

ALESSANDRO CASAGLI, ROBERTA PASTORELLI, ALESSANDRA LAGOMARSINO

# *Cambiamenti nella composizione fungina e nell'attività enzimatica durante la decomposizione della necromassa in mesocosmi*



*Changes in fungal composition and enzymatic activity during the deadwood decomposition in mesocosms.*

## *1. Introduzione*

La necromassa rappresenta una componente fondamentale dell'ecosistema forestale, la cui importanza dal punto di vista gestionale è stata riconosciuta a pieno titolo negli ultimi anni, in particolare da quando si è affermato a livello internazionale il concetto di Gestione Forestale Sostenibile (GFS). In passato, secondo i canoni classici della selvicoltura tradizionale, la presenza di alberi morti in bosco ha sempre rappresentato un fenomeno di disturbo sia per motivi fitosanitari (LA FAUCI *et al.*, 2006), sia per il maggior rischio d'incendi (CAMIA *et al.*, 2006).

Oggi, grazie all'inserimento della necromassa presente in bosco fra gli indicatori pan-europei di GFS e alla maggiore sensibilità della società nei confronti della biodiversità, questa componente è stata rivalutata mettendone in luce anche gli aspetti positivi (MARCHETTI E LOMBARDI, 2006).

La necromassa può essere considerata un insieme di diversi microhabitat che evolvono continuamente nel tempo e che, per una corretta gestione, devono essere ben conosciuti e distinti anche in relazione alle specie ad essi associate (WWF, SWITZERLAND 2004).

Inoltre, è definita dal *Global Forest Resources Assessment 2005* come tutta la biomassa legnosa non vivente, non contenuta nella lettiera, sia essa in piedi, a terra o nel suolo (FAO, 2004); questa viene comunemente suddivisa in tre principali componenti: le piante morte in piedi, le ceppaie e il legno morto a terra (HARMON E SEXTON, 1996). La necromassa gioca

quindi un ruolo chiave negli ecosistemi forestali: stocca il carbonio, migliora l'efficienza idrogeologica dei versanti proteggendoli dall'erosione, contribuisce alla conservazione della diversità biologica e incrementa la produttività complessiva della foresta (MARCHETTI E LOMBARDI, 2006). In particolar modo la funzione di fissazione temporanea del carbonio ha richiamato l'attenzione del mondo scientifico da quando questa componente è stata inclusa nei cinque *pools* (biomassa epigea e ipogea, necromassa, lettiera e suolo) che possono essere contabilizzati nel bilancio nazionale relativo allo stoccaggio d'anidride carbonica dei soprassuoli forestali da parte dei paesi firmatari del Protocollo di Kyoto (UNEP, 1997).

I principali decompositori del legno morto sono funghi, insetti, batteri ed enzimi. I funghi, in particolare i saporilici (cioè i funghi del marciume bianco, bruno e del marciume molle) svolgono importanti ruoli nei processi di decomposizione e mineralizzazione del legno morto riciclando i nutrienti in varie forme per renderli accessibili ad altri organismi (WEI E DAI, 2004). Gli insetti xilofagi provvedono alla frammentazione fisica del legno attraverso l'apparato masticatore; i batteri interagiscono con i funghi nella decomposizione e, in particolare, gli azotofissatori arricchiscono il substrato di azoto. Gli enzimi rappresentano i catalizzatori necessari a velocizzare le reazioni biologiche e sono classificati anche per la posizione in cui si trovano (KUNITO *et al.* 2001): enzimi intracellulari ed enzimi extracellulari.

Gli obiettivi del presente studio sono quelli di approfondire le conoscenze sulla composizione delle comunità fungine e delle attività enzimatiche implicate nel processo di degradazione della necromassa, valutandone l'influenza su varie componenti provenienti da soprassuoli di *Pinus nigra* quali: suolo, lettiera e necromassa a vari stadi di decomposizione.

## 2. Materiali e metodi

### 2.1 L'area sperimentale

I campioni di suolo, necromassa e lettiera utilizzati ai fini del presente studio, sono stati raccolti da mesocosmi (sezioni di tubi in pvc di 30 cm di diametro e 20 cm di altezza) allestiti nell'area sperimentale del progetto Life-FoResMit (Recupero di foreste degradate di conifere per il ripristino della sostenibilità e la mitigazione dei cambiamenti climatici) nella foresta periurbana di Monte Morello, nel comune di Sesto Fiorentino (FI). Gli aspetti vegetazionali del complesso di Monte Morello sono il risultato di rimboschimenti attuati all'inizio del XX secolo e conclusosi agli inizi degli anni '80. Le specie utilizzate per i rimboschimenti sono state prevalentemente conifere, come il *Cupressus sempervirens* L. e *Pinus nigra* J.F.Arnold che sono servite fino ad oggi da pioniere di una successione selvicolturale ai fini della rinaturalizzazione del soprassuolo con specie autoctone, per lo più quercine.



Figura 1 - Disposizione dei mesocosmi in campo.

L'allestimento di tali mesocosmi (figura 1), situato in una zona a prevalenza di pino nero, aveva come obiettivo quello di analizzare *in-situ* la velocità di degradazione della necromassa di pino nero e le emissioni di CO<sub>2</sub> in atmosfera dovute alla decomposizione del legno. I mesocosmi (tre repliche per 5 classi di decomposizione della necromassa più tre repliche prive di necromassa come controllo, per un totale di 18 mesocosmi) erano delimitati da dei collari costituiti da sezioni di tubi in pvc di 30 cm di diametro e 20 cm di altezza inseriti nel terreno e posizionati a una distanza di 60 cm sulla fila e 100 cm tra le file (PACINI *et al.*, 2019). La classe di decomposizione della necromassa era stata assegnata mediante una valutazione visiva prendendo in considerazione la struttura della corteccia, la presenza di piccoli rami, la consistenza del legno, l'estensione del marciume e lo sviluppo del micelio fungino, impiegando il sistema a 5-classi di decadimento proposto da HUNTER (1990) e modificato da PALETTO E TOSI (2010) (tabella 1).

Classe	Condizione Corteccia	Presenza di rami piccoli	Consistenza legno	Altre caratteristiche visive
1	Intera e attaccata	Presenti	Intatta	Piccole aree di marciume sottocorteccia
2	Intera ma distaccata	Parzialmente presenti	Intatta	Aree di marciume < 3 cm
3	Frammenti distaccati	Assenti	Parzialmente in frammenti	Aree di marciume > 3 cm
4	Assente	Assenti	In frammenti	Ampie aree di marciume
5	Assente	Assenti	In polvere	Ampie aree di marciume, muschi, licheni e corpi fruttiferi fungini

Tabella 1 - Caratteri visivi impiegati per l'assegnazione della classe di decomposizione del legno morto a terra.

## 2.2 Campionamento

Trascorsi due anni dall'allestimento dei mesocosmi, è stata effettuata la raccolta dei campioni delle diverse frazioni di suolo, lettiera e necromassa. Il suolo è stato campionato a due profondità, 10-30 e 0-10 cm tramite un carotatore. I campioni di lettiera sono stati raccolti e successivamente suddivisi in 3 diverse frazioni: frazione H (*Humified*) in cui era presente materiale amorfo e completamente degradato, frazione F (*Fragmented*) in cui erano riconoscibili miceli e radici; frazione L (*Leaf*) strato in cui il materiale è indecomposto o solo leggermente frammentato, con aspetto fresco e lievemente scolorito. Il suolo prelevato alle due profondità è stato inserito in buste di plastica sterili a chiusura ermetica e tutti i campioni sono stati conservati tal quali a -20°C fino al momento dell'estrazione del DNA.

I campioni di necromassa sono stati prelevati con un trapano a batteria con una punta progettata appositamente per estrarre cilindri in legno di 3 cm di diametro e conservati in buste di plastica sterili a -20 °C fino al momento dell'estrazione del DNA.

I campioni di lettiera e necromassa sono

stati triturati utilizzando un molino analitico Fritsch Pulverisette alla velocità di 1500 rpm min<sup>-1</sup>, fino ad ottenere una finezza di 0,5 mm e conservati in buste di plastica sterili a -20°C fino al momento dell'estrazione del DNA.

## 2.3 Caratteristiche chimiche

Per la determinazione del contenuto totale di carbonio organico (TOC) e azoto (TN), i campioni delle diverse componenti del mesocosmo (suolo, lettiera e necromassa) sono stati prima passati in un setaccio con maglie di 2 mm e poi per ognuno sono stati prelevati circa 10 g di materiale che è stato omogeneizzato in un mortaio a 0,5 mm. Di ogni campione sono stati pesati 20 mg in capsule di stagno. Il C organico dei campioni di suolo è stato precedentemente distrutto mediante aggiunta di acido cloridrico (HCl) 10% in capsule di argento. Le capsule sono state poi inserite nell'analizzatore elementare Flash 2000 (Thermo Fisher) che attraverso una combustione a 1800 °C e successiva analisi tramite TCD (*Thermal Conductivity*

*Detector*) ha fornito il contenuto complessivo di TOC e TN.

Per la determinazione del pH i campioni secchi sono stati addizionati a H<sub>2</sub>O distillata nelle seguenti proporzioni: suolo 20 gr (peso secco) + 40 ml di acqua; lettiera o necromassa 1 gr (peso secco) + 20 ml di acqua. Le sospensioni di suolo sono state miscelate per 30 min mentre quelle di lettiera o necromassa per 2 ore. Successivamente le sospensioni sono state lasciate depositare per 30 min e il pH è stato determinato con pHmetro a sonda pH 211 Microprocessor pH Meter (Hanna Instruments).

#### 2.4 Analisi molecolare delle comunità fungine

Le comunità fungine delle varie componenti dei mesocosmi sono state caratterizzate utilizzando un approccio di tipo molecolare tramite l'applicazione di due tecniche quali la PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e la DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*).

Il DNA totale è stato estratto da 200 mg di ciascun campione di suolo, lettiera e necromassa utilizzando il FastDNA<sup>TM</sup>SPIN Kit for Soil (MPBIO). Il DNA estratto è stato quindi controllato e quantificato tramite elettroforesi su gel di agarosio allo 0,8% (p/v), visualizzato mediante il sistema ChemiDoc (BioRad) e conservato a -20 °C per le successive analisi molecolari.

Un frammento del gene codificante l'RNA ribosomale (rRNA) 18S fungino è stato amplificato dal DNA estratto mediante specifici primer (EF390 E FR1-GC; VAINIO E HANTULA, 2000) addizionati alla miscela di amplificazione: Flexi PCR buffer 1X (Promega), MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, deossinucleotidi trifosfati (dNTPs) 250 µM, primer 400 nM, siero albumina bovina (BSA) 400 µgr, GoTaq®Flexi DNA polimerasi (Promega) 5U, 2 µl di DNA stampo. Le reazioni di amplificazione sono state condotte in un volume finale di 25 µl utilizzando un T100 Thermal Cycler (Biorad) secondo il seguente programma: denaturazione iniziale

a 95°C per 3 min; 35 cicli di denaturazione a 95°C per 30 sec, annealing a 55°C per 30 sec, polimerizzazione a 72°C per 45 sec; polimerizzazione finale a 72°C per 5 min.

I frammenti amplificati ottenuti sono stati separati elettroforeticamente mediante DGGE (LERMAN *et al.*, 1984) utilizzando un gel di poliacrilamide (8% v/v) contenente un gradiente di denaturazione lineare (35% - 65%) ottenuto con urea (7 M) e formammide (40% v/v). La corsa elettroforetica è stata eseguita utilizzando il sistema Dcode (Biorad) a 60°C e voltaggio costante (75 V). Al termine dell'elettroforesi i gel sono stati colorati con SYBR Gold (Molecular Probes) e le immagini digitalizzate utilizzando l'apparato ChemiDoc (Biorad).

#### 2.5 Analisi enzimatica

L'analisi dell'attività enzimatica delle diverse componenti (suolo, lettiera e necromassa) dei mesocosmi è stata eseguita secondo il metodo fluorimetrico descritto da MARX *et al.* (2001) e VEPSÄLÄINEN *et al.* (2001), utilizzando substrati sintetici e impiegando il lettore di piastre semiautomatico Bio-Tek Synergy HT per le misure di fluorescenza. Il 4 metilumbelliferone (MUF) è stata la molecola utilizzata per il rilevamento della fluorescenza e i substrati impiegati, ciascuno relativo ad un enzima specifico, sono riportati in tabella 2.

Per ciascun campione è stata ottenuta una sospensione omogeneizzando 2 g di campioni con 50 mL di acqua deionizzata mediante UltraTurrax a 9600 giri/min per 3 min. Aliquote di 50 µL sono state prelevate dalle sospensioni e distribuite micropiastre da 96 pozzetti (3 replicati analitici per ciascun campione per ciascun substrato). 50 µL di tampone Na-acetato (pH 5,5) sono stati aggiunti a ciascun pozzetto. Infine, sono stati aggiunti 100 µL di soluzione di substrato (1 mM) ottenendo così una concentrazione finale del substrato pari a 500 µM. La fluorescenza è stata misurata dopo

0, 30, 60, 120, 180 minuti di incubazione a 28 °C. Per il calcolo dell'attività enzimatica la fluorescenza è stata confrontata con una curva di calibrazione per ogni campione, utilizzando concentrazioni di MUF crescenti.

Enzima	Substrato	Ciclo biogeochimico	Descrizione
$\beta$ -glucosidasi	4-MUF- $\beta$ -D-glucopiranoside	Carbonio	Catalizza l'idrolisi del cellobiosio a glucosio
Cellulasi	4-MUF- $\beta$ -D-cellobioside	Carbonio	Gruppo enzimatico coinvolto nelle prime fasi di degradazione della cellulosa
Xilosidasi	4-MUF- $\beta$ -D-xilopiranoside	Carbonio	Catalizza l'idrolisi di polisaccaridi (xilani) costituenti le emicellulose
Fosfatasi acida	4-MUF-fosfato	Fosforo	Catalizza l'idrolisi degli esteri fosforici a fosfato disponibile
Chitinasi	4-MUF-N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminide	Carbonio, azoto	Coinvolta nella degradazione della chitina, fonte di N mineralizzabile e componente della parete fungina e dell'esoscheletro degli insetti
Acetato esterasi	4-MUF acetato	Carbonio	Enzima aspecifico coinvolto nell'idrolisi degli esteri carbossilici.
Butirrato esterasi	4-MUF butirrato	Carbonio	Enzima aspecifico endocellulare coinvolto nell'idrolisi degli esteri carbossilici.
Ariilsulfatasi	4-MUF solfato	Zolfo	Catalizza l'idrolisi degli esteri solforici a solfato. Indicatore di biomassa fungina.

*Tabella 2 - Substrati impiegati e relativi enzimi.*

## 2.6 Analisi statistica

I profili elettroforetici DGGE sono stati analizzati utilizzando il software GelCompar II v 4.6 (Applied Maths). Per ciascun profilo sono stati calcolati gli indici di *Richness* e di diversità di *Shannon-Wiener* come descritto da PASTORELLI *et al.* (2011). L'analisi della struttura delle comunità fungine delle diverse componenti dei mesocosmi è stata condotta tenendo conto della presenza/assenza delle bande in ciascun profilo elettroforetico. Le matrici binarie così ottenute da ciascun DGGE sono state esportate nel software PAST (<http://folk.uio.no/hammer/past>) tramite il quale è stato possibile effettuare l'analisi *Multidimensional Scaling* (MDS) e l'analisi di similarità (ANOSIM) utilizzando in entrambi i casi il coefficiente di similarità di Dice. Le differenze tra le medie dei valori di pH, TOC, TN, *Richness*, indice di *Shannon-Wiener* e attività enzimatica sono stati analizzati statisticamente tramite analisi della varianza (ANOVA) seguita dal test di Tuckey ( $P < 0,05$ ).

## 3. Risultati e discussione

### 3.1 Andamento dei valori di C, N e pH

Il contenuto di carbonio (C) è rimasto pressoché stabile in tutte le componenti: suolo, lettiera L ed F e necromassa (Figura 2). Solo nella frazione H della lettiera è stato registrato un aumento dei valori in modo crescente dalla prima all'ultima classe di decomposizione. I valori più bassi di TN sono stati registrati nel suolo alla profondità 10-30, mentre quelli massimi nella lettiera, nella quale i più elevati sono stati osservati nella frazione H (Figura 3). I valori del rapporto C/N (carbonio/azoto) hanno quindi mostrato un significativo aumento nell'ordine: suolo alla profondità 10-30 < suolo alla profondità 0-10 < frazione H della lettiera < frazioni F e L della lettiera < necromassa (Figura 4).

I valori di pH all'interno di ciascun mesocosmo decrescono significativamente

a partire dal suolo, in cui si sono registrati i valori più alti, fino alla necromassa in cui si sono registrati i valori più bassi (Figura 5).

I risultati dell'analisi ANOVA a due vie (Tabella 3) hanno mostrato che TOC, TN, rapporto C/N e pH variano significativamente solo se si confrontano le medie ottenute dalle diverse frazioni all'interno di ciascun mesocosmo (per componente), mentre presentano un andamento pressoché costante e privo di significatività considerando le medie ottenute dalle varie classi di mesocosmo all'interno di ciascuna componente analizzata (per mesocosmo); ad eccezione della necromassa in cui si registrano dei valori del rapporto C/N significativamente più alti nelle classi 2 e 5 (mesocosmo C e F).

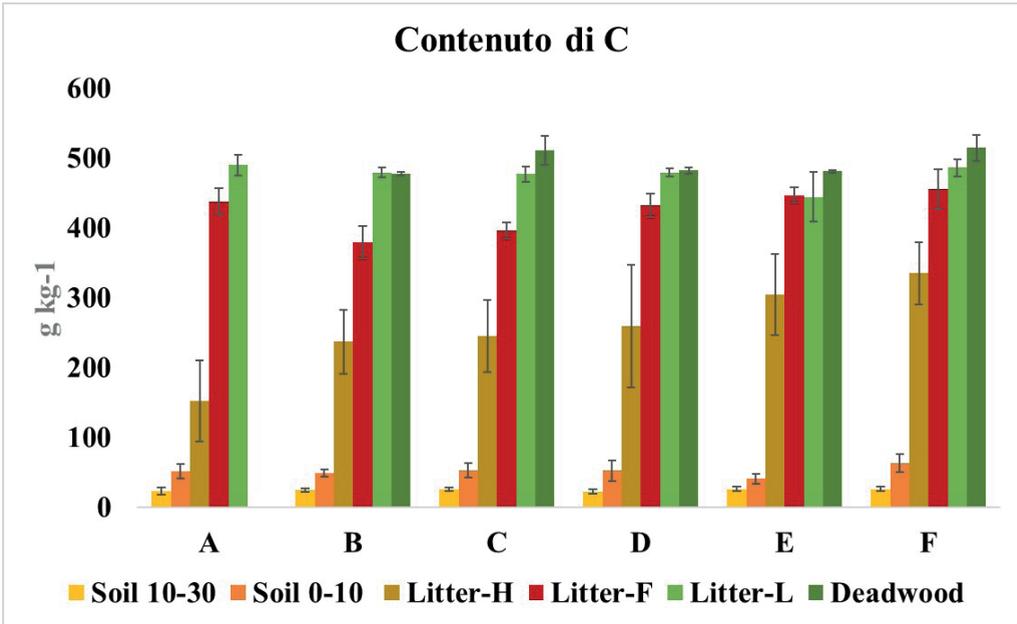


Figura 2 - Rappresentazione dell'andamento del contenuto di C per ciascun mesocosmo nelle diverse componenti e relativo errore standard.

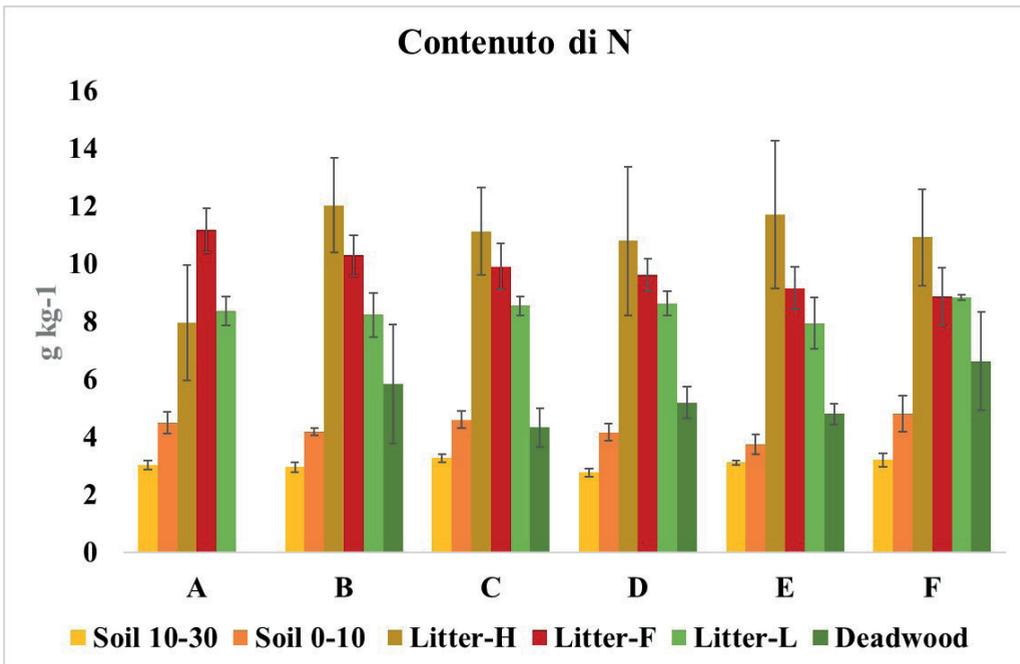


Figura 3 - Rappresentazione dell'andamento del contenuto di N per ciascun mesocosmo nelle diverse componenti e relativo errore standard.

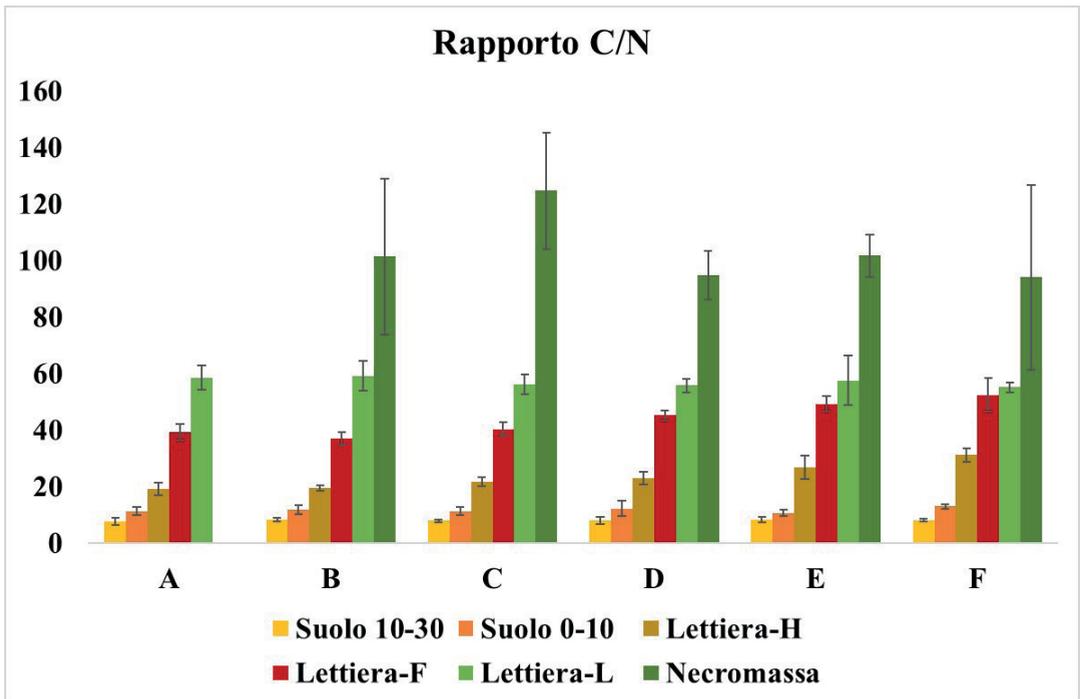


Figura 4 - Rappresentazione dell'andamento del rapporto C/N per ciascun mesocosmo nelle diverse componenti e relativo errore standard.

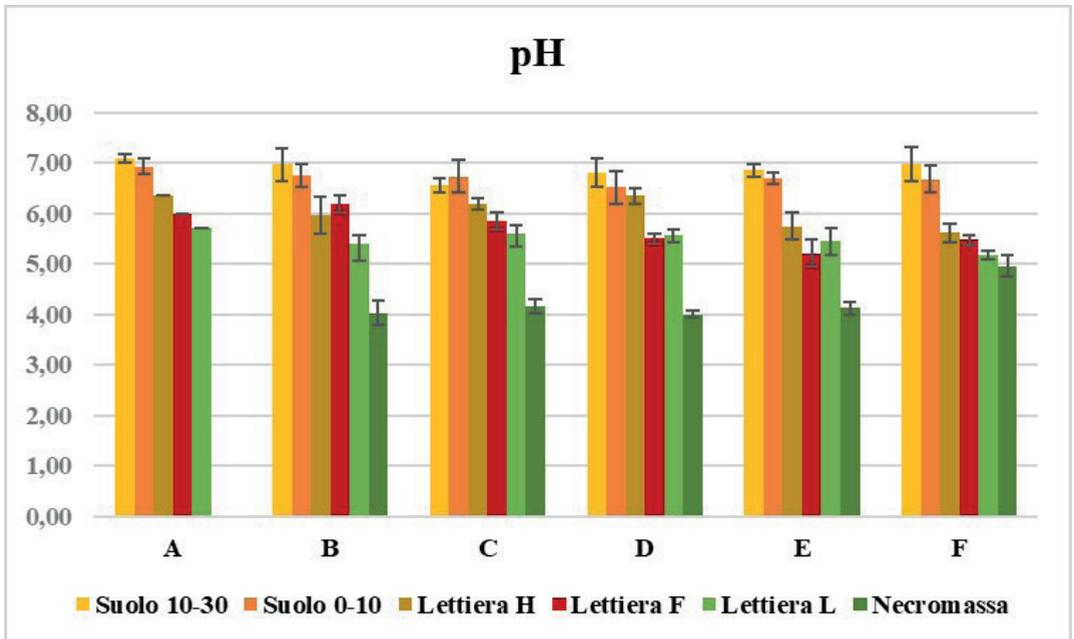


Figura 5 - Rappresentazione dell'andamento del pH per ciascun mesocosmo nelle diverse componenti e il relativo errore standard.

	C	N	C/N	pH
<b>Mesocosmo</b>	0,158	0,895	0,921	0,582
<b>Componente</b>	0,000	0,000	0,000	0,000
<b>Componente x mesocosmo</b>	0,731	0,994	0,999	0,119

Tabella 3 - Valori di probabilità (P) ottenuti confrontando le medie dei campioni per tipo di mesocosmo (diverso mesocosmo per ciascuna componente) o per tipo di componente (diversa componente per ciascun mesocosmo) analizzando i valori del contenuto di C e N, il rapporto C/N e il pH.

### 3.2 Comunità fungina

La composizione e la diversità delle comunità fungine residenti nelle varie frazioni di suolo, lettiera e necromassa sono state analizzate raggruppando i campioni in base alla diversa componente e in base al tipo di mesocosmo. Ciascun DGGE presenta dei profili con un discreto numero di bande, alcune più intense ed altre più deboli che identificano le Unità Tassonomiche Operative (OTU) presenti nei vari campioni. Il numero di OTU di ciascun profilo corrisponde all'abbondanza di OTU (*Richness*), la diversa intensità delle bande presenti indica la distribuzione relativa delle OTU (evenness, l'indice di *Shannon-Wiener*) mentre la presenza/assenza e posizione delle bande nel profilo esprime la struttura della comunità fungina di ciascun campione (*composition*).

I valori di *Richness* più alti sono stati osservati nei campioni di suolo, mentre quelli più bassi i quelli della lettiera. In generale nel mesocosmo D si sono osservati i valori più alti per ciascuna componente, mentre nei mesocosmi E ed F è stato osservato un trend decrescente della *Richness* (Figura 6). I valori maggiori dell'indice di *Shannon-Wiener* sono stati osservati nei campioni di suolo e i più bassi nei campioni di lettiera. Nei mesocosmi si è osservato un trend decrescente all'aumentare della classe di decomposizione della necromassa (Figura 7).

Le comunità fungine sono quindi maggiormente presenti nelle prime fasi di decomposizione della lettiera e

della necromassa mentre con l'avanzare della degradazione della necromassa si è osservata una diminuzione della presenza fungina e un aumento di quella batterica, avvantaggiandosi dell'attività di decomposizione precedentemente svolta, come dimostrato dagli studi di VALÁŠKOVÁ *et al.* (2009), PASTORELLI *et al.* (2017) e PACINI *et al.* (2019).

Mediante l'analisi MDS sono state ottenute delle rappresentazioni grafiche, in uno spazio bidimensionale, delle somiglianze e differenze nella composizione (struttura) delle comunità fungine all'interno di ciascuna componente e/o mesocosmo. Più simile risulta la struttura delle varie comunità fungine prese in esame, minore sarà la distanza tra i vari simboli. L'Analisi MDS condotta sui DGGE ottenuti analizzando i campioni per componente non ha mostrato raggruppamenti significativi in base alla diversa classe di decomposizione della necromassa (ANOSIM  $R < 0,3$ ). In accordo con lo studio di CLARKE E GORLEY (2001) il test compara il grado di distanza tra gruppi e la distanza all'interno dei gruppi. Il risultato ottenuto con il test Rwwf afferma che le comunità sono distinguibili quando  $R=1$ , mentre non sono distinguibili quando  $R=0$ . Valori di R al di sopra di 0,75 vengono solitamente interpretati come comunità 'ben separate', sopra 0,5 'separate ma overlapping', sotto lo 0,25 'poco separabili' (RAMETTE, 2007). Ciò significa che la necromassa nei vari stadi di decomposizione non ha avuto effetto sulla diversificazione delle comunità fungine. A titolo di esempio

viene riportato il grafico MDS relativo alla componente necromassa (Figura 8). L'Analisi MDS condotta sui DGGE ottenuti raggruppando i campioni per mesocosmo ha mostrato come la composizione delle comunità fungine si raggruppi dipendentemente alla diversa componente

(ANOSIM  $R > 0,5$ ). A titolo di esempio viene riportato il grafico MDS del mesocosmo B (Figura 9).

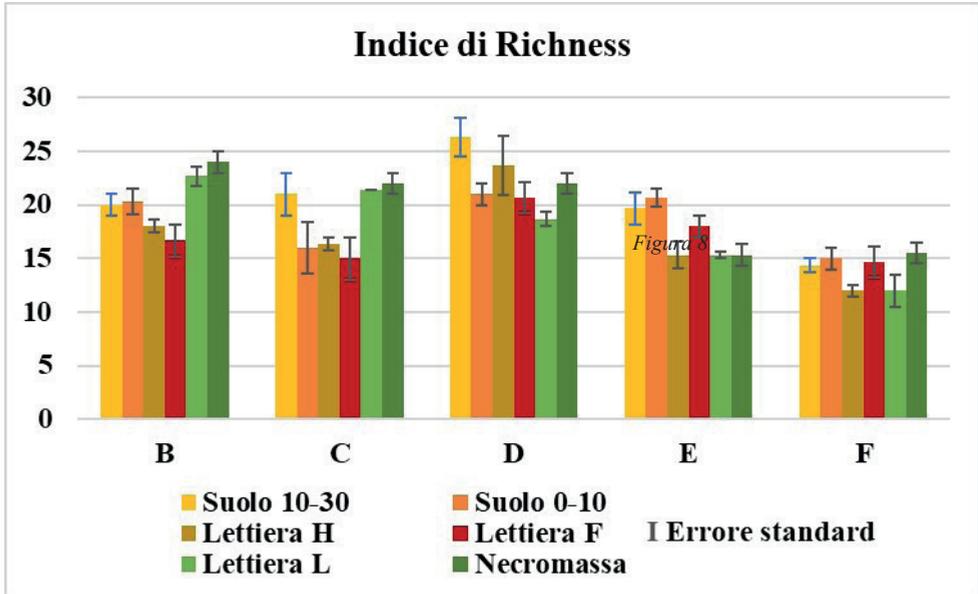


Figura 6 - Rappresentazione dell'indice di Richness per ciascun mesocosmo nelle diverse componenti e il relativo errore standard.

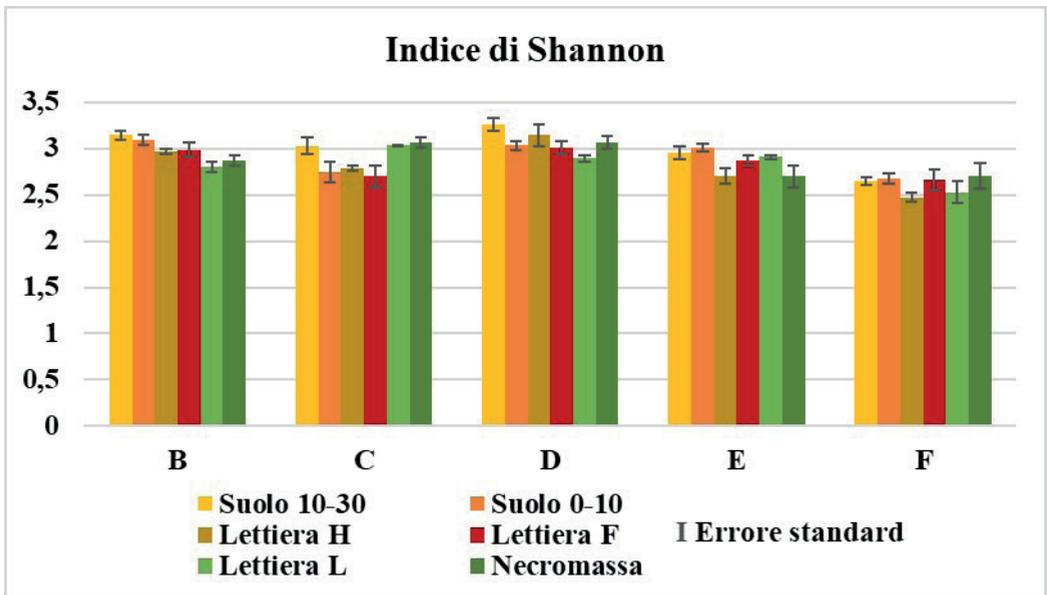


Figura 7 - Rappresentazione dell'indice di Shannon Wiener per ciascun mesocosmo nelle diverse componenti e il relativo errore standard.

## Necromassa

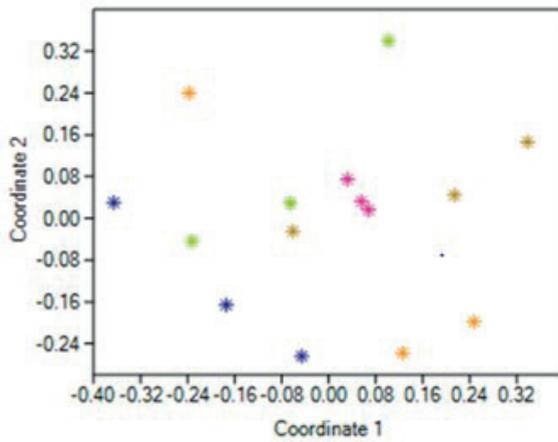
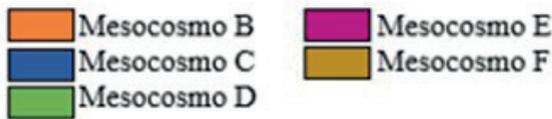


Figura 8 - Rappresentazione grafica delle analisi MDS eseguite sui profili DGGE 18S rDNA. Il grafico contiene i simboli relativi alle frazioni di necromassa di ogni mesocosmo come indicato in legenda.



## Mesocosmo B

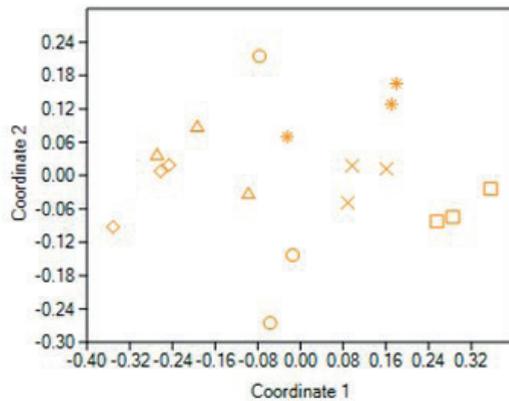
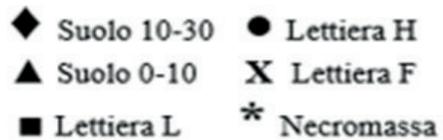


Figura 9 Rappresentazione grafica dell'analisi MDS eseguita sui profili DGGE 18S rDNA. Il grafico contiene le frazioni di suolo alle due profondità 0-10 cm e 10-30 cm, lettiera (foglie, materiale frammentato e humus) e necromassa appartenenti al mesocosmo B, come indicato in legenda.



### 3.3 Componente enzimatica

Complessivamente l'attività enzimatica più elevata è concentrata nella classe di decomposizione della lettiera frammentata. Quindi gli enzimi sembrano intervenire maggiormente dopo una prima fase di triturazione fisica della lettiera.

In accordo con lo studio di FUKUSAWA *et al.* (2009) vi è stata una prima fase con alti tassi di decomposizione della frazione prontamente degradabile (zuccheri semplici), seguita da una seconda fase in cui sono stati attaccati prima i polimeri di peso molecolare minore (amidi, emicellulose, pectine) e poi i polimeri vegetali più resistenti e recalcitranti come la cellulosa e la lignina, con una notevole riduzione del tasso di decomposizione.

In linea con quanto riportato nello studio sulla mineralizzazione dell'N effettuato da EKENLER E TABATABAI (2002), l'idrolisi della chitina è considerata importante nel ciclo dell'N e del C perché partecipa al processo in cui la chitina è convertita in amino zuccheri, una delle principali fonti di N minerale nel suolo.

In particolare, nella frazione F della lettiera sembrano essersi attivati prima gli enzimi degradativi di molecole complesse, come cellulosa (cellulasi e  $\beta$ -glucosidasi), emicellulosa (xilanasi) e chitina (chitinasi). Con il procedere della decomposizione della lettiera sono stati predominanti altri enzimi, quali l'arilsulfatasi e le esterasi. Infatti, in accordo con quanto riportato da LÓPEZ-PIÑEIRO *et al.* (2011) l'arilsulfatasi è intervenuta in una fase degradativa successiva durante il processo di umificazione (frazione H) e l'attività delle esterasi potrebbe inoltre aver indicato una maggior presenza di biomassa microbica (KÄHKÖNEN *et al.*, 1999) nelle frazioni di lettiera maggiormente decomposte.

La chitinasi e l'arilsulfatasi, pur essendo entrambe indicatori di biomassa fungina

(BANDICK E DICK, 1999), hanno trend e attività diverse: la prima ha raggiunto il massimo dell'attività nella frazione di lettiera F ed è diminuita con il grado di decomposizione della necromassa; la seconda è raggiunto la massima attività nella frazione H aumentando con il grado di decomposizione della necromassa.

Ad eccezione della chitinasi, tutti gli enzimi mostrano i valori massimi nelle ultime classi di decomposizione della necromassa, indicando i) una maggiore accessibilità dei substrati, ii) una probabile maggior presenza di biomassa microbica (come indicato dal trend della butirrato esterasi) nonché iii) un cambiamento strutturale delle comunità fungine e batteriche coinvolte.

#### *Enzimi degradativi di cellulosa e emicellulose*

Gli enzimi responsabili della degradazione di cellulosa e emicellulose, quali Cellulasi,  $\beta$ -Glucosidasi e Xilanasi, hanno mostrato l'attività massima nella frazione F della lettiera, con una progressiva diminuzione all'aumentare della classe di decomposizione. L'unico trend crescente osservato dell'attività di tali enzimi è quello nella componente necromassa. (Figure 10-12).

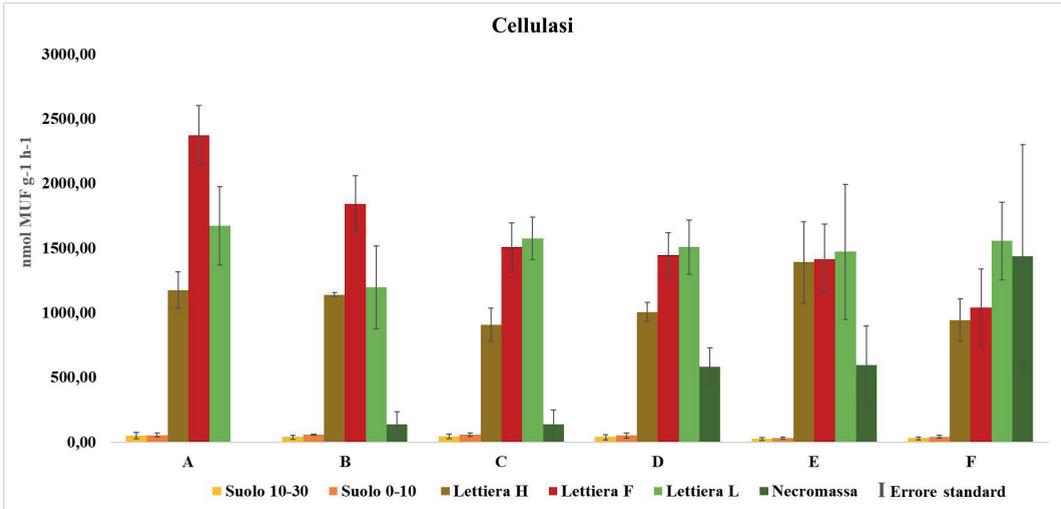


Figura 10 - Rappresentazione dell'andamento dell'attività enzimatica della cellulasi per ciascun mesocosmo nelle diverse componenti e il relativo errore standard.

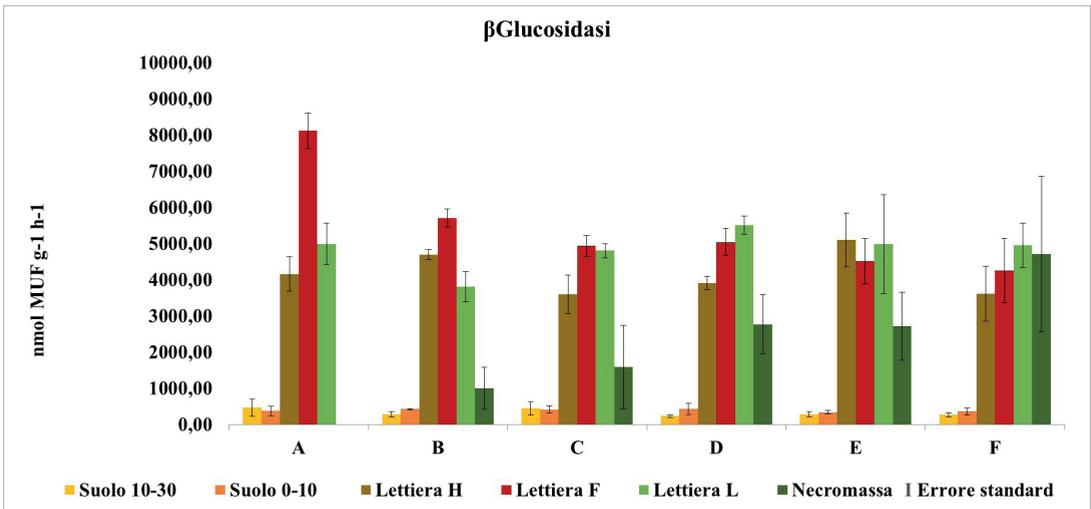


Figura 11 - Rappresentazione dell'andamento dell'attività enzimatica della  $\beta$ -glucosidasi per ciascun mesocosmo nelle diverse componenti e il relativo errore standard.

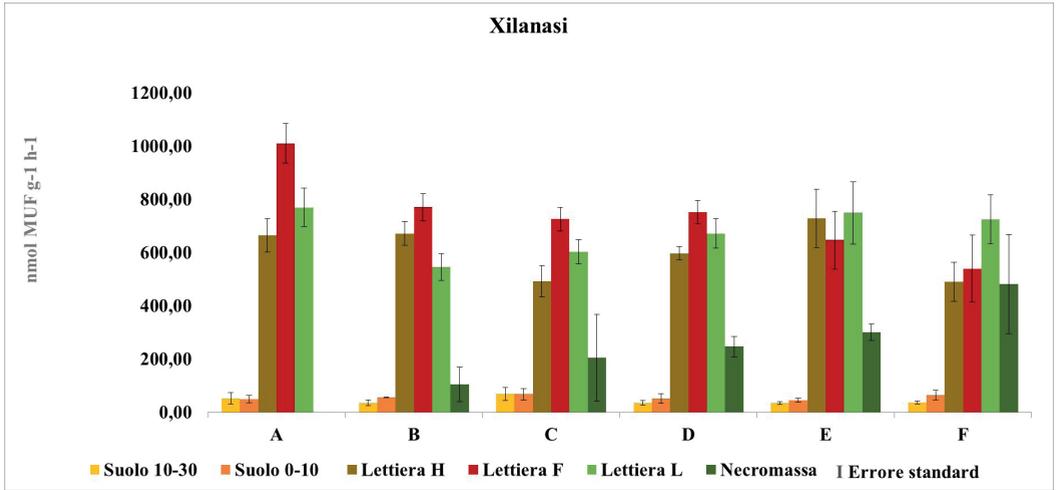


Figura 12 - Rappresentazione dell'andamento dell'attività enzimatica della xilanasi per ciascun mesocosmo nelle diverse componenti e il relativo errore standard.

### Enzimi aspecifici coinvolti nella degradazione degli esteri carbossilici

Gli enzimi responsabili della degradazione degli esteri carbossilici, quali Acetato esterasi e Butirrato esterasi hanno mostrato i valori massimi nelle frazioni di lettiera

F e H. L'unico trend crescente osservato dell'attività di tali enzimi è quello nella componente necromassa. (Figure 13-14)

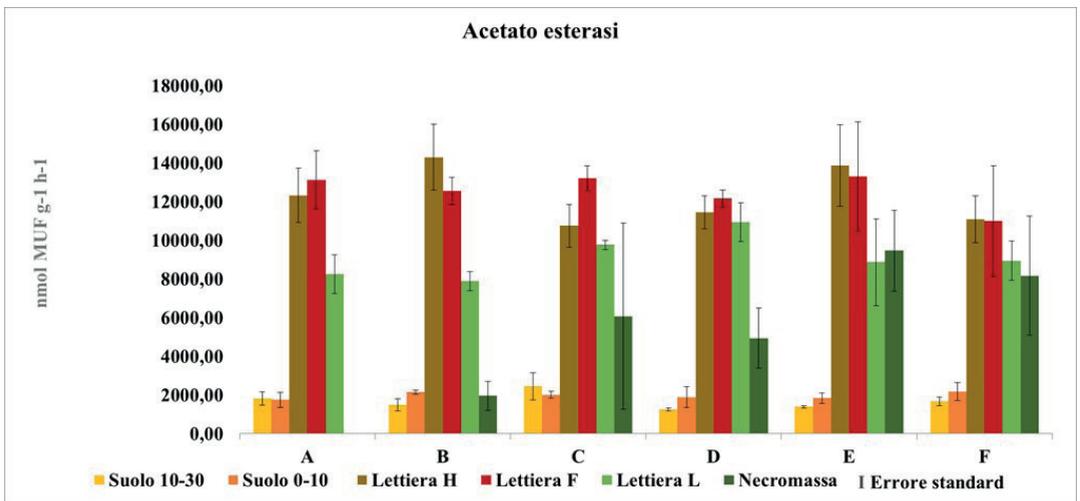


Figura 13 - Rappresentazione dell'andamento dell'attività enzimatica dell'acetato esterasi per ciascun mesocosmo nelle diverse componenti e il relativo errore standard.

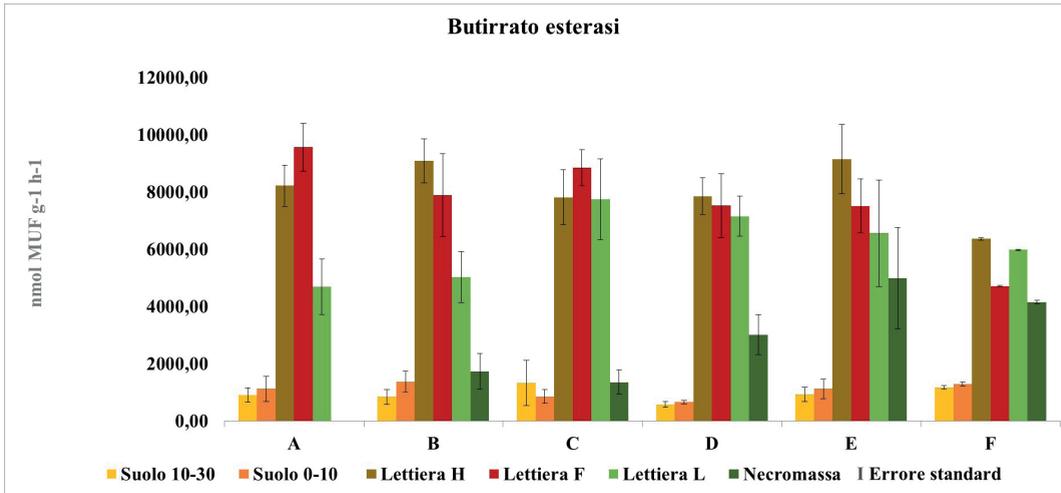


Figura 14 - Rappresentazione dell'andamento dell'attività enzimatica del butirrato esterasi per ciascun mesocosmo nelle diverse componenti e il relativo errore standard.

### Enzimi coinvolti nei cicli di P, N, S

Per gli enzimi coinvolti nei cicli di P, N e S quali Arilsulfatasi, Chitinasi e Fosfatasi, si è osservata una generale diminuzione dell'attività enzimatica nella frazione F della lettiera e un trend crescente nella necromassa

ad eccezione della chitinasi. In particolare, l'attività massima di chitinasi e fosfatasi si è verificata nelle frazioni F e L della lettiera, mentre quella dell'arilsulfatasi nella frazione H. (Figure 15-17)

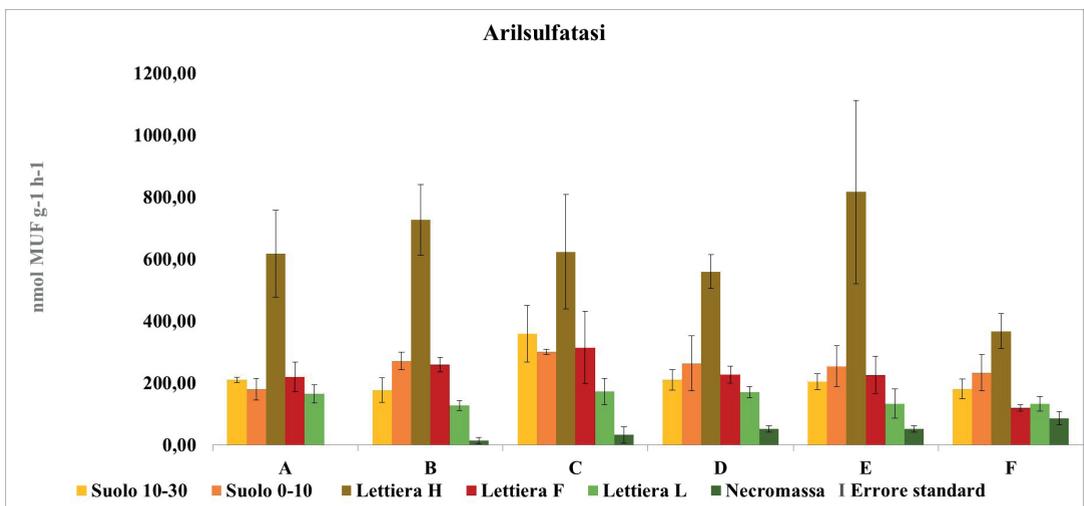


Figura 15 - Rappresentazione dell'andamento dell'attività enzimatica dell'arilsulfatasi per ciascun mesocosmo nelle diverse componenti e il relativo errore standard.

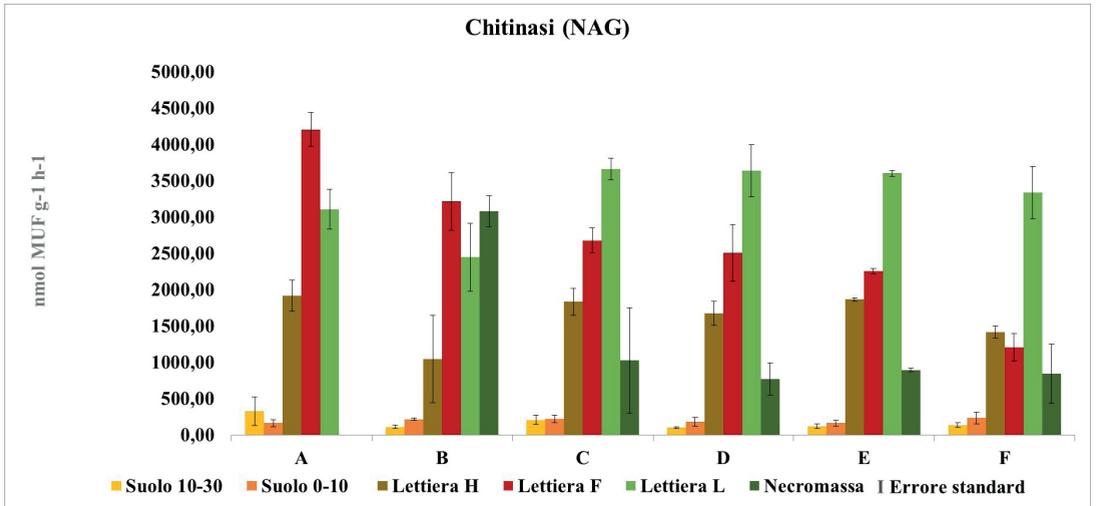


Figura 16 - Rappresentazione dell'andamento dell'attività enzimatica della NAG per ciascun mesocosmo nelle diverse componenti e il relativo errore standard.

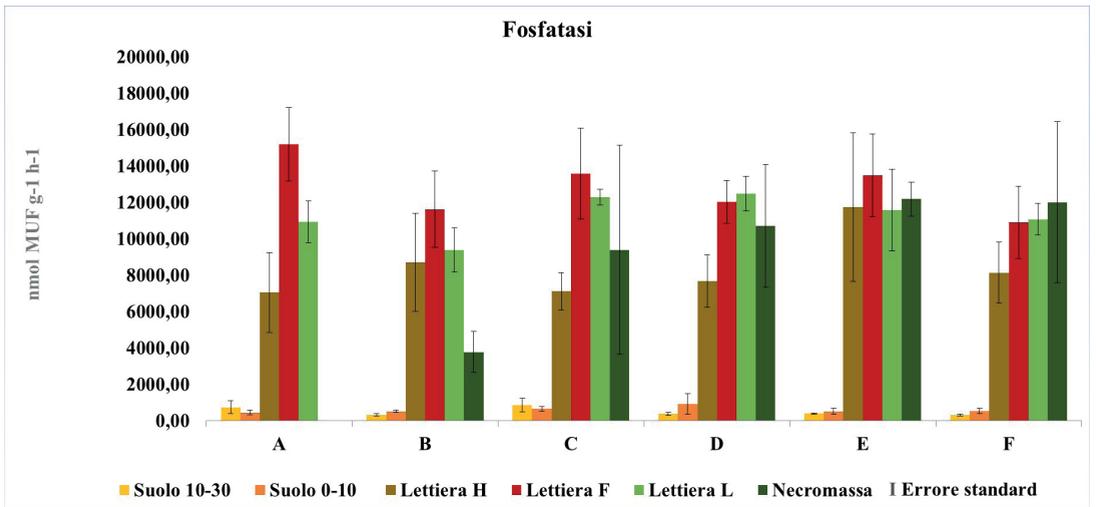


Figura 17 - Rappresentazione dell'andamento dell'attività enzimatica della fosfatasi per ciascun mesocosmo nelle diverse componenti e il relativo errore standard.

#### 4. Conclusioni

I risultati ottenuti hanno dimostrato una diminuzione nell'abbondanza e diversità della comunità fungina all'aumentare della classe di decomposizione della necromassa aggiunta al mesocosmo. Questa osservazione suggerisce una maggiore specializzazione dei funghi nelle fasi iniziali di decomposizione. Inoltre, è stato constatato come la presenza della biomassa fungina nelle varie classi di decomposizione sia associabile al trend dell'enzima chitinasi che ne è un indicatore. I risultati ottenuti dall'analisi dell'attività enzimatica suggeriscono come questa intervenga sulla lettiera e sulla necromassa in seguito ad una frammentazione fisica probabilmente ad opera di insetti. Durante la decomposizione della necromassa sembra esserci in generale un aumento delle attività enzimatiche, ad eccezione della chitinasi, dovuto presumibilmente più ad una maggiore accessibilità della sostanza organica che a differenze qualitative dei substrati. L'elevata attività dell'enzima arilsulfatasi nella frazione di lettiera H è legata al processo di umificazione della sostanza organica. Nonostante che i risultati ottenuti abbiano dimostrato una certa differenziazione nei livelli di attività enzimatica e nella caratterizzazione delle comunità fungine per ciascuna componente nelle diverse classi di decomposizione, non è stata osservata la stessa differenziazione a livello di mesocosmo. Ciò è probabilmente dovuto all'influenza del microclima circostante, della posizione dei mesocosmi all'interno del bosco e della distanza fra loro.

#### 5. Ringraziamenti

Si ringrazia il Consiglio per la Ricerca e l'Analisi per l'Economia Agraria Centro di Ricerca Agricoltura e Ambiente (CREA-AA) per la fondamentale collaborazione prestata alla realizzazione del presente lavoro. Il lavoro è stato finanziato dal programma LIFE nel contesto del Progetto FoResMit

(LIFE14/CCM/IT/905 – Recovery of degraded coniferous Forests for environmental sustainability Restoration and climate change Mitigation).

#### BIBLIOGRAFIA

- BANDICK A., DICK R.P., 1999 - *Field management effects on soil enzyme activities*, Soil Biology Biochemistry, 31: 1471-1479.
- CAMIA A., BARBOSA P., AMATULLI G., SAN-MIGUEL-AYANZ J., 2006 - *Fire danger rating in the European Forest Fire Information System (EFFIS): Current developments*, Forest Ecology and Management, 234.
- CLARKE K.R., GORLEY R.N., 2001 - *User manual/tutorial*, PRIMER-E. Plymouth UK, 91.
- EKENLER M., TABATABAI M.A., 2002 - *B-Glucosaminidase activity of soil: effects of cropping system and its relationship to nitrogen mineralization*, Biology and Fertility of Soils, 36: 367-376.
- FAO, 2004 - *Global Forest Resources Assessment Update 2005: Terms and Definitions*. Working Papers 83/E, Forest Resources Assessment Programme, Rome.
- FUKUSAWA Y., OSONO T., TAKEDA H., 2009 - *Dynamics of physicochemical properties and occurrence of fungal fruit bodies during decomposition of coarse woody debris of *Fagus crenata**. Journal of Forest Research, 14: 20-29.
- HARMON M. E., SEXTON J., 1996 - *Guidelines for measurements of woody detritus in forest ecosystems*. Publication n. 20. University of Washington. 73 p.
- HUNTER M.L., 1990 - *Wildlife, forests, and forestry: principles of managing forests for biological diversity*. Englewood Cliffs, N.J., Prentice Hall. p. 370.
- KÄHKÖNEN, M. P., HOPIA, A. I., VUORELA, H. J., RAUHA, J.-P., PIHLAJA, K., KUJALA, T. S., HEINONEN, M., 1999 - *Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47: 3954-3962.
- KUNITO T., SAEKI K., GOTO S., HAYASHI H., OYAIZU H., MATSUMOTO S., 2001- *Copper and zinc fractions affecting microorganisms in long-term sludge-amended soils*. Bioresource Technology, 79:135-146.
- LA FAUCI A., BAGNATO S., GUGLIOTTA O.I., MERCURIO R., 2006 - *Osservazioni preliminari sulla necromassa in popolamenti di pino laricio nel Parco Nazionale dell'Aspromonte*, Forest@ 3: 54-62.
- LERMAN L.S., FISCHER S.G., HURLEY I., SILVERSTEIN K., LUMELSKY N., 1984 - *Sequence-determined DNA separations*,

Annual Review of Biophysics and Bioengineering, 13: 399-423.

LÓPEZ-PIÑEIRO A., ALBARRÁN A., NUNES J.R., PEÑA D., CABRERA D., 2011 - *Long-term impacts of de-oiled two-phase olive mill waste on soil chemical properties, enzyme activities and productivity in an olive grove*, Soil and Tillage Research, 114: 175-182.

MARCHETTI M., LOMBARDI F., 2006 - *Analisi quali-quantitativa del legno morto in soprassuoli non gestiti: il caso di "Bosco Pennataro"*, alto Molise, Rivista L'Italia Forestale e Montana, 61: 275-301.

MARX M.C., WOOD M., JARVISS C., 2001 - *A MICROPLATE FLUORIMETRIC ASSAY FOR THE STUDY OF ENZYME DIVERSITY IN SOILS*, SOIL BIOLOGY AND BIOCHEMISTRY, 33: 1633-1640.

PACINI A., VITI C., PASTORELLI R., 2019 - *Dinamiche delle comunità batteriche durante il processo di decomposizione della necromassa*, Dendronatura, 2: 12-30.

PALETTO A., TOSI V., 2010 - *Deadwood density variation with decay class in seven tree species of the Italian Alps*. Scandinavian Journal of Forest Research, 25: 164-173.

PASTORELLI R., LANDI S., TRABELSI D., PICCOLO R., MENGONI A., BAZZICALUPO M., PAGLIAI M., 2011 - *Effects of soil management on structure and activity of denitrifying bacterial communities*, Applied Soil Ecology, 49: 46-58.

PASTORELLI R., AGNELLI A.E., DE MEO I., GRAZIANI A., PALETTO A., LAGOMARSINO A., 2017 - *Analysis of microbial diversity and greenhouse gas production of decaying pine logs*, Forests, 8: 224.

RAMETTE A., 2007 - *Multivariate analyses in microbial ecology*, FEMS Microbiology Ecology, 62: 142-160.

UNEP (UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME), 1997 - *Global Environmental Outlook*, New York: Oxford University Press.

VAINIO F.J., HANTULA J., 2000 - *Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA*, Mycological Research, 104: 927-936.

VALÁŠKOVÁ V., DE BOER W., KLEIN GUNNEWIEK P.J.A., POSPIŠEK M., BALDRIAN P., 2000 - *Phylogenetic composition and properties of bacteria coexisting with the fungus hypoholoma fasciculare in decaying wood*, The ISME Journal, 3: 1218-1221.

VEPSÄLÄINEN M., KUKKONEN S., VESTBERG M., SIRVIÖ H., NIEMIR. M., 2001 - *Application of soil enzyme activity test kit in a field experiment*, Soil Biology and Biochemistry, 33: 1665-1672.

WEI Y., DAI Y., 2004 - *Ecological function of wood-inhabiting fungi in forest ecosystem*, Journal of Applied Ecology, 15: 1935-1938.

WWF SWITZERLAND, 2004 - *Deadwood - Living Forest. The importance of veteran trees and deadwood to biodiversity*. WWF Report, October 2004.

## Alessandro Casagli

Dipartimento di Scienze e Tecnologie  
Agrarie, Alimentari e Forestali (DAGRI),  
Università degli Studi di Firenze,  
Piazzale delle Cascine 24, 50144 Firenze, 055 2755921.  
E-mail: alessandro.casagli@stud.unifi.it

## Roberta Pastorelli

Centro di Ricerca Agricoltura e Ambiente,  
Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi  
dell'Economia Agraria (CREA-AA),  
via di Lanciola 12/A, 50125 Firenze, 055 2492247.  
E-mail roberta.pastorelli@crea.gov.it

## Alessandra Lagomarsino

Centro di Ricerca Agricoltura e Ambiente,  
Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi  
dell'Economia Agraria (CREA-AA),  
via di Lanciola 12/A, 50125 Firenze, 055 2492240.  
E-mail: alessandra.lagomarsino@crea.gov.it

## RIASSUNTO

Il presente studio si pone come obiettivo l'approfondimento delle conoscenze sulla composizione delle comunità fungine e sulle attività enzimatiche implicate nei processi degradativi della necromassa, inserendosi nell'ambito della mitigazione dei cambiamenti climatici, al fine di attuare una gestione forestale sostenibile e consapevole.

Sono state analizzate le comunità fungine e le attività di alcuni enzimi idrolitici in campioni di suolo, lettiera (frammentata, umificata e fresca) e necromassa a vari stadi di decomposizione, provenienti da mesocosmi allestiti in soprassuoli di pino nero (*Pinus nigra* Arnold ssp. *nigra*) sulle pendici di Monte Morello (FI). Lo scopo è stato quello di valutare i cambiamenti della composizione delle comunità fungine e i livelli dell'attività enzimatica nei campioni, al variare della classe di decomposizione della necromassa, mediante un approccio multidisciplinare. Sono stati determinati il pH, i contenuti di carbonio organico totale (TOC) e di azoto totale (TN). La tecnica DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) è stata utilizzata per la caratterizzazione delle comunità fungine e quella della fluorescenza per misurare i livelli di attività enzimatica. I risultati ottenuti hanno evidenziato che l'attività enzimatica è prevalentemente concentrata nella frazione di lettiera frammentata, nella quale sembrano attivarsi prima gli enzimi degradativi di molecole complesse come cellulosa, emicellulosa e chitina. Sono inoltre emerse delle tendenze come il decremento degli indici di diversità fungina all'au-

mentare delle classi di decomposizione, correlato a quello dell'azoto e dell'enzima chitinasi. Si è infatti osservato che la presenza di N influenza direttamente la presenza e l'attività chitinasi delle diverse specie fungine.

**KEY WORDS:** *Enzymes, Fungi, Deadwood decomposition. Organismi degradatori, Necromassa, Mesocosmi*

## ABSTRACT

This study, which deepens the knowledge on the composition of the fungal communities and the enzymatic activities involved in the degradation processes of the deadwood, is part of the mitigation of climate change issue, through the implementation of sustainable and aware forest management. In the present study, fungal communities and several enzymatic activities were analyzed in soil, litter (fragmented, humified and fresh) and deadwood samples at various stages of decay, coming from mesocosms set up in black pine stands (*Pinus nigra* Arnold ssp. *nigra*) on the slopes of Monte Morello (FI). The aim was to evaluate how fungal communities change and the levels of enzymatic activity in soil, litter and deadwood samples, as the decay class varies, by means of a multidisciplinary approach. The pH, total carbon (TOC) and total nitrogen (TN) contents for each sample were determined. Furthermore, through the DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) technique, the characterization of the fungal communities was possible, and the levels of enzymatic activity were measured through a fluorescence method. The results obtained showed that the decomposition stage of the deadwood does not significantly affect the chemical and biological parameters analyzed, despite the evidence of trends such as the decrease in the diversity indices with the increase in the decay classes, correlated to that of nitrogen and enzyme chitinase.