	N / ha	G / ha	QMD (cm)	Altezza media (m)		
Selettivo	629	42,82	29,4	20,3		
Classico (dal basso)	682	55,54	32,2	21,0		
AMIATA						
	Prima del diradamento				Diradamento	
Trattamento	N / ha	G / ha	QMD (cm)	Altezza media (m)	N / ha	G / ha
Selettivo	1033	47,72	24,3	17,1	33,5%	33,3%
Classico (dal basso)	1050	43,30	23,1	17,0	27,5%	19,4%
	Dopo il diradamento					
Trattamento	N / ha	G / ha	QMD (cm)	Altezza media (m)		
Selettivo	687	31,83	24,3	18,2		
Classico (dal basso)	761	34,90	24,2	17,5		

QMD=Quadratic mean diameter= diametro di area basimetrica media

N/ha= numero di piante ad ettaro

G/ha= area basimetrica ad ettaro

Questi parametri sono in grado di fornire informazioni sulla struttura del popolamento sia prima che dopo l'intervento. Da essi infatti si possono dedurre le densità dei vari popolamenti (numero di piante ad ettaro), biomassa presente in termini di area basimetrica e due indici dimensionali come il diametro e l'altezza media, ovvero altezza e diametro corrispondente ad un individuo di area basimetrica media.

Inoltre nel campo "diradamento" si può osservare quale sia stata l'entità del prelievo delle aree, permettendo, soprattutto in futuro, di osservare l'incremento delle dimensioni diametriche nelle differenti ipotesi di trattamento.

Trattandosi di uno schema riassuntivo, per ogni trattamento i valori inseriti nelle tabelle sono dati da una media dei valori ottenuti nelle 3 plots in ciascuna delle 3 aree (quindi una media di nove valori).

Dai risultati dei dati raccolti si può osservare come i popolamenti del Pratomagno siano maggiormente sviluppati dal punto di vista diametrico e di altezza nonostante la densità sia simile nelle due stazioni (Amiata e Pratomagno). Pur tenendo conto della maggior età del popolamento del Pratomagno le differenze riscontrate dimostrano che la densità non è il fattore che influenza principalmente le variazioni diametriche.

La densità del popolamento non influenza in modo marcato lo sviluppo dello stesso, bensì tali differenze negli sviluppi possono essere dovute a parametri climatici o caratteristiche stazionali come l'altitudine, la fertilità del terreno, ed altri fattori.

Nelle aree di studio sottoposte al diradamento classico vi è una sostanziale differenza tra la percentuale di piante ad ettaro rimosse e la percentuale di area basimetrica; ciò sta appunto a sottolineare come si siano tolti molti individui di piccole dimensioni, operazione tipica di tali diradamenti. A conferma di ciò si può osservare come nelle aree trattate secondo il diradamento selettivo, le due percentuali quasi coincidano, il che sottolinea come il prelievo degli individui interessi anche piante con valori di area basimetrica elevati.

Ovviamente le percentuali dei diradamenti, specialmente in termini di area basimetrica, risultano maggiori per le aree del Pratomagno proprio per quanto già detto, ovvero che diametralmente gli individui del Pratomagno risultano di maggiori dimensioni.

La variazione di diametro medio, prima e dopo il diradamento, risultano ovviamente maggiore nel diradamento classico, proprio perché sono stati rimossi gli individui di dimensioni minori.

3.5) Analisi statistica

3.5.1) 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. Indice di Shannon-Weiner ottenuto dall'analisi molecolare con Gel Compare
5. Indice di Simpson ottenuto dall'analisi molecolare con Gel Compare
6. Numero di bande ottenuto dall'analisi molecolare con Gel Compare
7. Biomassa microbica
8. Quoziente metabolico (qCO_2)

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 35: Percentuale di varianza delle due componenti principali

In figura 36 è riportato la disposizione dei campioni di Amiata e Pratomagno rispetto alle due componenti principali in funzione delle variabili inserite. Inoltre, nelle figure 37 e 38 sono riportati i grafici di quanto le variabili "pesino" sulle componenti principali.

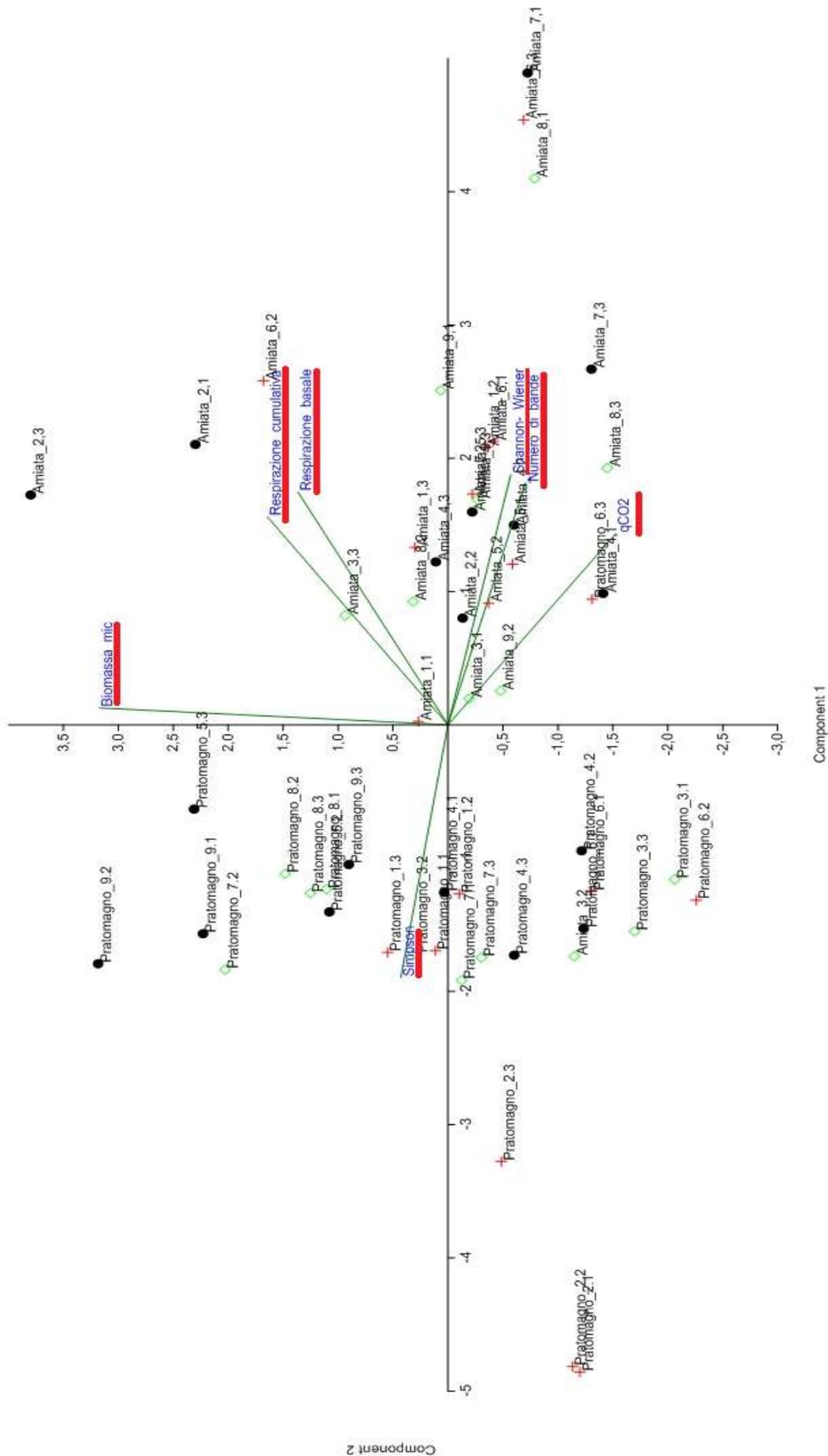


Figura 36: Risultato PCA con variabili inserite (respirazione basale, respirazione cumulativa, indice di Shannon-Weiner, Indice di Simpson, numero di bande, biomassa microbica, quoziente metabolico). La percentuale di varianza delle due componenti principali è di 54,6% per la PC1 e 22,7% per la PC2.

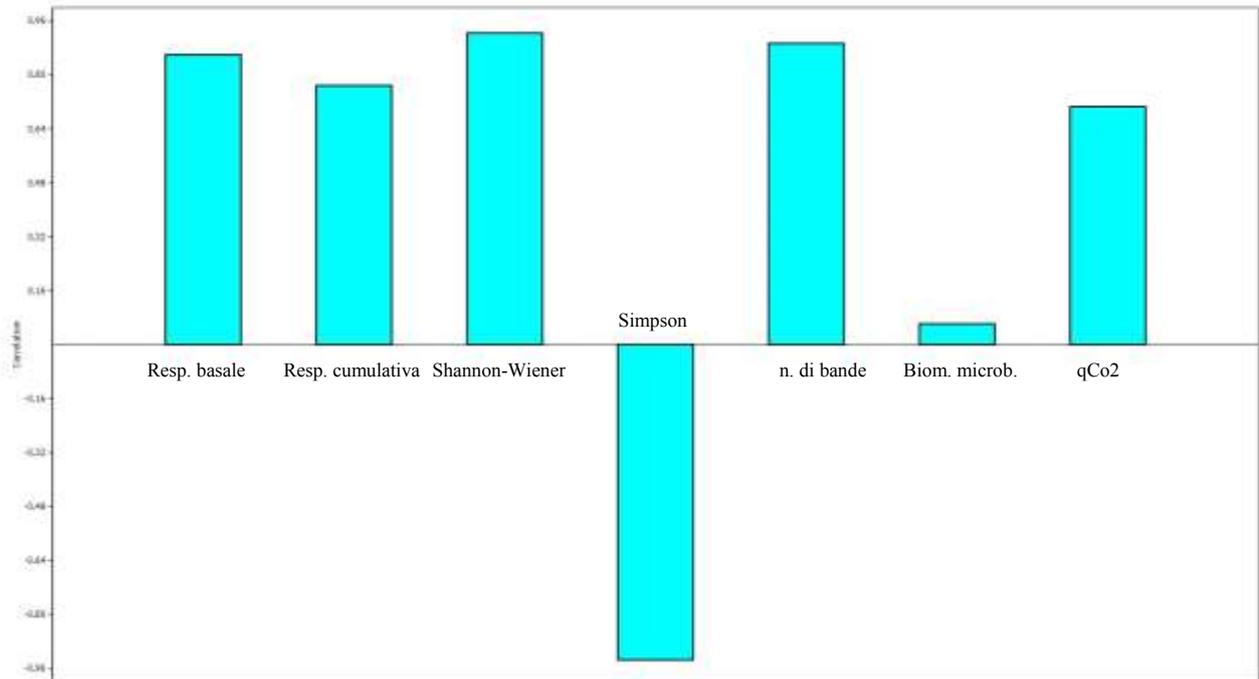


Figura 37: Loadings plots PC1

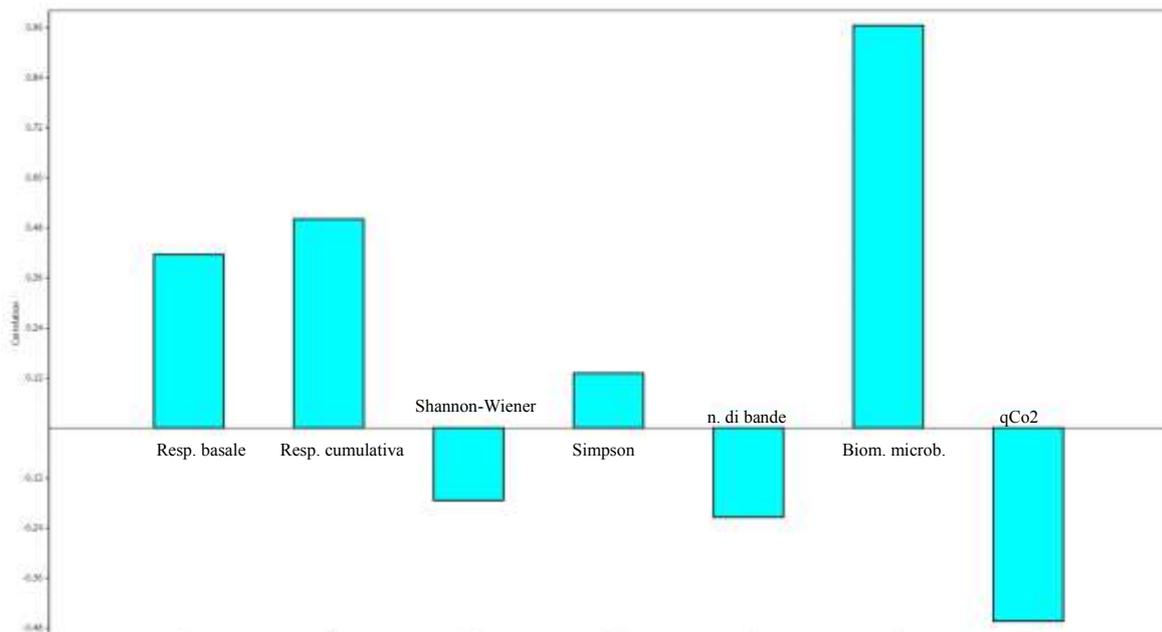


Figura 38: Loading plots PC2

Dai risultati della PCA, riportati nelle figure 36, 37 e 38, si possono fare ulteriori osservazioni in aggiunta a quella già espresse negli altri paragrafi.

Innanzitutto si osservi come vi è una netta separazione tra i campioni del Pratomagno (a sinistra) e quelli dell'Amiata (a destra rispetto all'asse PC2); ciò a conferma che comunque i due complessi sono simili per gli sviluppi storici che hanno avuto ma risultano comunque differenti per moltissimi caratteri.

Per quanto riguarda le variabili considerate, da notare che la biomassa microbica non contribuisca in modo sostanziale alla separazione tra i due complessi poiché difatti non vi sono marcate differenze; viceversa, tutte le altre variabili contraddistinguono l'uno o l'altro complesso.

Ad esempio, le due variabili rappresentanti la respirazione (basale e cumulativa) sono concretamente indirizzate verso i campioni dell'Amiata, proprio a sottolineare la maggior attività microbica del suolo di questo complesso, come osservato nel paragrafo 4.3.. In modo analogo anche il quoziente metabolico presenta valori più elevati nei campioni dell'Amiata, indicandone le maggiori condizioni di stress.

Inoltre gli indici di diversità di Shannon-Weiner e il numero di bande, sottolineano quanto espresso sulla biodiversità dei sistemi, ovvero che i suoli dell'Amiata risultano più ricchi di biodiversità microbica. L'indice di diversità di Simpson, che tiene maggiormente in considerazione la *evenness* del sistema, è orientato invece verso i campioni del Pratomagno dato che, come sottolineato dall'analisi molecolare, in esso è presente minor biodiversità ma vi è una maggior dominanza delle specie presenti.

Sulla componente principale 2 (PC2), ovvero quella che rappresenta maggiormente le differenze intra-campioni, la variabile che incide in modo predominante è la biomassa poiché, come sottolineato precedentemente, essa presenta valori molto eterogenei e quindi distinti per ogni campione. Inoltre anche i valori di respirazione basale e cumulativa sono determinanti per la differenziazione dei *plots* all'interno dei complessi.

La PCA ha perciò confermato le osservazioni che erano state espresse per ogni analisi effettuata.

3.5.2) Analisi della varianza (ANOVA)

L'analisi della varianza permette di confrontare due o più gruppi di dati analizzando la variabilità interna a questi gruppi con la variabilità tra i gruppi, nel tentativo di provare che tali fenomeni trovino spiegazione in caratteristiche proprie del gruppo di appartenenza.

L'analisi della varianza viene effettuata per verificare se le deduzioni e i risultati osservati in questa tesi possano essere generalizzati e che quindi essi non siano soltanto derivati da risultati non significativi e casuali ma da relazioni realmente esistenti e replicabili.

Nella tabella sottostante sono riportate le significatività delle variabili utilizzate nell'analisi della variabilità tra Amiata e Pratomagno. Tale livello di significatività, detto *p-value* indica la probabilità di ottenere un risultato pari o più estremo di quello osservato. Generalmente una serie di dati viene detta statisticamente significativa da un'altra se il suo valore *p* è minore o uguale a 0,05 (ovvero il 5%). In tal caso significa che vi è il 95 % di possibilità di ottenere gli stessi risultati ripetendo lo studio e che, di conseguenza, le differenze rilevate sono statisticamente significative.

Variabile	Sig.
Cbas	0,0000
Ccum	0,0003
Shannon	0,0000
Simpson	0,0000
Cmic	0,6826
Richness	0,0000
qCO2	0,0012

Dalla tabella è possibile osservare come tutte le variabili siano statisticamente significative per distinguere i campioni dell'Amiata e del Pratomagno, fatta eccezione per la biomassa microbica. Tale variabile, difatti, presenta valori molto eterogenei (varianza elevata) ed un'elevata deviazione standard, di conseguenza non risulta utile per poter differenziare i due sistemi analizzati.

Nelle figure sottostanti, dalla 39 alla 45, sono invece riportati i grafici della variabilità dei campioni rispetto a tutte le variabili prese in considerazione. In seguito ad una analisi post hoc, effettuata con la procedura di Tukey, è stato possibile confrontare i campioni tra di loro e poterli suddividere in base alla loro somiglianza, creando così dei sottoinsiemi e verificando l'esistenza di una variabilità interna ai gruppi e/o tra i gruppi.

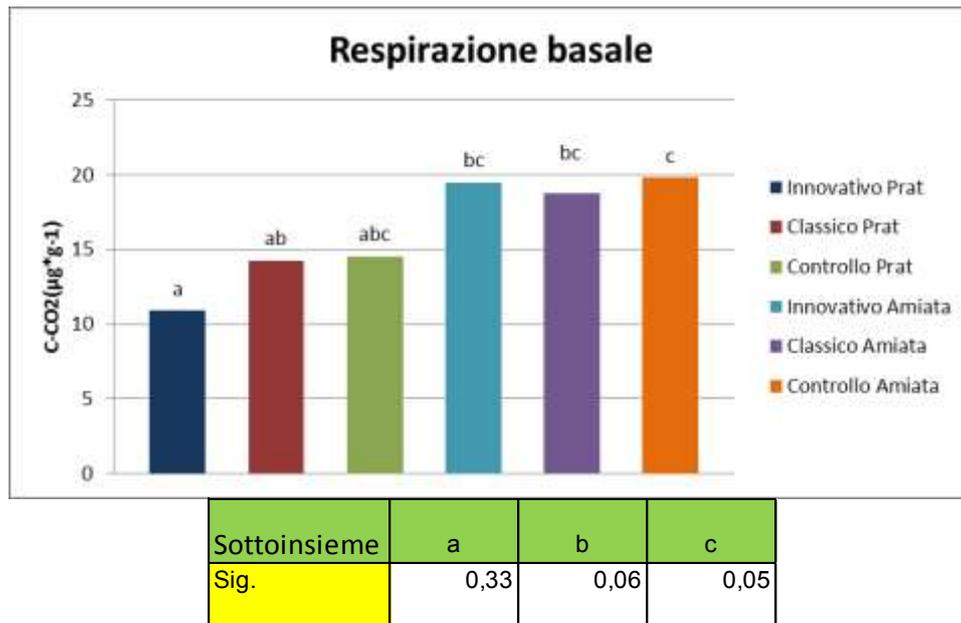
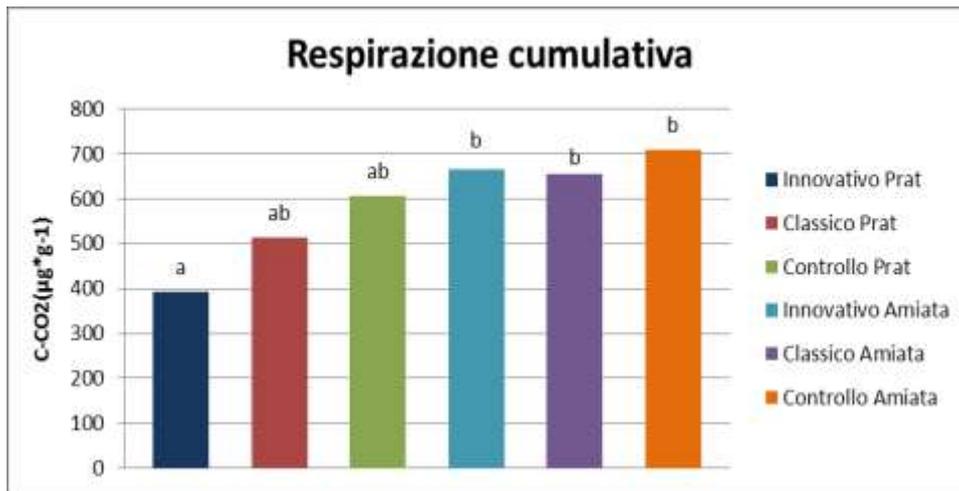


Figura 39: Valori della respirazione basale per i tre trattamenti nelle due aree; le lettere rappresentano la diversa significatività calcolata con il test di ANOVA (metodo di Tukey, $p < 0,05$). Nel riquadro sottostante sono riportati i valori della significatività intra-gruppo

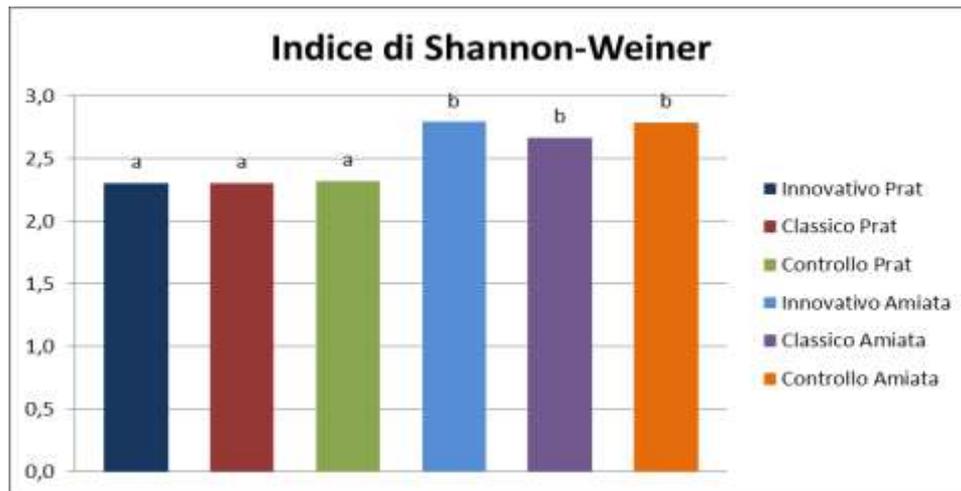
Dalla figura 39 si può notare come i valori della respirazione basale siano piuttosto eterogenei tra di loro, specialmente per i campioni del Pratomagno. Dall'analisi della varianza i campioni possono essere raggruppati in tre sottoinsiemi; da ciò si può sostenere come con la respirazione basale non si riesca separare i due complessi Amiata e Pratomagno e che quindi essa non sia strettamente correlata all'area dove è stata rilevata. Infatti, tutti i campioni dell'Amiata sono presenti nel sottoinsieme "c", di cui due anche nel sottoinsieme "b" mentre il Pratomagno risulta maggiormente eterogeneo presentando tre campioni appartenenti ai sottoinsiemi in modo molto differente. Inoltre il *p-value* dei sottoinsiemi b e c risulta essere particolarmente basso, a differenza del valore del sottoinsieme a, sottolineando perciò come sia difficile suddividere in modo adeguato i campioni in base a due complessi distinti e che perciò il grado di diversità risulta particolarmente elevato.



Sottoinsieme	a	b
Sig.	0,06	0,11

Figura 40: Valori respirazione cumulativa per i tre trattamenti nelle due aree; le lettere rappresentano la diversa significatività calcolata con il test di ANOVA (metodo di Tukey, $p < 0,05$). Nel riquadro sottostante sono riportati i valori della significatività intra-gruppo

Dall'analisi della respirazione cumulativa (figura 40) si osserva che, anche in questo caso, i campioni dell'Amiata sono riuniti in un unico sottoinsieme e che non vi sia molta diversità tra loro ($p\text{-value}=0,11$). Viceversa i campioni del Pratomagno risultano molto differenti gli uni dagli altri ed il sottoinsieme che li contraddistingue (a) ha un $p\text{-value}$ molto basso, vicino alla soglia minima di 0,05. Come più volte sottolineato, il Pratomagno si conferma essere, tra i due sistemi, quello maggiormente eterogeneo.



Sottoinsieme	a	b
Sig.	1,00	0,37

Figura 41: Valori dell'indice di Shannon-Weiner ottenuti dall'analisi molecolare per i tre trattamenti nelle due aree; le lettere rappresentano la diversa significatività calcolata con il test di ANOVA (metodo di Tukey, $p < 0,05$). Nel riquadro sottostante sono riportati i valori della significatività intra-gruppo

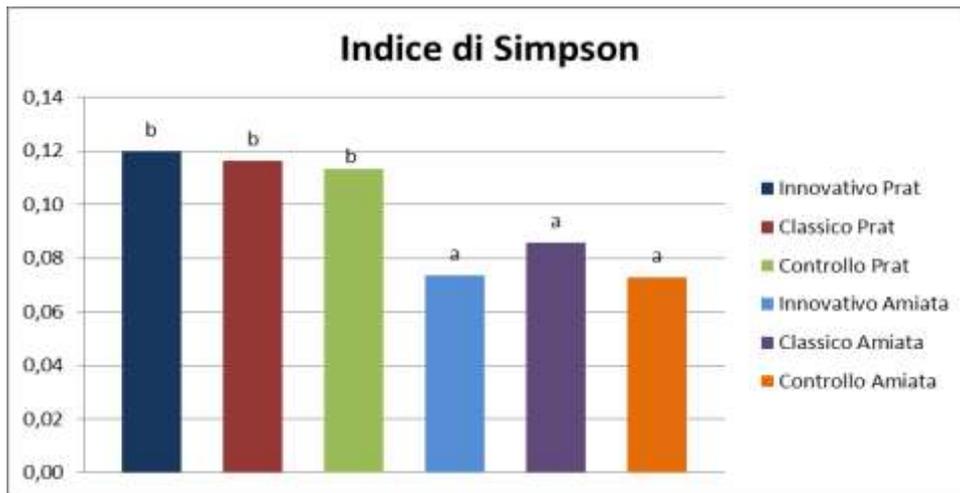
Gli indici di diversità ottenuti dall'analisi molecolare, contrariamente alle variabili precedenti, suddividono in modo molto netto e significativo i due sistemi di Amiata e Pratomagno.

L'indice di Shannon-Weiner suddivide i campioni in modo marcato, in particolar modo i campioni del Pratomagno (gruppo a) che presentano una elevata omogeneità interna e sono ben distinti da quelli dell'Amiata (gruppo b). Il gruppo b tuttavia presenta una maggior diversità al suo interno ma ben più alta della soglia minima di 0,05.

La stesse considerazioni possono essere espresse per la varianza della *bacterial richness* dei due sistemi (figura 43); anche in questo caso la suddivisione dei due sistemi è netta e la varianza intra-gruppo è molto bassa.

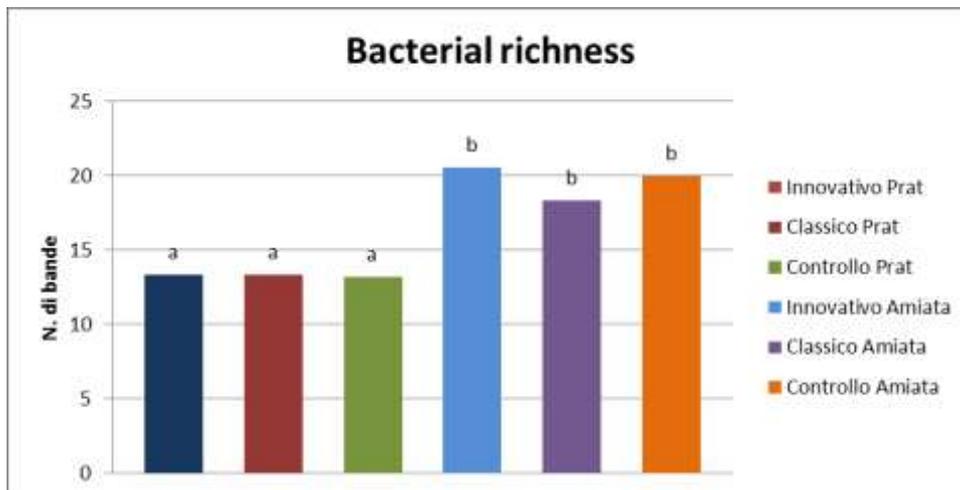
Si osservi, in figura 42, come tale suddivisione sia nuovamente marcata, ma in tal caso i campioni del Pratomagno presentano valori maggiori per tale indice poiché, come precedentemente sottolineato, esso tiene maggiormente in considerazione la maggior *evenness* del sistema Pratomagno.

Anche in questo caso il *p-value* delle differenze rilevate tra i campioni del Pratomagno ha un valore maggiore, proprio per sottolineare la loro minore varianza.



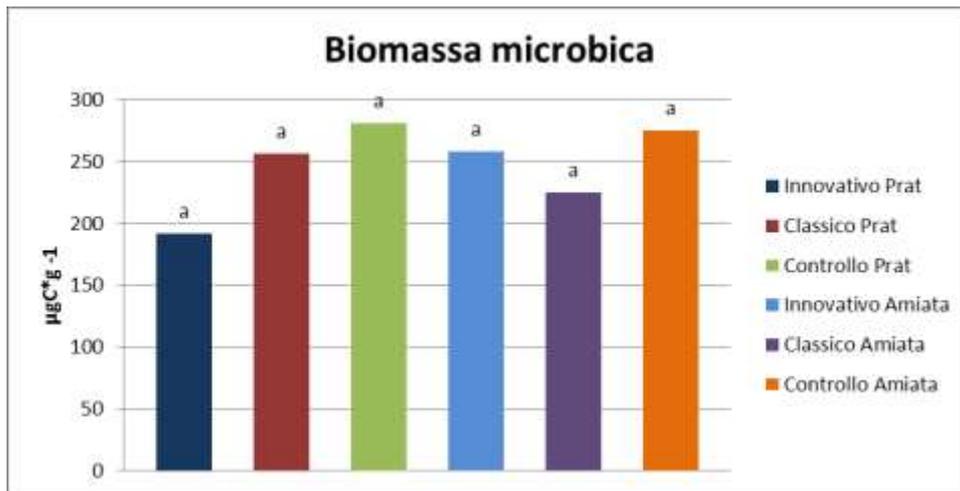
Sottoinsieme	a	b
Sig.	0,37	0,92

Figura 42: Valori dell'indice di Simpson ottenuti dall'analisi molecolare per i tre trattamenti nelle due aree; le lettere rappresentano la diversa significatività calcolata con il test di ANOVA (metodo di Tukey, $p < 0,05$). Nel riquadro sottostante sono riportati i valori della significatività intra-gruppo.



Sottoinsieme	a	b
Sig.	1,00	0,29

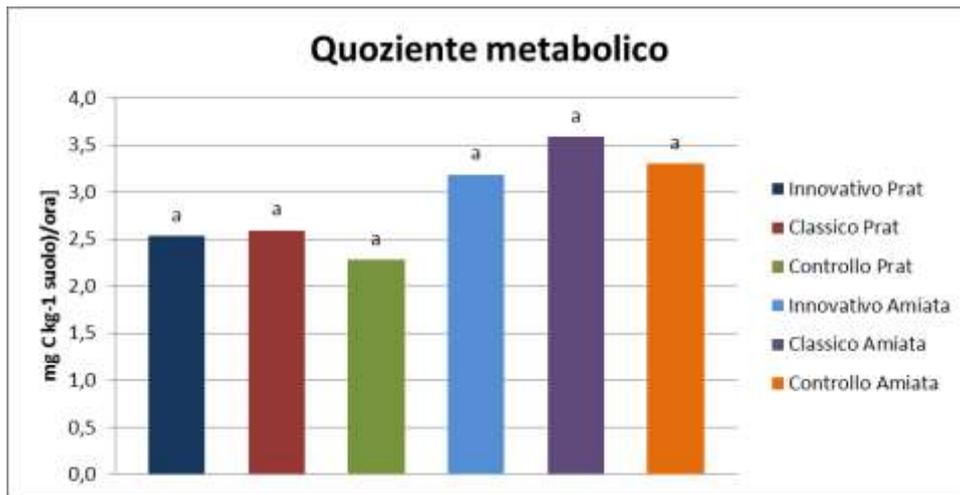
Figura 43: Valori del numero di bande (*bacterial richness*) ottenuti dall'analisi molecolare per i tre trattamenti nelle due aree; le lettere rappresentano la diversa significatività calcolata con il test di ANOVA (metodo di Tukey, $p < 0,05$). Nel riquadro sottostante sono riportati i valori della significatività intra-gruppo.



Sottoinsieme	a
Sig.	0,22

Figura 44: Valori della biomassa microbica per i tre trattamenti nelle due aree; le lettere rappresentano la diversa significatività calcolata con il test di ANOVA (metodo di Tukey, $p < 0,05$). Nel riquadro sottostante sono riportati i valori della significatività intra-gruppo.

I risultati della biomassa microbica non mostrano differenze statisticamente significative e, come si osserva in figura 44, non è stato possibile individuare alcun sottoinsieme differente. I valori di biomassa sono infatti molto simili tra di loro e presentano inoltre una deviazione standard elevata. Inoltre i risultati della biomassa microbica sottolineano come, per questo parametro, i due sistemi risultino simili. Essi infatti sono entrambi due sistemi forestali indisturbati ed in equilibrio, dove l'impatto dell'uomo risulta simile e dove quindi la biomassa microbica non presenta particolari variazioni. Di conseguenza, in questo momento, tale parametro non può essere utilizzato come tratto distintivo di uno o dell'altro sistema. Nei rilievi e risultati che si avranno in futuro, in seguito ai diradamenti, sarà possibile osservare delle probabili differenze.



Sottoinsieme	a
Sig.	0,07

Figura 45: Valori del quoziente metabolico per i tre trattamenti nelle due aree; le lettere rappresentano la diversa significatività calcolata con il test di ANOVA (metodo di Tukey, $p < 0,05$). Nel riquadro sottostante sono riportati i valori della significatività intra-gruppo.

Per quanto riguarda il quoziente metabolico, l'analisi della varianza non ha mostrato sostanziali diversità dal punto di vista statistico, raggruppando tutti i campioni in un unico sottoinsieme; va però sottolineato che il *p-value* ottenuto in questa analisi è di 0,07 e di conseguenza molto vicino alla soglia minima dello 0,05. In questo caso potremmo sostenere infatti che esiste una certa *trend* della diversità, se pur non così netta, all'interno dei dati.

Va altresì considerato che tali valori possono non essere significativi dal punto di vista statistico, ma dal punto di vista biologico anche una piccola variazione di questo quoziente costituisce grandi differenze per ciò che concerne la qualità del suolo e il suo funzionamento. Inoltre tale quoziente è ottenuto tramite il rapporto respirazione basale su biomassa, dove la biomassa microbica ha un peso notevole sul risultato; di conseguenza, essendo i valori di biomassa molto eterogenei tra di loro, influenzano anche i risultati di questo quoziente.

4) Conclusioni

Allo stato attuale, nelle aree di saggio dell'Amiata e del Pratomagno, il 15 Giugno 2015 sono stati effettuati i diradamenti previsti, come prescritto in seguito alla martellata. Si rimanda perciò a studi futuri per ulteriori conclusioni e risultati che potranno essere ottenuti esclusivamente con lo sviluppo e la modificazione dei sistemi in seguito agli interventi selvicolturali.

Questo studio sarà fondamentale nell'arco del progetto Selpibiolife per poter monitorare l'intero sistema nel tempo e considerare tutte le variabili in esso coinvolte; difatti, come precedentemente introdotto, si suppone che il sistema nel suo complesso trarrà giovamento dai trattamenti effettuati, migliorandosi sotto molteplici aspetti.

Le analisi preliminari effettuate in questa tesi hanno fornito informazioni fondamentali sullo stato attuale dei due sistemi, permettendone il confronto su molteplici scale. Tutti i fattori che sono stati analizzati concorrono allo sviluppo del soprassuolo e saranno influenzati, in modo differente, dai trattamenti applicati.

Con i risultati ottenuti si possono effettuare delle prime ipotesi sul potenziale sviluppo dei due complessi.

Innanzitutto l'attuale presenza di rinnovazione di specie arboree ed arbustive nel sottobosco nel complesso dell'Amiata fa supporre che il processo di rinnovazione delle specie autoctone possa essere maggiormente favorito.

Per quanto concerne la biodiversità, sia a livello di bosco che di suolo, il complesso dell'Amiata risulta essere maggiormente ricco in biodiversità, anche grazie alle condizioni climatiche più miti; per tale ragione si può supporre che dai diradamenti tali componenti ne potranno trarre dei benefici.

Nonostante il complesso del Pratomagno sia caratterizzato da un minore livello biodiversità, la sua efficienza risulta maggiore, sia in termini di dimensioni degli individui arborei, sia per le minori condizioni di stress del suolo; da ciò ne consegue che con l'attuazione dei diradamenti tale sistema trarrà sicuramente beneficio dal punto di vista degli accrescimenti ed inoltre il suolo, grazie anche all'apertura di *gaps* nella copertura, riuscirà ad accrescere la propria biodiversità.

5) Bibliografia

- Alexander, M. (1977). Introduction to soil microbiology (No. Ed. 2). John Wiley & Sons..
- Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.H., (1995) *Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation*. Microbiol Rev. 59(1):143-69.
- Amorini E., (1983). *Prove di diradamento nella pineta di pino nero di Monte della Modina sull'Appennino Toscano*. Annali Istituto Sperimentale per la Selvicoltura, 14: 101-148.
- 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.
- Bakken, L. R., van Elsas, J. D., Trevors, J. T., & Wellington, E. M. H. (1997). Culturable and nonculturable bacteria in soil. *Modern soil microbiology.*, 47-61.
- Benedetti A., Mocali S. (2008), *Analisi a livello di suolo, in Indicatori di biodiversità per la sostenibilità in agricoltura*, Roma, ISPRA, 159-208.
- Bloem, J.; Didden, W.A.M.; Jagers op Akkerhuis, G.A.J.M.; Keidel, H.; Rutgers, M.; Breure, T. (2004), *Measuring soil biodiversity: experiences, impediments and research needs*. In: *Agricultural impacts on soil erosion and soil biodiversity: developing indicators for policy analysis*. - Rome (Italy) : Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante, 2004 - p. 109 - 120.
- Bloem, J., Hopkins, D. W., & Benedetti, A. (Eds.). (2005), *Microbiological methods for assessing soil quality*. CABI.
- Bottalico F., Brundu P., Moriondo M., Nocentini S. , Puletti N., Travaglini D., (2012), *Natural regeneration and Climate Change adaptation in Pinus nigra Arn. stands from reforestation projects*. International Conference Tours 2012 – Tackling climate change: the contribution of forest scientific knowledge.
- Bussotti F. (2002). *Pinus nigra Arnold*. In: *“Pines of Silvicultural Importance*. CABI Publishing, Wallingford, UK: 266-286 .

- Cantiani P. (2012). *Pinete di pino nero in Toscana- Norme sul trattamento in ordine alle normative vigenti*. Sherwood 184: 15-20.
- Cantiani P., Piovosi M. (2009), *La gestione dei rimboschimenti di pino nero appenninici. I diradamenti nella strategia di rinaturalizzazione*. Annali CRA-SEL, 35:35-42.
- Cantiani P., Plutino M. (2009), *Le pinete di impianto di pino nero. Indagini sperimentali sul trattamento selvicolturale*. Atti del Terzo Congresso Nazionale di Selvicoltura. Taormina (ME) 16-19 ottobre 2008: 1465-1471.
- Castaldini M.. (2010), *DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)*. In: *Metodi di analisi molecolare per lo studio dei microrganismi del suolo*. Mocali S., Miclaus N. (eds). Osservatorio Nazionale Pedologico per la Qualità del Suolo Agricolo e Forestale pp.155-173.
- Ciancio O., Corona P., Marchetti M., Nocentini S., (2002), *Teoria della gestione sostenibile delle risorse ambientali e forestali*. In *Linee guida per la gestione sostenibile delle risorse forestali e pastorali nei Parchi Nazionali*, Ed. a cura del Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio - Accademia Italiana di Scienze Forestali.
- Curtis, T. P., & Sloan, W. T. (2005), *Exploring microbial diversity-A vast below*. Science, 309(5739), 1331-1333.
- De Meo I., Cantiani P., Becagli C., Bianchetto E., Cazau C., Mocali S., Salerni E. (2015), *I diradamenti come strumento per incrementare la biodiversità nei rimboschimenti di pino nero: un'esperienza in Toscana*. Article in press.
- Felske A., Wolterink A., Van Lis L., Akkermans A.D.L., (1998). "Phylogeny of the main bacterial 16S rRNA sequences in Drentse A grassland soils (The Netherlands)". Appl.Env.Microb. 64: 871-879.
- Fierer, N., & Jackson, R. B. (2006). *The diversity and biogeography of soil bacterial communities*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103(3), pp. 626-631.
- Gellini R., Grossoni P., (1996). *Botanica forestale*. Volume 1. Gimnosperme CEDAM Editore, Milano, pp 160-170.

- Gelsomino A. (2010), *Amplificazione del 16S rDNA mediante reazione a catena della polimerasi (PCR)*. In: *Metodi di analisi molecolare per lo studio dei microrganismi del suolo*. Mocali S., Miclaus N. (eds). Osservatorio Nazionale Pedologico per la Qualità del Suolo Agricolo e Forestale pp.105-110
- Inventario Nazionale delle Foreste e dei Serbatoi forestali di Carbonio” (INFC) 2005.
- Isermeyer, H. (1952). Eine einfache Methode zur Bestimmung der Bodenatmung und der Karbonate im Boden. *Zeitschrift für Pflanzenernährung, Düngung, Bodenkunde*, 56(1- 3), 26-38.
- Loreau, M., Naeem, S., Inchausti, P., Bengtsson, J., Grime, J.P., Hector, A. et al. (2001), *Biodiversity and ecosystem functioning: current knowledge and future challenges*. *Science*, 294, 804–808.
- Martín-Benito D., Del Río M., Heinrich I., Helleb, G., Cañellasa I., (2010), *Response of climate-growth relationships and water use efficiency to thinning in a Pinus nigra afforestation*. *Forest Ecology and Management*, Vol. 259, Issue 5, pp 967–975.
- Martin-Laurent F., Philippot L., Hallet, S., Chaussod R., Germon J.C., Soulas G. & Catroux G. (2001). *DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 2354–2359.
- Mercurio R., (2003) – *La rinaturalizzazione dei rimboschimenti: tra aspettative e realtà scientifica*. Atti del III Congresso SISEF Meridiani Foreste, Potenza: 19 – 25.
- Mercurio R. (2010), *Restauro della foresta mediterranea*. Clueb, 368pp.
- Mercurio R., Mallamaci C., Muscolo A., Sidari M (2009), *Effetti della dimensione delle buche sulla rinnovazione naturale in rimboschimenti di pino nero*. *Forest@* vol. 6: 312-319.
- Mocali S., Benedetti A. (2010), *Exploring research frontiers in microbiology: the challenge of metagenomics in soil microbiology*. *Res Microbiol*. 2010 Jul-Aug;161(6): pp.497-505.
- Muyzer, G. & Smalla, K. 1998. *Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology*. *Antonie van Leeuwenhoek*, *International Journal of General and Molecular Microbiology*, 73, 127–141.
- Nannipieri P., Ascher J., Ceccherini M. t., Landi L., Pietramellara G. Renella G., (2003). *Microbial diversity and soil functions*. *European journal of soil science*, vol. 54, pp. 655-670.

- Nocentini S. (2001), *La rinaturalizzazione come strumento di recupero dei sistemi forestali semplificati nell'Italia Meridionale*. L'Italia Forestale e Montana, LVI (5): 344-351.
- Nocentini S., Puletti N., (2009), *La rinaturalizzazione dei rimboschimenti. Prova sperimentale su un popolamento di pino nero e laricio*. Atti del Terzo Congresso Nazionale di Selvicoltura per il miglioramento e la conservazione dei boschi italiani. 16-19 ottobre 2008, Taormina (Messina) ed. Accademia Italiana di Scienze Forestali, vol. I: 217-227. Firenze – 2009.
- Olsen, G. J., & Woese, C. R. (1993). *Ribosomal RNA: a key to phylogeny*. The FASEB journal, 7(1), 113-123.
- Pankhurst, C.E., Doube, B.M., Gupta, V.V.S.R. (1997), *Biological indicators of soil health: Synthesis*. In: Biological Indicators of Soil Health (eds C.E. Pankhurst, B.M. Doube & V.V.S.R. Gupta), pp. 419–435. CAB International, Wallingford.
- 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.
- Piermattei A, Renzaglia F, Urbinati C (2012). *Recent expansion of Pinus nigra Arn. above the timberline in the central Apennines, Italy*. Annals of Forest Science 69 (4): 509-517.
- Piovanelli C., Gamba C., Batistoni E., (2004), *Valutazione della stabilità e funzionalità degli ecosistemi tellurici in rimboschimenti di Pinus Nigra tramite indicatori biologici del suolo*. Congresso Ri.Selv.Italia.
- Piussi P., (1986), *Diradamenti e stabilità dei soprassuoli*. Monti e Boschi Vol. 4: 9-13.
- Prescott C. E., Grayston S.J. (2013). *Tree species influence on microbial communities in litter and soil: Current knowledge and research needs*. Forest ecology and management, 309:19-27.
- Regione Toscana, 2003 – *Regolamento Forestale della Toscana*. 8 agosto 2003 n° 48/R.
- Seybold, C.A., Herrick, J.E. & Brejda, J.J. (1999), *Soil resilience: a fundamental component of soil quality*. Soil Science, 164, 224–234.
- Tiedje, J. M., Cho, J. C., Murray, A., Treves, D., Xia, B., Zhou, J. (2001), *Sustainable management of soil organic matter*. In: *Sustainable management of soil organic matter*; issue 6, pp. 393-412; CAB International, Wallingford.

- Thoms, C., Gattinger, A., Jacob, M., Thomas, F. M., & Gleixner, G. (2010). *Direct and indirect effects of tree diversity drive soil microbial diversity in temperate deciduous forest*. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(9), pp. 1558-1565.
- Torsvik V., Goksøyr J., Daae F.L. (1990). High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:782-787.
- Vance, E. D., Brookes, P. C., & Jenkinson, D. S. (1987). *An extraction method for measuring soil microbial biomass C*. *Soil biology and Biochemistry*, 19(6), 703-707.

6) Ringraziamenti

Molte persone sono state fondamentali, in differenti modi, per la realizzazione di questa tesi.

Vorrei ringraziare innanzi tutto i colleghi del CREA- ABP di Piazza d'Azeglio per l'aiuto ed il sostegno fornitomi; mi hanno veramente insegnato come si opera nel mondo scientifico e quanto lavoro ci sia dietro a progetti che spesso vengono riassunti in articoli di poche pagine.

Mi hanno formato, non solo dal punto di vista accademico, seguendomi in modo accurato e paziente, ma anche dal punto di vista umano; prima di trovare dei colleghi ho trovato degli amici.

Ringrazio perciò Stefano, Isabella, Elisa, Maurizio, Carolina, Roberta, Alessandro, Alessandra e gli altri colleghi del CREA-ABP e del Centro di Ricerca per la Selvicoltura di Arezzo. Ringrazio in particolar modo Arturo che mi ha seguito, insegnato e sostenuto anche con troppa (o troppa poca) pazienza.

Un ringraziamento al Professore Pietramellara, per la disponibilità dimostrata e per aver "rotto gli schemi" del mio pensiero forestale con il suo insegnamento, dimostrandomi in modo tangibile come il bosco e la natura siano veramente "multidisciplinari".

Inoltre ringrazio "Babbo" e "Mamma", Fabiola, mio fratello e mia cognata per avermi supportato, sopportato e per essersi interessati al mio lavoro.

Infine ringrazio i miei amici del Corso di Laurea per gli splendidi cinque anni che abbiamo passato insieme; vorrei scrivere tutti i loro nomi ma, per fortuna, sono tanti.

Un sentito GRAZIE a tutti per aver reso possibile, a vostro modo, tutto ciò.