



Università degli Studi di Sassari



SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA

Scienze dei Sistemi Agrari e Forestali

e delle Produzioni Alimentari

Indirizzo Monitoraggio e Controllo degli Ecosistemi Forestali
in Ambiente Mediterraneo

Ciclo XXIV

Dinamica delle comunità ectomicorriziche
in sugherete della Sardegna

Dott. Salvatore Seddaiu

<i>Direttore della Scuola:</i>	prof. Giuseppe Pulina
<i>Referente di Indirizzo</i>	prof. Antonio Franceschini
<i>Docente Guida</i>	prof. Antonio Franceschini
<i>Tutor</i>	dott. Enrico Lancellotti

Triennio accademico 2009- 2011

Indice

Abstract	III
Riassunto	IV
1. Premessa	1
2. Introduzione	4
2.1 La quercia da sughero	4
2.1.1 Inquadramento sistematico e gestione	4
2.1.2 Ecologia e della distribuzione della sughera	6
2.1.3 Gestione delle sugherete	9
2.2 La simbiosi micorrizica	12
2.3 Le comunità ectomicorriziche	20
3. Scopo della ricerca	25
4. Materiali e Metodi	27
4.1 Aree di indagine	27
4.2 Rilievi della vegetazione	29
4.3 Rilievi dello stato fitosanitario	29
4.4 Metodo di campionamento e isolamento delle ectomicorrize	30
4.5 Caratterizzazione morfo-anatomica delle ectomicorrize	31
4.5.1 Tipo di ramificazione	31
4.5.2 Caratteri distintivi per la superficie del mantello	32
4.5.3 Colore	34
4.5.4 Caratteri anatomici delle ectomicorrize	35
4.5.5 Struttura anatomica del mantello	35
4.5.6 Cistidi	37
4.5.7 Rizomorfe	38
4.6 Discriminazione morfologica e anatomica delle ectomicorrize	38

4.7 Identificazione genetica delle ectomicorrize	39
4.7.1 Estrazione del DNA.....	39
4.7.2 Polymerase chain reaction (PCR)	40
4.7.3 Purificazione e sequenziamento della regione ITS	41
4.8 Analisi statistiche	43
4.8.1 Diversità e struttura della comunità	43
4.8.2 Coefficiente di similarità	44
4.8.3 Selezione di modelli di variazione dei parametri ecologici in funzione delle variabili ambientali	45
4.8.4 Analisi multivariata	45
5. Risultati	47
5.1 Comunità ectomicorrizica associata alla sughera	47
5.2 Struttura e composizione delle comunità ectomicorriziche	48
5.3 Influenza del tipo di gestione, del periodo di campionamento e del substrato litologico sui parametri ecologici.....	56
5.3.1 Esplorazione dei dati.....	56
5.3.2 Modellizzazione della risposta dei parametri ecologici alle variabili ambientali	56
5.3.3 Analisi della varianza e confronti per coppie	56
5.3.4 Relazione tra la composizione della comunità ectomicorrizica e le variabili ambientali considerate	61
5.4 Influenza delle variabili ambientali sulla composizione della comunità ectomicorrizica	62
6. Discussione.....	66
7. Conclusioni.....	73
8. Bibliografia.....	75

Abstract

The aim of the research was to detect the variations in structure and composition of the ectomycorrhizal fungal communities in several cork oak stands that differed in lithologic substrate (granitic, basaltic, trachytic) and management systems. This survey was carried out in order to implement generalizable models of the dynamics of ectomycorrhizal communities in ecosystems dominated by cork oak trees. Overall of nine cork oak stands, representative of 75% of the natural cork oak stands, 40% of the grazed and 60% ploughed that occur in Sardinia were investigated. Two transects were delimited in each cork oak stand and soil samples were collected to study the ectomycorrhizal community in spring and autumn respectively. In total 82.333 ectomycorrhizal tips were isolated and 185 Operative Taxonomic Units (OTUs) were characterized based on morpho-anatomic analysis. 149 of them were identified on the basis genetic analysis. Both structure and composition of the ectomycorrhizal community were significantly influenced by the sampling season, management system and lithologic substrate: particularly the structure was influenced by the management system and season, whereas the composition in the OTUs by the management and lithologic substrate. The latest result have allowed to individuate guilds of fugal species that characterize the cork oak stands investigated.

Riassunto

La ricerca è stata indirizzata a rilevare le variazioni in struttura e composizione delle comunità dei funghi ectomicorrizici in sugherete che insistono su substrati litologici differenti (granitico, basaltico, trachitico) e sono sottoposte a differenti tipi di gestione. Ciò con l'intento di definire modelli generalizzabili della dinamica delle comunità ectomicorriziche in ecosistemi dominati dalla sughera. Le indagini sono state svolte in nove sugherete rappresentative del 75% delle sugherete naturali, del 40% di quelle pascolate e del 60% di quelle lavorate presenti in Sardegna. In ciascuna sughereta sono stati delimitati due transetti nei quali, rispettivamente in autunno e in primavera, sono stati prelevati i campioni di suolo per lo studio della comunità ectomicorrizica. In totale sono stati isolati 82.333 apici micorrizzati e caratterizzati sotto il profilo morfo-anatomico 185 *Operative Taxonomic Unit* (OTU). Di questi, 149 sono stati identificati su base genetica. Sia la struttura che la composizione delle comunità risultano influenzate significativamente dalla stagione di campionamento, dal tipo di gestione e dal tipo di substrato litologico: la struttura in modo particolare dal tipo di gestione e dalla stagione, mentre la composizione in OTU soprattutto dal tipo di gestione e dal tipo di substrato, quest'ultimo risultato ha consentito di individuare gilde di specie fungine che caratterizzano le sugherete indagate.

1. Premessa

Le sugherete costituiscono una delle formazioni boschive più importanti delle regioni del Mediterraneo per il loro indiscutibile valore sotto l'aspetto ecologico, paesaggistico, ambientale e socio-economico. Esse sono diffuse specialmente nel settore occidentale dei territori circummediterranei – si estendono su circa 1,3 milioni di ha nei Paesi europei (Portogallo, Spagna, Francia, Italia) e su 0,9 milioni di ha nei Paesi del Magreb (Marocco, Algeria, Tunisia) – e assicurano una costante copertura dei suoli, essendo utilizzate essenzialmente non per il taglio degli alberi ma per la produzione del sughero. Le sugherete, inoltre, grazie alla protezione offerta dalla spessa scorza sugherosa delle piante e all'elevata capacità pollonifera delle stesse (caratteristiche che fanno rientrare la quercia da sughero tra le pirofite passive), hanno un'elevata resistenza agli incendi che da sempre costituiscono una delle principali cause di degrado degli ambienti forestali mediterranei.

Il sughero prodotto – mediamente circa 300.000 tonnellate ogni anno – rappresenta un'importante fonte di integrazione del reddito delle attività agropastorali e costituisce la materia prima che alimenta una fiorente industria di trasformazione in cui sono coinvolte numerose aziende di piccole e medie dimensioni, spesso le sole presenti nelle aree meno industrializzate.

Per questi motivi le sugherete sono state sempre oggetto di un'attenzione particolare da parte dell'uomo che ha favorito sia la diffusione della sughera in ambienti dove altre specie forestali risultano ecologicamente più competitive, sia lo sviluppo di varie forme di gestione assimilabili a sistemi agro-silvo-pastorali, nei quali una copertura arborea variabile sovrasta colture cerealicole e da foraggio o pascoli ed erbai annuali o poliennali. Esempi di queste forme di gestione sono i pascoli arborati in Sardegna, le "dehesas" in Spagna, e i "montados" in Portogallo.

Tuttavia, tale dipendenza antropica, unita alla diffusione della sughera in ambienti ecologicamente molto diversi – dalla fascia costiera fino ai 2000 m s.l.m. in Marocco – hanno reso questi soprassuoli molto vulnerabili negli ultimi decenni sia ai cambiamenti legati all'urbanizzazione della società rurale, sia ai

mutamenti climatici intervenuti in ambiente mediterraneo. Non a caso, accanto a una progressiva contrazione delle superfici investite a sughera a favore di quelle destinate ad altre attività agro-pastorali, si assiste da tempo alla crescente diffusione di forme di degrado delle sugherete, riconducibili al ben noto fenomeno del “deperimento delle querce” (*oak decline*), che hanno causato e continuano a causare perdite gravi in termini di produttività e di consistenza della risorsa sughera.

Senza dubbio, tale situazione impone l’adozione di strategie efficaci di salvaguardia del patrimonio sughericolo, a cominciare da una riduzione dello sfruttamento delle risorse ad una soglia che consenta agli ecosistemi a sughera di mantenere la loro naturale resilienza. Ciò si potrà ottenere se si acquisiscono le informazioni necessarie per valutare sia l’impatto delle tipologie gestionali attuate nelle diverse realtà forestali in cui vegeta la sughera, sia la capacità di adattamento delle piante alle mutate condizioni ambientali.

Proprio in tale contesto appare rilevante approfondire le conoscenze sulle relazioni che le piante instaurano con le altre componenti biotiche dell’ecosistema, in particolare con quella microbica del suolo e, soprattutto, con quella fungina che forma ectomicorrize con le radici delle piante.

I funghi ectomicorrizici, infatti, stabiliscono con le piante un rapporto di simbiosi mutualistica. La pianta fornisce al fungo i carboidrati semplici che gli occorrono per svilupparsi, il micelio fungino si diffonde nel suolo e consente alla pianta di incrementare l’assorbimento di acqua e di elementi minerali, in particolare di quelli meno mobili o non utilizzabili dalla pianta. Inoltre i funghi simbiotici influenzano il bilancio ormonale delle piante, sia producendo e trasferendo ad esse fattori di crescita di tipo auxinico. A ciò si unisce la capacità dei funghi micorrizici di contrastare la sopravvivenza e l’attività di organismi patogeni tellurici e di proteggere la pianta anche nei confronti di composti potenzialmente tossici presenti nel suolo.

L’importanza della simbiosi ectomicorrizica non è legata solo ai vantaggi che derivano ai singoli simbiotici, ma anche e soprattutto al ruolo essenziale che le comunità di questi funghi svolgono nell’assicurare la funzionalità dell’intero

ecosistema. Le comunità di funghi ectomicorrizici, infatti, comprendono specie con caratteristiche ecologiche e fisiologiche differenti che occupano nicchie ecologiche diverse, permettendo loro di massimizzare l'utilizzo delle risorse presenti nel suolo. Esse inoltre originano una fitta rete miceliare (*mycorrhizal micelial network*) attraverso cui avvengono scambi di sostanze tra piante della stessa specie, e anche di specie differenti. È chiaro quindi che la massima efficienza della comunità ectomicorrizica nel favorire la vita del bosco è strettamente dipendente dal mantenimento della sua diversità.

Da quanto finora esposto emerge evidente il ruolo centrale che le micorrize rivestono nel ciclo degli elementi del suolo, nel favorire lo sviluppo delle piante ospiti, nel contribuire alla biodiversità microbica degli ecosistemi forestali e quindi alla corretta funzionalità degli stessi. In sostanza, esse costituiscono un sicuro indice di valutazione dello stato di "salute" degli ecosistemi forestali.

Con tali presupposti è stato impostato il lavoro di ricerca svolto per questa tesi di dottorato nell'intento di apportare un contributo significativo alla conoscenza della dinamica delle comunità ectomicorriziche in sugherete della Sardegna. Di seguito, prima di esporre più in dettaglio gli obiettivi specifici della ricerca, la metodologia seguita e i principali risultati ottenuti, è parso opportuno richiamare brevemente i caratteri peculiari della quercia da sughero e quelli delle simbiosi micorriziche.

2. Introduzione

2.1 La quercia da sughero

2.1.1 Inquadramento sistematico e descrizione

La quercia da sughero (*Quercus suber* L.) appartiene alla famiglia *Fagaceae* dell'ordine *Fagales*; è una specie arborea con individui che possono arrivare ad altezze di 15-20 m e diametri fino a 1,50 m. Rispetto alle altre querce mediterranee è poco longeva, di norma non supera i 250-300 anni d'età.

La sughera è monoica e prevalentemente allogama. I fiori maschili sono sessili con un perianzio diviso in 5-8 lobi e con 5-6 stami, sono riuniti in numerosi amenti pendenti, che appaiono alla base dei rami dello stesso anno, all'ascella delle foglie, o all'estremità dei rami di un anno. I fiori femminili hanno il perianzio 4-6 lobato con tre stili, si formano all'ascella delle foglie dei rami dell'anno e sono riuniti in spighe erette. L'impollinazione è anemofila e incrociata tra fiori di piante diverse. Talvolta può avvenire tra individui di altre specie del genere *Quercus* dando origine a ibridi (Gellini e Grossoni, 1997).

La fruttificazione è precoce, avviene entro i 12-15 anni d'età, ed è duratura, continua per oltre 100 anni. In Sardegna avviene tra aprile e giugno ma è piuttosto irregolare e strettamente legata all'andamento climatico. Può essere annuale o, in stazioni sfavorevoli, mista: ossia con fioritura primaverile e maturazione del frutto ripartita tra l'autunno dello stesso anno e l'estate dell'anno successivo. Le annate di pasciona si alternano ogni due, tre o più anni, spesso condizioni siccitose causano ripetuti anni di scarse produzioni (Dettori *et al.*, 2001). Il frutto, la ghianda, è un achenio ovale racchiuso in parte dentro una cupola sub-emisferica brevemente pedunculata e con squame grigio-tomentose appressate.

La chioma è ampia e poco simmetrica, talvolta in individui isolati o in popolamenti poco densi si presenta notevolmente espansa. Le foglie hanno un picciolo corto, sono semplici, alterne, coriacee, lunghe 3-7 cm e larghe 1,5-3 cm, ovato-lanceolate, persistenti (2-3 anni) o semipersistenti (1 anno); sono ornate da piccole stipole (lunghe circa 5 mm) di color rosso-carminio, lineari o

lanceolate, pelose e caduche con margine liscio o provvisto di denti lassi. Le foglie delle piante giovani o dei rami di un anno hanno la faccia superiore peloso-pulverulenta con nervature principali incise, quella inferiore tomentosa e con nervature molto rilevate, mentre nelle piante adulte la pagina superiore è glabra e di colore verde-scuro, quella inferiore è tomentosa e biancastra o grigiastra (Gellini e Grossoni, 1997).

Il tronco della sughera si presenta contorto e relativamente corto, terminando dando luogo ad alcune branche molto vigorose (Gellini e Grossoni, 1997). Il legno è differenziato, con albarno chiaro e durame bruno-rossastro, è molto duro, pesante e con ottime caratteristiche di resistenza meccanica, ma soggetto a imbarcarsi e a spaccarsi durante la stagionatura (Gellini e Grossoni, 1997). La corteccia si presenta notevolmente suberosa, prima grigia e liscia, poi spessa, leggera, rugosa, spugnosa e irregolarmente e profondamente fessurata nelle parti non estratte (sugherone) mentre regolare e compatta nelle parti del tronco soggette ad estrazione (sughero gentile) (Dettori *et al.*, 2001). L'estrazione della corteccia è la principale attività economica legata a questa specie arborea. In Sardegna la legge regionale n. 4 del 9 febbraio 1994 impone che la prima decortica (demaschiatura) possa avvenire solo quando la pianta raggiunge la circonferenza a petto d'uomo di almeno 60 cm (intorno ai 15-20 anni) e che le successive decortiche avvengano con turni non inferiori a 10 anni. Tuttavia diversi operatori al fine di ottenere un prodotto di grosso calibro (spessore) e quindi qualitativamente migliore, realizzano anche turni 12-15 anni (Dettori *et al.*, 2001).

L'apparato radicale è fittonante e presenta robuste ramificazioni laterali che si espandono notevolmente in orizzontale e assicurano alla pianta una buona solidità in suoli poco profondi, condizione tipica di molte stazioni in cui vegeta la specie (Gellini e Grossoni, 1997).

La spiccata capacità pollonifera che si conserva fino a 120 anni d'età, e il notevole spessore della corteccia rendono la sughera un specie pirofita, e quindi adatta a sopravvivere in un ambiente, quello mediterraneo, in cui l'incendio è un importante fattore ecologico. Tale caratteristica unitamente

all'azione dell'uomo ha determinato l'attuale diffusione della specie, avvenuta spesso a discapito anche di specie con una maggiore valenza ecologica come il leccio (*Quercus ilex*) o la roverella (*Quercus pubescens*).

2.1.2 Ecologia e distribuzione della sughera

L'areale originario della sughera sembra essere il sud-ovest della Cina. Nell'era Terziaria è avvenuta la migrazione verso l'area mediterranea (Dettori *et al.*, 2001). Attualmente la quercia da sughero estende il suo areale dal settore centro-occidentale del bacino mediterraneo alle coste atlantiche (Fig. 1).

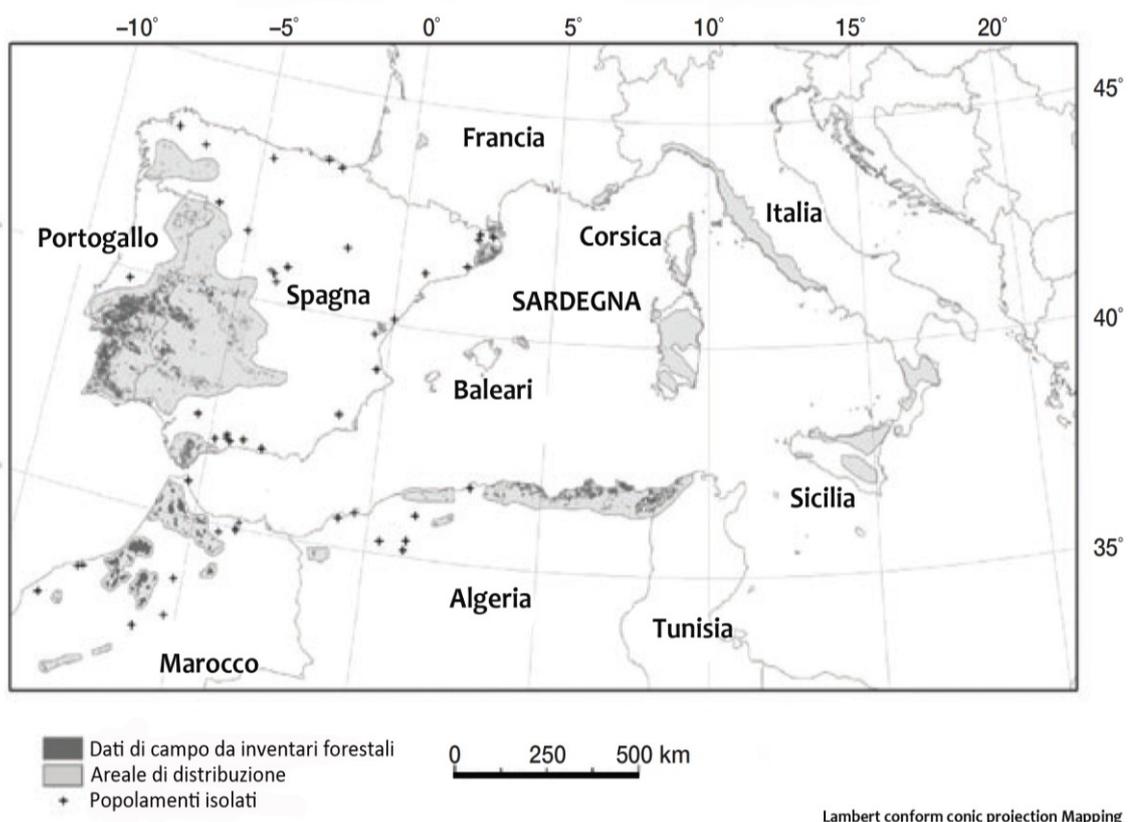


Figura 1. Areale di distribuzione della sughera (da Bugalho *et al.*, 2011).

In Africa è presente soprattutto in Marocco, e nelle aree costiere di Algeria e Tunisia. In Europa la sua maggiore diffusione si ha nella penisola Iberica, in particolare in Portogallo. In Spagna è diffusa soprattutto nella parte occidentale del paese; in Francia si riscontra in Corsica e nelle coste che si affacciano sul Mediterraneo. Inoltre, sono presenti alcuni micro-areali con quercia da sughero nelle coste Atlantiche.

Complessivamente, le foreste costituite da quercia da sughero si estendono su più di 2.777.000 ettari (Tab. 1) (Campos *et al.*, 2007; Vallejo *et al.*, 2009).

Per quanto riguarda l'Italia, la sughera è diffusa soprattutto in Sardegna, ma si riscontra anche lungo la costa tirrenica e in Sicilia.

In Sardegna, la superficie sughericola regionale, secondo la mappa di uso del suolo, comprende circa 84.763 ettari di sugherete pure e 53.178 ettari di sugherete associate a coltivi. In totale nell'Isola è concentrata l'83% della superficie nazionale a quercia da sughero (Sedda *et al.*, 2011).

Tabella 1. Superfici investite a quercia da sughero e produzioni di sughero nei Paesi sughericoli (APCOR, 2009).

Paesi	Superficie		Produzione di sughero	
	ha	%	q.li	%
Portogallo	736.000	32,4	1.570.000	52,5
Spagna	506.000	22,4	880.400	29,5
Algeria	414.000	18,2	150.000	5,2
Marocco	345.000	15,2	110.000	3,7
Italia	92.000	4,0	170.000	5,5
Tunisia	92.000	4,0	70.500	2,5
Francia	92.000	4,0	30.400	1,1
Totale	2.277.700	100	2.990.300	100

La sughera è una specie eliofila la cui diffusione, soprattutto in aree continentali interne, è limitata dal freddo. Infatti non tollera temperature medie annue inferiori a 13-14 °C e temperature minime fredde inferiori a 7-8 °C, tuttavia può tollerare minime assolute fino a -10 °C. Nelle stazioni più fredde un altro fattore limitante è la neve: se le nevicate sono ripetute e abbondanti si verificano frequenti rotture delle branche principali a causa del peso della neve (Dettori *et al.*, 2009). Le precipitazioni minime devono essere di almeno 500 - 600 mm di pioggia annua; in tal senso la sughera è considerata una specie xerofila, anche se risente dell'aridità e delle elevate temperature estive più del leccio. Il suo areale di vegetazione si estende dal livello del mare sino alle quote di 950 m in Sardegna, 1200 m in Sicilia, 1300 m in Algeria fino ai 2400 m in Marocco in funzione delle diverse condizioni climatiche e in particolare delle temperature minime (Pignatti, 1998).

La sughera vegeta su suoli con diverse caratteristiche edafiche, tuttavia predilige quelli silicei mentre non tollera quelli con reazione alcalina ed in particolare con elevati contenuti di carbonati. Si adatta molto bene a suoli con bassa fertilità che presentano pH acidi o sub-acidi compresi tra 4,5-6 poco profondi, con una buona permeabilità, tessitura sabbio-argillosa e con tenori in sabbia anche superiori al 50%.

2.1.3 Gestione delle sugherete

La fisionomia attuale dei boschi di quercia da sughero deriva essenzialmente dalle caratteristiche stagionali ma anche dal tipo di gestione selvicolturale attuato negli anni (Montaldo *et al.*, 2008; Urbietta *et al.*, 2008; Bugalho *et al.*, 2011; Azul *et al.*, 2009). Attraverso la gestione, infatti, l'uomo può modificare la distribuzione delle specie forestali, sia direttamente con l'introduzione e l'utilizzazione di specie o genotipi nuovi, sia indirettamente attraverso le pratiche che privilegiano lo sviluppo di una determinata specie a discapito di altre (Urbietta *et al.*, 2008).

Un esempio di ecosistemi derivati dall'interazione uomo-ambiente è rappresentato proprio dalle foreste mediterranee dove gli interventi antropici hanno senza dubbio influenzato la composizione e la struttura dei boschi, in particolare delle foreste di quercia da sughero (Bugalho *et al.*, 2011; Azul *et al.*, 2009).

La presenza della sughera in ambito mediterraneo è stata sempre salvaguardata dall'uomo per via dei beni e servizi forniti dai boschi che essa forma. Basti pensare al fatto che le piante di sughera hanno una spessa corteccia che oltre a proteggerle in modo efficace dagli incendi, costituisce un'importante fonte di reddito che garantisce la sostenibilità economica della loro coltivazione. Inoltre, essendo la quercia da sughero una specie eliofila, forma boschi ad elevata biodiversità che consentono di associare l'attività selvicolturale ad altre attività di tipo agricolo e zootecnico. Pertanto la sughera si ritrova molto spesso associata a culture cerealicole destinate ad essere pascolate direttamente oppure a formare prati o erbai. Questa fisionomia, seppur indicata con nomi differenti nei vari Paesi sughericoli (pascoli arborati in Sardegna, *Montados* in Portogallo, *Dehesa* in Spagna) è sempre riconducibile ad una stessa tipologia di gestione (Sedda *et al.*, 2011).

In Sardegna si possono trovare boschi con produzioni sughericole di alta qualità, solo di rado associate ad attività pastorali; oppure boschi in cui le produzioni sughericole costituiscono solo una piccola parte del reddito di aziende a spiccata vocazione zootecnica, con ampie superfici cerealicole dove

l'intervento antropico ha portato, in alcuni casi, alla semplificazione degli ecosistemi a sughera e alla comparsa di fattori di degrado con un'intensità di pressione che spesso supera l'intrinseca resilienza del sistema compromettendo la sua capacità di autoregolazione (Dettori *et al.*, 2001).

Ovviamente esiste un'ampia variabilità di tipologie gestionali in funzione delle caratteristiche stazionali: giacitura, substrato litologico, regime termo-pluviometrico ecc.. Nel complesso, le fisionomie dei boschi di sughera riscontrabili in Sardegna si possono essenzialmente ricondurre alle seguenti tre tipologie:

a) Sugherete naturali, in cui la principale attività antropica è rappresentata dall'estrazione del sughero. Sono sugherete disetanee che più si avvicinano ai sistemi naturali dove la sughera forma boschi misti con altre specie arboree ed arbustive. Esse raramente vengono pascolate e tendono ad assumere una struttura idonea per assolvere funzioni di protezione, per cui si riscontrano soprattutto nelle aree a rischio idrogeologico. Peraltro, la diffusa e continua presenza di novellame da salvaguardare preclude la possibilità di utilizzare il territorio con altre attività di natura agronomica o zootecnica. In ogni caso la conservazione di tali sugherete necessita dell'intervento dell'uomo in quanto la sughera, essendo specie eliofila, in condizioni di bosco chiuso viene naturalmente sostituita dal leccio o dalla roverella. Inoltre, in assenza di cure colturali l'ecosistema a sughera va incontro più facilmente a forme di degrado a causa dell'eccessivo sviluppo del sottobosco che rende difficile l'insediamento della rinnovazione naturale, del maggiore rischio di incendi, del più facile sviluppo di malattie e di una maggiore competizione per le risorse (Brasier, 1996; Pinto-Correira e Mascarenhas, 1999; Nunes *et al.*, 2005; Bugalho *et al.*, 2011).

b) Sugherete pascolate. Queste formazioni sono condotte secondo schemi selvicolturali che prevedono il pascolo con bestiame ovino e/o bovino e l'allevamento delle piante di sughera che rappresentano un'importante fonte

di reddito per il bilancio dell'azienda. Sono sugherete coetanee e disetanee pure o miste per la presenza delle altre specie quercine, leccio e roverella. In esse vengono tagliate solo le piante stramature non più in produzione o quelle deperenti; la rinnovazione è mista da seme o da ceppaie che emettono polloni dopo ceduzione o perché deperenti. Il sottobosco è costituito da uno strato erbaceo-arbustivo, naturale o artificiale, destinato al pascolo del bestiame che, però, solitamente presenta carichi ridotti. Lo sviluppo della componente arbustiva viene controllato periodicamente attraverso decespugliamento meccanico con lo scopo di favorire l'insediamento del novellame di sughera, di origine gamica o agamica, di prevenire lo sviluppo degli incendi e di facilitare le operazioni di decortica.

c) Sugherete lavorate. Queste formazioni sono dei sistemi agro-selvi-colturali in cui la principale attività economica è di tipo zootecnico e il reddito ottenuto dall'estrazione del sughero è solo marginale. Si tratta di sugherete che vengono sottoposte a lavorazione del terreno ogni due o tre anni e a semina con cereali destinati all'alimentazione del bestiame. In esse la densità delle piante di sughera è normalmente bassa e la rinnovazione naturale molto scarsa per via del pascolamento. Le sughere presenti si sono originate o da seme caduto al suolo o da ceppaie di piante ceduate per il passaggio di incendio o perché deperenti. Il trattamento selvicolturale consiste essenzialmente nell'eliminazione delle piante che via via divengono deperenti e scarsamente produttive. Sono infatti sugherete ad elevata criticità, dove di frequente si verificano situazioni che compromettono le condizioni vegetative della pianta, per es. con arature a ridosso del fusto che causano danni all'apparato radicale o con fertilizzazioni irrazionali che ne influenzano la produttività e l'invecchiamento.

2.2 La simbiosi micorrizica

Il termine simbiosi è stato utilizzato probabilmente per la prima volta da Frank (1877) che definiva “*symbiotismus*” la regolare coesistenza tra organismi differenti in riferimento all’associazione tra funghi e alghe (licheni). In seguito De Bary (1887) ha usato il termine “*symbiose*” per indicare lo stile di vita in associazione tra due organismi appartenenti a *taxa* differenti. Egli considerava una relazione di simbiosi come “parassitaria” nel caso in cui traeva profitto solamente una delle due specie coinvolte nel rapporto, oppure “mutualistica” quando entrambi i simbionti ricavano dei vantaggi, evidenziando che a seconda delle condizioni ambientali il limite tra i due tipi di simbiosi non sempre era ben definito.

In seguito, il termine “simbiosi” venne utilizzato essenzialmente per definire le associazioni che implicavano un reciproco beneficio degli organismi coinvolti, mentre il termine “parassitismo” per indicare un rapporto patogenetico (Smith e Read, 2008). Solo recentemente è stata rivalutata la definizione originale proposta da De Bary, secondo la quale mutualismo e parassitismo devono essere considerati i due estremi del rapporto di simbiosi.

Tra le associazioni mutualistiche maggiormente diffuse ed evolute rientra la “simbiosi micorrizica”. Il termine “micorrizza” si traduce letteralmente come “fungo-radice” (*myco* = fungo, *rhyza* = radice) e definisce l’associazione di funghi del suolo con le radici di piante. Tale associazione si è evoluta nel paleozoico, oltre 400 milioni di anni fa, ed ha consentito la conquista della terra da parte delle piante (Selosse e Le Tacon, 1998).

Nel tempo il concetto di simbiosi mutualistica è stato interpretato in vari modi e con esso quello di simbiosi micorrizica che, recentemente, Brundrett (2004) ha definito come: “associazione tra un fungo (capace di vivere nel suolo e nella pianta) e una radice (o altro organo vegetale di contatto con il suolo) di una pianta viva, essenziale per la vita di uno o entrambi i partner e responsabile del trasferimento di sostanze nutritive che si realizza quando pianta e fungo si sviluppano assieme”. Formano questa associazione diversi *taxa* fungini, appartenenti ai *Basidiomycota*, *Ascomycota*, *Zygomycota* e *Glomeromycota*, e

la maggior parte delle piante vascolari e delle briofite (Smith e Read, 2008). La natura del rapporto di simbiosi può variare in base alle caratteristiche degli organismi coinvolti e alle condizioni ambientali, ma si risolve sempre con un reciproco vantaggio per i simbionti. Fanno eccezione le micorrize delle *Orchidaceae* che nelle prime fasi di sviluppo dell'ospite (tutte le orchidee sono acolorofilliche nei primi stadi di vita) comportano un esclusivo vantaggio per quest'ultimo.

Essenzialmente si possono distinguere i seguenti tipi di simbiosi micorriziche:

Micorrize vescicolo-arbuscolari (VAM). Vengono così definite le micorrize in cui il micelio del fungo che colonizza le radici dell'ospite simbiote si ramifica tra le cellule corticali e produce caratteristici arbuscoli (strutture ifali finemente ramificate e rapidamente senescenti) che proliferano all'interno di una singola cellula e fungono da interfaccia di scambio tra fungo e ospite (Smith e Read, 2008). Inoltre, il micelio può differenziare, sia nel simplasto che nell'apoplasto, strutture di forma rotonda (vescicole) che hanno una durata superiore a quella degli arbuscoli e fungono da organi di riserva.

I funghi delle VAM appartengono alla divisione *Glomeromycota*, sono simbionti obbligati, per lo più asettati e non producono corpi fruttiferi visibili ma spore di grandi dimensioni (50-1000 μm di diametro). Essi, pur manifestandosi in natura con una diversità limitata, sono molto diffusi. Infatti, formano VAM la maggior parte delle piante terrestri; tra queste rientrano diverse specie di interesse forestale come quelle appartenenti ai generi *Acer*, *Cupressus*, *Fraxinus*, *Platanus*, *Prunus*, *Sequoia*, *Taxus*, *Ulmus*.

Ectomicorrize. Sono formate da funghi che, al contrario di quelli coinvolti nelle VAM, causano evidenti cambiamenti morfologici nelle radici colonizzate. Infatti, gli apici radicali appaiono rivestiti dalle ife fungine che organizzano una struttura denominata "mantello" o "micoclona". Da questa si dipartono verso l'esterno numerose ife, definite "trofiche", che formano una rete miceliare di collegamento tra apice radicale, suolo e sporomi. Verso l'interno altre ife si

ramificano tra le cellule dell'epidermide organizzando un reticolo, detto "reticolo di Hartig", che funge da interfaccia di scambio tra fungo e radice. La forma finale della micorrizza dipende dal tempo di colonizzazione necessario al fungo per organizzare il mantello, ma anche dal tempo di crescita della radice in quanto lo sviluppo della simbiosi determina un aumento della ramificazione degli apici radicali. In ogni caso, le caratteristiche morfo-anatomiche delle ectomicorrize sono costanti e distintive per ogni combinazione fungo simbionte – pianta ospite (Agerer, 1987-2002).

Circa il 3% delle piante fanerogame forma simbiosi ectomicorriziche. Finora si conoscono 26 famiglie, 145 generi e circa 6000 specie di piante, approssimativamente 5600 Angiosperme e 285 Gimnosperme, che formano simbiosi ectomicorriziche con una grande diversità di specie fungine (Brundrett, 2009). Le stime al riguardo contano che in queste associazioni sono coinvolte 5000-6000 specie di funghi tra *Ascomycota*, *Basidiomycota* e *Zigomycota* (Smith e Read, 2008). Una caratteristica delle piante che formano simbiosi ectomicorriziche è il basso livello di specificità nei confronti dei funghi a cui si associano. Infatti, nonostante alcune eccezioni – per esempio le specie del genere *Alnus* che mostrano specificità verso i funghi del genere *Alpova* – si stima che una singola specie vegetale si possa associare con centinaia di specie fungine e un singolo albero con decine di specie fungine (Smith e Read, 2008).

In ogni caso, il primo passo per la formazione di una ectomicorrizza è legato alla presenza nella rizosfera di essudati radicali secreti dalle piante che contengono sostanze utili per la crescita dei funghi e che perciò ne mediano la compatibilità con le radici. È stato dimostrato che nelle radici di *Eucalyptus globulus* durante la colonizzazione di *Pisolithus tinctorius* si riduce la concentrazione di polipeptidi, normalmente più elevata negli individui che non vivono in simbiosi, si ha la sintesi di proteine chiamate "ectomicorrizine" e un aumento della concentrazione di auxine (Martin *et al.*, 2001; Smith e Read, 2008). Una volta avvenuto il riconoscimento tra fungo e apice radicale si ha la formazione della micoclona la cui morfologia varia a seconda delle specie

simbionti coinvolte nell'associazione (Martin *et al.*, 2001). La micoclona ha una biomassa superiore a quella del reticolo di Hartig e sostanzialmente funge da organo di accumulo di sostanze nutritive, assicurando nel contempo la protezione fisica dell'apice radicale. Tra le ife che la costituiscono albergano batteri che pare svolgano un ruolo attivo per il mantenimento della simbiosi (Garbaye, 1994; Peterson *et al.*, 2004; Smith e Read, 2008). In seguito alla differenziazione del mantello si ha la penetrazione delle ife del fungo tra le cellule corticali dell'ospite e la formazione del reticolo di Hartig che rappresenta la zona di contatto tra i due simbionti ed è sede di un'intensa attività metabolica. Nelle radici di Angiosperme le ife di tale reticolo non penetrano oltre la parete esterna del primo strato di cellule epidermiche, mentre in quelle delle Gimnosperme si spingono oltre l'epidermide e attraversano alcuni strati delle cellule corticali (Fig. 2).

Un ruolo fondamentale nel rapporto simbiotico è svolto dal terzo elemento che caratterizza una ectomicorrizza, il micelio extramatricale. Esso è costituito dalle ife trofiche che si diffondono nel suolo a partire dal mantello, aumentando di fatto la zona di esplorazione delle radici e, di conseguenza, l'assunzione di acqua e di soluti da parte delle stesse (Agerer, 1991). Queste ife possono svilupparsi singolarmente oppure aggregarsi tra loro con vari livelli di organizzazione, da quelli più semplici in forma di cordoni ifali, a quelli più complessi rappresentati dall'intima unione di ife che si accrescono parallelamente per costituire strutture chiamate rizomorfe. La loro morfologia può variare in funzione della complessità del livello organizzativo, ma rimane costante e distintiva per le varie specie fungine (Agerer, 1991-2002). Queste ife si irradiano nel suolo ramificandosi per adsorbire acqua e soluti che poi traslocano nel mantello attraverso la differenziazione di ponti interfali e anastomosi di collegamento (Smith e Read, 2008). Uno degli aspetti che assume grande importanza ecologica legato allo sviluppo del micelio extramatricale è la possibilità che uno stesso fungo colleghi con le proprie ife piante diverse della medesima e di diverse specie, assumendo così un ruolo chiave nel garantire la resilienza dell'ecosistema. Infatti la rete miceliare

trofica che realizza una comunità ectomicorrizica nel suolo con scambi bidirezionali di sostanze tra piante diverse, è di indubbio sostegno alla produttività dell'ecosistema durante periodi di siccità o di disponibilità limitata di risorse (Simard *et al.*, 1997).

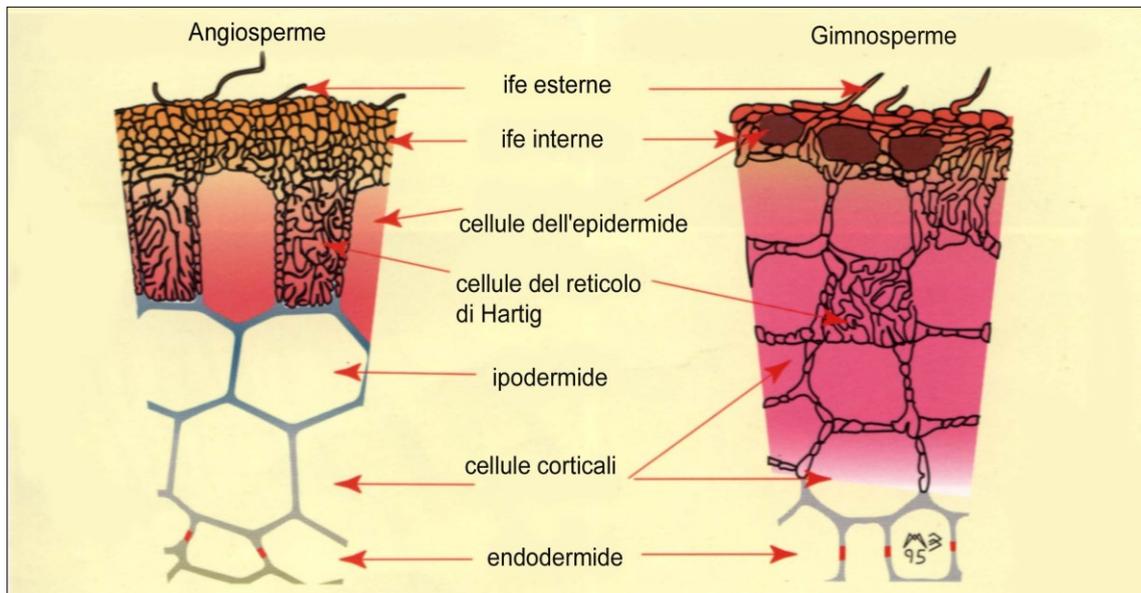


Figura 2. Diffusione delle ife del reticolo di Hartig nelle radici di Angiosperme e di Gimnosperme (da Brundrett *et al.*, 1996).

Ectendomicorrize. Si differenziano dalle ectomicorrize perché formano un mantello più sottile o non lo formano affatto, e perché le ife del reticolo di Hartig hanno un andamento intracellulare. Formano questo genere di micorrize sia Gimnosperme che Angiosperme con diversi funghi Ascomiceti e Basidiomiceti.

Micorrize arbutoidi. Sono formate dalle radici di piante che appartengono alle famiglie *Ericaceae* e *Pyrolaceae* dell'ordine *Ericales* e da funghi Basidiomiceti. Il mantello è più o meno spesso a seconda della specie fungina coinvolta nell'associazione (Peterson *et al.*, 2004). Da esso si dipartono esternamente le ife trofiche e internamente il reticolo di Hartig

(Massicotte *et al.*, 1993). Le ife del reticolo possono penetrare nelle cellule adiacenti e formare ammassi miceliari che occupano gran parte del volume delle cellule. Queste ife sono separate dal citoplasma della cellula vegetale per via di una membrana plasmatica che funge da interfaccia (Fusconi e Bonfante-Fasolo, 1984). Le ife penetrate all'interno delle cellule vegetali degenerano in seguito all'invecchiamento delle radici.

Micorrize monotropoidi. Sono formate da piante della famiglia *Monotropaceae*, ordine *Ericales*, e da funghi Basidiomiceti. Le piante di questa famiglia, che annovera circa dieci generi, sono tutte aclorofilliche, eterotrofe, la cui esistenza è assicurata proprio dalla simbiosi micorrizica. Infatti lo sviluppo della relativa rete miceliare nel substrato funge da ponte di collegamento con le piante autotrofe che forniscono le sostanze nutritive (Peterson *et al.*, 2004). Queste micorrize presentano un mantello spesso, solitamente multistratificato, con presenza di cistidi o rizomorfe a seconda della specie fungina coinvolta, e un reticolo di Hartig confinato all'epidermide. Dal reticolo si originano strutture simili ad austori che penetrano nelle cellule epidermiche.

Micorrize ericoidi. Sono associazioni costituite da piante dell'ordine *Ericales* e da funghi Ascomiceti. Le radici di queste piante sono rivestite da due strati di cellule epidermiche, uno esterno (esodermide) privo di peli radicali, e uno interno (endodermide). Queste cellule hanno una vita di breve durata in quanto vengono presto sostituite da altre cellule ispessite e suberificate. La colonizzazione del fungo è limitata alla sola fase in cui è presente lo strato epidermico. Le ife fungine creano prima una rete attorno alla zona delle radici fini della pianta, poi penetrano all'interno delle cellule epidermiche dove proliferano abbondantemente. Qui la membrana plasmatica della cellula vegetale si invagina ripetutamente impedendo alle ife del fungo di entrare in diretto contatto con il citoplasma. Poiché ciascuna cellula viene penetrata in un solo punto, nel tessuto corticale si possono avere cellule adiacenti con

colonizzazioni di età e sviluppo diverso. Queste strutture rimangono attive per circa 5-6 settimane, dopo di che si assiste ad una degenerazione del citoplasma della cellula ospite seguita da quella delle ife fungine (Smith e Read, 2008).

Micorrize delle Orchidaceae. Sono associazioni che questa famiglia di piante instaura con funghi Basidiomiceti. Invero, nelle radici di orchidee sono state riscontrate anche alcune specie di Ascomiceti (*Tuber* spp.), il cui ruolo funzionale però dev'essere ancora dimostrato (Dearnaley, 2007). È una simbiosi studiata da tempo per via dell'importanza economica della famiglia della pianta ospite che, peraltro, annovera il maggior numero di specie (oltre 25.000) del mondo vegetale (Jones, 2006), e per il fatto che l'associazione con i funghi risulta indispensabile per lo sviluppo di queste piante. Infatti, com'è noto, la quasi totalità delle orchidee sono aclorofilliche nelle prime fasi del loro sviluppo, e circa un centinaio di specie conservano questa caratteristica anche in fase adulta (Leake, 2005). Inoltre, i semi delle orchidee sono molto piccoli tanto che le loro riserve nutritive sono generalmente insufficienti a garantire lo sviluppo delle piantine. Nell'associazione simbiotica il fungo colonizza i tessuti vegetali formando caratteristici gomitoli di ife intracellulari denominati "pelotoni", attraverso i quali avvengono gli scambi nutrizionali con la pianta. I pelotoni hanno una durata limitata in quanto subiscono la lisi in seguito alle reazioni di difesa attiva della pianta.

Nella successiva tabella 2 sono sintetizzate le principali caratteristiche dei vari tipi di micorrize.

Tabella 2. Principali caratteristiche dei più importanti tipi di micorrize. Le caratteristiche delle strutture si riferiscono allo stadio maturo, non di sviluppo o senescente. Tra parentesi sono indicate condizioni rare. Sono abbreviati i *taxa* fungini per *Glomeromycota*, *Basidiomycota*, *Ascomycota*; i *taxa* di piante per *Bryophyta*, *Pteridophyte*, *Gymnospermae*, *Angiospermae* (modificato, da Smith e Read, 2008).

Tipi di Micorriza	Micorriza Arbuscolo Vescicolare	Ecto micorriza	Ectendo micorriza	Micorriza arbutoide	Micorriza monotrofoide	Micorriza Ericoide	Micorriza delle Orchidaceae
Funghi settati	-	+	+	+	+	+	+
Funghi asettati	+	-	-	-	-	-	-
Colonizzazione intracellulare	+	-	+	+	+	+	+
Mantello	-	+	+ 0 -	+ 0 -	+	-	-
Reticolo di Hartig	-	+	+	+	+	-	-
Aclorofilliche	-(+)	-	-	-	+	-	+
Funghi	Glomero	Basidio Asco (Glomero)	Basidio Asco	Basidio	Basidio	Asco	Basidio
Piante	Bryo Pterido Gymno Angio	Gymno Angio	Gymno Angio	Ericales	Monotropo	Ericales Bryo	Orchidales

2.3 Le comunità ectomicorriziche

Da tempo le ectomicorrize sono state oggetto di numerosi studi, ma un concreto avanzamento delle conoscenze sulle loro comunità si è avuto solo in epoca recente. Fino a circa 30 anni fa le ricerche sui consorzi micorrizici fornivano risultati sicuramente parziali in merito alla loro reale composizione. Infatti, la gran parte delle ricerche si basavano essenzialmente sulla raccolta e successiva identificazione di sporomi, e non consentivano perciò di rilevare tutte quelle specie ectomicorriziche che originano sporomi ipogei o sporomi epigei incospicui difficilmente osservabili (Gardes e Bruns 1996; Horton e Bruns, 2001). Progressi significativi si sono avuti solo con lo sviluppo di studi basati sull'osservazione diretta delle caratteristiche morfologiche e anatomiche degli apici micorrizzati e sull'identificazione genetica delle specie mediante l'analisi di regioni specifiche dell'rDNA fungino (Agerer, 1987-2002; Gardes e Bruns, 1993). In tal modo è stato possibile accertare importanti differenze tra comunità epigee ed ipogee, facendo emergere per esempio che certe specie fungine possono produrre una notevole quantità di sporomi ed essere poco rappresentate nelle ectomicorrize, oppure produrre pochi sporomi ed essere abbondanti nell'apparato radicale delle piante (Gardes e Bruns 1996; Dahlberg, 2001; Erland e Taylor, 2002). Inoltre, è stato possibile accertare lo stile di vita simbiotico di numerose specie molto diffuse ma poco note, come quelle appartenenti alle famiglie delle *Thelephoraceae* e *Sebacinaceae* (Horton e Bruns, 2001; Glen *et al.*, 2002), o ancora verificare che una stessa specie micorrizica può formare simbiosi con radici di differenti specie arboree, come ad esempio *Cenococcum geophilum* che ha uno spettro d'ospiti di oltre 200 specie diverse o, viceversa, con radici di una sola specie arborea, come il caso di *Boletus elegans* con *Larix decidua* (Montecchio e Rossi, 2000).

Attualmente gli studi sulle comunità ectomicorriziche sono indirizzati oltre che a verificare la loro biodiversità nei diversi ecosistemi, anche a definire il ruolo che effettivamente svolgono nel garantire la funzionalità degli stessi ecosistemi e a prevedere le loro dinamiche in risposta ad eventi di disturbo biotici o abiotici (BASTIAS *et al.*, 2006; TEDERSOO *et al.*, 2006; VALDÉS *et al.*, 2006; Courty *et al.*,

2010; Richard *et al.*, 2011). Va tuttavia sottolineato che molte di queste ricerche sono state finora realizzate solo su scala locale, per cui hanno fornito una visione limitata del rapporto dei funghi ectomicorrizici con l'ambiente, evidenziando la necessità di realizzare studi su vasta scala sia per migliorare la conoscenza di queste relazioni, sia per definire modelli predittivi a validità più generale (Lilleskov e Parrent, 2007). In tal caso, ovviamente, gli studi dovranno essere pianificati in modo da rappresentare in maniera esaustiva la variabilità dei fenomeni oggetto d'indagine, ponendo particolare attenzione agli aspetti di seguito esemplificati.

Disegno sperimentale. Per descrivere una comunità fungina ectomicorrizica vengono di solito utilizzati grafici e indici sintetici che ne esprimono la diversità, la struttura e la composizione in specie. Tuttavia, affinché i parametri ecologici utilizzati descrivano completamente la comunità è necessario definire attentamente il disegno sperimentale, individuando il metodo migliore di campionamento e il numero ottimale di campioni di suolo da osservare in funzione degli obiettivi dell'indagine. A tal fine bisogna tener conto che la distribuzione delle specie ectomicorriziche nel suolo può essere influenzata da fattori, quali ad esempio l'architettura dell'apparato radicale degli ospiti vegetali, le caratteristiche chimico-fisiche del suolo, il tenore di umidità e di temperatura. Inoltre, bisogna considerare che le stesse occupano nicchie ecologiche differenti compatibili con il loro tasso di crescita, la loro capacità di colonizzare una radice o volumi di suolo dove, per di più, può variare la concentrazione minima alla quale una risorsa si rende disponibile (Koide *et al.*, 2011). A ciò si unisce il fatto che è praticamente impossibile rilevare il numero totale delle specie di una comunità di organismi, soprattutto quando questa è costituita da un numero elevato di specie rare, come appunto si verifica nella maggior parte delle comunità ectomicorriziche (Gotelli e Colwell, 2001; Taylor, 2002). Di certo, nelle indagini volte a descrivere in modo esaustivo la ricchezza di queste comunità, è sempre preferibile impostare un disegno sperimentale che preveda di esplorare nicchie ecologiche diverse (Colwell e Coddington, 1994).

Natura del suolo forestale. Essendo le foreste dei sistemi naturali, le uniche fonti di nutrizione minerale per le piante sono costituite dalle deposizioni atmosferiche e dagli elementi del suolo resi disponibili anche grazie all'attività svolta dai microorganismi tellurici, in particolare dai funghi che instaurano simbiosi micorriziche (Courty *et al.*, 2010). Peraltro è ben noto che l'efficienza del rapporto simbiotico di questi funghi con le piante è influenzata proprio dalle caratteristiche chimico-fisiche del suolo (Conn e Dighton, 2000). Thomson e coll. (1996) hanno ottenuto risposte differenti nell'accrescimento di piantine di *Eucalyptus globulus* micorrizzate con specie fungine diverse in substrati di crescita a pH differenti. Altri Autori hanno dimostrato che la simbiosi micorrizica favorisce la crescita delle piante nei suoli con contenuti di umidità più elevati (Kennedy e Peay, 2007). Domish e coll. (2002) hanno evidenziato che l'aumento di temperatura del suolo da 5 a 17 °C favorisce la colonizzazione delle radici di piantine di *Pinus sylvestris* da parte di funghi ectomicorrizici con conseguente aumento della concentrazione di elementi nutritivi nei tessuti delle stesse piantine. In esperimenti condotti negli Stati Uniti è emerso che l'erosione della sostanza organica e l'aumento del livello di compattazione del suolo influenzano negativamente la diversità e l'abbondanza di apici radicali micorrizzati (Amaranthus *et al.*, 1996). Altri studi hanno messo in evidenza una differente distribuzione verticale nel suolo dei funghi ectomicorrizici. Per esempio, *Cenococcum geophilum*, capace di esplorare il suolo a corta distanza, si riscontra di preferenza in orizzonti organici, mentre *Tylospora fibrillosa* e diverse specie del genere *Tomentella*, in grado di esplorare il suolo a media-lunga distanza, preferiscono orizzonti minerali (Erland e Taylor, 2002; Baier *et al.*, 2006). Risulta pertanto che le caratteristiche del suolo possono influenzare la struttura tassonomica delle comunità fungine ectomicorriziche, creando di conseguenza una funzionalità strutturale all'interno della stessa comunità.

Gestione del bosco. La pianificazione di una gestione sostenibile negli ecosistemi forestali è oggi una necessità prioritaria, in particolare in ecosistemi come quello a quercia da sughero la cui sopravvivenza è strettamente legata alla

presenza fattiva dell'uomo. In tali ecosistemi le attività selvicolturali sono state spesso associate in vario modo a quelle agricole e zootecniche con lo scopo di contribuire alla sostenibilità socio-economica del territorio. Ciò però ha portato, in molti casi, ad un aumento dell'incidenza dei fattori di disturbo nel sistema bosco a causa dell'intensificazione delle pratiche di uso del suolo o, per altro verso, dell'abbandono delle terre per la rarefazione della società rurale con avvio di processi naturali di successione ecologica (Urbieta *et al.*, 2008; Azul *et al.*, 2009; Bugalho *et al.*, 2011). Queste modificazioni si ripercuotono su tutte le componenti dell'ecosistema e in particolare sulle comunità dei funghi ectomicorrizici. Vari studi hanno dimostrato che tali comunità possono essere influenzate direttamente oltre che dalle modificazioni climatiche o della componente vegetale, anche dal pascolamento, dalle lavorazioni del suolo e dalle fertilizzazioni (Smith e Read, 2008; Erland e Taylor, 2002; Courty *et al.*, 2010); da fattori, quindi, strettamente legati alle attività antropiche nel bosco.

Dinamiche stagionali. In ambito mediterraneo il clima è caratterizzato da una forte stagionalità che influenza lo sviluppo della componente vegetazionale delle formazioni boschive, prevalentemente costituite da alberi e arbusti sempreverdi sclerofillici. Diverse indagini sono state effettuate per verificare le relazioni tra cambiamenti climatici e dinamica delle comunità ectomicorriziche, ma non sempre i risultati hanno portato alle medesime conclusioni (Richard *et al.*, 2011; Courty *et al.*, 2008). Ricerche svolte in ambiente mediterraneo, nei *montados* portoghesi, hanno mostrato l'esistenza di variazioni stagionali nella composizione in specie e nella struttura delle comunità ectomicorriziche (Azul *et al.*, 2009). Invece, in altri studi effettuati sempre in ambiente mediterraneo, in boschi dominati da *Quercus ilex*, non sono state rilevate variazioni stagionali sia nella composizione che nella ricchezza in specie delle comunità ectomicorriziche (Richard *et al.*, 2011). Izzo e coll. (2005) e de Roman e de Miguel (2005) ribadiscono che per chiarire la dinamica stagionale delle comunità ectomicorriziche sono necessari studi di maggiore dettaglio, mettendo a confronto più stazioni con tipologie vegetazionali e caratteristiche climatiche

ed edafiche simili. Koide e coll. (2011) affermano che le diverse specie presenti all'interno di una comunità coesistono perché hanno, in termini funzionali, esigenze ambientali simili. Tuttavia, se ad esempio si considera la temperatura come fattore di riferimento, si vede che al suo variare non tutte le specie fungine reagiscono allo stesso modo. Le specie che tollerano temperature più elevate diventeranno dominanti nei periodi più caldi, mentre verranno sostituite da altre specie, senza però scomparire, in seguito all'abbassamento delle temperature. Solo in caso di cambiamenti unidirezionali e permanenti della temperatura le specie dominanti sostituiranno definitivamente le altre specie dominate.

3. Scopo della ricerca

Come già accennato, gli ecosistemi a sughera della Sardegna, come pure quelli delle altre regioni sughericole del bacino del mediterraneo, sono spesso soggetti, ormai da decenni, a forme di degrado che ne causano la progressiva semplificazione. Di conseguenza è divenuta ormai prioritaria la necessità di adottare misure adeguate di prevenzione, la cui definizione non può prescindere da un'attenta valutazione delle cause che modificano gli equilibri tra le varie componenti biotiche e abiotiche degli ecosistemi alterandone la funzionalità.

Un ausilio in tal senso può essere fornito dall'analisi delle comunità ectomicorriziche. È stato infatti osservato che quando sull'ecosistema agiscono fattori di disturbo, naturali o antropici (per es.: siccità, incendi, inquinamenti, erosione del suolo, infestazioni di insetti e attacchi di patogeni, sfruttamento eccessivo delle risorse del bosco, ecc.), si verificano modificazioni evidenti nelle micocenosi e nello stato di micorrizzazione delle piante (Saikonen *et al.*, 1999; Montecchio *et al.*, 2000; Torta, 2001; Courty *et al.*, 2010).

Purtroppo finora sono molto poche le ricerche effettuate sulle comunità ectomicorriziche nelle sugherete, per cui non si hanno a disposizione termini di paragone per comprendere quando e in che misura le comunità ectomicorriziche si discostano dalle loro condizioni di "normalità" (Azul *et al.*, 2009; Aponte *et al.*, 2010). Inoltre, la gran parte delle indagini in tal senso sono state effettuate su piccola scala, per cui hanno fornito risultati frammentari, talvolta contraddittori e comunque riferibili solo agli specifici ambienti considerati. Ambienti, peraltro, spesso molto differenti tra loro per quanto riguarda la natura del substrato litologico o l'impatto delle attività antropiche relative soprattutto al pascolamento e/o alle pratiche agronomiche che comportano l'eliminazione dello strato arbustivo o la lavorazione del suolo a ridosso degli apparati radicali con successive fertilizzazioni.

Ciò, ovviamente, impone confronti con più comunità ectomicorriziche di riferimento, rappresentative dei vari ecosistemi a sughera più diffusi.

Pertanto, nell'ambito degli studi intrapresi dalla sezione di Patologia vegetale

del Dipartimento di Protezione delle Piante dell'Università degli Studi di Sassari sulle comunità ectomicorriziche delle sugherete sarde, al fine di acquisire informazioni utili per realizzare modelli previsionali della dinamica delle comunità ectomicorriziche applicabili negli ecosistemi tipici della quercia da sughero, è parso utile, per questa tesi di dottorato, svolgere una ricerca estesa ai diversi ambienti in cui vegeta la sughera in Sardegna con l'intento di rilevare le variazioni in struttura e composizione delle comunità dei funghi ectomicorrizici in relazione al tipo di substrato litologico, alla tipologia di gestione del bosco e alla stagionalità dei rilievi.

4. Materiali e metodi

4.1 Aree di indagine

Al fine di individuare sotto il profilo litologico e gestionale i principali comprensori in cui vegeta la quercia da sughero in Sardegna è stata svolta preliminarmente un'analisi cartografica utilizzando la Carta di Uso del Suolo (1997) e la Carta Ecopedologica Regionale (Madrau *et al.*, 2006). Dal loro confronto è emerso che le tre principali tipologie di sugherete (naturali, pascolate, lavorate) già descritte nel capitolo introduttivo, insistono su substrati di tipo granitico, alluvionale, trachitico, basaltico e metamorfico.

Pertanto, sono stati effettuati sopralluoghi nei vari comprensori con l'intento di individuare per ogni tipologia di substrato tutte e tre le tipologie gestionali di sugherete. Tale condizione è stata possibile rilevarla solo nei comprensori con matrice litologica di natura trachitica, basaltica e granitica, di seguito descritti:

1) Comprensorio situato in località "M.te Minerva" nel Comune di Villanova Monteleone (SS) a 300 m s.l.m. (Fig. 3). La componente litologica è costituita da rocce effusive acide del Cenozoico, che hanno dato origine a suoli compresi nella classificazione *Lithic Xerorthents* (Madrau *et al.*, 2006). Si tratta di suoli moderatamente profondi, con tessitura da franco-sabbiosa ad argilloso-sabbiosa, struttura poliedrica subangolare, buona permeabilità, reazione neutra, elevata presenza di scheletro e una notevole pietrosità (Aru *et al.*, 1991). La componente arborea è costituita da *Quercus suber* e *Q. pubescens*, mentre quella arbustiva da *Arbutus unedo*, *Myrtus communis*, *Phillyrea angustifolia*, *Erica arborea*.



Figura 3. Sugherete situate nel comprensorio "M.te Minerva" (N = sughereta naturale; P = sughereta pascolata; L = sughereta lavorata).

2) Comprensorio situato in località “Su Monte” nel Comune di Santu Lussurgiu (OR) a 500 m s.l.m. (Fig. 4). La componente litologica è costituita da rocce effusive basiche (basalti) del Pliocene superiore. I suoli predominanti sono ascrivibili a *Rock outcrop* e *Lithic Xerorthents* (Madrau *et al.*, 2006). Si presentano poco profondi, permeabili, con tessitura franco-argillosa, struttura poliedrica sub angolare e reazione neutra. Sono suoli caratterizzati da un eccesso di scheletro, rocciosità e pietrosità elevate, con una limitata quantità di sostanza organica (Aru *et al.*, 1991). La componente arborea è costituita da *Quercus suber* e *Q. pubescens* e pochi elementi sparsi di *Q. ilex*, mentre quella arbustiva è formata prevalentemente da *Cytisus villosus*. Sono presenti inoltre suffrutici come *Rubus ulmifolius* e lianose quali *Smilax aspera* e *Hedera helix*.

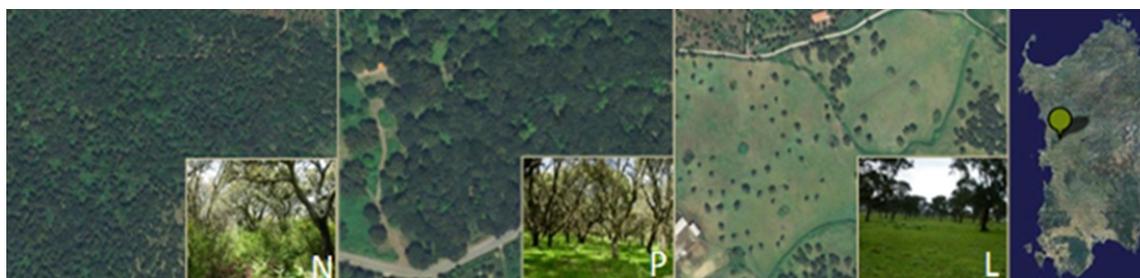


Figura 4. Sugherete situate nel comprensorio “Su Monte” (N = sughereta naturale; P = sughereta pascolata; L = sughereta lavorata).

3) Comprensorio situato in località “Sa Mudditta” nel Comune di Oschiri (OT) a 200 m s.l.m. (Fig.5). La componente litologica è costituita da rocce intrusive (graniti, granodioriti, ecc.) del Paleozoico. I suoli predominanti sono ascrivibili a *Rock outcrop* e *Lithic Xerorthents* (Madrau *et al.*, 2006). Si presentano poco profondi, permeabili, con tessitura da sabbioso-franca a franco-sabbiosa, struttura poliedrica sub angolare e reazione acida. Sono suoli caratterizzati da un eccesso di scheletro, rocciosità e pietrosità elevate (Aru *et al.*, 1991). La componente arborea è costituita in prevalenza da *Q. suber* e da qualche sporadico elemento di *Q. ilex*, mentre la componente arbustiva annovera specie quali: *Arbutus unedo*, *Erica arborea*, *Cistus monspeliensis*, *Cistus incanus*, *Calicotome villosa*, *Lavanda stoechas*, *Phillyrea angustifolia* e *P.*

latifolia, *Euphorbia* sp., *Prunus spinosa*, *Pistacia lentiscus*, *Viburnum tinus*, *Crataegus monogyna*.

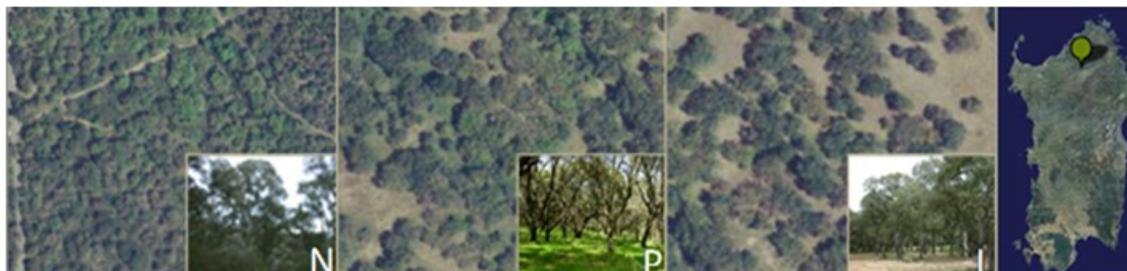


Figura 5. Sugherete situate nel comprensorio “sa Mudditta” (N = sughereta naturale; P = sughereta pascolata; L = sughereta lavorata).

4.2 Rilievi della vegetazione

In ciascuna delle 9 sugherete individuate sono stati allestiti due transetti (30 x 7,5 m), in ognuno dei quali sono state rilevate il numero di piante appartenenti al genere *Quercus*. Inoltre, le stesse sono state valutate sotto il profilo sanitario al fine di assicurare nella successiva elaborazione dei risultati l’omogeneità dei dati da confrontare.

4.3 Rilievi dello stato fitosanitario

In ciascuna area di saggio è stato rilevato il numero di piante di quercia da sughero, leccio e roverella presenti e valutato il loro stato sanitario sulla base del grado di trasparenza della chioma e dell’incidenza dei sintomi specifici di deperimento quali: necrosi, essudati, cancri, carie, rami epicormici presenti sul fusto e sulle branche, in accordo con la metodologia descritta da Franceschini e coll., (2002).

In base a queste valutazioni è stata attribuita a ciascuna pianta una “classe di deperimento” utilizzando una scala empirica di valori compresi tra 0 e 4, dove 0 = pianta sana, 1 = pianta con grado di deperimento lieve, 2 = medio, 3 = grave, 4 = pianta morta. L’elaborazione dei dati ottenuti ha consentito di calcolare l’Indice di Deperimento (ID) di ciascuna area di saggio, applicando la formula ID

= $\Sigma (C \times F)/N$, dove: C = valore (0÷4) della classe di deperimento di ciascuna pianta; F = frequenza delle piante con la stessa classe di deperimento; N = numero totale delle piante esaminate.

Sulla base del valore dell'Indice di Deperimento, per ciascun sito è stata attribuita una soglia di attenzione del fenomeno variabile da:

- nulla, per valori di ID compresi <0,2;
- lieve, per valori di ID compresi tra 0,21 e 0,9;
- moderata, per valori di ID compresi tra 0,91 e 1,7;
- media, per valori di ID compresi tra 1,71 e 2,6;
- alta, per valori di ID compresi >2,61.

4.4 Metodo di campionamento e isolamento delle ectomicorrize

Per campionare la comunità ectomicorrizica in ogni transetto sono stati effettuati due campionamenti: uno in autunno e uno nella primavera successiva, prelevando con un carotatore un monolite di terreno di 10 cm di diametro (Fig. 6). Tale monolite rappresenta il campione dal quale, in laboratorio, sono stati poi isolati tutti gli apici ectomicorrizici presenti.

Ciascun campione, subito dopo il prelievo, è stato conservato in una busta di plastica contenente carta bibula inumidita e siglato con due lettere, che indicano rispettivamente il tipo di substrato litologico e la tipologia di gestione di riferimento, e un numero identificativo da 1 a 10 per i campionamenti autunnali e da 30 a 40 per quelli primaverili.

I campioni di terreno, in laboratorio sono stati posti in un setaccio e sottoposti ad una prima pulizia per eliminare tutto lo scheletro, residui legnosi o radici grossolane. Successivamente da ciascun campione sono stati prelevati 5 sottocampioni che, sono stati posti in un vaglio con maglie da 2 mm e

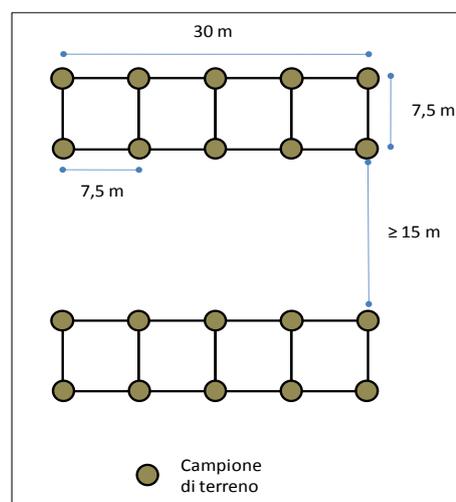


Figura 6. Schema di campionamento.

sciacquati con acqua corrente a bassa pressione in modo da asportare completamente le particelle di terreno libere. Dal materiale rimasto nel setaccio sono stati prelevati gli apici ectomicorizzati e sottoposti ad una pulizia più approfondita, prestando attenzione a non eliminare o modificare le strutture esterne delle ectomicorrize. Tutte le ectomicorrize presenti in ciascun sottocampione sono state numerate e, successivamente, analizzate per caratterizzarle sotto il profilo morfologico e anatomico.

4.5 Caratterizzazione morfo-anatomica delle ectomicorrize

Per la descrizione delle caratteristiche morfologiche delle ectomicorrize si è fatto riferimento alla “Check List A” proposta da Agerer nel “Color Atlas of Ectomycorrhizas” (1987-2002). L’osservazione di queste caratteristiche è stata fatta immergendo la ectomicorriza in una capsula Petri colma d’acqua e con sfondo nero, così da far risaltare maggiormente i colori e le strutture. Più in particolare, sono stati osservati i seguenti caratteri:

4.5.1 Tipo di ramificazione

a. ectomicorrize non ramificate o semplici: il sistema ectomicorrizico è semplice, la micorriza non è ramificata e il mantello avvolge i singoli apici radicali;



b. ramificazione monopodiale-pinnata: il sistema ectomicorrizico è formato da un asse centrale da cui si dipartono branche laterali più corte, le quali si sviluppano su un unico piano;



c. ramificazione monopodiale-piramidale: simile a quella monopodiale-pinnata ma con geometria tridimensionale anziché bidimensionale;



d. ramificazione dicotomica: il sistema ectomicorrizico si divide dicotomicamente in branche laterali della stessa lunghezza. La ramificazione principale può dare origine a ramificazioni di ordine superiore al primo;



e. ramificazione irregolare-pinnata: il sistema si divide in branche di diversa; può assomigliare alla ramificazione dicotomica quando la branca laterale ha una lunghezza uguale o maggiore a quella dell'asse principale;



f. ramificazione tubercoloide: gli apici micorrizzati sono avvolti all'interno di una sacca di micelio e non sono visibili; l'ectomicorriza assume l'aspetto di un tubercolo;



g. ramificazione coralloide: il sistema ectomicorrizico presenta una ramificazione dicotomica o pinnata ma con branche corte e fortemente ramificate, così da assumere un aspetto coralloide.



4.5.2 Caratteri distintivi della superficie del mantello

La superficie del mantello può essere:

✓ distinguibile oppure no: talvolta il mantello delle ectomicorrize è densamente coperto da emanazioni ifali, altre volte le parti esterne del mantello sono intrecciate lascamente; in questi casi la sua superficie non è ben distinguibile;

✓ con cellule corticali, visibili oppure no: alcune volte il mantello delle ectomicorrize è piuttosto sottile e si possono distinguere le cellule corticali;

✓ lucida: la superficie del mantello è lucente se osservata illuminando il campione con luce obliqua. Queste ectomicorrize hanno la superficie del mantello ben definita, non mascherata dalle emanazioni ifali;



✓ argentea: il mantello è formato da ife piuttosto lasche che imprigionano aria negli interstizi, conferendo un aspetto argenteo alla superficie del mantello;



✓ liscia: alcune ectomicorrize hanno la superficie del mantello ben definita, con nessuna o pochissime emanazioni ifali; in queste ectomicorrize la superficie del mantello può essere anche lucida;



✓ granulosa o verrucosa: la superficie del mantello è ornata da piccole protuberanze che la rendono rugosa. Si usano i termini: verruche o tubercoli per indicare le strutture di maggiori dimensioni, grani o papille per quelle di dimensioni minori;



✓ lanosa: le micorrize sono circondate da spesse emanazioni ifali con bordo sfrangiato, come fossero fili di lana;



✓ cotonosa: le micorrize sono circondate da sottili emanazioni ifali simili a fili di cotone;



✓ filamentosa: le emanazioni ifali, presenti sulla superficie della ectomicorriza, sono organizzate come piccoli fasci;



✓ con spine corte: sono presenti numerosi cistidi rigidi che ricoprono quasi tutta la superficie della micorriza; la loro lunghezza è inferiore ad un quarto del diametro della stessa;



✓ con spine lunghe: come sopra, ma la dimensione dei cistidi è maggiore di un quarto del diametro della micorriza.



Se questi termini non sono sufficienti per definire la superficie del mantello, si possono utilizzare combinati tra loro; inoltre alcune caratteristiche possono essere evidenziate meglio mediante disegni a matita o fotografie a diversi ingrandimenti.

4.5.3 Colore

Per evitare l'utilizzo di termini soggettivi si è fatto riferimento ai colori proposti da Agerer (1987-2002). Nel caso di combinazioni di colori, come ad es. blu-biancastro, l'ultimo aggettivo si riferisce sempre al colore più evidente. Poiché talvolta il colore delle ectomicorrize varia con l'età, è stato indicato solo il colore delle parti in fase di sviluppo; quello delle parti più vecchie è stato, quando necessario, indicato a parte.

4.5.4 Caratteri anatomici delle ectomicorrize

Per l'osservazione di queste caratteristiche sono stati allestiti dei preparati per microscopia ottica utilizzando come mezzo di inclusione latte-glicerolo (acido lattico 50%, glicerolo 50%). La descrizione delle strutture anatomiche è stata fatta seguendo i criteri delle Check List C1 e C2 proposte da Agerer (1987-2002).

4.5.5 Struttura anatomica del mantello

Le ife fungine che avvolgono l'apice radicale per la costituzione del mantello si possono organizzare in diversi modi e subire varie modificazioni, dando origine ai seguenti tipi di mantello:

A. plectenchimatico, con fasci di ife sistemate ad anello;



B. plectenchimatico, con ife sistemate piuttosto irregolarmente; non è individuabile nessun modello particolare e le ife spesso si sviluppano longitudinalmente rispetto all'orientamento delle radici;



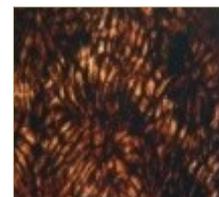
C. plectenchimatico, con una matrice gelatinosa tra le ife (Immagine in Agerer 1987-2002);

D. plectenchimatico, con ife sistemate a mo' di reticolo; sono evidenti dei cistidi prominenti (Immagine in Agerer 1987-2002);

E. plectenchimatico, con ife sistemate a mo' di reticolo, ma ripetutamente ramificate e schiacciate (Immagine in Agerer 1987-2002);

F. plectenchimatico, con gruppi occasionali di cellule tonde nel mantello (Immagine in Agerer 1987-2002);

G. con ife unite insieme a formare strutture simili a stelle;

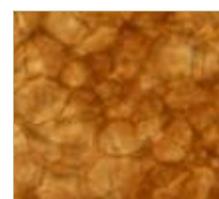


H. mantello di transizione tra quelli con organizzazione plectenchimatica e quelli con organizzazione pseudoparenchimatica; le ife sono talvolta disposte a formare uno pseudoreticolo;



I. plectenchimatico, con strutture imeniformi; le cellule terminali delle ife sono tozze, leggermente ricurve e spesso ripiene di goccioline oleose (Immagine in Agerer 1987-2002);

K. pseudoparenchimatico, formato da cellule angolari sormontate da gruppi di cellule tonde;



L. pseudoparenchimatico, con cellule angolari;

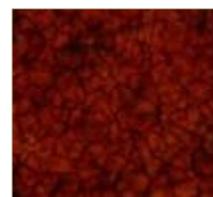


M. pseudoparenchimatico, con cellule epidermoidi;



N. pseudoparenchimatico, con cellule di forma variabile, alcune delle quali contengono goccioline e si colorano con la solfo-vanilina (Immagine in Agerer 1987-2002);

O. ;pseudoparenchimatico, con cellule angolari sormontate da cellule piatte;



P. pseudoparenchimatico, con cellule angolari disposte sotto un sottile reticolo di ife;



Q. pseudoparenchimatico, con cellule epidermoidi disposte anch'esse sotto un sottile reticolo di ife.



4.5.6 Cistidi

Possono caratterizzare il mantello o le rizomorfe delle ectomicorrize. Se ne conoscono diversi tipi definiti in base alla loro forma: a) a punteruolo, tipo setola; b) a bottiglia con collo diritto; c) a bottiglia con collo piegato; d) a boccetta con manopola apicale; e) ramificati; f) fusiformi; g) globulari; h) a forma di setola con lobi apicali; i) a bottiglia con diverticoli; k) a falce con pareti spesse; l) ifa normale o spesso a forma di cavaturaccioli; m) a sviluppo laterale con manopola conica terminante con un cuscinetto; n) longilinea con un rigonfiamento all'apice; o) a pareti sottili, simile a una normale terminazione ifale; p) acantocistidio (Immagini in Agerer 1987-2002);

4.5.7 Rizomorfe

In base alla disposizione e al tipo di ife si possono osservare le seguenti tipologie di rizomorfe (Immagini in Agerer 1987-2002);

- A. indifferenziata, con ife di diametro uniforme e una tessitura lasca; molte ife si sviluppano dai margini;
- B. indifferenziata, con margini piuttosto lisci; le ife hanno un'organizzazione compatta e diametro uniforme;
- C. leggermente differenziata, con ife centrali più grosse;
- D. differenziata, con alcune ife molto spesse distribuite a caso; talvolta la parte dell'ifa vicino ai setti è svasata;
- E. differenziata, con ife grosse che formano la parte centrale; i setti sono completi;
- F. molto differenziata, con ife grosse che formano un cilindro centrale; i setti sono parzialmente o completamente dissolti, e in alcuni casi se ne possono individuare i resti.

4.6 Discriminazione morfologica e anatomica delle ectomicorrize

L'osservazione e la descrizione delle caratteristiche morfologiche e anatomiche hanno permesso di definire i morfotipi ectomicorrizici (Mecm). Con questo termine viene indicato un "tipo" di ectomicorriza con caratteristiche peculiari tali da consentirne la differenziazione rispetto alle altre ectomicorrize (Baier *et al.*, 2006).

L'importanza tassonomica e sistematica delle caratteristiche morfologiche e anatomiche, con particolare riguardo a: 1) organizzazione esterna del mantello,

2) struttura delle rizomorfe, 3) forma dei cistidi, 4) struttura delle emanazioni ifali, consente di assimilare ogni mecm ad una specie fungina (Agerer, 2006).

Tuttavia l'identificazione tassonomica degli mecm è possibile solo se questi sono già stati descritti e se ad essi è stata associata una specie fungina; in caso contrario le caratteristiche morfo-anatomiche possono essere utilizzate solo per distinguere tra loro gli Mecm.

Ciascun morfotipo riscontrato è stato conservato per le successive analisi in una provetta eppendorf da 1,5 ml contenente 500 µl di tampone di lisi Doyle e Doyle costituito da: 2% di CTAB (bromuro di esadecil-trimetil-ammonio), 100 mM di Tris-HCl pH 8 (idrossimetil-amminometano-cloridrato), 20 mM EDTA pH 8 (sale disodico dell'acido etilendiamminotetracetico), 1,4 M NaCl e 1% PVP 40 (polivinilpirrolidone).

4.7 Identificazione genetica delle ectomicorrize

Per poter assegnare a ciascun morfotipo una collocazione tassonomica è stata sequenziata la regione ITS1-5.8S-ITS2 del rDNA fungino(Fig. 1).

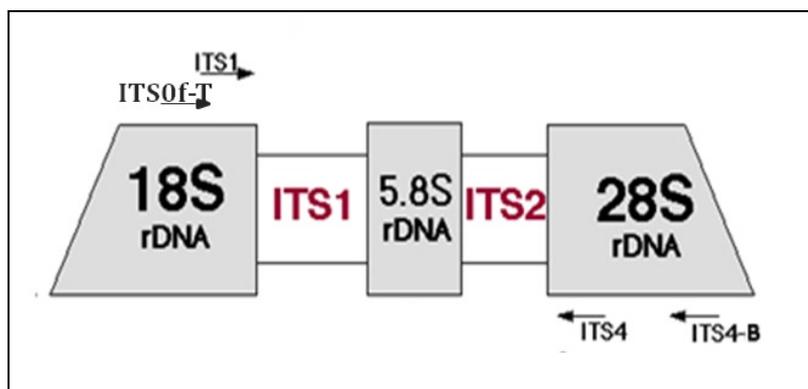


Figura 7. Regione ITS del rDNA.

4.7.1 Estrazione del DNA

Il DNA è stato estratto seguendo il metodo di Doyle e Doyle (1987).

In una provetta Eppendorf da 1,5 ml è stato messo un campione di ectomicorriza e una biglia d'acciaio di 3 mm di diametro. I campioni sono stati

triturati 2 volte mediante un omogeneizzatore Mixer Mill MM300 (Qiagen) per 2,5 min a una frequenza di 30 Hz, la prima volta senza tampone e la seconda dopo aver aggiunto 500 μ l di tampone di lisi *Doyle & Doyle* e successivamente incubati in un blocco termostato (Eppendorf) alla temperatura di 55°C per 30 min. Dopo l'incubazione è stato aggiunto un volume di cloroformio/alcool isoamilico (24:1). I campioni sono stati accuratamente miscelati per inversione e centrifugati con una microcentrifuga Eppendorf per 10 min a 8000 rpm. Dopo aver recuperato la fase acquosa (superiore) è stato aggiunto un volume di isopropanolo pre-raffreddato a -20°C. Previa agitazione per inversione, i campioni sono stati incubati in ghiaccio per 10 min e poi centrifugati a 13000 rpm per 15 min a 4°C. L'isopropanolo è stato eliminato. Il pellet di DNA è stato lavato aggiungendo 500 μ l di etanolo all'80% e centrifugato a 13000 rpm per 5 min a 4°C. Dopo aver eliminato l'etanolo, il pellet è stato asciugato all'aria, il DNA è stato risospeso in 50 μ l di TE buffer (Tris-HCl 10 mM e EDTA 1 mM) a pH 8 e conservato a -20 °C per le successive analisi.

4.7.2 PCR (Polymerase Chain Reaction)

L'amplificazione delle regioni ITS1, 5.8S e ITS2 dell' rDNA è stata ottenuta mediante PCR (reazione a catena della polimerasi) effettuata con le seguenti coppie di primers: ITS1 (5'- CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA -3') e ITS0F-T (5'-ACTTGGTCATTTAGAGGAAGT -3') (Taylor e McCormick, 2008) come Forward, ITS4B (5'-CAGGAGACTTGACACGGTCCAG -3') (Gardes e Bruns, 1993) specifico per basidiomiceti e ITS4 (5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3') (White *et al.*, 1990) come Reverse. La reazione è stata realizzata in un volume totale di 50 μ l contenente: 18.7 μ l di acqua deionizzata sterile, 10 μ l di buffer 5X (soluzione tampone della polimerasi), 5 μ l di 10 mg/ml BSA (albumina di siero bovino), 5 μ l di 2 mM desossiribonucleotide trifosfato set (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 5 μ l di 10 μ M di ciascun primer, 1,5 unità di GO-TAQ DNA Polimerasi (Promega), 10-30 ng di DNA stampo. È stato utilizzato un termociclatore "PCR express" (Hybaid) con il seguente programma :

1 ciclo iniziale di denaturazione per 2 min alla temperatura di 94°C; 35 cicli costituiti da: denaturazione a 94°C per 30 sec, appaiamento dei primers con il DNA stampo (annealing) a 60°C per 30 sec e sintesi a 72°C per 1 min per finire 1 ciclo finale di completamento della sintesi a 72°C per 7 min.

4.7.3 Purificazione e sequenziamento della regione ITS.

Gli amplificati sono stati purificati con il kit Eurogold Gel Extraction Kit adoperando il seguente protocollo:

la reazione di pcr ottenuta è stata trasferita in un tubo da 1,5 ml a cui è stato aggiunto un ugual volume di buffer XP2, la miscela è stata sottoposta a vortex per alcuni secondi, successivamente, quest'ultima è stata trasferita in una colonna di purificazione e centrifugata a 10000 giri per un minuto. Eliminato il liquido passato in colonna sono stati aggiunti 750 µl di SPW washing buffer diluito con etanolo (80 ml) e centrifugato a 10000 giri per 1 minuto. Ancora eliminato il liquido passato in colonna e riaggiunti 750 µl di SPW washing buffer diluito con etanolo (80 ml). Dopo aver centrifugato a 10000 giri per 1 minuto, è stato eliminato il liquido passato in colonna e nuovamente centrifugato a 10000 giri per 1 minuto per asciugare la membrana. Successivamente, la colonna, è stata messa in un tubo da 1,5 ml e sono stati aggiunti direttamente sulla membrana di silice 40 ml di elution buffer per poi essere centrifugati a 5000 giri per un minuto. Infine, dopo aver gettato via la colonna i campioni sono stati messi in freezer (- 20 °C) per successive analisi.

Tutti gli amplificati ottenuti, dopo purificazione, sono stati sequenziati con il metodo automatico (sequenziatori ABI 3730XL a 96 capillari e ABI 3100 a 16 capillari, Università di Padova, BMR-Genomics servizio sequenziamento di DNA; www.bmr-genomics.it). In presenza di prodotti di amplificazione multipli, i singoli frammenti sono stati estratti e purificati da gel con lo stesso kit e successivamente sequenziati.

La collocazione tassonomica delle specie ectomicorriziche è stata effettuata attraverso il confronto, tramite il programma Blast (Altschul *et al.*, 1990), delle sequenze realizzate con quelle depositate nelle banche dati

DDBJ/EMBL/GenBank e UNITE (Kõljalg *et al.*, 2005). In particolare, con riferimento al livello di similarità e all'origine della sequenza depositata con cui è stato ottenuto il miglior allineamento, è stato riportato qui di seguito:

1. se deriva da uno sporoma ed è identificata a livello di specie come è il caso di quelle presenti in UNITE, il criterio usato è quello riportato nella tabella 3 (Landeweert *et al.*, 2003);
2. se deriva da campioni di suolo o da apici ectomicorrizici, o in tutti i casi in cui non vengono fornite indicazioni sulla specie ma solo sul genere di appartenenza, si conserva l'identificazione per similarità uguali o superiori al 95%, e si identifica a livello di famiglia per valori di similarità tra il 94% e il 90% (Smith *et al.*, 2007);
3. se deriva da campioni di suolo o da apici ectomicorrizici e vengono fornite indicazioni sulla famiglia di appartenenza, si conserva l'identificazione se la similarità è uguale o superiore al 90 % (Smith *et al.*, 2007);
4. se deriva da campioni di suolo o da apici ectomicorrizici e la sequenza è identificata a un livello tassonomico superiore a quello di famiglia, si conserva il taxon per valori uguali o superiori al 90% di similarità;
5. se la sequenza con cui si ottiene il miglior allineamento è identificata a livello di specie, genere o famiglia ma la similarità è inferiore al 90%, si assegna l'ordine (Tab. 3).

Tabella 3. Criteri per la collocazione tassonomica dei funghi ectomicorrizici.

percentuale di similarità	livello di identificazione
≥ 99%	specie
98 ÷ 95%	genere
94 ÷ 90%	famiglia

Nel seguito del lavoro sarà utilizzato il termine di "OTU" intendendo l'unità operativa tassonomica che ha dato origine ad una ectomicorriza caratterizzata

da un ben definito “morfotipo” e da una sequenza della regione ITS, nel caso in cui sia stata ottenuta. Ad ogni specie ectomicorrizica così individuata sarà assegnato un codice utile a identificare le diverse OTU in funzione della loro collocazione tassonomica. La necessità di definire la “OTU” è una conseguenza del fatto che non tutti i funghi rilevati sono stati identificati a livello di specie, ma di alcuni si conosce solo il genere mentre di altri addirittura solo il phylum di appartenenza. Tuttavia i criteri utilizzati nella descrizione delle caratteristiche morfologiche e anatomiche sono tali da poter dire che ogni morfotipo rappresenta una OTU distinta.

4.8 Analisi statistiche

Le comunità ectomicorriziche sono state analizzate in base ai valori di “abbondanza” e di “frequenza” delle OTU, così definiti:

- Abbondanza assoluta (Ab): misura la presenza di una specie nell’ambiente, viene espressa come la percentuale di sottocampioni in cui ciascun OTU è stata osservata;
- Frequenza assoluta (Fr): misura la diffusione di una specie nell’ambiente e corrisponde al numero di campioni in cui si riscontra la stessa OTU;

4.8.1 Diversità e struttura delle comunità

L’analisi della diversità delle comunità è stata realizzata utilizzando i seguenti parametri:

- Ricchezza (R): rappresenta il numero di OTU che compongono una comunità;
- Coefficiente di stima della ricchezza: indica il più probabile numero di OTU che costituiscono una comunità e vengono utilizzati negli studi realizzati con analisi a campione (Gotelli e Colwell, 2001). Nella presente indagine è stato utilizzato il coefficiente di stima di “Chao” (Chao, 1987), basato rispettivamente sui dati di frequenza delle OTU;

- Indice di Pielou (J): rappresenta il livello di equipartizione (*evenness*) degli individui tra le OTU di una comunità in funzione della diversità e della ricchezza in specie: $J = H / (\log_n R)$ (Pielou, 1969);
- Indice di Shannon (H): fornisce una misura della diversità in funzione della ricchezza in OTU e dell'abbondanza di ciascuna specie nella comunità; si calcola applicando la formula: $H = - \sum p_i \log_n p_i$, dove p_i è il rapporto tra l'Abb_{ass} dell'*i*-esima specie ed N (Shannon e Weaver, 1949);
- Profilo di Rényi (Kindt et al., 2006): mostra graficamente con un'unica curva i diversi parametri di diversità (ricchezza, equipartizione, dominanza, etc.) di una comunità di organismi. Consente perciò di ordinare le comunità in base alla loro diversità: quelle con un profilo più alto avranno una diversità maggiore (Tóthmérész, 1995).

La struttura della comunità è stata descritta attraverso la *curva rango-frequenza* (Whittaker, 1965) che permette di confrontare le specie della comunità in funzione della loro frequenza. Essa è costruita riportando nell'asse delle ascisse le OTU ordinate per valori di frequenza decrescenti e nell'asse delle ordinate i valori di frequenza di ciascuna OTU. Dalla forma della curva si possono trarre indicazioni anche sulla diversità della comunità che sarà tanto minore quanto maggiore sarà la pendenza della curva e minore la sua lunghezza.

4.8.2 Coefficiente di Similarità

Coefficiente di Bray-Curtis (C_N): si basa sul numero di individui presenti in ciascuna comunità e sul valore di abbondanza minimo con cui compaiono le specie comuni nelle due comunità; si calcola mediante la formula: $C_N = 2jN / (N_a + N_b)$, dove N_a è il numero di individui della comunità *a*, N_b è il numero di individui della comunità *b* e $2jN$ è la somma dei valori minimi di abbondanza delle specie presenti in entrambe le comunità (Bray e Curtis, 1957). Questo coefficiente assume valori compresi tra 0, se le due comunità non hanno alcuna specie in comune, e 1 se le comunità condividono tutte le specie. Viene utilizzato nelle tecniche di analisi multivariata applicate alla valutazione

delle relazioni tra variabili ambientali e composizione in specie delle comunità.

4.8.3 Selezione dei modelli di variazione dei parametri ecologici in funzione delle variabili ambientali.

Per verificare l'influenza delle variabili ambientali sui parametri ecologici è stato applicato un metodo interattivo. Questo ha previsto: una fase esplorativa dei dati, realizzata attraverso la costruzione di boxplot condizionati con le variabili ambientali di volta in volta considerate; la realizzazione di un modello con tutte le variabili disponibili e le loro interazioni; la selezione attraverso l'Akaike Information Criterion (AIC) del modello più parsimonioso (massima quantità di varianza spiegata utilizzando il minor numero di gradi di libertà). L'applicazione dell'analisi della varianza al fine di individuare le variabile che influenzano in modo significativo i paramentri ecologici. Per verificare in che modo i diversi livelli di ciascuna variabile influenzano i parametri ambientali è stato realizzato il test corretto di Bonferroni. Sono considerate significative le differenze supportate da un p-value inferiore a 0,05.

4.8.4 Analisi multivariata

Per valutare l'influenza delle variabili ambientali sulla distribuzione delle OTU nei plot d'indagine sono stati utilizzati due metodi di analisi. Il primo è il Non Metric Multi Dimensional Scaling permette valutare se esiste una correlazione tra la composizione delle comunità ectomicorriziche osservate nelle diverse sugherete e le variabili ambientali considerate. Al risultato dell'ordinamento viene successivamente applicato un test delle permutazioni che consente di verificare la significatività dell'eventuale correlazione tra comunità di organismi e variabili ambientali. Il secondo metodo utilizzato è l'analisi Canonica delle Coordinate Principali che permette di valutare come uno o più fattori ambientali influenzano la composizione delle comunità di ectomicorrize, quest'ultimo metodo fornisce tra l'altro indicazioni quota di

variabilità spiegata dai diversi fattori ambientali, nonché il grado di significatività statistica associato al risultato ottenuto. Entrambe queste tecniche di analisi si applicano, non direttamente ai dati osservati, ma alle rispettive matrici di similarità, che nella presente ricerca sono state costruite utilizzando il coefficiente di Bray-Curtis, in quanto consente una migliore interpretazione ecologica dei risultati (Faith *et al.* 1987).

Per l'applicazione delle tecniche statistiche di base sono stati usati i pacchetti preinstallati del software statistico *R* 2.9.2 (R Development Core Team, 2009), mentre per l'applicazione delle tecniche di ordinamento, realizzate secondo le indicazioni riportate da Oksanen (2008), è stato utilizzato il *package vegan* (Oksanen *et al.*, 2009) dello stesso software.

5. RISULTATI

L'analisi cartografica preliminare ha consentito di rappresentare, con i transetti individuati, il 75% delle sugherete naturali, il 40% delle sugherete pascolate e il 60% delle sugherete lavorate presenti nel territorio regionale.

La valutazione dello stato fitosanitario ha consentito di ottenere dei valori dell'indice di deperimento (ID) che variavano da un minimo di 0 ad un massimo di 0,89 (Tab. 4). Questi valori rientrano nella soglia di indice di deperimento nulla o lieve per cui lo studio delle comunità ectomicorriziche è stato condotto in condizioni di omogeneità risultando non essere influenzate dallo stato di salute delle piante.

Tabella 4. Densità (d) e indice di deperimento (ID) misurati nei transetti.

Gestione	Stagione	d			ID		
		Graniti	Basalti	Trachiti	Graniti	Basalti	Trachiti
Naturale	Autunno	13	13	11	0,08	0	0
	Primavera	11	13	13	0	0,15	0
Pascolata	Autunno	19	13	7	0,89	0,08	0,27
	Primavera	29	19	17	0,2	0,21	0,36
Lavorata	Autunno	13	6	3	0,15	0,17	0
	Primavera	8	6	4	0,13	0,33	0

5.1 Comunità ectomicorrizica associata alla sughera

In totale sono stati prelevati 180 campioni di terreno, 167 dei quali con apici micorrizzati. L'analisi dei campioni di terreno ha portato a isolare e caratterizzare 82.333 ectomicorrize (ecm), appartenenti a 185 OTU. Di queste ultime 149 sono state identificate su base genetica o morfo-anatomica a livello di: specie (38), genere (85), famiglia (22), e a livelli tassonomici superiori (4). 36 OTU non

sono state identificate perché le analisi molecolari non sono riuscite e perché non presentavano caratteristiche morfo-anatomiche tali da consentirne la loro identificazione. Tuttavia, proprio in base a tali caratteristiche è stato possibile assimilarli a OTU differenti.

Nella comunità ectomicorrizica sono presenti i funghi delle divisioni *Ascomycota*, *Basidiomycota* e *Zygomycota*. La prima è rappresentata da funghi degli ordini *Pezizales* e *Sordariales* e dalla specie *Cenococcum geophylum* Fr. un dothideomycete *incertae sedis* di cui non è nota la forma riproduttiva sessuale. Questo fungo è, peraltro, l'unica specie osservata in tutte le sugherete oggetto della presente indagine. La divisione *Basidiomycota* è rappresentata principalmente dagli ordini *Thelephorales*, *Agaricales* e *Russulales*. Il primo annovera il maggior numero di OTU (50) distribuiti in 1 famiglia e 2 generi tra cui *Tomentella* al quale appartengono il maggior numero di OTU in assoluto (42). L'ordine *Agaricales* è rappresentato da meno OTU (45), ma da numerose famiglie (9), le principali delle quali sono: *Inocybaceae* e *Cortinariaceae* rispettivamente con 20 e 11 OTU. L'ordine *Russulales* è rappresentato da un'unica famiglia, ma da ben tre generi di cui il principale è *Russula* al quale appartengono 15 OTU, tra cui *Russula odorata* Rom., che è il basidiomicete più diffuso. Altri ordini meno rappresentati sono *Boletales* (10 OTU), *Cantharellales* (8 OTU) e *Sebacinales* (5 OTU) (All. 1).

5.2 Struttura e composizione delle comunità ectomicorriziche

Il maggior numero di campioni senza ectomicorrize sono stati trovati nella sughereta lavorata che insiste su substrato trachitico, mentre in nessuna sughereta naturale sono stati trovati campioni privi di ectomicorrize.

Il maggior numero di ectomicorrize è stato osservato nella sughereta naturale che insiste su substrato granitico, il minor numero, circa un ventesimo, nella sughereta lavorata che insiste su substrato basaltico; questa presenta anche il minor valore di ricchezza. La sughereta naturale che insiste su substrato granitico e quella con il maggior valore di ricchezza ed anche quella che potenzialmente ospita il maggior numero di OTU, come rivelato dal

coefficiente di stima della ricchezza “Chao” (Tab.5). Nella sughereta naturale che insiste su substrato trachitico, si ha la maggior differenza tra il numero di OTU rilevate e il numero di OTU stimate dal coefficiente “Chao” (circa 38), mentre la minor differenza si ha nella sughereta lavorata che insiste su substrato basaltico.

Tabella 5. Dimensione campionaria e principali parametri ecologici delle comunità ectomicorriziche oggetto d'indagine. Le lettere b, g ed l indicano il substrato litologico in cui insiste la sughereta da cui deriva la comunità ectomicorrizica, ed in particolare b = basaltico; g = granitico; t = trachitico; le lettere l, n, p indicano il tipo di gestione a cui è sottoposta la sughereta e precisamente: l = lavorata, n = naturale, p = pascolata. N. = numero di campioni in cui sono state trovate ectomicorrize.

sughereta	N.	N. ectomicorrize	Ricchezza	Coefficiente di Chao	Indice di Pielou	indice di Shannon
bl	18	3527	16	16,6	0,881	2,44
bn	20	7357	36	52,0	0,86	3,08
bp	20	10410	51	57,5	0,882	3,47
gl	17	4828	34	39,0	0,848	2,99
gn	20	28108	60	78,4	0,825	3,38
gp	20	10819	34	45,6	0,842	2,97
tl	15	1015	19	25,1	0,775	2,28
tn	20	11859	40	77,8	0,802	2,96
tp	17	4422	21	36,1	0,868	2,64

Il minor valore dell'indice di Pielou è stato rilevato nella sughereta lavorata che insiste su substrato trachitico, mentre il maggior valore in quella pascolata che insiste su substrato basaltico, in queste sugherete si osservano anche, rispettivamente il minore e il maggiore valore dell'indice di Shannon (Tab.5).

Le 9 comunità ectomicorriziche osservate nelle sugherete oggetto di indagine, come si evince dalle curve rango-frequenza, mostrano una struttura caratterizzata dalla presenza di poche OTU ampiamente diffuse e di molte OTU rare (Fig. 8). Ciò è particolarmente evidente nella sughereta pascolata che insiste su substrato granitico, nella quale la comunità ectomicorrizica è ampiamente dominata da un'unica OTU, mentre lo è meno nella sughereta naturale che insiste sul medesimo substrato e nella sughereta pascolata che insiste su substrato basaltico, in cui oltre all'OTU dominante sono presenti

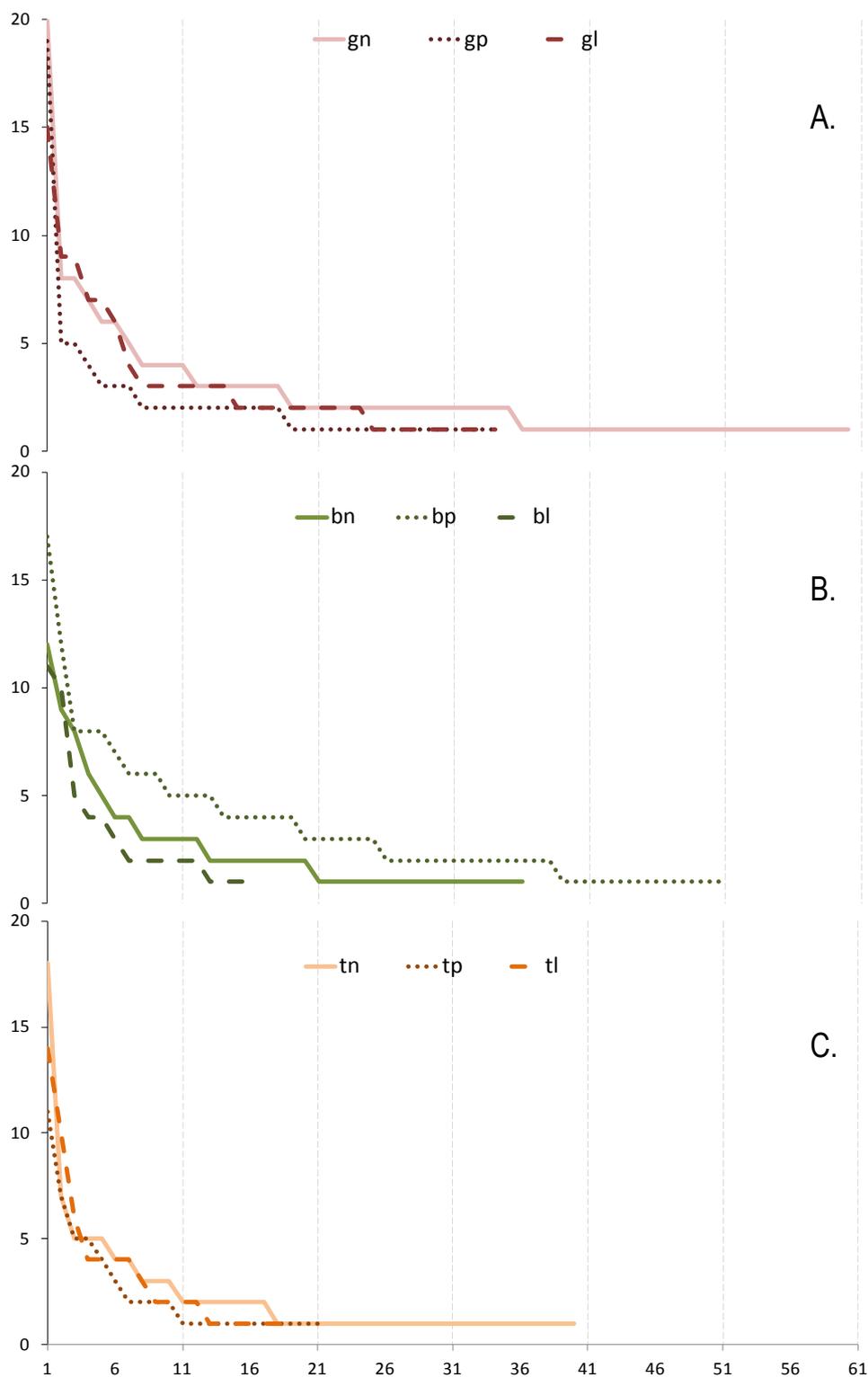


Figura 8. Curve rango-frequenza. A. sugherete su substrato granitico. B. sugherete su substrato basaltico. C. sugherete su substrato trachitico. L'asse orizzontale indica il numero di OTU rilevato in ciascuna sughereta; l'asse verticale il numero di campioni in cui ciascun OTU è stato osservato. La linea tratteggiata si riferisce alla comunità ectomicorrizica nella sughereta lavorata, la linea continua a quella nella sughereta naturale; quella punteggiata alla comunità osservata nella sughereta pascolata.

diverse OTU codominanti, cioè con valori di frequenza prossimi a quelli della OTU dominante.

Sia i parametri ecologici che le curve rango-frequenza danno informazioni sulla diversità delle comunità ectomicorriziche, come è possibile osservare dai valori di ricchezza, dell'indice di Shannon e dall'aspetto della curva rango – frequenza (pendenza e lunghezza), la comunità ectomicorrizica che presenta la maggiore diversità è stata osservata nella sughereta naturale che insiste su substrato granitico, mentre quella con la diversità minore è stata rilevata nella sughereta lavorata che insiste su substrato basaltico.

Attraverso l'osservazione del profilo di Renyi si possono fare altre considerazioni sulla diversità delle comunità ectomicorriziche. Confrontando le sugherete che insistono nel medesimo substrato si rileva che le comunità nelle sugherete lavorate hanno una diversità minore di quelle osservate nelle sugherete naturali, eccetto nel caso del substrato granitico. Tra le sugherete che insistono in quest'ultimo substrato quella naturale ha la comunità ectomicorrizica con la diversità più elevata.

Inoltre se si considerano le sugherete sottoposte allo stesso tipo di gestione le comunità ectomicorriziche delle sugherete naturali non possono essere ordinate in base alla loro diversità. La comunità ectomicorrizica associata ad una sughereta pascolata che presenta la maggiore diversità è quella osservata su substrato basaltico. Tra le comunità ectomicorriziche delle sugherete lavorate, quella presente nel substrato granitico ha la maggiore diversità (Fig.9).

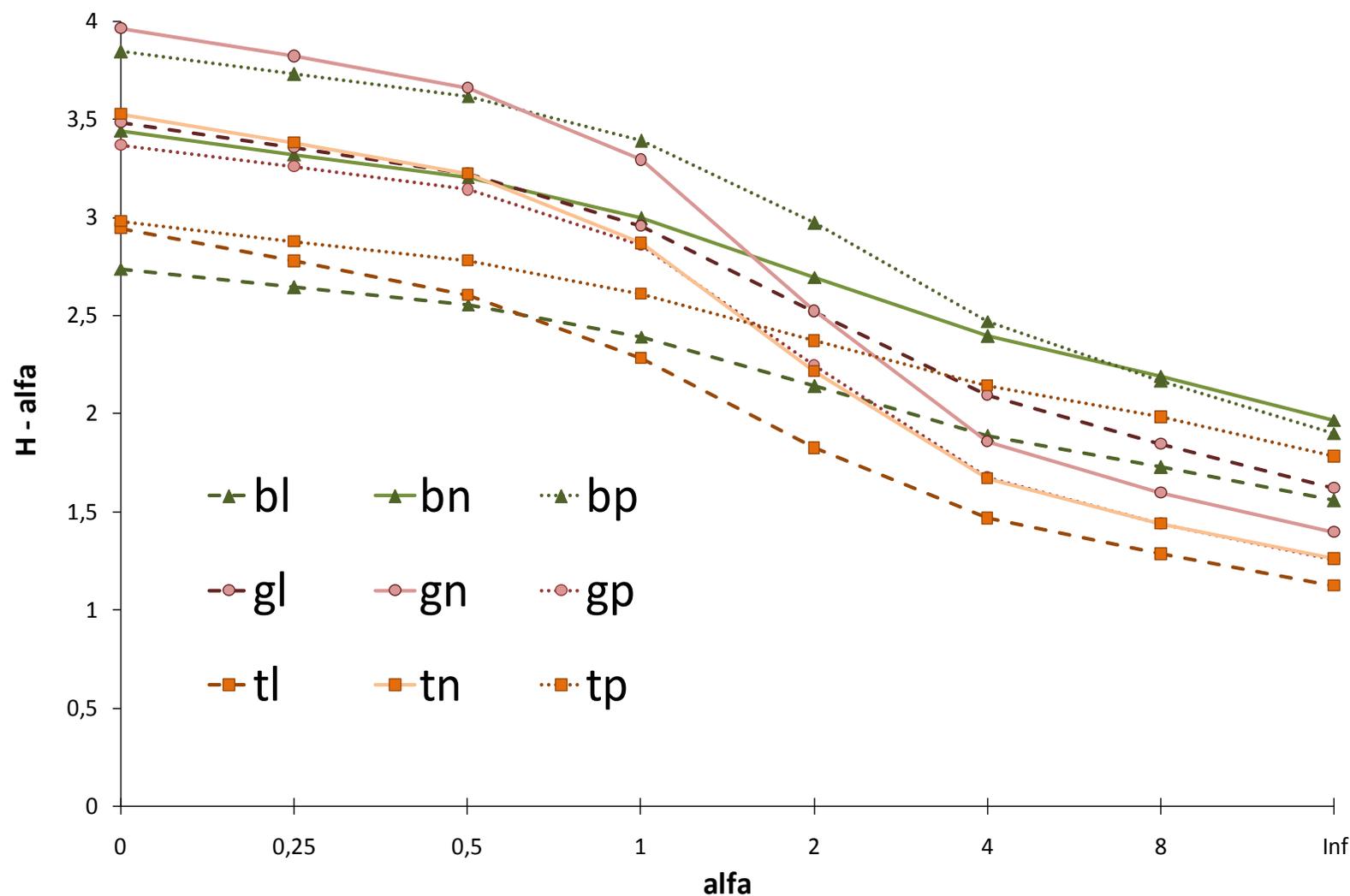


Figura 9. Profili di Renyi delle comunità ectomicorriziche su substrato basaltico (b), granitico (g), trachitico (t) presente in sugherete lavorate (l), naturali (n), pascolate (p).

Le divisioni *Ascomycota* e *Basidiomycota* sono rappresentate in tutte le comunità ectomicorriziche, mentre la divisione *Zygomycota* è stata rilevata esclusivamente in quella associata alla sughereta lavorata che insiste su substrato basaltico.

Della divisione *Ascomycota* il *Cenococcum geophilum*, come già riportato, è presente in tutte le sugherete. Anche i funghi dell'ordine delle *Pezizales* sono molto diffusi, mancano solo nelle sugherete lavorate su substrato basaltico e trachitico. Al contrario gli stessi sono molto diffusi nella sughereta lavorata su substrato granitico. L'ordine *Sordariales* invece è poco diffuso, infatti è stato ritrovato solo nella comunità ectomicorrizica associata alla sughereta pascolata che insiste su substrato granitico.

Alla divisione *Basidiomycota* appartengono gran parte dei funghi simbiotici osservati. *Agaricales*, *Russulales* e *Thelephorales* concorrono in maniera più o meno simile alla composizione delle comunità ectomicorriziche osservate nelle sugherete naturali. Inoltre il primo ordine contribuisce in particolar modo alla costituzione delle comunità ectomicorriziche associate alle sugherete pascolate e lavorate su substrato basaltico e trachitico, mentre in quelle su substrato granitico prevalgono *Russulales* e *Thelephorales*. Tra gli ordini meno rappresentati, quello delle *Cantharellales* è particolarmente diffuso nelle sugherete su substrato granitico, è inoltre presente nella sughereta pascolata che insiste su substrato trachitico. L'ordine *Boletales* è particolarmente diffuso in tutte le sugherete su substrato basaltico, anche se il massimo numero di specie è osservato nella sughereta naturale su substrato granitico. Infine l'ordine *Sebacinales* appare sporadicamente, assumendo un qualche rilievo nella sughereta lavorata su substrato trachitico e nell'eterogenea comunità ectomicorrizica associata alla sughereta naturale su substrato granitico (Fig. 10).

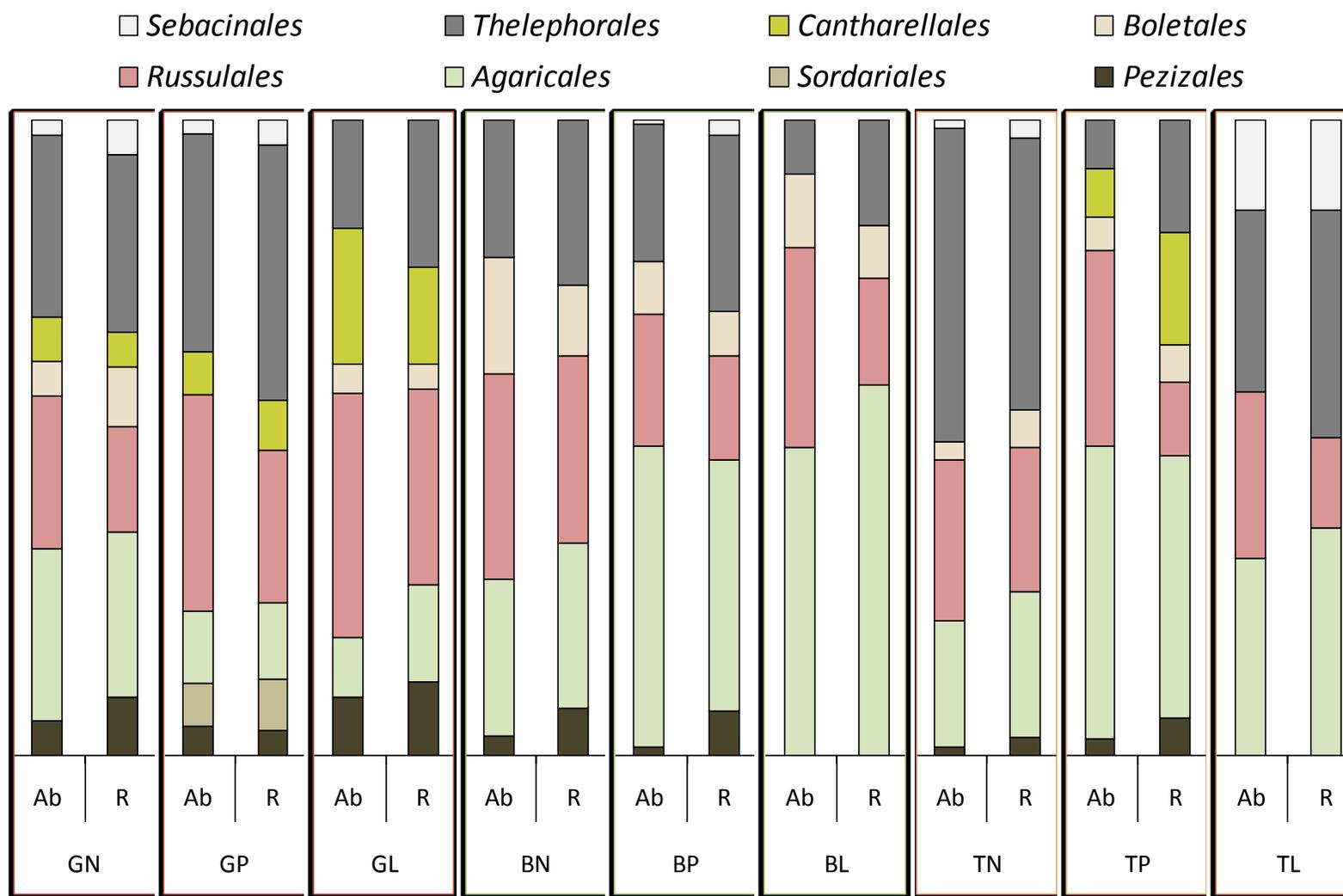


Figura 10. Composizione in ordini delle comunità ectomicorriziche su substrato basaltico (b), granitico (g), trachitico (t) presenti in sugherete lavorate (l), naturali (n), pascolate (p). Ab= abbondanza di ciascun ordine, R= numero di OTU di ciascun ordine.

Per concludere, nella sughereta naturale su substrato granitico si rileva la maggior variabilità in generi (15), la minore in quella lavorata su substrato trachitico. Il genere *Tomentella* è un componente importante di tutte le comunità ectomicorriziche, in particolare di quelle presenti nelle sugherete naturali e pascolate su substrato granitico e di quelle naturali e lavorate su substrato trachitico. Anche il genere *Russula* è molto importante, soprattutto nelle sugherete pascolate e lavorate. Il genere *Inocybe*, come i due precedenti, è presente in tutte le sugherete ma assume notevole importanza in quelle su basalto e tra queste in quella lavorata. Il genere *Cortinarius* è presente in quasi tutte le sugherete, eccetto che nella sughereta pascolata su substrato granitico. Esso assume rilevanza nelle sugherete lavorate e pascolate su substrato basaltico e trachitico. Il genere *Xerocomus*, come il genere *Boletus* sono importanti costituenti delle comunità ectomicorriziche presenti su substrato basaltico. Mentre il genere *Tricholoma* ed *Hebeloma*, pur essendo sporadicamente presenti in diverse sugherete, caratterizzano quelle che insistono su substrato trachitico (Fig. 11).

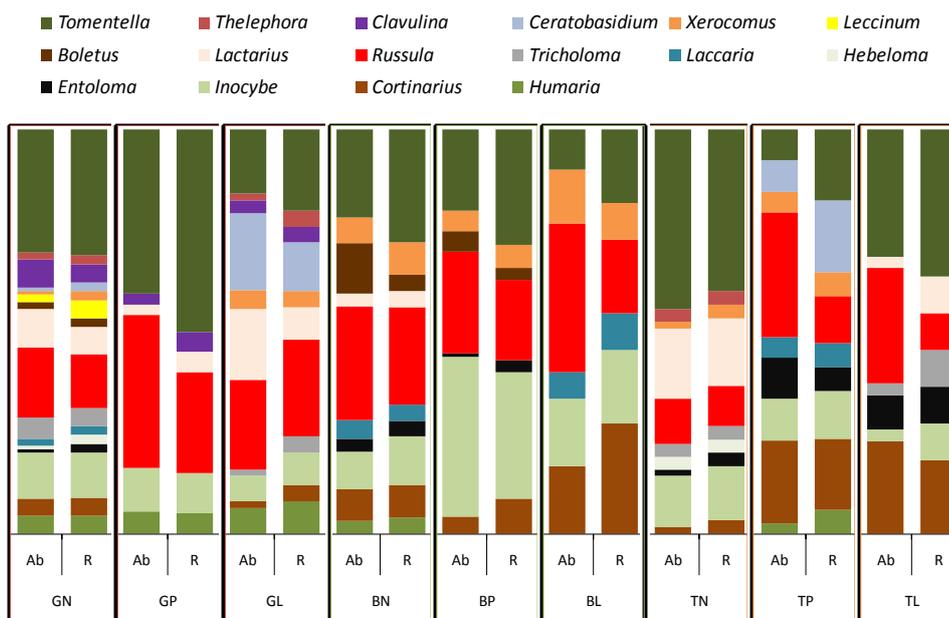


Figura 11. Composizione in generi delle comunità ectomicorriziche osservate nelle nove sugherete. Con Ab si riportano i valori di abbondanza di ciascun genere, con R il numero di OTU appartenenti a ciascun genere.

5.3 Influenza del tipo di gestione, del periodo di campionamento e del substrato litologico sui parametri ecologici.

5.3.1 Esplorazione dei dati

L'osservazione dei boxplot condizionati rispetto alle variabili ambientali fornisce chiare indicazioni sulla possibile influenza del tipo di gestione, della stagione in cui sono stati prelevati i campioni e del substrato litologico sui parametri ecologici (Allegato 1 Fig.1A - C). I valori delle variabili necm (numero di ectomicorrize) e R (ricchezza in OTU) sono state utilizzati nella forma logaritmica al fine di rispettare i criteri di normalità della distribuzione dei dati. La distribuzione delle altre variabili non si discosta dalla distribuzione normale. Utilizzando il test di Bartlett è stata verificata l'eteroschedasticità della varianza.

5.3.2 Modellizzazione della risposta dei parametri ecologici alle variabili ambientali

Il processo interattivo per la selezione del modello di risposta dei diversi parametri ecologici alle variabili ambientali ha portato ad individuare un modello lineare che può essere così schematizzato

$$pe = x + a \text{ gestione} + b \text{ stagione} + c \text{ substrato} + d \text{ gestione} \times \text{stagione} + e$$

dove a, b, c, d sono i parametri stimati attraverso il modello realizzato ed e rappresenta l'errore dovuto alla varianza non spiegata dal modello.

5.3.3 Analisi della varianza e confronti per coppie

L'analisi della varianza (Tab 6, 8, 10, 12) mostra che le variabili considerate (substrato litologico, tipo di gestione, stagione di raccolta dei campioni e interazione tra substrato litologico e tipo di gestione applicato alla sughereta) influenzano tutte in modo significativo i parametri ecologici, solo l'interazione tra substrato litologico e tipologia di gestione non influenza in modo netto ($p=0,07$) l'indice di evenness. Dalle tabelle riportate di seguito si può osservare che il numero di ectomicorrize e il valore dell'indice di evenness sono influenzati principalmente (valore assunto dalla voce: "somma dei quadrati") dal tipo di gestione, mentre la ricchezza in specie e l'indice di Shannon sono influenzati

dalla stagione di raccolta dei campioni. I confronti a coppie (Tab. 7, 9, 11, 13) mostrano che i valori medi più elevati per tutti i parametri ecologici sono stati rilevati nelle sugherete naturali che insistono su substrato granitico, mentre quelli più bassi nelle sugherete sottoposte a pascolo su substrato trachitico.

Tabella 6. Risultati dell'ANOVA per la variabile: Logaritmo in base 10 del numero di ectomicorrize.

Fonte	GDL	Somma dei quadrati	Media dei quadrati	F	Pr > F
Substrato	2	17,187	8,593	20,439	< 0,0001
Gestione	2	45,875	22,938	54,557	< 0,0001
Stagione	1	17,873	17,873	42,511	< 0,0001
Substrato:Gestione	4	10,341	2,585	6,149	0,000
Residui	170	71,474	0,4204		

Tabella 7. Confronti a coppie realizzati con il test di Bonferroni per la variabile: Logaritmo in base 10 del numero di ectomicorrize. Lettere diverse indicano differenze tra le medie con un livello di significatività inferiore allo 0,05.

Modalità	Media	Gruppi	Modalità	Media	Gruppi	Modalità	Media	Gruppi
Granito	2,490	A	Naturale	2,702	A	Primavera	2,461	A
Basalto	2,207	A	Pascolata	2,255	B	Autunno	1,831	B
Trachite	1,740	B	Lavorata	1,480	C			
Modalità	Media	Gruppi	Modalità	Media	Gruppi	Modalità	Media	Gruppi
Sub. Granitico Gest. Naturale	2,490	A	Sub.Basaltico Gest. Pascolata	1,807	BC	Sub Trachitico Gest. Lavorata	1,807	BC
Sub. Basaltico Gest. Lavorata	2,207	AB	Sub. Granitico Gest. Lavorata	1,807	BC	Sub Trachitico Gest. Naturale	1,807	BC
Sub. Basaltico Gest. Naturale	1,807	BC	Sub. Granitico Gest. Pascolata	1,807	BC	Sub. Trachitico Gest Pascolata	1,740	C

Tabella 8. Risultati dell'ANOVA per la variabile: Logaritmo in base 10 della ricchezza in OTU.

Fonte	GDL	Somma dei quadrati	Media dei quadrati	F	Pr > F
Substrato	2	1,243	0,622	11,704	< 0,0001
Gestione	2	1,895	0,947	17,834	< 0,0001
Stagione	1	2,820	2,820	53,078	< 0,0001
Substrato:Gestione	4	1,656	0,414	7,794	< 0,0001
Residui	170	9,031	0,053		

Tabella 9. Confronti a coppie realizzati con il test di Bonferroni per la variabile: Logaritmo in base 10 della ricchezza in OTU. Lettere diverse indicano differenze tra le medie con un livello di significatività inferiore allo 0,05.

Modalità	Media	Gruppi	Modalità	Media	Gruppi	Modalità	Media	Gruppi
Granito	0,742	A	Naturale	0,798	A	Primavera	0,802	A
Basalto	0,729	A	Pascolata	0,686	B	Autunno	0,552	B
Trachite	0,560	B	Lavorata	0,547	C			
Modalità	Media	Gruppi	Modalità	Media	Gruppi	Modalità	Media	Gruppi
Sub. Granitico Gest. Naturale	0,742	A	Sub. Basaltico Gest. Pascolata	0,580	BC	Sub. Trachitico Gest. Lavorata	0,580	BC
Sub. Basaltico Gest. Lavorata	0,729	AB	Sub. Granitico Gest. Lavorata	0,580	BC	Sub. Trachitico Gest. Naturale	0,580	BC
Sub. Basaltico Gest. Naturale	0,580	BC	Sub. Granitico Gest. Pascolata	0,580	BC	Sub. Trachitico Gest. Pascolata	0,560	C

Tabella 10. Risultati dell'ANOVA per la variabile: Indice di Shannon.

Fonte	GDL	Somma dei quadrati	Media dei quadrati	F	Pr > F
Substrato	2	4,885	2,442	9,031	0,000
Gestione	2	9,688	4,844	17,909	< 0,0001
Stagione	1	16,383	16,383	60,577	< 0,0001
Substrato:Gestione	4	10,802	2,701	9,985	< 0,0001
Residui	170	45,978	0,271		

Tabella 11. Confronti a coppie realizzati con il test di Bonferroni per la variabile: Indice di Shannon. Lettere diverse indicano differenze tra le medie con un livello di significatività inferiore allo 0,05.

Modalità	Media	Gruppi	Modalità	Media	Gruppi	Modalità	Media	Gruppi
Granito	1,388	A	Naturale	1,505	A	Primavera	1,545	A
Basalto	1,330	A	Pascolata	1,284	B	Autunno	0,942	B
Trachite	1,013	B	Lavorata	0,942	C			
Modalità	Media	Gruppi	Modalità	Media	Gruppi	Modalità	Media	Gruppi
Sub. Granitico Gest. Naturale	1,388	A	Sub. Basaltico Gest. Pascolata	1,075	A	Sub. Trachitico Gest. Lavorata	1,075	A
Sub. Basaltico Gest. Lavorata	1,330	A	Sub. Granitico Gest. Lavorata	1,075	A	Sub. Trachitico Gest. Naturale	1,075	A
Sub. Basaltico Gest Naturale	1,075	A	Sub. Granitico Gest. Pascolata	1,075	A	Sub. Trachitico Gest Pascolata	1,013	B

Tabella 12. Risultati dell'ANOVA per la variabile: Indice di Pielou.

Fonte	GDL	Somma dei quadrati	Media dei quadrati	F	Pr > F
sub	2	0,524	0,262	3,244	0,041
gestione	2	2,397	1,198	14,830	< 0,0001
stagione	1	1,322	1,322	16,365	< 0,0001
Substrato:Gestione	4	0,706	0,177	2,184	0,073
residuo	170	13,737	0,808		

Tabella 13. Confronti a coppie realizzati con il test di Bonferroni per la variabile: Indice di Pielou. Lettere diverse indicano differenze tra le medie con un livello di significatività inferiore allo 0,05.

Modalità	Media	Gruppi	Modalità	Media	Gruppi	Modalità	Media	Gruppi
Basalto	0,836	A	Naturale	0,915	A	Primavera	0,875	A
Granito	0,819	A	Pascolata	0,817	A	Autunno	0,704	B
Trachite	0,714	A	Lavorata	0,637	B			

Modalità	Media	Gruppi	Modalità	Media	Gruppi	Modalità	Media	Gruppi
Sub. Basaltico Gest. Lavorata	0,836	A	Sub. Basaltico Gest. Naturale	0,709	A	Sub. Granitico Gest. Pascolata	0,709	A
Sub. Granitico Gest. Naturale	0,819	A	Sub. Basaltico Gest. Pascolata	0,709	A	Sub. Trachitico Gest. Lavorata	0,709	A
Sub. Trachitico Gest Pascolata	0,714	A	Sub. Granitico Gest. Lavorata	0,709	A	Sub. Trachitico Gest Naturale	0,709	A

5.3.4 Relazione tra la composizione della comunità ectomicorrizica e le variabili ambientali considerate

Il non Metric Multidimensional Scaling indica che la composizione in OTU della comunità ectomicorrizica osservata in una sughereta rispecchia nettamente sia la natura del substrato litologico in cui insiste (p-value: 0,001) sia il tipo di gestione a cui la stessa sughereta è sottoposta (p-value: 0,049).

Diversamente ne la densità del bosco (p-value: 0,191) ne il periodo in cui vengono raccolti i campioni di terreno per lo studio della comunità ectomicorrizica (p-value: 0,528) sono ad essa correlati.

Il diagramma di ordinamento ottenuto con il non Metric Multidimensional Scaling (Fig 12) mostra quanto indicato dai valori di significatività riportati sopra. Inoltre, se per la costruzione del diagramma di ordinamento si usano i primi due assi (NMDS1, NMDS2), si può osservare che le comunità in sugherete pascolate e lavorate hanno composizioni abbastanza simili tra loro, mentre entrambe sono notevolmente differenti da quelle osservate nelle sugherete naturali. Come già riportato la stagione ha un effetto non significativo sulla composizione della comunità ectomicorrizica, infatti i poligoni (linee grigie) che uniscono i plot in cui sono stati prelevati i campioni nello stesso periodo si sovrappongono quasi perfettamente, le sole differenze riguardano le sugherete lavorate in cui i campioni sono stati raccolti in autunno (distribuiti nella parte bassa del poligono in basso) e quelle naturali in cui i campioni sono stati raccolti in primavera (parte alta del poligono più in alto). Il diagramma di ordinamento realizzato utilizzando gli assi NMDS1 e NMDS3 mette in risalto le nette differenze tra le comunità ectomicorriziche associate a sugherete in diverso substrato litologico. Il diagramma realizzato utilizzando gli assi NMDS2 e NMDS3 oltre a confermare tali differenze, mette in risalto le differenze tra le comunità ectomicorriziche osservate in sugherete sottoposte a differenti tipi di gestione. Infine osservando quest'ultimo diagramma si può notare che le sugherete su substrato basaltico se sono pascolate hanno una comunità simile a quella delle sugherete su substrato granitico, mentre se sono lavorate, la loro

comunità è simile a quelle osservate in sugherete lavorate su substrato trachitico.

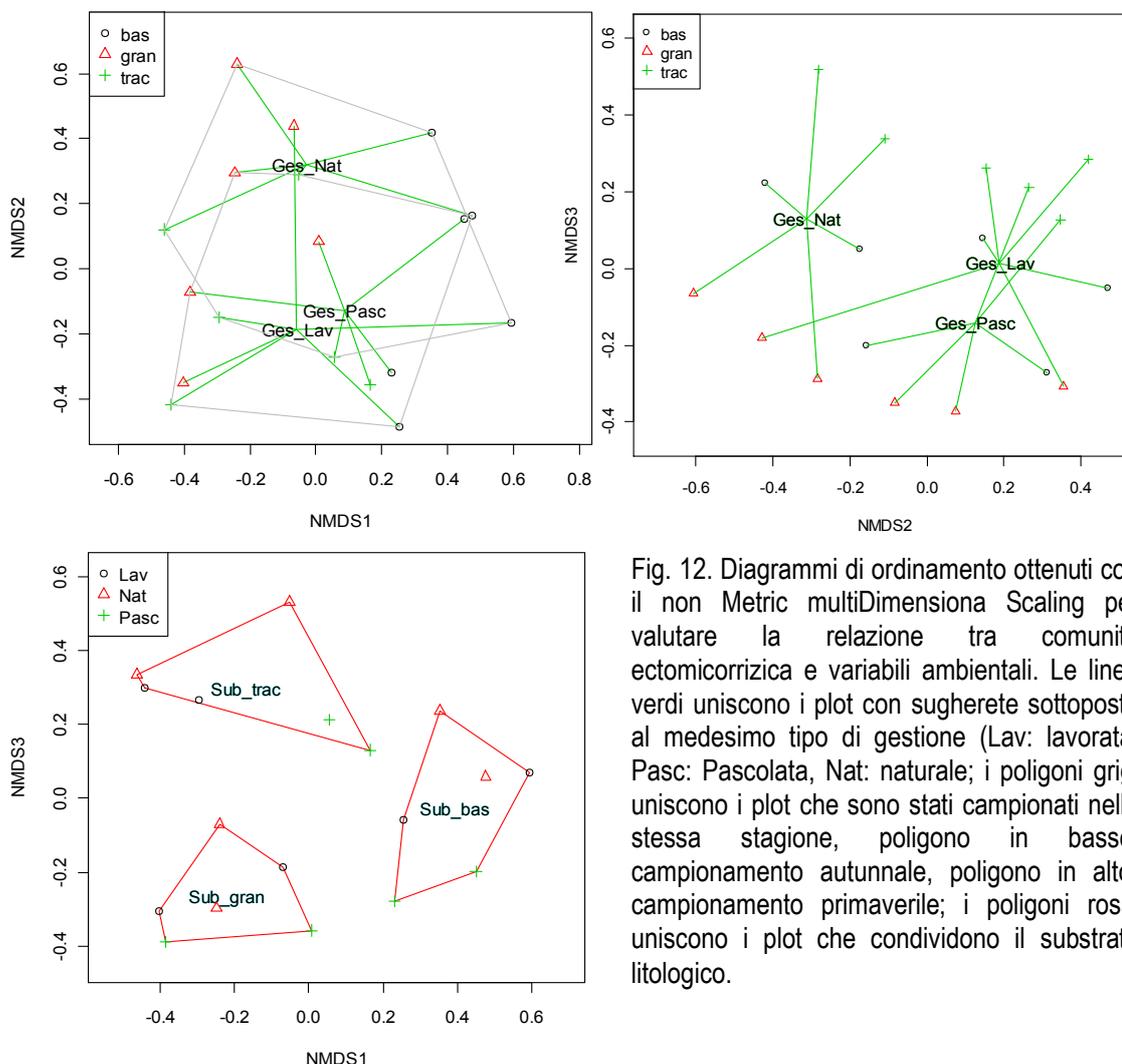


Fig. 12. Diagrammi di ordinamento ottenuti con il non Metric multiDimensional Scaling per valutare la relazione tra comunità ectomicorrizica e variabili ambientali. Le linee verdi uniscono i plot con sugherete sottoposte al medesimo tipo di gestione (Lav: lavorata; Pasc: Pascolata, Nat: naturale); i poligoni grigi uniscono i plot che sono stati campionati nella stessa stagione, poligono in basso: campionamento autunnale, poligono in alto: campionamento primaverile; i poligoni rossi uniscono i plot che condividono il substrato litologico.

5.4 Influenza delle variabili ambientali sulla composizione della comunità ectomicorrizica.

L'analisi Canonica delle Coordinate Principali mostra un effetto altamente significativo sia del substrato su cui insistono le sugherete (p-value: 0.01) sia del sistema di gestione ad esse applicato (p-value: 0.01) sulla composizione della comunità ectomicorrizica ad esse associate. Mentre nessun'influenza, è esercitata dalla stagione in cui vengono raccolti i campioni e dalla densità di piante di sughera. Questi risultati sono sostanzialmente in accordo con quelli

ottenuti con il non Metric Multidimensional Scaling. Come messo in luce anche dai grafici di ordinamento riportati nella figura 13. Dall'osservazione del grafico ottenuto utilizzando gli assi di ordinamento CAP1 e CAP3 si può notare la scarsa influenza della densità di piante della sughereta sulla composizione della comunità ectomicorrizica. Infatti sugherete che nel grafico appaiono vicine (composizione in OTU simile) possono avere valori di densità di piante molto differenti (diverse dimensioni dei cerchi grigi) e che tali valori non sono dipendenti dal tipo di gestione al contrario di quanto ci si potrebbe aspettare.

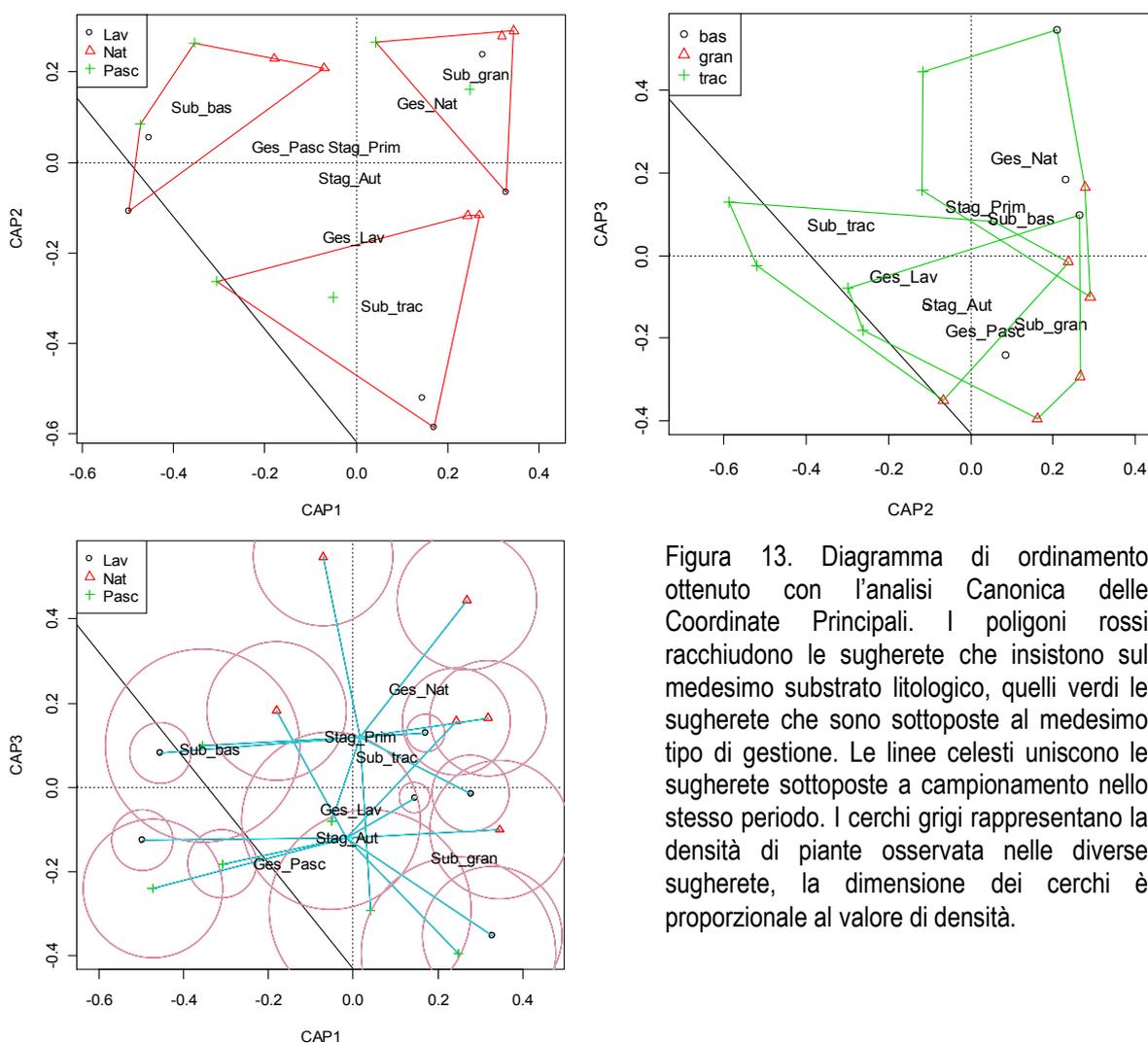
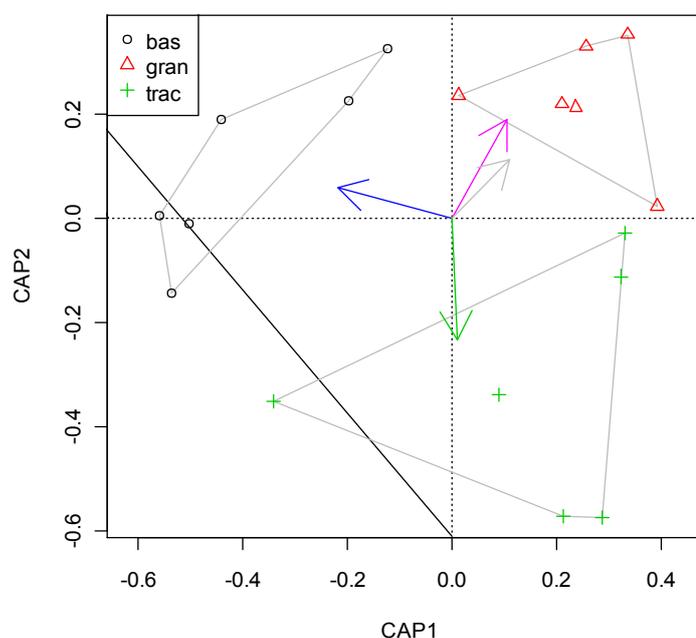


Figura 13. Diagramma di ordinamento ottenuto con l'analisi Canonica delle Coordinate Principali. I poligoni rossi racchiudono le sugherete che insistono sul medesimo substrato litologico, quelli verdi le sugherete che sono sottoposte al medesimo tipo di gestione. Le linee celesti uniscono le sugherete sottoposte a campionamento nello stesso periodo. I cerchi grigi rappresentano la densità di piante osservata nelle diverse sugherete, la dimensione dei cerchi è proporzionale al valore di densità.

Il modello utilizzato nell'analisi Canonica delle Coordinate Principali per valutare l'effetto delle variabili ambientali sulla composizione delle comunità ectomicorriziche ci consente di evidenziare che le 4 variabili considerate sono responsabili del 45% della variabilità in composizione delle comunità ectomicorriziche osservate. Il 19% di questa variabilità è imputabile all'influenza esercitata dal substrato litologico, il 14% al tipo di gestione applicato alla sughereta, il 5,5% alla stagione e il rimanente 6,5% è dovuto alla differente densità di piante delle sugherete oggetto dell'indagine. Attraverso l'analisi canonica delle corrispondenze è stato anche possibile individuare le gilde di OTU che caratterizzano le comunità ectomicorriziche dei diversi ambienti.

Figura 14. Esempio di diagramma di ordinamento ottenuto con l'analisi Canonica delle Coordinate Principali. Le frecce di colori diversi indicano OTU diverse, la dimensione delle frecce è proporzionale all'importanza che le OTU hanno nella composizione delle comunità ectomicorriziche. Blu: *Inocybe maculata*; viola: *Tomentella* sp3; grigio: *Lactarius chrysorrheus*; verde: *Entolomataceae* sp1.



L'utilizzo di questo metodo come mostrato in figura 14 ha consentito la compilazione della tabella 14, nella quale sono riportate le OTU che maggiormente caratterizzano le diverse situazioni ambientali dove vegeta la sughera.

Tabella 14. Importanza delle diverse OTU nella costituzione delle comunità osservate in sugherete che insistono su substrato differente e sono soggette ad un diverso tipo di gestione

Substrato Basaltico		Substrato Granitico		Substrato Trachitico	
Specie	Contrib. %	Specie	Contrib. %	Specie	Contrib. %
<i>Russulaceae sp1</i>	33,49	<i>Russula odorata</i>	22,32	<i>Russula odorata</i>	16,32
<i>Hymenogaster sp1</i>	8,82	<i>Tomentella sp3</i>	15,15	<i>Cortinarius sp2</i>	14,51
<i>Boletus radicans</i>	7,52	<i>Russula aff.</i>		<i>Cortinarius sp1</i>	8,16
<i>Inocybe maculata</i>	5,03	<i>Xerampelina</i>	11,24	<i>Entolomataceae sp1</i>	8,16
<i>MECM20</i>	4,41	<i>MECM51</i>	9,96	<i>Inocybe sp3</i>	8,16
<i>Tomentella sp25</i>	4,41	<i>Lactarius chrysorrheus</i>	9,53		
<i>Pezizaceae sp1</i>	3,76	<i>Tricholoma sulphureum</i>	6,35	<i>Tomentella badia</i>	8,16
<i>Xerocomus rubellus</i>	3,76	<i>Russula sp7</i>	5,1	<i>Tomentella sp22</i>	8,16
<i>Cortinarius leucopus</i>	3,65	<i>Tomentella sp1</i>	5,1	<i>Xerocomus rubellus</i>	4,84
<i>Russula sp2</i>	3,65	<i>Clavulinaceae sp1</i>	3,18	<i>Lactarius subumbonatus</i>	4,08
<i>Byssocorticium sp1</i>	3,02	<i>Humaria sp1</i>	3,18	<i>Tomentella sp24</i>	4,08
<i>Inocybe sp3</i>	3,02			<i>MECM41</i>	3,84
<i>Entoloma sp1</i>	2,61			<i>Sebacina sp3</i>	3,84
<i>Inocybe sp1</i>	2,61				
<i>Inocybe sp2</i>	2,61				
Sugherete Lavorate		Sugherete Naturali		Sugherete Pascolate	
Specie	Contrib. %	Specie	Contrib %	Specie	Contrib. %
<i>Russulaceae sp1</i>	26,45	<i>Boletus radicans</i>	12,24	<i>Cortinarius sp2</i>	14,98
<i>Russula odorata</i>	9,48	<i>Russula odorata</i>	9,32	<i>Russula odorata</i>	14,55
<i>Hymenogaster sp1</i>	8,82	<i>Lactarius chrysorrheus</i>	9,05	<i>Inocybe sp3</i>	11,61
<i>Cortinarius sp1</i>	7,99	<i>Tomentella sp3</i>	9,05	<i>Entolomataceae sp1</i>	8,43
<i>Tomentella badia</i>	7,99	<i>Lactarius subumbonatus</i>	6,5	<i>Russulaceae sp1</i>	7,43
<i>Tomentella sp22</i>	7,99	<i>Tomentella sp24</i>	6,5	<i>Russula aff. Xerampelina</i>	6,91
<i>MECM20</i>	4,41	<i>Pezizaceae sp1</i>	6,12	<i>MECM51</i>	6,13
<i>Tomentella sp25</i>	4,41	<i>Xerocomus rubellus</i>	6,12	<i>Inocybe maculata</i>	5,31
<i>MECM41</i>	3,76	<i>Tricholoma sulphureum</i>	6,03	<i>Xerocomus rubellus</i>	4,99
<i>Sebacina sp3</i>	3,76	<i>Entoloma sp1</i>	4,25	<i>Cortinarius leucopus</i>	3,85
<i>Sebacinales sp1</i>	3,76	<i>Inocybe sp1</i>	4,25	<i>Russula sp2</i>	3,85
<i>Tomentella sp23</i>	3,76	<i>Inocybe sp2</i>	4,25	<i>Tomentella sp3</i>	3,46
		<i>Tomentella sp91</i>	4,25		
		<i>Clavulinaceae sp1</i>	3,02		

6. Discussione

Come accennato in premessa, la simbiosi micorrizica nasce dall'interazione tra suolo, fungo e pianta. Ciò significa che la struttura e la composizione della comunità ectomicorrizica che risiede in un bosco sono influenzate dalle caratteristiche fisico-chimiche del suolo, dalle specie fungine presenti, che possono favorire la formazione di aggregati di ectomicorrize in funzione delle loro caratteristiche biologiche, e dalle caratteristiche della comunità vegetale che ospita i funghi ectomicorrizici (Rillig e Mummey, 2006).

I risultati ottenuti nella presente ricerca, in accordo con quanto appena riportato, indicano che l'equilibrio che si verifica tra suolo, pianta e fungo, è dinamico, cioè si modifica al variare di una o più di queste componenti dell'ecosistema e, inoltre, segue le fasi biologiche stagionali che ne regolano la vita e lo sviluppo.

Molte delle ricerche realizzate per valutare in che modo la comunità fungina simbiote si adatta alle diverse caratteristiche del suolo e alle modifiche che intervengono nella comunità vegetale sono state realizzate su scala locale, e pur contribuendo a chiarire i meccanismi che regolano tali adattamenti, forniscono un'immagine frammentaria del fenomeno e le indicazioni che si ricavano possono essere riferite esclusivamente al sito in cui è stata realizzata la ricerca. Al fine di ottenere informazioni di carattere generale appare sempre più evidente la necessità di realizzare indagini su vasta scala capaci di esplorare nel modo più esaustivo possibile la variabilità degli ambienti in cui una specie vegetale ospite e la sua comunità ectomicorrizica si sviluppano (Lilleskov e Parrent, 2007). In tal senso la presente ricerca è stata realizzata in sugherete che sono rappresentative del 75% delle sugherete naturali, del 40% delle sugherete pascolate e del 60% delle sugherete lavorate presenti in Sardegna.

Al fine di mettere in luce nel modo più esaustivo possibile la diversità della comunità ectomicorrizica associata alle diverse sugherete è stato utilizzato un metodo di campionamento di tipo geometrico che ha previsto il prelievo di campioni di suolo con metodo "bulk" dimostratosi particolarmente efficiente nel

rilevare la diversità della comunità ectomicorrizica (Lancellotti *et al.*, 2010). Questo metodo ha consentito di rilevare 185 OTU attraverso l'osservazione di 82.333 ectomicorrize, mostrando una notevole efficienza (numero di ectomicorrize osservate per individuare una OTU). Infatti in un'indagine di dimensioni simili, 9 differenti sugherete sottoposte a campionamento "core", realizzata in Portogallo, l'osservazione di 260.545 ectomicorriziche ha consentito di rilevare 55 OTU (Azul *et al.*, 2009).

La comunità ectomicorrizica osservata nel complesso mostra una notevole diversità tassonomica, infatti sono state trovate specie fungine appartenenti a quasi tutti gli ordini di Basidiomiceti ed Ascomiceti ectomicorrizici ed è stata trovata anche una specie della divisione *Zygomycota*, un ritrovamento piuttosto inconsueto, infatti pur essendo noto che a questa divisione appartengono funghi ectomicorrizici (Tedersoo *et al.*, 2010) i loro ritrovamenti sono piuttosto rari e peraltro negli studi realizzati sulle comunità ectomicorriziche associate alla sughera non sono mai stati segnalati (Azul *et al.*, 2009; Aponte *et al.*, 2010).

In analogia con numerosi studi, *C. geophilum* è la specie più diffusa in tutte le sugherete indagate, in particolare la sua notevole presenza in ecosistemi mediterranei (Richard *et al.* 2005; De Roman *et al.* 2005, Azul *et al.*, 2009, Aponte *et al.*, 2010), può dipendere dal fatto che le sue strutture di conservazione, gli sclerozi, consentono di superare le condizioni di siccità estiva tipiche del clima mediterraneo (LoBuglio *et al.*, 1999; Pigott, 1982). Se si esclude questa specie, gli Ascomiceti, come riportato anche da Aponte e coll. (2010) in sugherete della Spagna, sono poco abbondanti ma molto diffusi, infatti sono stati trovati in quasi tutte le sugherete, seppure in ciascuna di queste solo in pochi campioni. Tra i basidiomiceti dominano gli ordini *Thelephorales*, *Russulales* e *Agaricales*. Tra questi ultimi di maggiore importanza è il gruppo *Inocybel/Cortinarius*. Qualitativamente questo profilo compositivo è quello tipico delle comunità ectomicorriziche associate alla sughera (Azul *et al.*, 2009; Aponte *et al.*, 2010) ma anche ad altri ospiti sia di ambienti mediterranei (De Roman *et al.*, 2005; Richard *et al.*, 2005) che di altri ambienti (Horton e Bruns, 2001). Di notevole interesse è il fatto che in particolare nelle sugherete sui

substrati trachitici e basaltici soggette a pascolo e lavorazioni, l'ordine *Russulales* perda la sua importanza e venga rimpiazzato dall'ordine *Agaricales*.

È stato mostrato che i differenti tipi di gestione del bosco determinano alterazioni nella struttura e composizione delle comunità ectomicorriziche.

Le sugherete naturali sono quelle in cui la comunità ectomicorrizica raggiunge i maggiori livelli di diversità, sia quando si considera la comunità ectomicorrizica nel suo complesso, sia quando si va ad indagare quella che occupa i singoli campioni di suolo. Le comunità ectomicorriziche osservate sono caratterizzate da curve rango-frequenza lunghe e con una notevole pendenza. Tale andamento peraltro caratteristico delle comunità di funghi ectomicorrizici sottolinea la presenza di poche specie abbondanti e molte specie rare (Dalhberg, 2001). Peraltro queste sugherete sono anche quelle in cui le comunità ectomicorriziche si dimostrano tassonomicamente più eterogenee.

Nelle comunità ectomicorriziche associate alle sugherete pascolate si assiste alla riduzione della ricchezza in OTU. Le alterazioni che si verificano a carico della comunità vegetale ospite in seguito al decespugliamento influenzano negativamente questo parametro che, come è noto, è correlato alla ricchezza in specie della comunità vegetale (Dickie, 2007). Probabilmente il decespugliamento, anche se limitato all'asportazione della parte aerea degli arbusti, costringe queste piante ad impiegare le riserve immagazzinate nelle radici per la produzione di nuova vegetazione rendendole, almeno in parte, indisponibili per i simbionti fungini. È plausibile che la permanenza nel suolo dell'apparato radicale di queste piante limiti la perdita di ricchezza in specie rispetto a quanto si osserva nella sughereta lavorata. Tuttavia le notevoli differenze in composizione tra le sugherete naturali e quelle pascolate, lasciano intendere che le condizioni che si creano in questi ambienti (ad esempio la maggiore insolazione con le conseguenti alterazioni nel bilancio idrico del suolo, una maggiore compattazione di quest'ultimo a causa del calpestio degli animali, l'alterazione della cenosi vegetale a favore di specie erbacee pabulari) siano tali da favorire la presenza e la diffusione di nuove specie non presenti nelle sugherete naturali. Infatti se si escludono le OTU ubiquitarie come il *C.*

geophilum e la *Russula odorata*, solo due OTU, *Xerocomus rubellus* e *Tomentella* sp3, sono predominanti sia nelle sugherete pascolate che in quelle naturali. Peraltro le comunità osservate nelle sugherete pascolate presentano una maggiore ripartizione delle ectomicorrize tra le diverse OTU, come mostrato dai valori dell'indice di Pielou e dalla minore pendenza della curva rango-frequenza. Ciò indica l'assenza di specie fortemente dominanti come nel caso delle sugherete naturali o di quelle lavorate, e la presenza di diverse specie particolarmente competitive ed adatte a occupare questi ambienti.

Un altro fattore che spiega le differenze in composizione tra le comunità ectomicorriziche delle sugherete naturali e quelle delle sugherete pascolate e in particolar modo delle sugherete lavorate sono le attività antropiche. Queste ultime realizzate nelle sugherete pascolate e in misura molto più accentuata in quelle lavorate sono dirette a favorire lo sviluppo di essenze erbacee pabulari a discapito di quelle arboree. Proprio nelle sugherete lavorate è stato trovato il maggior numero di campioni di terreno senza ectomicorrize e sono stati rilevati i valori minori nel numero di ectomicorrize. Le alterazioni negli equilibri della cenosi vegetale a favore di specie erbacee determina modifiche anche nell'equilibrio tra i diversi gruppi della comunità fungina del suolo. In particolare i funghi VAM si sono dimostrati particolarmente competitivi nei confronti dei funghi ectomicorrizici, determinando la scomparsa di quelli con minore fitness (Wiensczyk *et al.*, 2002). La riduzione di diversità è sicuramente dovuto sia a quest'ultimo meccanismo, sia alla presenza di un unico ospite vegetale, rappresentato dalla sughera. Ma sicuramente anche alla notevole semplificazione del sistema suolo. Mentre un suolo forestale si presenta eterogeneo e offre la possibilità di sviluppo a specie fungine molto differenti tra loro dal punto di vista funzionale, il suolo delle sugherete soggette a lavorazioni presenta tutte le caratteristiche di un suolo agrario, nel quale la struttura fisica e la composizione chimica vengono alterate dalle lavorazioni agronomiche. Il risultato è un suolo dalle caratteristiche omogenee che ospita solo le specie adatte a quelle condizioni particolari. Tali specie peraltro devono avere notevoli capacità competitive nei confronti delle altre specie fungine ectomicorriziche

con cui devono condividere i pochi apici radicali presenti. In relazione a quanto detto si spiega il perché le curve rango-frequenza delle comunità ectomicorriziche osservate nelle sugherete lavorate si presentano corte e con un pendenza molto accentuata a sottolineare la notevole predominanza di poche specie. Va messo in evidenza che il degrado subito dalla comunità ectomicorrizica in seguito alla pressione antropica si traduce in una ridotta efficienza nell'utilizzo delle risorse del suolo sia perché pochi sono gli apici micorrizici presenti, che come è noto rappresentano i siti attraverso cui le piante possono accedere alle risorse del suolo, sia perché l'erosione della ricchezza in specie significa erosione della ricchezza funzionale in quanto diverse specie ectomicorriziche utilizzano risorse del suolo differenti a seconda della loro attività enzimatica (Courty *et al.*, 2010).

I risultati delle ricerche effettuate hanno evidenziato che la differente natura del substrato litologico delle sugherete oggetto di studio ha sicuramente influenzato la struttura e la composizione delle comunità ectomicorriziche.

In particolare, è stato rilevato che il numero medio di ectomicorrize nei campioni di terreno ma anche la ricchezza in OTU e più in generale la diversità sono più elevate nelle sugherete che insistono su substrato granitico. Molto probabilmente il suolo con tessitura franco-sabbiosa, originatosi in seguito all'alterazione della roccia madre granitica, ha favorito sia la diffusione dei funghi ectomicorrizici, sia uno sviluppo più agevole dell'apparato radicale delle piante ospiti.

Ciò non sorprende in quanto, anche se non è stato possibile confrontare questi risultati in letteratura è ben noto che le sugherete che vegetano su substrati litologici di natura granitica rappresentano i più importanti centri di biodiversità fungina dell'Isola (Brotzu, 1988 - 1993).

Per quanto riguarda le comunità ectomicorriziche osservate nelle altre due sugherete esaminate, esistono delle differenze sostanziali.

Le comunità rilevate nelle sugherete che insistono su substrato basaltico, presentano valori di ricchezza in OTU piuttosto bassi, ma valori dell'indice di Pielou piuttosto elevati. Ciò dimostra che le condizioni di quest'area sono

fortemente selettive (suoli a pH neutro e con tessitura argillosa) nei confronti dei funghi ectomicorrizici. Quelli che riescono a insediarsi, però, hanno notevoli possibilità di diffondersi sia per la limitata concorrenza da parte di altri funghi, sia per l'elevato livello di adattamento che devono aver acquisito per insediarsi in questi ambienti.

Le comunità osservata nella sugherete su substrato trachitico presentano invece un numero limitato di OTU. Per di più, solo pochi di questi ultimi sono abbastanza diffusi, come indicato sia dai bassi valori dell'indice di Pielou, sia dalla forte pendenza della curva rango-frequenza delle tre sugherete che sono state osservate su questo substrato. Sembra che le comunità ectomicorriziche che vivono su questo substrato si trovino in condizioni limite dove solo poche specie dimostrano la capacità di diffondersi e insediarsi stabilmente.

Gli studi sulla dinamica stagionale delle comunità ectomicorriziche sono piuttosto contraddittori, come già accennato nell'introduzione. Nella presente indagine la stagione di campionamento ha influenzato soprattutto i parametri ecologici delle comunità. Ciò probabilmente è da imputarsi alla biologia dei funghi ectomicorrizici. Infatti, mentre alcuni di questi riescono a svilupparsi anche durante il periodo siccitoso, il maggior numero di specie ectomicorriziche ha bisogno delle stagioni più umide per riprendere il loro sviluppo. Ciò determina un aumento della diversità rilevata con il campionamento ma senza differenze nelle specie presenti durante i due periodi, tanto che la composizione delle due comunità è piuttosto simile. Ciò è in accordo con quanto riportato in una recente pubblicazione in cui è stato affermato che le diverse specie ectomicorriziche coesistono durante tutto l'anno e che tuttavia eventuali differenze osservate sono imputabili al fatto che alcune specie più termofile diventano dominanti e sono più facilmente rilevabili quando vengono campionate nei periodi più caldi mentre altre specie possono diventare dominanti quando i rilievi vengono effettuati durante i mesi più freddi (Koide *et al.*, 2011).

7. Conclusioni

I risultati ottenuti con la presente ricerca hanno messo in evidenza che le comunità ectomicorriziche adattano la loro struttura in risposta alle modifiche degli ecosistemi conseguenti allo sviluppo di diverse tipologie gestionali. In particolare è stato rilevato che le differenze tra una sughereta naturale e una sughereta sottoposta a pascolo determinano una riduzione della ricchezza nella comunità ectomicorrizica e una maggiore ripartizione delle ectomicorrize tra le specie fungine rimaste. Ad un ulteriore intervento antropico che preveda l'applicazione di lavorazioni di tipo agronomico per la semina di essenze pabulari per il bestiame consegue una successiva e più accentuata riduzione della ricchezza in specie, ma anche una riduzione degli altri parametri ecologici con una notevole erosione della diversità della comunità ectomicorrizica. Questa appare caratterizzata dalla presenza di un numero limitato di specie, alcune delle quali diventano fortemente dominanti. È probabile che ciò sia la conseguenza della diminuita disponibilità di risorse nutritive. La riduzione della densità di ectomicorrize nei campioni di suolo, può essere dovuta al cambiamento avvenuto nella cenosi vegetale che risulta dominata da essenze erbacee ospiti di funghi VAM, i quali esercitano una forte competizione, per le risorse del suolo, nei confronti dei funghi ectomicorrizici. Tale modifica nella struttura della comunità ectomicorrizica si verifica in misura differente nelle sugherete che insistono su substrati litologici differenti. Tuttavia il meccanismo che regola la dinamica della struttura della comunità ectomicorrizica sembra costante ed estendibile alle diverse situazioni in cui vegeta la sughera.

Sia il substrato litologico sia il tipo di gestione influenzano notevolmente la composizione delle comunità ectomicorriziche. Ciò ha consentito di individuare gilde di specie tipiche delle diverse sugherete.

Questo risultato seppur rilevante non è sufficiente a chiarire le conseguenze che i cambiamenti nella composizione delle comunità ectomicorriziche determinano per l'ecosistema. In tal senso appaiono necessarie ulteriori indagini, ad esempio saggi sull'attività enzimatica, che consentano di acquisire informazioni sul ruolo funzionale delle diverse specie ectomicorriziche.

8. Bibliografia

- Amaranthus, M.P., Page-Dumroese D., Harvey A., Cazares E., Bednar. L.F. 1996. Soil compaction and organic matter affect conifer seedling nonmycorrhizal and ectomycorrhizal root tip abundance and diversity. U.S. Department of Agriculture Forest Service. Pacific Northwest Research Station, Portland, Oregon. Research Paper PNW-RP-494.
- Agerer R., 1987-2002. Colour Atlas of Ectomycorrhizae. Einhorn-Verlag Eduard Dietenberger, Schwäbisch Gmünd. 5 volumi.
- Agerer R. 1991. Characterization of ectomycorrhiza. In: Norris, JR, Read, DJ, Varma, AK, eds. Techniques for the study of mycorrhiza. London, UK: Academic Press 25-73.
- Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W., Lipman D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410.
- Apcor, 2009. <http://www.apcor.pt/artigo/63.htm>
- Aponte C., García L.V., Marañón T., Gardes M. 2010. Indirect host effect on ectomycorrhizal fungi: Leaf fall and litter quality explain changes in fungal communities on the roots of co-occurring Mediterranean oaks. *Soil Biology & Biochemistry* 5: 788-796.
- Aru A., Baldacchini P., Vacca A. 1991. Nota illustrativa alla carta dei suoli della Sardegna. Cagliari, Regione Autonoma della Sardegna.
- Azul A.M., Sousa J.P., Agerer R., Martín M.P., Freitas H. 2009. Land use practices and ectomycorrhizal fungal communities from oak woodlands dominated by *Quercus suber* L. considering drought scenarios. *Mycorrhiza* 20: 73-88.
- Baier R., Ingenhaag J., Blaschke H., Göttlein A., Agerer R. 2006. Vertical distribution of an ectomycorrhizal community in upper soil horizons of a young Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) stand of the Bavarian Limestone Alps. *Mycorrhiza* 16: 197-206.
- Bastias B.A., Xu Z., Cairney J. W. G. 2006. Influence of long-term repeated prescribed burning on mycelial communities of ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist* 172: 149-158.
- Brasier C.M. 1996. *Phytophthora cinnamomi* and oak decline in southern Europe. Environmental constraints including climate change. *Annals of Forest Science* 53: 347-358.

- Bray J.R., Curtis J.T. (1957). An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecological Monographs* 27: 325-349.
- Brundrett M, Bougher N, Dell B, Grove T, Malajczuk N. 1996. Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. ACIAR Monograph 32. Canberra, Australia: Australian Centre for International Agricultural Research.
- Brundrett M. 2004. Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biological Reviews* 79: 473-495.
- Brundrett M. 2009. Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant Soil* 320:37-77.
- Brotzu R. (1988-1993). Guida ai funghi della Sardegna. Ed. Foto Archivio Sardo, Nuoro, vol. 1-2, 733 pp.
- Bugalho N. M., Caldeira C. M., Pereira J. S., Aronson J., Pausas J. G. 2011. Mediterranean cork oak savannas require human use to sustain biodiversity and ecosystem services. *Frontiers in Ecology and the Environment* 5: 278-286.
- Campos P., Hassen H. D., Oviedo J.L., Ovando P., Chebil A. 2007. Accounting for single and aggregated forest incomes: Application to public cork oak forests in Jerez (Spain) and Iteimia (Tunisia). *Ecological Economics* 65: 76-86.
- Carta di uso del suolo 1997. Regione Autonoma della Sardegna.
- Chao A. 1987. Estimating the population size for capture-recapture data with unequal catchability. *Biometrics* 43: 783-791.
- Colwell R.K., Coddington J.A. 1994. Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. *Philosophical Transactions of the Royal Society (Series B)*, 345: 101-118.
- Conn C., Dighton J. 2000. Litter quality in Xuences on decomposition, ectomycorrhizal community structure and mycorrhizal root surface acid phosphatase activity. *Soil Biology and Biochemistry* 32: 489-496
- Courty P.E., Buée M., Diedhiou A.G., Frey-Klett P., Le Tacon F., Rineau F., Turpault M.P., Uroz S., Garbaye J. 2010. The role of ectomycorrhizal communities in forest ecosystem processes: new perspectives and emerging concepts. *Soil Biology and Biochemistry* 42: 679-698.

- Courty P.E., Franc A., Pierrat J.C., Garbaye J. 2008. Temporal changes in the ectomycorrhizal community in two soil horizons of a temperate oak forest. *Applied and Environmental Microbiology* 74:5792-5801.
- Dahlberg A. 2001. Community ecology of ectomycorrhizal fungi: an advancing interdisciplinary field. *New Phytologist* 150: 555-562.
- Dearnaley J. 2007. Further advances in orchid mycorrhizal research. *Mycorrhiza* 17: 475-486.
- de Román M., de Miguel A.M. 2005. Post-fire, seasonal and annual dynamics of the ectomycorrhizal community in a *Quercus ilex* L. forest over a 3-year period. *Mycorrhiza* 15:471-482.
- Dettoni S., Cillara M., Deplano G., Filigheddu M.R., Sirca C., Spano D., Usai A., Franceschini A. 2009. Danni da neve e rischi conseguenti nelle sugherete del Nord Sardegna. Atti III Congresso Nazionale di Selvicoltura per il miglioramento e la conservazione dei boschi italiani, 16-19 ottobre 2008, Taormina (Messina), Accademia Italiana di Scienze Forestali, Firenze, ISBN 978-88-87553-16-1, vol. III: 1380-1384.
- Dettoni S., Filigheddu M.R., Gutierrez M. 2001. La coltivazione della quercia da sughero. Dipartimento di Economia e Sistemi Arborei Università degli Studi di Sassari, Tipografia TAS, Sassari.
- Dickie I.A. 2007. Host preference, niches and fungal diversity. *New Phytologist* 174: 230-233
- Domisch T., Finer L., Lehto T., Smolander A. 2002. Effect of soil temperature on nutrient allocation and mycorrhizas in Scots pine seedlings. *Plant Soil* 239: 173-185.
- Doyle J.J., Doyle J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Erland S., Taylor A.F.S. 2002. Diversity of ectomycorrhizal communities in relation to the abiotic environment. In: Van der Heijden MGA, Sanders IR (eds) *Mycorrhizal ecology. Ecological studies*, vol 157. Springer, Berlin, pp. 470-485.
- Horton T.R., Bruns T.D. 2001. The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black box. *Molecular Ecology* 10: 1855-1871.
- Franceschini A., Maddau L., Serrra S., Pulina M.A. 2002. Methodological approaches to outline control strategies of cork oak decline in Sardinia (Italy). *IOBC/wprs Bulletin* 25: 17-20.

- Faith D.P., Minchin P.R., Belbin L. 1987. Compositional dissimilarity as a robust measure of ecological distance. *Vegetatio* 69: 57-68.
- Fusconi A., Bonfante-Fasolo P. 1984. Ultrastructural aspects of host-endophyte relationships in *Arbutus unedo* L. mycorrhizas. *New Phytologist* 96: 397-410.
- Garbaye J. 1994. Tansley review No. 76. Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* 128: 197-210.
- Gardes M., Bruns T.D. 1993: ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2: 113-118.
- Gardes M., Bruns T.D. 1996. Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: Above- and below-ground views. *Canadian Journal of Botany*. 74: 1572-1583.
- Gellini R., Grossoni P. 1997. *Botanica Forestale*. Vol. II:5-200. CLUSF, Firenze.
- Pignatti S., 1998. *I boschi d'Italia*. UTET, Torino.
- Glen M., Tommerup I.C., Bougher N.L., O'Brien P.A. 2002. Are *Sebacinaceae* common and widespread ectomycorrhizal associates of *Eucalyptus* species in Australian forests? *Mycorrhiza* 12: 243-247.
- Gotelli N.J., Colwell R.K. 2001. Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. *Ecology Letters* 4: 379-391.
- Izzo A., Agbowo, J., Bruns T.D. 2005. Detection of plot-level changes in ectomycorrhizal communities across years in an old-growth mixed-conifer forest. *New Phytologist* 166: 619-630.
- Jones D.L. 2006. *A complete guide to native orchids of Australia including the Island Territories*. Reed New Holland, Sydney.
- Kennedy P.G., Peay K.G. 2007. Different soil moisture conditions change the outcome of the ectomycorrhizal symbiosis between *Rhizopogon* species and *Pinus muricata*. *Plant Soil* 291: 155-165.
- Kindt R., Van Damme P., Simons A.J. 2006. Tree diversity in western Kenya: using profiles to characterise richness and evenness. *Biodiversity and Conservation* 15: 1253-1270.
- Koide R.T., Fernandez C., Petprakob K. 2011. General principles in the community ecology of ectomycorrhizal fungi. *Annals of Forest Science* 68 :45-55.

- Kõljalg U., Larsson K.H., Abarenkov K., Nilsson R.H., Alexander I.J., Eberhardt U., Erland S., Høiland K., Kjølter R., Larsson E., Pennanen T., Sen R., Taylor A.F.S., Tedersoo L., Vralstad T., Ursing B.M. 2005. UNITE: a database providing web-based methods for the molecular identification of ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist* 166: 1063-1068.
- Lancellotti E., Franceschini A., Corda P. 2010. Confronto tra metodi di campionamento utilizzati nello studio della comunità ectomicorrizica in una sugherata. *Micologia Italiana* 39: 25-42.
- Landeweert R., Leeflang P., Kuyper T.W., Hoffland E., Rosling A., Wernans K., Smit E. 2003. Molecular identification of ectomycorrhizal mycelium in soil horizons. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 327-333.
- Leake J.R. 2005. Plants parasitic on fungi: unearthing the fungi in myco-heterotrophs and debunking the “saprophytic” plant myth. *Mycologist* 19: 113-122.
- Lilleskov E.A., Parrent J.L. 2007. Can we develop general predictive models of mycorrhizal fungal community - environment relationships? *New Phytologist* 174: 244-250.
- LoBuglio K.F. 1999. *Cenococcum*. In: Cairney JWG, Chambers SM (eds) *Ectomycorrhizal fungi. Key genera in profile*. Springer, Berlin Heidelberg, New York pp 287-310.
- Madrau S., Deroma M.A., Loi G., Baldaccini P. 2006. Il database pedologico georeferenziato e la Carta dei Suoli della Sardegna. Gallizzi, Sassari, 22 pp.
- Martin F., Duplessis S., Ditengou F., Lagrange H., Voiblet C., Lapeyrie F. 2001. Developmental cross talking in the ectomycorrhizal symbiosis: signals and communication genes. *New Phytologist* 151: 145-154.
- Massicotte H.B., Melville L.H., Molina R., Peterson R.L. 1993. Structure and histochemistry of mycorrhizae synthesized between *Arbutus menziesii* (*Ericaceae*) and two basidiomycetes, *Pisolithus tinctorius* (*Pisolithaceae*) and *Piloderma bicolor* (*Corticaceae*). *Mycorrhiza* 3: 1-11.
- Montaldo N., Albertson J.D., Mancini M. 2008. Vegetation dynamics and soil water balance in a water-limited Mediterranean ecosystem on Sardinia, Italy. *Hydrology and Earth System Sciences* 12: 1257-71.
- Montecchio L., Rossi S. 2000. L'ectomicorrizzazione: efficace mutualismo tra funghi e piante forestali. *Sherwood* 57: 5-8.

- Nunes M.C.S., Vasconcelos M.J., Pereira J.M.C., Dasgupta N., Alldredge R.J., Rego F.C. 2005. Land cover type and fire in Portugal: do fires burn land cover selectively? *Landscape Ecology* 20: 661-673.
- Oksanen J. 2008. Multivariate analyses of ecological communities in R: vegan tutorial, 39 pp. <http://cc.oulu.fi/jarioksa/opetus/metodi/vegantutor.pdf>.
- Oksanen J., Kindt R., Legendre P., O'Hara B., Simpson G.L., Solymos P., Stevens M.H.H., Wagner H. 2009. *vegan: Community Ecology Package*. R package version 1.15-3. <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- Peterson R.L., Massicotte H.B., Melville L.H., F Phillips F. 2004. *Mycorrhizas: Anatomy and Cell Biology*. NRC Research Press, Canada.
- Pignatti S. 1998. *I boschi d'Italia. Sinecologia e biodiversità*. UTET, Torino.
- Pigott C.D. 1982. Fine structure of mycorrhiza formed by *Cenococcum geophilum* Fr. on *Tilia cordata* Mill. *New Phytologist* 92: 501-512.
- Pielou E.C. 1969. *An Introduction to Mathematical Ecology*. J. Wiley & Sons, New York, 292 pp.
- Pinto-Correia T., Mascarenhas J. 1999. Contribution to the extensification/intensification debate: new trends in the Portuguese Montado. *Landscape and Urban Planning* 46: 125-131.
- R Development Core Team (2009). R: a language and environment for statistical computing. <http://www.Royal-project.org>.
- Richard F., Millot S., Gardes M., Selosse M.A. 2005. Diversity and specificity of ectomycorrhizal fungi retrieved from an old-growth Mediterranean forest dominated by *Quercus ilex*. *New Phytologist* 166: 1011-1023.
- Richard F., Roy M., Shahin O., Sthultz C., Duchemin M., Joffre R., Selosse M.A. 2011. Ectomycorrhizal communities in a Mediterranean forest ecosystem dominated by *Quercus ilex*: seasonal dynamics and response to drought in the surface organic horizon. *Annals of Forest Science* 68: 57-68.
- Rillig M.C., Mummey D.L. 2006. Mycorrhizas and soil structure. *New Phytologist* 171:41-53.
- Sedda L., Delogu G., Dettori S. 2011. Forty -Four Years of Land Use Changes in a Sardinian Cork Oak Agro-Silvopastoral System: A Qualitative Analysis. *The Open Forest Science Journal* 4: 57-66.
- Selosse M.A., Le Tacon F. 1998. The land flora: a phototrophfungus partnership. *Tree* 13: 15-20.

- Shannon C.E., Weaver A. 1949. The mathematical theory of communication. Univeristy of Illinois Press, Urbana, IL, 148 pp.
- Simard S.W., Perry D.A., Jones M.D., Myrold D.D., Durall D.M., Molina R. 1997. Net transfer of carbon between ectomycorrhizal tree species in the field. *Nature* 388: 579-582.
- Smith M.E., Douhan G.W., Rizzo D.M. 2007. Ectomycorrhizal community structure in a xeric *Quercus* woodland based on rDNA sequence analysis of sporocarps and pooled roots. *New Phytologist* 174: 847-863.
- Smith S.E., Read D.J. 2008. Mycorrhizal symbiosis, 3rd edn. Cambridge, UK: Academic Press.
- Taylor A.F.S. 2002. Fungal diversity in ectomycorrhizal communities: sampling effort and species detection. *Plant and Soil* 244: 19-28.
- Taylor D.L., McCormick M. 2008. Internal transcribed spacer primers and sequences for improved characterization of basidiomycetous orchid mycorrhizas. *New Phytologist* 177: 1020-1033.
- Tedersoo L., Hansen K., Perry B.A., Kjølner R. 2006. Molecular and morphological diversity of pezizalean ectomycorrhiza. *New Phytologist* 170: 581-596.
- Tedersoo L, May T.W., Smith M.E. 2010. Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza* 4: 217-263.
- Thomson B.D., Hardy G.E.S., Malajczuk N., Grove T.S. 1996. The survival and development of inoculant ectomycorrhizal fungi on roots of outplanted *Eucalyptus globulus* Labill. *Plant Soil* 178:247-253.
- Tòthmérész B. 1995. Comparison of different methods for diversity ordering. *Journal of Vegetation Science* 6: 283-290.
- Valdés M., Asbjornsen H., Gómez-Cárdenas M., Juárez M., Vogt K.A. 2006. Drought effects on fine-root and ectomycorrhizal-root biomass in managed *Pinus oaxacana* Mirov stands in Oaxaca, Mexico. *Mycorrhiza* 16: 117-124.
- Vallejo V.R., Aronson J., Pausas J., 2009. The way forward. In: Aronson J, Pereira JS, and Pausas JG (Eds). *Cork oak woodlands on the edge*. Washington, DC: Island Press.

- Urbieto I.R, Zavala M.A., Maran T. 2008. Human and non-human determinants of forest composition in southern Spain: evidence of shifts towards cork oak dominance as a result of management over the past century. *Journal of Biogeography* 35: 1688-1700.
- White T. J., Bruns T. D., Lee S. B., Taylor J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR protocols - a guide to methods and applications*. (Innis M. A. Gelfand D. H. Sninsky J. J. White T. J. eds). Academic Press, New York, 315-322.
- Whittaker R.H. 1965. Dominance and diversity in land plant communities. *Science, New Series* 147: 250-260.
- Wiensczyk A.M., Gamiet S., Durall D.M., Jones M.D., Simard S.W. 2002. Ectomycorrhizae and forestry in British Columbia: A summary of current research and conservation strategies. *B.C. Journal of Ecosystems and Management* 1: 2-20.

Allegati

Codice Herbarium	Genere	sequenza con maggiore similitudine tra quelle presenti in NCBI e UNITE	similarità	Classe	Ordine	Famiglia	GN	GP	GL	BN	BP	BL	TN	TP	TL		
b1l38a	Zygomycetes sp1	EU490154 Uncultured zygomycete	600/620 (97%)	Zyg.			0	0	0	0	0	3	0	0	0		
b1p29g	Cenococcum geophilum	morfo-anatomia		Ascomycota	Pezizales		20	19	15	12	17	11	18	11	14		
b1n36d	Pezizaceae sp1	HM189838 Pezizaceae sp.	607/607 (100%)					1	0	0	6	2	0	0	0	0	0
b1p28i	Peziza succosella	JF908535 Peziza succosella	549/554 (99%)				Pezizaceae	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
g1l31l	Tuber borchii	FM205502 Tuber borchii	480/482 (99%)				Tuberaceae	1	0	2	0	0	0	1	0	0	0
g1n1g	Pyrenomataceae sp1	EU024873 Vouch mycore (Humaria)	574/619 (93%)				Pyrenomataceae	3	2	2	2	1	0	0	0	1	0
g1n35r	Humaria sp1	UDB000988 Humaria hemisphaerica	590/609 (96%)					2	0	2	0	0	0	0	0	0	0
g1p39b	Sordariomycetes sp1	DQ273344 Uncultured sordariomycete	456/484 (94%)				Sordariales		0	2	0	0	0	0	0	0	0
g1p39c	Sordariomycetes sp2	DQ273344 Uncultured sordariomycete	454/484 (94%)						0	1	0	0	0	0	0	0	0
b1p35u	Amanita rubescens	UDB000038 Amanita rubescens	607/610 (99%)			Basidiomycota	Agaricales	Amanitaceae	3	0	0	0	4	0	0	0	0
t1p5b	Cortinariaceae sp1	EU668257 Uncultured Cortinarius	497/540 (92%)							0	0	0	0	0	0	0	0
t1p26a	Cortinariaceae sp2	HQ211789 Uncultured Cortinarius	265/295 (90%)					0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
b1l33c	Cortinariaceae sp3	FM995556 Uncultured Cortinariaceae	490/522 (94%)					0	0	0	0	0	2	0	0	0	0
g1l34l	Cortinariaceae sp4	FM995556 Uncultured Cortinariaceae	491/522 (94%)					0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
b1p8b	Cortinariaceae sp5	FR852006 Uncultured Cortinarius	464/527 (88%)					0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
t1l30b	Cortinarius sp1	AY669673 Cortinarius rubricosus	512/528 (97%)		Cortinariaceae			0	0	0	1	0	0	0	0	0	6
b1p5a	Cortinarius sp2	HQ445588 Cortinarius cf. albonigrellus	510/521 (98%)					0	0	0	0	2	1	0	0	5	2
d2e002	Cortinarius sp3	HE601877 Uncultured Cortinarius	594/601 (99%)					0	0	0	4	0	0	1	0	0	0
g1n2d	Cortinarius gallurae	FN428982 Cortinarius gallurae	494/499 (99%)					4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
d3d002	Cortinarius holophaeus	GQ159904 Cortinarius holophaeus	599/602 (99%)					1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
b1p34m	Cortinarius leucopus	HQ604721 Cortinarius leucopus	503/506 (99%)					0	0	0	0	5	2	0	0	0	0
b1p32r	Inocybaceae sp1	HQ604091 Inocybe fuscidula	539/599 (90%)					0	0	0	0	4	0	0	0	0	0
b1p8c	Inocybaceae sp2	AJ534933 Inocybe maculata	117/129 (91%)		Inocybaceae			0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
b1p32f	Inocybaceae sp7	FR852259 Uncultured Inocybe	576/608 (95%)					0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
b1p34c	Inocybaceae sp8	FR852225 Uncultured Inocybe	538/566 (95%)					0	0	0	0	5	0	0	0	0	0

Codice Herbarium	Genere	sequenza con maggiore similitudine tra quelle presenti in NCBI e UNITE	similarità	Classe	Ordine	Famiglia	GN	GP	GL	BN	BP	BL	TN	TP	TL
b1p34r	Inocybaceae sp9	FR852225 Uncultured Inocybe	566/596 (95%)				0	0	0	0	5	0	0	0	0
b1n31b	Inocybe sp1	HQ204678 Uncultured Inocybe	240/241 (99%)				0	0	0	2	0	0	0	0	0
b1n34u	Inocybe sp2	FR852225 Uncultured Inocybe	580/597 (97%)				0	0	0	3	2	0	0	0	0
b1p28f	Inocybe sp3	HM105506 Uncultured Inocybe	539/558 (97%)				4	0	0	0	8	1	0	3	0
b1p34e	Inocybe sp4	JF908209 Inocybe sp	488/488 (100%)				0	0	0	0	6	0	0	1	0
g1n38b	Inocybe sp5	JF908248 Inocybe sp	632/637 (99%)				2	0	0	0	0	0	1	0	0
t1n2e	Inocybe sp6	FN550905 Inocybe cf. langei	526/539 (98%)				0	0	0	0	0	0	3	0	0
g1n35s	Inocybe sp10	JF908193 Inocybe sp.	607/613 (99%)				3	2	3	0	0	0	0	0	0
g1n33s	Inocybe sp11	morfo-anatomia					1	0	0	0	0	0	0	0	0
t1n34t	Inocybe calospora	AM882759 Inocybe calospora	561/564 (99%)				0	0	0	0	0	0	1	0	1
g1n40b	Inocybe geophylla	UDB002393 Inocybe geophylla	644/647 (99%)				3	0	1	0	0	0	0	0	0
b1p34s	Inocybe maculata	AJ534933 Inocybe maculata	543/545 (99%)				0	2	0	0	8	4	0	0	0
t1n31u	Inocybe posterula	JF908152 Inocybe posterula	596/603 (99%)				0	0	0	0	0	0	3	0	0
b1p30b	Inocybe rimosa	FJ904147 Inocybe rimosa	568/570 (99%)				0	0	0	0	2	0	0	0	0
b1n6e	Inocybe whitei	JF908146 Inocybe whitei	586/588 (99%)				0	0	0	1	0	0	0	0	0
b1p10f	Inocybe cf rimosa	AM882994 Inocybe cf. rimosa	541/547 (99%)				0	0	0	0	4	0	0	0	0
t1l30a	Entolomataceae sp1	FJ210729 Uncultured Entolomataceae	887/888 (99%)			Entolomataceae	0	0	0	0	0	0	0	4	3
b1n5a	Entoloma sp1	HQ204653 Uncultured Entoloma	881/888 (99%)				1	0	0	2	2	0	1	0	0
t1n9e	Hebeloma sp1	UDB003190 Hebeloma plesiocistum	595/615 (96%)				0	0	0	0	0	0	2	0	0
g1n39r	Hebeloma cistophilum	EU570177 Hebeloma cistophilum	609/617 (99%)			Strophariaceae	1	0	0	0	0	0	0	0	0
b1l38c	Hymenogaster sp1	JF273526 Hymenogaster sp.	586/606 (97%)				0	0	0	0	0	5	0	0	0
g1n35v	Laccaria sp1	HQ285387 Uncultured Laccaria	597/603 (99%)				2	0	0	0	0	0	0	0	0
b1l40b	Laccaria laccata	JN021050 Laccaria laccata	602/602 (100%)			Hydnangiaceae	0	0	0	3	0	2	0	0	0
t1p26c	Laccaria maritima	UDB001495 Laccaria maritima	600/604 (99%)				0	0	0	0	0	0	0	2	0
t1n31y	Tricholoma sp1	AF458440 Tricholoma muricatum	592/614 (96%)			Tricholomataceae	0	0	0	0	0	0	2	0	1

Codice Herbarium	Genere	sequenza con maggiore similitudine tra quelle presenti in NCBI e UNITE	similarità	Classe	Ordine	Famiglia	GN	GP	GL	BN	BP	BL	TN	TP	TL	
g1n10d	Tricholoma scalpturatum	EU160596 Tricholoma scalpturatum	602/606 (99%)				2	0	0	0	0	0	0	0	0	
g1n36s	Tricholoma sulphureum	AY462037 Tricholoma sulphureum	591/591 (100%)				4	0	1	0	0	0	0	0	0	0
b1p26r	Byssocorticium sp1	morfo-anatomia				Atheliaceae	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0
g1n1d	Hygrophorus sp1	UDB001191 Hygrophorus persoonii	477/495 (96%)			Hygrophoraceae	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0
b1l31a	Russulaceae sp1	GU256186 Uncultured Russulaceae	628/629 (99%)		Russulales	Russulaceae	2	2	3	1	12	10	0	5	0	
t1n5b	Russula sp1	GQ221653 Uncultured Russula	490/511 (96%)				0	0	0	0	0	0	1	0	0	
b1p28d	Russula sp2	FR852096 Uncultured Russula	602/610 (99%)				5	0	4	3	7	0	1	0	0	
b1n35b	Russula sp3	FN669244 Russula sp.	587/598 (98%)				0	0	0	9	1	0	0	0	0	
g1n6l	Russula sp4	FJ210751 Uncultured Russula	614/618 (99%)				2	0	0	0	0	0	0	0	0	
b1n6a	Russula sp5	FN669244 Russula sp.	584/600 (97%)				0	0	0	2	0	0	0	0	0	
g1l4a	Russula sp6	UDB000894 Russula livescens	580/591 (98%)				0	0	1	0	0	0	0	0	0	
g1n4b	Russula sp7	AF418604 Russula chloroides	589/605 (97%)				2	0	3	0	0	0	0	0	0	
b1p30p	Russula sp8	FR852096 Uncultured Russula	600/604 (99%)				0	0	0	0	3	0	0	0	0	
b1l35b	Russula sp9	FJ803947 Uncultured Russula	604/627 (96%)						0	0	0	0	0	1	0	0
b1p4b	Russula sp10	DQ377404 Uncultured Russulaceae	415/433 (96%)		0	0			0	0	1	0	0	0	0	
b1n1b	Russula amoenolens	UDB000343 Russula amoenolens	599/601 (99%)		1	0			0	1	2	0	0	0	0	
g1p27d	Russula livescens	UDB000894 Russula livescens	602/602 (100%)		0	1			1	0	0	0	0	0	0	
t1p33a	Russula odorata	AY061698 Russula odorata	598/601 (99%)		8	4			2	2	4	0	5	7	10	
g1p9b	Russula quercilicis	JF908700 Russula quercilicis	624/625 (99%)		0	2			0	0	0	0	0	0	0	
g1p10b	Russula aff. Xerampelina	JF834361 Russula aff. xerampelina	388/395 (98%)		0	5			0	0	0	0	0	0	0	
t1n31w	Lactarius acerrimus	JF908318 Lactarius acerrimus	656/656 (100%)		3	0			0	0	0	0	0	4	0	
t1n7f	Lactarius azonites	EF560658 Lactarius azonites	611/611 (100%)		0	0			0	0	0	0	0	1	0	
g1n34r	Lactarius chrysorrheus	AM930241 Lactarius chrysorrheus	647/652 (99%)		7	0			2	2	0	0	1	0	1	
t1n38t	Lactarius ilicis	JF908317 Lactarius ilicis	650/654 (99%)		0	1			0	0	0	0	0	2	0	
g1l28d	Lactarius subumbonatus	DQ658878 Lactarius subumbonatus	420/421 (99%)		1	0			9	0	0	0	3	0	0	

Codice Herbarium	Genere	sequenza con maggiore similitudine tra quelle presenti in NCBI e UNITE	similarità	Classe	Ordine	Famiglia	GN	GP	GL	BN	BP	BL	TN	TP	TL		
s0a001	Zelleromyces sp1	JF960852 Uncultured Zelleromyces	638/645 (99%)		Boletales	Boletaceae	0	0	0	1	0	0	0	0	0		
g1n38e	Boletus aereus	UDB000940 Boletus aereus	184/186 (98%)				2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
b1n36c	Boletus radicans	UDB000761 Boletus radicans	635/637 (99%)				0	0	0	8	6	0	0	0	0	0	0
g1n40f	Leccinum sp1	HQ204690 Uncultured Leccinum	434/447 (97%)				1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
g1n3e	Leccinum sp2	morfo-anatomia					1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
b1n39r	Xerocomus cisalpinus	HM190085 Xerocomus cisalpinus	654/655 (99%)				0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
b1l37c	Xerocomus rubellus	EF644119 Xerocomus rubellus	707/707 (100%)				0	0	3	3	3	4	1	2	0	0	0
g1n2l	Xerocomus subtomentosus	DQ066372 Xerocomus subtomentosus	493/498 (99%)				1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
b1p27r	Xerocomus sp1	HE601897 Uncultured Xerocomus	634/658 (96%)				0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0
t1n6d	Scleroderma sp1	EU718117 Scleroderma laeve	647/658 (98%)				Sclerodermataceae		0	0	0	0	0	0	1	0	0
s0ell002	Astraeus sp1	AJ629408 Astraeus hygrometricus	662/678 (98%)		Diplocystidiaceae		2	0	0	0	0	0	0	0	0		
g1p36c	Hydnaceae sp1	UDB002253 Sistotrema alboluteum	307/329 (93%)		Cantharellales	Hydnaceae	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	
t1p31c	Ceratobasidiaceae sp1	GQ268595 Uncultured Ceratobasidiaceae	541/569 (95%)			0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
g1l26e	Ceratobasidium sp1	AF354089 Ceratobasidium sp.	731/747 (98%)			0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	
g1l27n	Ceratobasidium sp2	DQ028790 Vouc mycor (Ceratobasidium)	570/580 (98%)			0	0	3	0	0	0	0	0	1	0	0	
t1p32c	Ceratobasidium sp3	GQ223450 Uncultured Ceratobasidium	284/288 (99%)			0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
g1n33r	Ceratobasidium sp4	JF912487 Ceratobasidium sp.	294/294 (100%)			1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
g1l28c	Ceratobasidium sp5	AB290021 Ceratobasidium sp.	571/580 (98%)			0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	
g1n32d	Clavulinaceae sp1	UDB001121 Clavulina cristata	581/628 (92%)			Clavulinaceae		6	0	2	0	0	0	0	0	0	
g1n3b	Clavulinaceae sp2	EU862219 Clavulina cristata	573/629 (91%)			2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
b1p32t	Thelephoraceae sp1	GU220673 Uncultured Tomentella	513/545 (94%)	Thelephorales		Thelephoraceae	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	
t1n39b	Thelephoraceae sp2	EU668214 Uncultured Tomentella	554/586 (95%)		0		0	0	0	0	0	0	4	0	1		
t1n5a	Thelephoraceae sp3	HM044615 Uncultured Thelephoraceae	399/402 (99%)		0		0	0	0	0	0	0	1	0	0		
b1p34f	Thelephoraceae sp4	FJ897234 Unc myc Tomentella	546/579 (95%)		0		0	0	0	5	0	0	0	0	0		
t1n9c	Thelephora sp1	HQ204724 Uncultured Thelephora	586/588 (99%)		0		0	0	0	0	0	0	2	0	0		

Codice Herbarium	Genere	sequenza con maggiore similitudine tra quelle presenti in NCBI e UNITE	similarità	Classe	Ordine	Famiglia	GN	GP	GL	BN	BP	BL	TN	TP	TL
g1n38r	Thelephora sp2	HQ204725 Uncultured Thelephora	573/591 (97%)				2	0	0	0	0	0	0	0	0
g1l10a	Thelephora sp3	HQ204725 Uncultured Thelephora	571/590 (97%)				0	0	1	0	0	0	0	0	0
t1n7d	Tomentella sp1	DQ990852 Uncultured Tomentella	587/589 (99%)				0	0	3	0	0	0	1	0	0
b1n4c	Tomentella sp2	FR852173 Uncultured Tomentella	580/583 (99%)				0	0	0	1	1	1	0	0	0
g1n33t	Tomentella sp3	FJ897240 Uncultured Tomentella	502/508 (99%)				6	3	1	0	0	0	0	0	0
b1p31z	Tomentella sp4	HQ204730 Uncultured Tomentella	575/578 (99%)				0	0	0	0	3	0	0	0	0
t1n8c	Tomentella sp7	GQ240906 Uncultured Tomentella	265/271 (98%)				0	0	0	0	0	0	1	0	0
g1n10c	Tomentella sp8	EF644160 Uncultured Tomentella	575/580 (99%)				2	0	0	0	0	0	0	0	0
g1n5b	Tomentella sp9	FR852157 Uncultured Tomentella	567/582 (97%)				1	0	0	0	0	0	0	0	0
b1p28c	Tomentella sp10	GQ985418 Uncultured Tomentella	556/578 (96%)				0	1	0	0	4	0	0	0	0
b1p30d	Tomentella sp11	AJ581550 Uncultured Tomentella	578/594 (97%)				0	2	0	0	4	0	0	0	0
g1l27e	Tomentella sp14	FN565378 Uncultured Tomentella	497/511 (97%)				0	0	2	0	0	0	0	0	0
g1l27o	Tomentella sp15	FR852146 Uncultured Tomentella	466/482 (97%)				0	0	2	0	0	0	0	0	0
g1n32r	Tomentella sp17	EU668251 Uncultured Tomentella	576/584 (99%)				1	0	0	0	0	0	0	0	0
g1n37h	Tomentella sp18	HQ204743 Uncultured Tomentella	560/577 (97%)				3	0	0	0	0	0	0	0	0
g1n38c	Tomentella sp19	HM105528 Uncultured Tomentella	495/506 (98%)				2	0	0	0	0	0	0	0	0
g1n39d	Tomentella sp20	AY748877 Uncultured Tomentella	247/251 (98%)				1	0	0	0	0	0	0	0	0
g1n7e	Tomentella sp21	HM370461 Uncultured Tomentella	565/584 (97%)				2	0	0	0	0	0	0	0	0
t1l30e	Tomentella sp22	GU214811 Tomentella fuscocinerea	532/544 (98%)				0	0	0	0	0	0	0	0	4
t1l31c	Tomentella sp23	AJ879644 Uncultured Tomentella	555/580 (96%)				0	0	0	0	0	0	0	0	2
t1n34a	Tomentella sp24	FJ210772 Uncultured Tomentella	288/289 (99%)				0	0	0	0	0	0	7	0	0
g1p2c	Tomentella sp25	EF218826 Uncultured Tomentella	555/580 (96%)				0	1	0	0	0	2	5	0	0
t1n7b	Tomentella sp26	FJ897234 Uncultured Tomentella	567/574 (99%)				0	0	0	0	0	0	1	0	0
b1n38a	Tomentella sp27	HM370460 Uncultured Tomentella	576/580 (99%)				0	0	0	5	3	0	0	0	0
b1n38r	Tomentella sp28	EU625825 Uncultured Tomentella	565/578 (98%)				0	0	0	1	0	0	0	0	0

Codice Herbarium	Genere	sequenza con maggiore similitudine tra quelle presenti in NCBI e UNITE	similarità	Classe	Ordine	Famiglia	GN	GP	GL	BN	BP	BL	TN	TP	TL		
t1n5d	Tomentella sp30	HQ271387 Uncultured Tomentella	480/502 (96%)				0	0	0	0	0	0	2	0	0		
b1p2c	Tomentella sp35	HQ204739 Uncultured Tomentella	583/587 (99%)				0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
t1n10c	Tomentella sp51	FJ210775 Uncultured Tomentella	280/283 (99%)				0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
t1n3c	Tomentella sp52	HQ204743 Uncultured Tomentella	569/578 (98%)				2	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0
g1p7c	Tomentella sp61	EU625804 Uncultured Tomentella	563/580 (97%)				2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
d3a005	Tomentella sp75	GU256170 Uncultured Tomentella	576/576 (100%)				8	0	0	2	0	0	0	5	1	1	1
b1n39b	Tomentella sp81	AY010277 Tomentella stiposa	570/581 (98%)				0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0
g1p10c	Tomentella sp82	FJ897223 Unc mycor Tomentella	569/587 (97%)				0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
g1n8h	Tomentella sp90	FJ827245 Uncultured Tomentella	565/579 (98%)				1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
t1p32b	Tomentella sp91	EU625803 Uncultured Tomentella	559/580 (96%)				0	1	0	3	1	0	0	0	1	0	0
d3d001	Tomentella sp92	FJ210770 Uncultured Tomentella	570/586 (97%)				0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
d1d007	Tomentella sp93	AY874384 Unc ectomyc (Tomentella)	582/587 (99%)				0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
g1p40b	Tomentella sp94	FJ897238 Unc mycor Tomentella	564/579 (97%)				3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
g1i31e	Tomentella sp96	HQ204729 Uncultured Tomentella	570/585 (97%)				0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
b1p27q	Tomentella sp97	FJ897225 Unc mycor Tomentella	572/586 (98%)				0	2	0	0	0	2	0	0	0	0	0
b1p34h	Tomentella badia	UDB001656 Tomentella badia	580/582 (99%)				0	0	0	0	2	0	0	0	1	4	4
s0all008	Tomentella castanea	UDB000120 Tomentella castanea	576/578 (99%)				0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
t1n9d	Tomentella galzinii	UDB000264 Tomentella galzinii	403/407 (99%)				0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
g1n2g	Tomentella viridula	UDB000261 Tomentella viridula	541/542 (99%)				1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
b1p35f	Sebacinales sp1	AM181396 Uncultured Sebacinales	538/543 (99%)				Sebacinales		Sebacinaceae	0	1	0	0	1	0	0	0
g1n3c	Sebacina sp1	AF440641 Sebacina endomycorrhiza	539/530 (100%)	1	0	0				0	0	0	0	0	0	0	
t1n31a	Sebacina sp2	AF440645 Sebacina endomycorrhiza	528/529 (99%)	1	0	0				0	0	0	1	0	0	0	
t1i33b	Sebacina sp3	GU189737 Uncultured Sebacina	543/547 (99%)	0	0	0				0	0	0	0	0	0	4	
d1d002	Sebacina sp4	AF440646 Sebacina	526/531 (99%)	1	0	0				0	0	0	0	0	0	0	

Codice Herbarium	Codice morfotipo	Metodo di identificazione o caratterizzazione		GN	GP	GL	BN	BP	BL	TN	TP	TL
g1p10d	MECM1	morfo - anatomia		0	5	0	0	0	0	0	0	0
g1n7d	MECM2	morfo - anatomia		1	1	0	0	0	0	0	0	0
g1l10b	MECM4	morfo - anatomia		0	0	1	0	0	0	0	0	0
g1l28b	MECM5	morfo - anatomia		0	3	9	0	0	0	0	0	0
b1n9c	MECM15	morfo - anatomia		0	0	0	1	0	0	0	0	0
b1p31x	MECM16	morfo - anatomia		0	0	0	0	1	0	0	0	0
t1p4d	MECM17	morfo - anatomia		0	0	0	0	0	0	0	1	0
b1n4b	MECM18	morfo - anatomia		0	0	0	2	0	0	0	0	0
g1p27l	MECM19	morfo - anatomia		1	0	1	0	0	0	0	0	0
b1p31a	MECM20	morfo - anatomia		0	0	0	1	1	2	0	0	0
b1l34a	MECM26	morfo - anatomia		0	0	0	1	0	2	1	0	0
g1n9n	MECM28	morfo - anatomia		1	0	0	0	0	0	0	0	0
t1p4f	MECM29	morfo - anatomia		0	0	0	0	0	0	0	1	0
b1p30i	MECM30	morfo - anatomia		0	0	0	0	1	0	0	0	0
b1p28m	MECM33	morfo - anatomia		0	0	0	0	1	0	0	0	0
b1p33d	MECM34	morfo - anatomia		0	1	0	1	8	0	0	0	0
g1l27d	MECM36	morfo - anatomia		0	0	6	0	0	0	0	0	0
g1l33d	MECM38	morfo - anatomia		0	0	7	0	0	0	0	0	0
g1l33g	MECM39	morfo - anatomia		0	0	3	0	0	0	0	0	0
t1l31f	MECM41	morfo - anatomia		0	0	0	0	0	0	1	0	2
b1n2a	MECM46	morfo - anatomia		0	0	0	4	0	0	0	0	0
g1p6b	MECM49	morfo - anatomia		0	1	0	0	0	0	0	0	0
g1p8c	MECM51	morfo - anatomia		0	3	0	0	0	0	0	0	0
t1p4e	MECM54	morfo - anatomia		0	0	0	0	0	0	0	2	0
b1n2d	MECM55	morfo - anatomia		0	0	0	1	0	0	0	0	0

Codice Herbarium	Codice morfotipo	Metodo di identificazione o caratterizzazione		GN	GP	GL	BN	BP	BL	TN	TP	TL	
g1p36b	MECM56	morfo - anatomia		0	1	0	0	0	0	0	0	0	
g1n31d	MECM58	morfo - anatomia		2	0	0	0	0	0	0	0	0	
b1n34r	MECM59	morfo - anatomia		0	0	0	1	0	0	0	0	0	
b1p35n	MECM62	morfo - anatomia		0	0	0	0	1	0	0	0	0	
g1n31c	MECM63	morfo - anatomia		1	0	1	0	0	0	0	0	0	
t1l29a	MECM71	morfo - anatomia		0	0	0	0	0	0	0	0	1	
t1l2e	MECM72	morfo - anatomia		0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
t1l3a	MECM73	morfo - anatomia		0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
t1n31v	MECM77	morfo - anatomia		0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
t1n40r	MECM80	morfo - anatomia		0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
b1p33c	MECM90	morfo - anatomia		0	2	0	0	3	0	0	0	0	0

Incertae sedis	Russulales		Pezizaceae	Inocybaceae		Hygrophoraceae		Ceratobasidiaceae
Pezizomycotina	Boletales		Tuberaceae	Entolomataceae		Russulaceae		Clavulinaceae
Pezizales	Cantharellales		Pyronemataceae	Strophariaceae		Boletaceae		Thelephoraceae
Sordariales	Thelephorales		Amanitaceae	Hydnandaceae		Sclerodermataceae		Sebacinaceae
Agaricomycotina	Sebacinales		Cortinariaceae	Tricholomataceae		Diplocystidiaceae		Zygomycota
Agaricales				Atheliaceae		Hydnaceae		

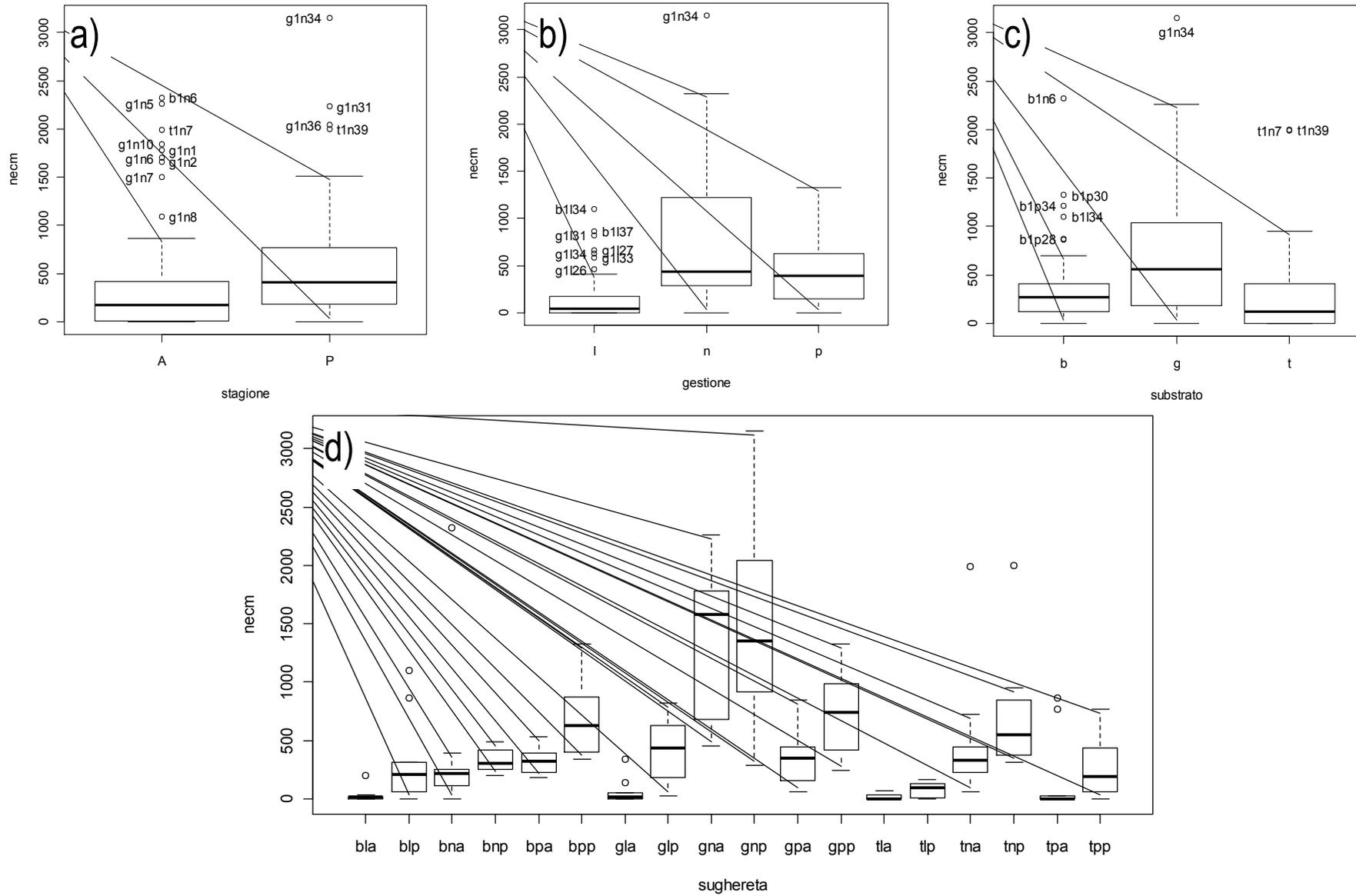


Figura 1. Boxplot del numero di ectomicorrize condizionati rispetto a: a) stagione; b) gestione; c) substrato; d) sughereta.

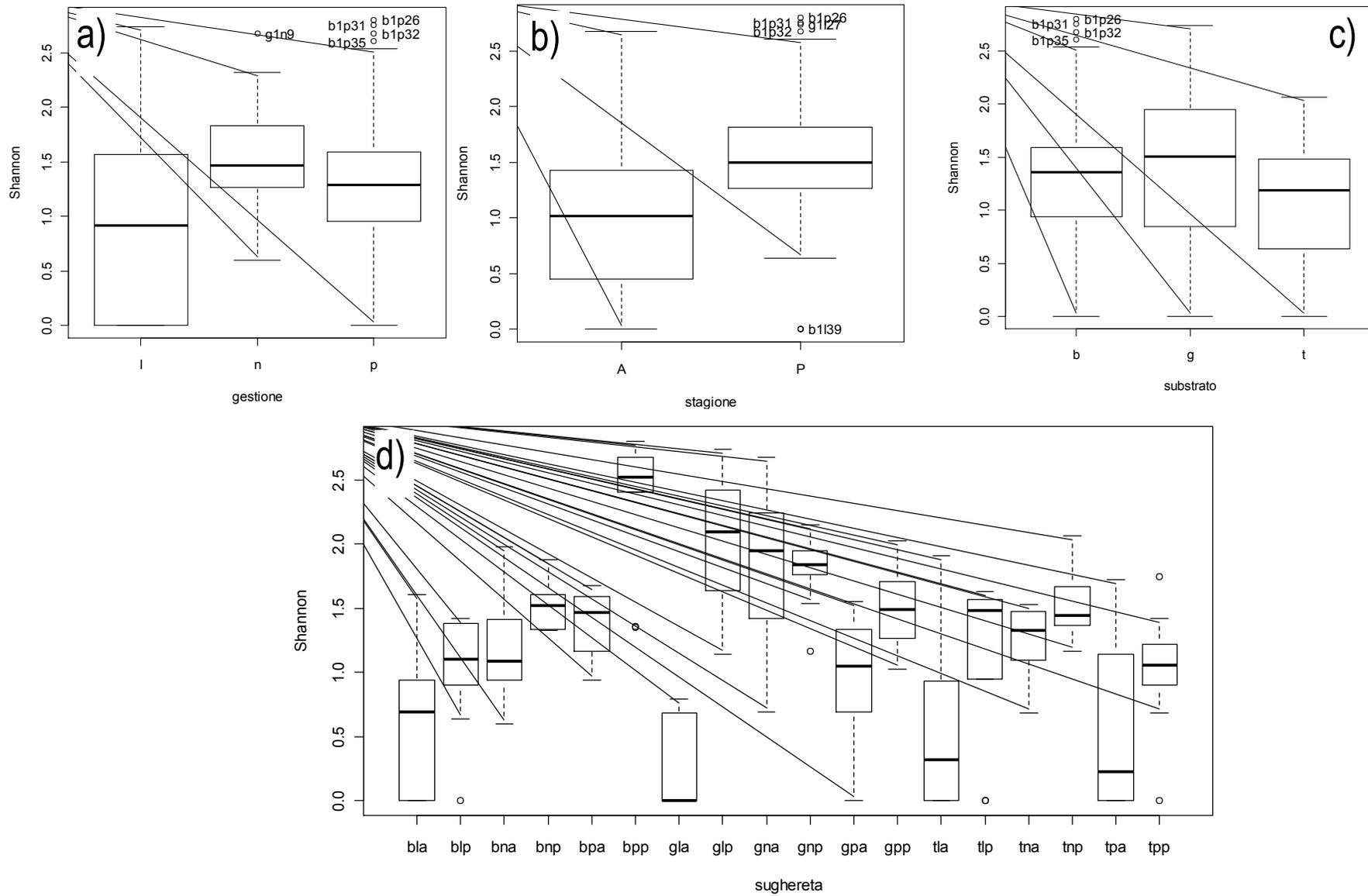


Figura 2. Boxplot dei valori assunti dall'indice di Shannon condizionati rispetto a: a) stagione; b) gestione; c) substrato; d) sughereta.

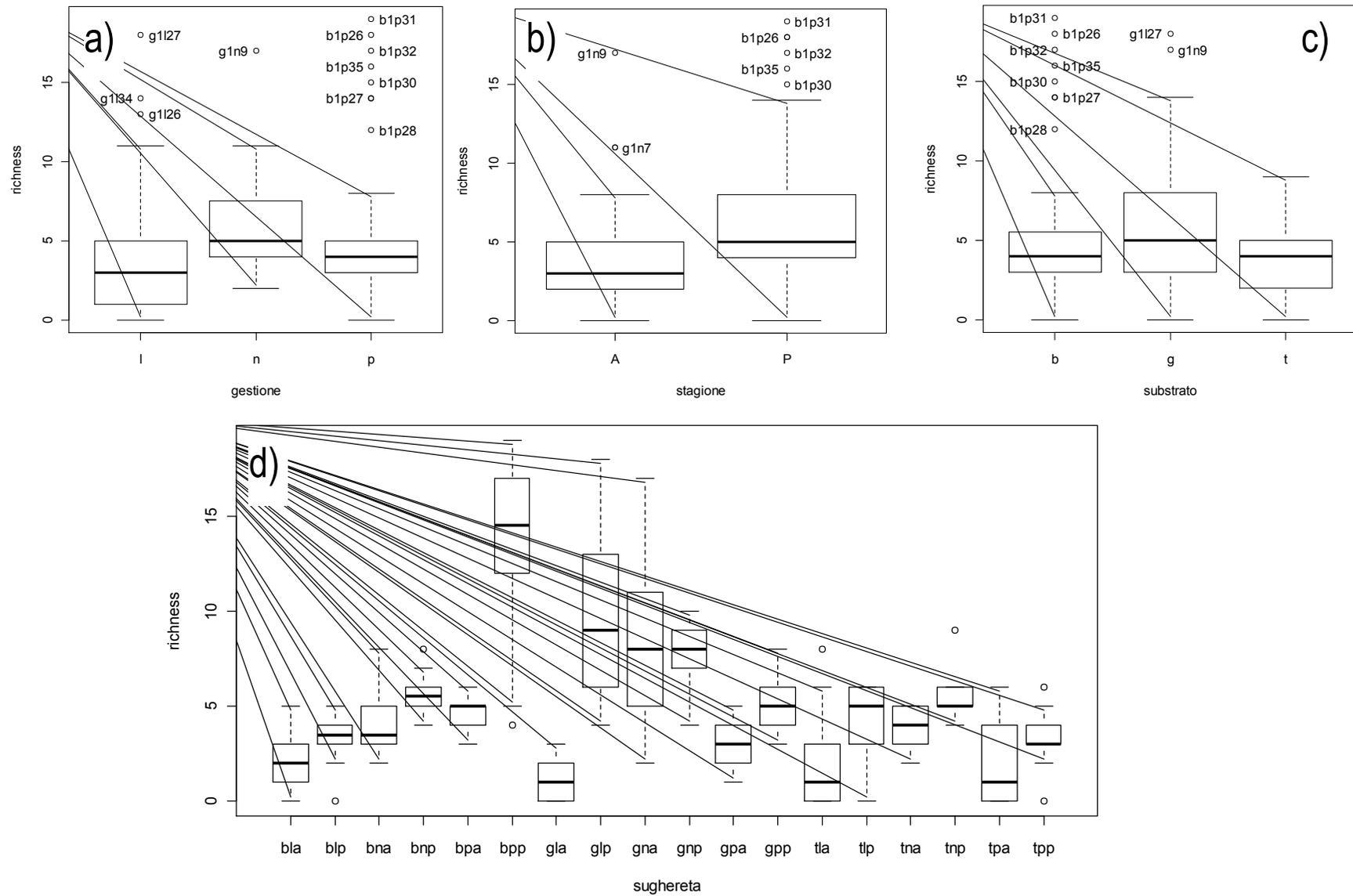


Figura 3. Boxplot dei valori di ricchezza in OTU condizionati rispetto a: a) stagione; b) gestione; c) substrato; d) sughereta.