



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



SCD UHP NANCY 1  
Bibliothèque des Sciences  
Rue du Jardin Botanique - CS 20140  
54601 VILLERS LES NANCY CEDEX

**UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1**  
UMR Interactions Arbres/Microorganismes, INRA



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA**  
Dipartimento di Agronomia Ambientale e Produzioni Vegetali



Thèse présentée pour l'obtention du titre de  
**Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy-I**  
en Biologie Forestière  
en co-tutelle avec l'Université du Padova,  
par **Elena MOSCA**

**DEPERISSEMENT DU CHÊNE ET STATUT ECTOMYCORHIZIEN:  
EFFET DU TRAITEMENT SYLVICOLE**

**RAPPORTO TRA DEPERIMENTO DELLA FARNIA E STATO  
ECTOMICORRIZICO: EFFETTO DI UN TRATTAMENTO  
SELVICOLTURALE**

Membres du jury:

Rapporteurs:	Claude Plassard Nicolotti Giovanni	Chargée de Recherche INRA, Montpellier Professeur, Università di Torino, Italia
Examineurs:	Lucio Montecchio Jean Garbaye Marc-André Selosse Paolo Gonthier	Professeur, Università di Padova, Italia Directeur de Recherche INRA, Nancy Professeur, Université Montpellier II Professeur, Università di Torino, Italia

Soutenance publique prévue pour le 26 Mars 2007



# RAPPORTO TRA DEPERIMENTO DELLA FARNIA E STATO ECTOMICORRIZICO: EFFETTO DI UN TRATTAMENTO SELVICOLTURALE

## Riassunto

Negli ultimi anni i popolamenti di querce sono stati colpiti da una grave sindrome, nota come "deperimento delle querce", diffusa in Italia ed in numerosi Paesi europei ed extraeuropei. L'eziologia della malattia è complessa, e il quadro sintomatologico variabile. A livello radicale, il deperimento determina una riduzione della biomassa ed una variazione dello stato ectomicorrizico.

Nel corso del presente studio, è stato verificato l'effetto di un taglio di diradamento sullo stato micorrizico di farnie deperenti.

In un querceto planiziale deperente, 16 farnie sono state suddivise in due classi di deperimento (moderatamente e severamente deperenti) e le loro limitrofe sono state abbattute.

L'effetto del trattamento è stato valutato con cadenza trimestrale quantificando i seguenti parametri: 1) vitalità e micorrizzazione degli apici radicali, 2) struttura e funzionalità della comunità ectomicorrizica, 3) attività enzimatica potenziale di tre anatomotipi dominanti e 4) dinamica dei parametri radicali.

Le piante appartenenti alla classe severamente deperente hanno presentato una vitalità e micorrizzazione minore di quelle di classe moderatamente deperente, prima e dopo aver realizzato il diradamento. Si è inoltre assistito ad una riduzione di tali parametri nelle piante trattate.

Nel corso delle due annate di studio sono stati individuati 64 anatomotipi ectomicorrizici, la cui abbondanza relativa si è dimostrata essere dipendente sia dello stato di salute della pianta sia dal trattamento selvicolturale. In particolare, è stata evidenziata la permanenza di alcune specie dominanti nell'intera comunità ectomicorrizica nei due anni di studio e la parziale sostituzione di altre specie.

La comunità ectomicorrizica è stata inoltre classificata secondo la capacità esplorativa dei singoli anatomotipi, stabilita in base alla loro morfologia. Dal punto di vista della funzionalità si è assistito ad un progressivo aumento nella presenza di anatomotipi appartenenti al "gruppo esplorativo" (*sensu* Agerer, 2001) di lunga distanza, a partire dalle piante severamente deperenti e trattate.

Durante il periodo di studio sono stati individuati tre anatomotipi dominanti in tutti i trattamenti: *Clavulina cinerea*, *Tomentella sublilacina*, *Russula* sp. L'attività enzimatica potenziale dei tre anatomotipi dominanti è stata misurata nell'inverno e nella primavera del 2006. I valori d'attività ottenuti nell'inverno sono stati, in genere, più elevati di quelli primaverili. In primavera si sono riscontrati dei profili d'attività diversi tra gli anatomotipi e tra i trattamenti.

Lo studio sulla dinamica di: a) densità di lunghezza radicale, b) numero di apici su volume di suolo, c) diametro medio del campione e d) indice di ramificazione, ha evidenziato che la data di prelievo influenza tutti tali parametri, i quali variano anche con la classe di deperimento e il trattamento. In particolare, la densità di lunghezza radicale e l'indice di ramificazione sono influenzati sia dalla classe di deperimento sia dal trattamento selvicolturale, mentre il numero d'apici su volume ed il diametro medio sono influenzati dal trattamento.

Complessivamente, la ricerca ha confermato come lo stato di salute delle radici, in termini di vitalità e micorrizzazione, fornisca indicazioni valide per l'intera pianta. Per quanto riguarda l'effetto del trattamento selvicolturale, è importante sottolineare la resilienza della comunità ectomicorrizica e la plasticità manifestata nell'adattarsi alle mutate condizioni ambientali.

Il presente studio è un piccolo tassello nella ricerca delle dinamiche degli ecosistemi forestali e delle comunità ectomicorriziche, in relazione agli interventi antropici.



# OAK DECLINE AND ECTOMYCORRHIZAL STATUS: EFFECT OF A SYLVICULTURAL TREATMENT

## Abstract

Recently, a serious phenomenon called "oak decline" has stricken the oak stands and has become a worldwide problem, spreading through Europe, Asia, North and South America. Decline has a complex aetiology and it displays different symptoms, depending on tree susceptibility. At root level, decline is often associated with a reduced biomass of fine roots, and a significant change in the ectomycorrhizal community composition.

The present study addressed the effect of a thinning treatment on the ectomycorrhizal status of declining oak trees. Sixteen dominant oak trees of similar dimensions were chosen to represent two contrasting decline classes (moderate and severe decline).

The thinning effect was seasonally evaluated on the following characters: 1) root tip vitality and mycorrhization, 2) ectomycorrhizal community structure and functionality, 3) potential enzymatic activity of three dominant anatomotypes, 4) dynamics of root descriptors.

Both before and after thinning, trees belonging to the severely declining class showed lower vitality and mycorrhization than the other class. These variables decreased along time in the thinned trees. During the all studied period, 64 ectomycorrhizal anatomotypes were found, with relative abundances depending on tree decline status and silvicultural treatment. In particular, some fungal species were always dominant, while a partial substitution occurred.

The community structure was also evaluated in terms of ability of the ectomycorrhizae to explore the soil. The anatomotypes belonging to the "long-distance" exploration type were recorded firstly in the severely declining thinned trees.

Over the study period, three anatomotypes were dominant in all treatments: *Clavulina cinerea*, *Tomentella subilacina* and *Russula sp.* The potential secreted enzymatic activities of the dominant anatomotypes were measured in winter and

spring 2006. In general, the values measured in winter were higher than in spring. In spring, the enzymatic profile was different for each anatomotype.

The dynamics of four fine root descriptors: a) root length density; b) root tip density; c) average diameter and d) branching index, changed according to sampling date. The root length density and the branching index were influenced by both decline class and thinning, whereas the tip number per soil volume and the average diameter changed depending on thinning.

This research confirms that root vitality and mycorrhization provides several indications able to evaluate the tree health status. Following a silvicultural treatment, the ectomycorrhizal community displayed great resilience and was able to adapt to the changed environmental conditions.

This study is a small fragment of the research on the dynamics of forest ecosystems and ectomycorrhizal communities, in relation to the anthropic impacts.

# DEPERISSEMENT DU CHÊNE ET STATUT ECTOMYCORHIZIEN: EFFET DU TRAITEMENT SYLVICOLE

## Résumé

Ces dernières années, un grave phénomène appelé "dépérissement des chênes" a frappé les peuplements de chênes et est devenu un problème mondial s'étendant à travers l'Europe, l'Asie et l'Amérique du Nord et du Sud. Ce dépérissement présente une étiologie complexe et est caractérisé par différents symptômes selon la sensibilité des arbres. Au niveau des racines, le dépérissement est souvent associé à la réduction de la biomasse des racines fines et à une modification significative de la structure de la communauté des ectomycorhizes.

Le présent travail a concerné l'effet d'un traitement d'éclaircie sur le statut ectomycorhizien de chênes dépérissants. Seize arbres dominants de mêmes dimensions ont été choisis comme représentatifs de deux classes de dépérissement : modéré et sévère.

L'effet de l'éclaircie a été évalué saisonnièrement grâce aux caractères suivants : 1) vitalité et mycorhization des apex racinaires, 2) structure spécifique et fonctionnelle de la communauté ectomycorhizienne, 3) activités enzymatiques potentielles de trois anatomotypes dominants et 4) dynamique de descripteurs de la morphologie racinaire.

Que ce soit avant ou après l'éclaircie, les arbres appartenant à la classe de dépérissement sévère ont présenté la plus faible vitalité des racines fines et la plus faible colonisation ectomycorhizienne. Chez les arbres éclaircis, ces variables ont diminué avec le temps. Tout au long de la période d'étude, 64 anatomotypes d'ectomycorhize ont été répertoriés, avec des abondances relatives dépendant de la classe de dépérissement et du traitement sylvicole. En particulier, certaines espèces fongiques étaient toujours dominantes, alors que d'autres faisaient l'objet de substitutions.

La structure de la communauté a également été analysée en termes de capacité des ectomycorhizes à explorer le sol. Les anatomotypes appartenant au type d'exploration à grande distance ont surtout été trouvés sur les racines des arbres les plus dépérissants et éclaircis.



Trois anatomotypes étaient dominants dans tous les traitements pendant toute la durée de l'étude : *Clavulina cinerea*, *Tomentella sublilacina* et *Russula* sp. Les activités enzymatiques secrétées potentielles de ces anatomotypes dominants ont été mesurées au cours de l'hiver et du printemps 2006. Les valeurs mesurées en hiver étaient en général plus élevées que celles mesurées au printemps. Au printemps, le profil enzymatique était différent pour chaque anatomotype.

La dynamique de quatre descripteurs de l'architecture des racines fines (densité de longueur, densité d'apex, diamètre moyen et indice de ramification) variait en fonction de la date de prélèvement. La densité de longueur et l'indice de ramification dépendaient à la fois de la classe de dépérissement et de l'éclaircie, alors que la densité d'apex et le diamètre moyen n'étaient influencés que par l'éclaircie.

Ce travail confirme que la vitalité des racines et leur statut ectomycorhizien fournissent de précieuses indications permettant de préciser l'état de santé des arbres. A la suite d'un traitement d'éclaircie, la communauté des ectomycorhizes fait preuve d'une grande résilience et est capable de s'adapter aux nouvelles conditions environnementales.

Cette étude n'est qu'une petite partie d'un programme de recherche sur la dynamique des écosystèmes forestiers et des communautés d'ectomycorhizes en relation avec les activités humaines.

# INDICE

	Pag.
<b>Indice</b>	<b>1</b>
<b>1. Introduzione</b>	<b>3</b>
<b>1.1. Il deperimento della quercia</b>	<b>3</b>
<b>1.2. Il deperimento in Italia</b>	<b>5</b>
<b>1.3. La sintomatologia</b>	<b>6</b>
<b>1.4. Le cause del deperimento</b>	<b>8</b>
1.4.1 <i>Ruolo dei fattori abiotici</i>	10
1.4.2 <i>Ruolo dei fattori biotici</i>	13
<b>1.5. Misure di controllo</b>	<b>20</b>
<b>1.6. Le simbiosi micorriziche</b>	<b>21</b>
1.6.1 <i>Le ectomicorrize</i>	24
1.6.2 <i>L'instaurarsi della simbiosi</i>	26
1.6.3 <i>Interazioni con le piante simbionti</i>	27
1.6.4 <i>Il ruolo dell'ectomicorrizzazione</i>	28
1.6.5 <i>La biodiversità ectomicorrizica</i>	30
1.6.6 <i>Ecologiai delle comunità ectomicorriziche</i>	31
1.6.7 <i>Fattori di disturbo della micorrizzazione</i>	33
<b>1.7 I boschi planiziali</b>	<b>34</b>

	<b>Pag.</b>
<b>1.8 Il Bosco di Basalghelle</b>	<b>36</b>
1.8.1 <i>Inquadramento geografico</i>	36
1.8.2 <i>Parametri stazionali</i>	36
1.8.3 <i>Parametri vegetazionali</i>	39
<b>2. Bibliografia</b>	<b>41</b>
<b>3. Obiettivi del lavoro</b>	<b>57</b>
<b>4. Materiali e metodi, Risultati e Discussioni</b>	<b>58</b>
4.1 <i>Vitalità e micorrizzazione degli apici radicali</i>	59
4.2 <i>Struttura e funzionalità della comunità ectomicorrizica</i>	93
4.3 <i>Attività enzimatica potenziale di tre anatomotipi dominanti</i>	119
4.4 <i>Dinamica dei parametri radicali</i>	143
<b>5. Conclusioni</b>	<b>169</b>
<b>6. Bibliografia</b>	<b>173</b>
<b>7. Allegati</b>	
ALLEGATO 1: <i>Cartografia</i>	175
ALLEGATO 2: <i>Immagini degli anatomotipi</i>	177

## **1. Introduzione**

Il “deperimento delle piante forestali” è un fenomeno assai complesso, la cui rapida ed estesa diffusione lo porta ad essere uno dei principali problemi fitopatologici che dovrà essere affrontato nel prossimo futuro (AA. VV., 2006). Esso si manifesta con sintomi generalizzati, non ascrivibili a nessun parassita in particolare, quali disseccamenti e clorosi della chioma, rallentamento del ritmo di crescita, frequente emissione di rami epicormici.

Tra i tentativi di definire questo fenomeno, Manion (1981) lo interpreta come “una categoria patologica a sé stante, in quanto causata non da un solo fattore, ma da una complessa e mutabile interazione di fattori biotici ed abiotici fra loro intercambiabili che possono provocare gradualmente e generalizzati deterioramenti nella pianta e che spesso hanno fine solamente con la morte del vegetale”, mentre Shütt (1993), più sinteticamente, lo definisce come un “complesso di malattie complesse”.

Le prime segnalazioni di deperimento risalgono ai primi anni settanta del secolo scorso, quando in Germania si è riscontrato uno stato di malessere dell'abete bianco. Circa dieci anni dopo, anche sull'abete rosso vennero segnalati danni inspiegabili; si susseguirono allarmi per le condizioni del pino silvestre, del larice, della douglasia, del faggio e di alcune latifoglie, quali le querce, gli aceri e i sorbi. Aspetto insolito del fenomeno è legato alla possibilità di presentare sintomi analoghi su varie specie forestali e di non avere una relazione specifica tra l'entità del danno ed i fattori stagionali (Colpi, 1986). In Italia ed in Europa le piante del genere *Quercus* sono tra le più colpite dal deperimento e le più studiate.

### **1.1. Il deperimento della quercia**

E' stato dimostrato come il deperimento della quercia sia un fenomeno complesso in cui intervengono fattori biotici e abiotici, la cui azione può avvenire in serie o simultaneamente (Ragazzi et al., 2000). Discusso è l'impatto del deperimento sugli ecosistemi, infatti da alcuni ricercatori è considerato come un nuovo evento pericoloso che potrebbe determinare la scomparsa delle foreste di quercia, altri lo



ritengono un evento cronico comune a tutte le piante e a tutti gli ecosistemi forestali (Babos, 1989).

A livello europeo il genere *Quercus* è uno dei più importanti sia per il suo valore economico sia per la notevole valenza ecologica. Nel centro Europa sono naturalmente diffuse e più rappresentate le specie *Q. petraea* (Matt.) Liebl. E *Q. robur* L., che si estende anche verso est, mentre in misura minore si trovano anche *Q. pubescens* Willd. E *Q. cerris* L.

Nell'area mediterranea sono presenti oltre a *Q. pubescens* e *Q. cerris*, anche altre specie, quali *Q. frainetto* Ten., *Q. ilex* L., *Q. suber* L. (Meusel et al., 1965).

Negli ultimi trent'anni, le segnalazioni del deperimento della quercia si sono susseguite in molti Paesi europei, interessando tutta l'area compresa tra la Russia ed il Portogallo e tra il sud della Svezia e l'Italia (Thomas et al., 2002). Nelle regione mediterranea il leccio è stato tra le specie più colpite dal deperimento (Müller-Edzards et al., 1997), tuttavia anche specie a foglia caduca o semipersistente ne sono state interessate; in particolare, in Italia *Q. cerris*, *Q. frainetto*, *Q. pubescens* e *Q. robur* (Ragazzi et al., 1998) e nella penisola iberica *Q. suber* (Sousa Santos e Moura Martins, 1993).

La diffusione di tale fenomeno in aree molto diverse, fa pensare che i sintomi e le cause varino da una regione all'altra (Thomas et al., 2002). Nel nord ovest della Germania il deperimento è caratterizzato da ciclici episodi di rapida mortalità in centri sparsi e molto estesi. Essi potrebbero essere preceduti da una fase di predisposizione al deperimento, in cui la crescita è ridotta, e poi persistere per più di 10 anni. In Germania questi episodi sono stati evidenziati negli anni 1910 e 1940, successivamente tra il 1987 e il 1997 (Hartmann et al., 1989; Hartmann e Blank, 1998; Wachter, 1999; 2001).

A partire dal 1987 è iniziato un programma pan europeo di monitoraggio delle foreste europee (Council Regulation 3528/86). La scala di indagine di questo progetto erano le grandi aree forestali, in cui è stata identificata l'esistenza di una correlazione tra la rarefazione delle chiome e lo stress idrico (Klap et al., 2000).

Secondo tale metodo, la maggior parte delle querce mostrava minore o media trasparenza della chioma ed una bassa mortalità (Eichhorn e Paar, 2000). Tuttavia, eventi di mortalità localizzata come quelli rilevati in Germania non venivano presi in considerazione.



## 1.2. Il deperimento della quercia in Italia

Il boschi a prevalenza di querce caducifoglie rappresentano il 27% della superficie forestale italiana, coprendo una superficie pari a 2134.733 ha (Bologna et al., 2004). Secondi al genere *Quercus* sono i boschi caratterizzati dalla presenza di *Fagus sylvatica* L. (12%) e quelli di altre latifoglie mesofite e mesotermofite (12%), quali il genere *Acer*, *Carpinus*, *Ostrya* e *Fraxinus*. Seguono i boschi di abete bianco e rosso (9%), quelli a leccio e sughera (9%) e quelli a prevalenza di pini montani e oromediterranei (5%).

Al genere *Quercus* appartengono più di 300 specie di piante legnose, arboree o arbustive. *Quercus robur* è diffusa nel sud est Europa come componente delle foreste miste di pianura (Anic et al., 1999; Godreau et al., 1999). Predilige infatti terreni profondi di origine alluvionale (Gellini e Grossoni, 1997) ed ambienti umidi, in cui la falda freatica è superficiale e continua per tutto l'anno. Anche per questa sua attitudine, in Italia è stata utilizzata nelle riforestazioni di aree agricole nelle zone di pianura (Ponti e Baratozzi, 1999).

La farnia ha un fusto molto ramificato e foglie a margine lobato, munite di un picciolo breve o assente e di stipole alla base; è una specie molto esigente in luce e calore estivo. La crescita della farnia è favorita su terreni freschi, ricchi in elementi minerali, fertili e profondi, non troppo compatti; in queste condizioni non viene limitata dal tipo di substrato, riesce a vivere sia su suoli acidi che alcalini, perché non eccessivamente calcarei, e tollera terreni argillosi se costantemente riforniti d'acqua. L'apparato radicale è di tipo fittonante nelle plantule, forma poi rapidamente radici laterali che col tempo diventano predominanti e costituiscono nell'insieme un apparato abbastanza superficiale ma robusto ed espanso (Gellini e Grossoni, 1998).

La prima segnalazione di deperimento della quercia risale agli anni 1911-1914, quando piante di 50-60 anni cominciarono a deperire nella pianura veneta e negli Appennini, dove i fenomeni furono meno intensi e accompagnati da attacchi di *Tortrix viridana* (Cecconi, 1912; 1914). In seguito ci fu una moria di querce nella regione del Chianti in Toscana. A partire dal 1980 venne segnalata la presenza di querce deperenti nel Parco del Circeo e di seguito il fenomeno di diffuse all'intera penisola italiana (Ragazzi et al., 2000).

Nel 1988 il deperimento fu segnalato su singoli alberi e interi boschi del Lazio, Molise, Basilicata e Campania (Luisi et al., 1988). Le specie colpite furono *Quercus robur*, *Q. cerris*, *Q. pubescens* e *Q. frainetto*.

Negli anni novanta segni di sofferenza generalizzata si manifestarono in sempre più regioni, quali il Veneto, il Friuli Venezia Giulia, la Toscana, il Lazio, le Marche, la Puglia, la Basilicata, la Calabria, la Sicilia e la Sardegna. Ed ulteriori specie ne furono interessate, come *Q. ilex* e *Q. suber*. In generale le specie più suscettibili si sono dimostrate: *Quercus robur*, *Q. cerris*, *Q. suber*, *Q. pubescens* e *Q. frainetto*, mentre le più resistenti *Q. ilex*, *Q. trojana* e *Q. macrolepis*.

### 1.3. La sintomatologia

Il quadro sintomatologico è complesso, in cui l'intensità della malattia varia con la specie e l'età della pianta. La suscettibilità al deperimento varia con la specie, in particolare le specie italiane più colpite sono la *Q. cerris*, *Q. frainetto*, *Q. pubescens* e *Q. robur*. La lista dei sintomi riportata in letteratura è assai complessa, tra i più comuni ci sono quelli riportati in tabella 1.

	<i>Q. cerris</i>	<i>Q. frainetto</i>	<i>Q. petraea</i>	<i>Q. pubescens</i>	<i>Q. robur</i>	<i>Q. suber</i>	<i>Q. ilex</i>
CHIOMA	- rarefazione	+	+	+	+	+	+
	- avvizzimento	+	+	+	+	+	+
	- ritardata emissione fogliare	+	+	+	+	+	
	- clorosi	+		+			+
	- disseccamento rami	+	+	+	+	+	+
	- microfillia			+			
	- abscissione gemme				+		
	- rametti epicormici	+	+	+	+	+	+
	- fessurazione longitudinale	+	+	+	+	+	+
FUSTO	- colatura mucillaginosa	+	+	+	+	+	
	- riduzione biomassa					+	
	- lesioni necrotiche					+	+
	- diminuzione micorrize vitali	+	+	+	+	+	+
RADICI	- necrosi radici assorbenti				+	+	+

**Tabella 1:** Quadro sintomatologico distinto in base all'area colpita (Ragazzi et al, 1995; Mosca, 2003).



Si possono distinguere i sintomi vistosi, definiti macrosintomi da Saracchi (AA. VV, 2006), come quelli che colpiscono la chioma determinandone prima la trasparenza e l'ingiallimento fogliare, in seguito la morte delle estremità delle branche e dell'intera chioma. Un ulteriore sintomo evidente è l'emissione di abbondanti rami epicormici lungo il fusto (Fig. 1). Vi sono inoltre sintomi meno vistosi, che coinvolgono sia la chioma, con la microfillia, necrosi e avvizzimento fogliare, morte dei germogli, ramificazioni anomale, che il tronco, con la presenza di fessurazioni, necrosi ed emissione di essudati, e le radici, con necrosi ed infezioni di funghi.

La chioma delle piante deperenti si presenta alterata rispetto alla situazione normale. L'allungamento anormale dei rami, l'abscissione dei giovani rametti (cladoptosi) determina una vegetazione spoglia, in cui i rametti sono concentrati nell'area apicale e si presentano con foglie più piccole rispetto alle normali dimensioni (Bussotti e Bruschi, 2000).

Altro sintomo occasionale di declino è l'arricciamento delle foglie e la torsione del picciolo. Gli individui più colpiti presentano ingiallimenti e arrossamento della parte distale della chioma (Bussotti e Bruschi 2000).



**Fig. 1:** Sintomi del deperimento a livello di chioma, rarefazione della chioma e morte di branche, e di fusto, emissione di rametti epicormici nel Bosco di Basalghelle.

I primi studi condotti nel Parco Nazionale del Circeo avevano indicato come l'evoluzione del deperimento sia rapida nei soggetti con meno di venticinque anni d'età, portandoli alla morte nel corso di una stagione vegetativa, e come ciò non accada negli individui adulti, in cui il deperimento – anche in condizioni di stress –

evolve lentamente, facendo morire la pianta in due o tre stagioni vegetative (Ragazzi et al., 2000).

Per quanto riguarda il quadro sintomatologico di queste due forme di deperimento, si fa riferimento alla segnalazione di Ragazzi et al. (1986).

Nei giovani individui il sintomo più comune era la massiccia produzione di rami epicormici lungo il fusto, con foglie più piccole e di color verde tenue. Erano presenti fessurazioni longitudinali sulla corteccia, colature e aree necrotiche. Il deperimento iniziava dall'apice della pianta e si diffondeva rapidamente verso il basso. L'apparato radicale secondario presentava lesioni superficiali e localizzate.

Nelle piante adulte e stressate il primo sintomo era l'apparizione di numerosi rami epicormici lungo il tronco. La colatura mucillagginosa era molto abbondante e precedeva la morte delle piante che avveniva nel corso di 2 o 3 stagioni vegetative. In corrispondenza delle fessurazioni erano presenti necrosi cambiali, evidenziate dall'esame delle sezioni trasversali e longitudinali del tronco. Tali necrosi erano talvolta profonde ed interessavano lo xilema, mentre imbrunimenti a macchia erano concentrati nelle cerchie legnose più esterne.

Nei querceti deperenti del nord Italia, a Mezzana del Turgnano (Udine) e Cornuda (Treviso), è stata descritta una forma di deperimento particolare (Ragazzi et al., 1993). Gli individui di farnia che avevano un'età compresa tra i 40-50 anni, presentavano un unico sintomo evidente di deperimento: chiome sottili e trasparenti. Tuttavia morivano nel corso di due stagioni vegetative. Dall'analisi delle sezioni del tronco, è stata evidenziata la presenza di aree scure negli anelli legnosi esterni, a partire dal colletto fino a un'altezza di 25 m. Inoltre, anche nelle sezioni delle radici si potevano vedere queste aree scure.

#### **1.4. Cause del deperimento**

Il deperimento della quercia si può definire una sindrome, in quanto risultato di molte azioni sinergiche che possono agire in successione o in contemporanea sullo stato di salute della pianta. Vari sono stati i tentativi di spiegazione di questo fenomeno complesso. Manion (1991) ha proposto un modello in cui l'azione dei vari agenti di danno è divisa in base alla loro temporalità ed alla loro azione. Si distinguono quindi tre categorie di fattori:



- 1) fattori predisponenti (predisposing factors): fattori climatici, umidità del suolo, caratteristiche genetiche, inquinamento, disponibilità di nutrienti;
- 2) fattori scatenanti (inciting factors): insetti defogliatori, periodi siccitosi, salinità della falda, gelo, alte temperature, inquinamento dell'aria, danni meccanici quali gli schianti da neve, cambiamenti nella microflora del suolo ;
- 3) fattori concorrenti (contributing factors): insetti corticicoli, funghi agenti di cancri, carie, marciume radicale, virus.

L'azione dei fattori predisponenti 1 e concorrenti è continua, essi agiscono indebolendo il popolamento e rendendolo più suscettibile a contrarre malattie. I fattori scatenanti intervengono su una situazione di generale sofferenza ed hanno il ruolo di aggravare repentinamente lo stato della pianta.

Il modello a spirale di Manion trova riscontri nel fenomeni di deperimento segnalati in Italia centrale e meridionale. Tra le cause predisponenti il declino dei querceti di Sala Consilina in provincia di Salerno si annoverano profondità e scioltezza del suolo, età del popolamento e densità di impianto dei giovani alberi (Cellerino et al., 1991). Mentre la prolungata siccità assume il ruolo di fattore scatenante.



**Fig. 2:** Diagramma generale di evoluzione del deperimento delle querce (Ragazzi et al., 2000).

Tutte le specie di *Quercus* presenti in Italia mostrano segni acuti o cronici di deperimento. Tuttavia, esse devono essere considerate singolarmente, poiché variano le limitazioni ecologiche a cui ciascuna specie è sottoposta e che sono strettamente legate alla sua ecofisiologia (AA. VV., 2006). Ad esempio, *Q. robur* è la più suscettibile alla siccità ma è meno suscettibile al freddo invernale rispetto a *Q. petraea*.



L'evoluzione del deperimento dipende quindi da come la pianta reagisce ad un evento destabilizzante, a cui si aggiungono gli effetti ripetuti dei fattori di deperimento successivi, insieme alla reazione a ciascuno di essi.

E' stato inoltre evidenziato come i querceti del nord Italia (Udine e Treviso) differiscono da quelli precedentemente citati, dove le farnie non sono in condizioni di particolare stress ambientale ma manifestano i tipici sintomi del deperimento. Nel bosco del Fagaré è stato inoltre isolato *Fusarium eumartii* (Ragazzi et al., 2000b).

I possibili agenti causali sono distinti in fattori abiotici e biotici. Ognuno di questi verrà considerato singolarmente.

#### 1.4.1 *Ruolo dei fattori abiotici*

Il deperimento della quercia è un fenomeno mondiale ed interessa regioni molto diverse. Per spiegare questa sindrome, nell'ultimo decennio l'ipotesi climatica ha assunto crescente credito tra i ricercatori (Cellerino e Gennaro, 2000).

Il clima degli ultimi decenni è stato caratterizzato da estremi climatici, quali inverni rigidi e gelate tardive, estati secche e calde. Si sono verificati inoltre alcuni anni particolarmente piovosi, che hanno determinato ampie fluttuazioni del livello di falda. Lo sviluppo di molti patogeni potrebbe essere stato favorito da queste condizioni climatiche (Oszako, 2000).

Per quanto riguarda la siccità estiva, le querce europee mostrano degli adattamenti morfologici e fisiologici che permettono di ritardare il disseccamento e ne aumentano la tolleranza. Tra gli adattamenti morfologici si annoverano lo sviluppo di un apparato radicale profondo (Köstler et al., 1968), la formazione di peli sulla pagina inferiore della foglia che ne riducano la traspirazione, la cladoptosi (Klugmann e Roloff, 1999).

Una reazione di acclimatizzazione è il ritardo del disseccamento, realizzato aumentando la proporzione di radici assorbenti rispetto alle foglie a seguito della siccità (Thomas, 2000; Thomas e Gausling 2000).

La conduttanza ed il controllo stomatico, la variazione del potenziale idrico delle foglie, quello osmotico (Hinckley et al. 1980; Kozłowski et al. 1991) permettono alla pianta di tollerare la siccità. La chiusura degli stomi determinata dallo stress idrico ha come conseguenza la riduzione della fotosintesi (Epron et al., 1992) e la sospensione della crescita del germoglio. Lo stress idrico agisce in modo negativo sull'intero

sistema pianta, riducendone le riserve in fotosintati e carboidrati, la rende più suscettibile ad altri fattori di stress (Dreyer, 1994). In molti studi è stato confermato come lo stress idrico sia tra i principali fattori di esplosione del deperimento della quercia in Francia (Landmann et al., 1993; Bréda, 2000), Gran Bretagna (Mather et al., 1995), Polonia (Siwecki e Ufnalski, 1998) e nella regione del Danubio (Rösel e Reuther, 1995).

Lo stress idrico determina una condizione di generale sofferenza, in cui le reazioni di difesa della pianta sono inibite; a questo punto l'azione dei patogeni di debolezza può accelerarne il declino e portare alla morte della pianta (Cellerino e Gennaro, 2000; Landmann et al., 1993; Siwecki e Ufnalski, 1998).

Le diverse specie di quercia sono suscettibili in vario modo allo stress idrico, non vi è quindi una reazione comune (Dickson e Tomlinson, 1996). *Q. robur* è molto esigente in acqua (Lévy et al. 1992) ed è più sensibile allo stress idrico che *Q. petraea* (Cochard et al. 1992; Vivin et al. 1993). mentre *Q. pubescens* è più tollerante di *Q. cerris* e *Q. frainetto* (Cellerino et al., 1993).

La resistenza al gelo varia tra le specie di quercia ed anche tra individui appartenenti alla medesima specie, dipende da quale organo o tessuto ne è colpito e dallo stato nutrizionale della pianta (Sakai e Larcher, 1987). *Q. petraea* è più sensibile alle gelate invernali e di fine inverno rispetto a *Q. robur* (Ellenberg, 1996). Le zone più interessate dal gelo sono quelle al limite dell'areale della quercia nel nord-est Europa, a ovest degli Urali (Yakovlev, 2000). Le gelate primaverili possono determinare il congelarsi dell'acqua all'interno dei vasi primaverili e causare quindi embolia dei vasi ed il blocco del trasporto idrico (Zimmermann, 1983). E' stato dimostrato che possono inoltre danneggiare l'espansione fogliare (Sakai e Larcher 1987). Ulteriore conferma dell'effetto delle gelate primaverili sulle querce è stato dato da Hartmann e Blank (1998), che hanno evidenziato come queste possano occasionalmente intervenire nel deperimento.

L'inquinamento dell'aria, in particolare la concentrazione di anidride solforosa ozono e azoto, è considerato uno dei fattori predisponenti che può accelerare il deperimento del bosco, specialmente nell'Europa Centrale (Oszako, 2000). Per quanto riguarda il anidride solforosa è stato dimostrato come la farnia sia relativamente tollerante, sopportando 70 giorni di fumigazione senza che vi sia una riduzione della fotosintesi netta (Thomas e Runge, 1992).



L'esposizione delle conifere all'ozono aumenta la suscettibilità al gelo ed alla siccità (Schmieden e Wild, 1995). Non si sono comunque evidenziati effetti particolarmente negativi su piante a crescita lenta, come *Q. robur* e *petrea*. Secondo Skärbyet et al. (1998) l'ozono determina un'alterazione nell'allocazione del C, dovuta al restringimento dei vasi floematici, che ha come effetti la riduzione del rapporto radici/germogli e la predisposizione della pianta a stress idrico.

In quasi tutti i popolamenti di querce del Centro e Nord Europa, la quantità di azoto presente nel suolo è superiore a quella considerata critica per un popolamento gestito ( $15 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ a}^{-1}$ ). Secondo Thomas et al. (2002), una quantità eccessiva di azoto può influire sulla pianta aumentando il rischio di stress idrico nei periodi siccitosi (Aber et al., 1989) e la suscettibilità ai danni da freddo. L'azoto non ha un effetto diretto sulle querce ma ne diminuisce la resistenza al gelo, e favorisce gli attacchi di insetti defogliatori che trovano tessuti più ricchi in sostanze azotate di cui nutrirsi (Oszako, 2000). Sui semenzali di quercia, l'acidità del suolo o le piogge acide possono provocare la riduzione dell'infezione micorrizica, della crescita delle radici fini e della conduzione idraulica (Reich et al., 1986). Tuttavia, questi fattori sembrano inefficaci nell'aumentare la predisposizione dei querceti (LeBlanc, 1998).

Tra i fattori che concorrono nel predisporre la quercia al deperimento indotto dalla siccità hanno particolare importanza le caratteristiche edafiche e selvicolturali. L'inadeguata gestione forestale, associata alla mancanza di utilizzazioni sembra essere coinvolta nell'inizio del deperimento (Cellerino e Gennaro, 2000).

Sempre legato alla disponibilità idrica è l'effetto del tipo di suolo sulla crescita della pianta. I suoli molto sabbiosi perdono molto rapidamente l'acqua delle precipitazioni, mentre nei suoli compatti i sistemi radicali delle querce sono spesso allagati in primavera, e questo disturba le funzioni fisiologiche quali la respirazione. Nei terreni che contengono argilla compatta, nella stagione secca si verifica una mancanza di acqua disponibile superficialmente (Oszako, 2000).

Anche le temperature più miti in inverno potrebbero essere responsabili della diminuita resistenza al gelo e a un aumento della suscettibilità a improvvisi abbassamenti di temperatura (Oszako, 2000).

Molti specialisti considerano l'azione simultanea di fattori climatici ed edafici come causa primaria del deperimento. Esso infatti è spesso preceduto da lunghi periodi di siccità. La siccità può indurre importanti disfunzioni nel sistema di conduzione idrica delle querce, quali la cavitazione e la conseguente embolia, che

possono verificarsi quando le tensioni nelle colonne capillari superano un valore soglia (Aussenac et al., 1993). Si ha quindi una forte riduzione della conducibilità idraulica. Le specie di querce mostrano sensibilità variabile alla cavitazione nello xilema; in ordine di sensibilità decrescente abbiamo *Q. robur*, *Q. petraea* e *Q. pubescens*.

Di seguito si riporta una tabella riassuntiva dei principali fattori abiotici coinvolti nel deperimento.

FATTORI ABIOTICI	
EDAFICI	ATMOSFERICI
deficienze idriche	siccità
abbassamento della falda	forti venti
bruschi cambiamenti nel bilancio idrico	gelate tardive/precoci
scarsa fertilità	inverni molto rigidi
salinità	eccessive escursioni termiche
insufficiente drenaggio	eccessiva radiazione solare
suoli rocciosi/sabbiosi	fenomeni di gelo/disgelo
pH elevati	inquinamento
squilibrio nei macroelementi	
ECOLOGICO-SELVICOLTURALI	FISIOLOGIA DELLA PIANTA
pascolo	alterazioni nella fotosintesi
invecchiamento del popolamento	carenze nutrizionali
inadatta densità del popolamento	età
specie oltre i limiti fitogeografici	potenziale genetico
tecniche selvicolturali inappropriate o mancanti	diminuzione della vitalità delle radici assorbenti
	alterazioni nella biomassa radicale
	insufficienti riserve di amido
	prolungato periodo vegetativo
	anomale variazioni dello stato di micorrizzazione
	squilibrio nei rapporti N/P e N/Mg

**Tabella 2:** Fattori abiotici coinvolti nel deperimento delle querce (Ragazzi et al., 2000; modificato).

#### 1.4.2 Ruolo dei fattori biotici

Tra i fattori biotici coinvolti nel complesso sistema del deperimento delle querce ci sono le defogliazioni compiute da larve di insetti, gli attacchi di coleotteri cortricicoli, i patogeni fungini ed i microrganismi.



Gli insetti defogliatori

L'aumento nelle defogliazioni sembra essere favorito dalle difficili condizioni ecologiche in cui si trovano molte delle querce italiane (Ragazzi et al., 2000). Le maggiori infestazioni sono causate da tortricidi, limantridi, geometridi, taumetopeidi e lasiocampidi. L'azione dei defogliatori e degli agenti di ruggine avviene in maniera indipendente dalle condizioni della pianta, essi vengono quindi definiti come agenti di danno primari. Attaccano gli organi rinnovabili della pianta, foglie e germogli, senza determinare la morte dell'ospite vegetale. Tuttavia la perdita delle foglie modifica lo stato fisiologico della pianta e porta ad una diminuzione dell'attività fotosintetica.

Seguono quindi alterazioni a catena, quali disturbi nei processi di traspirazione, cambiamenti nel trasferimento delle sostanze trasformate e degli ormoni all'interno degli alberi, e disturbi nella regolazione della temperatura a livello di chioma. Come effetto della defogliazione, vi è inoltre la riduzione delle sostanze di riserva della pianta, in quanto impiegate per ricostituire il fogliame. La pianta quindi non potrà utilizzare le proprie riserve nell'accrescimento, è stato visto come una severa riduzione dei carboidrati di riserva sia alla base di una carenza nella formazione del legno tardivo in piante defogliate per vari anni (Hartmann e Blank, 1992). Inoltre, la produzione di nuove radici verrà ridotta a seguito di una forte defogliazione (Kozloski et al., 1991; Block et al., 1995); rendendo la pianta più suscettibile alla siccità. Il danno determinato dalla defogliazione si ripercuote per alcuni anni, determinando una minor resistenza dei tessuti della pianta alle basse temperature. I boschi deperenti diventano più vulnerabili all'attacco di molti organismi patogeni. La seconda vegetazione è più stentata e sensibile all'attacco di patogeni non molto virulenti, quali l'infezione dell'oidio (*Microsphaera alphitoides*, phylum Ascomycota). Esso causa un danno maggiore sulle seconda serie di foglie, con il risultato che queste possono anche essere completamente distrutte (Oszako, 2000).

I principali insetti defogliatori appartengono alla famiglia dei lepidotteri, *Lymantria dispar*, *Euproctis chrysorrhoea*, *Malacosoma neustria*, *Erannis defoliaria*, *Operopthera brumata* e *Tortrix viridana* e sono tra i più segnalati nell'Europa centrale e occidentale.

Secondo Lobinger (1999) è sufficiente una sola defogliazione di *L. dispar* per ridurre considerevolmente il vigore delle piante e predisporle ad un rapido deperimento.



Inoltre, è nota la preferenza di *T. viridana* per una chioma meno densa, caratteristica sempre più evidente nelle foreste europee, la cui vitalità sta progressivamente riducendosi.

E' stato stabilito un valore soglia di defogliazione critica, pari al 30% del fogliame per querce con più di 40 anni, superato il quale la defogliazione diventa un problema serio, mentre su alberi isolati una defogliazione inferiore al 25% non causa alcuna visibile perdita di crescita (Oszako, 2000).

### Gli insetti xilofagi

A seconda del tessuto vegetale di cui si nutrono si distinguono due categorie di insetti xilofagi: i **corticicoli**, che usano il floema delle branche, della chioma, del tronco e delle radici ed i **lignicoli**, che scavano tunnel di diversa lunghezza e diametro sia in piante sane che deperenti. Essi agiscono da patogeni secondari, intervenendo su una situazione di generale sofferenza della pianta, determinata da altri stress abiotici e biotici, possono portare alla morte della pianta.

Da dettagliate analisi su querce centenarie nel nord della Germania, *Agrilus biguttatus* Fabr. Dei buprestidi è stato individuato come il principale patogeno secondario, che colpisce i popolamenti in stress (Hartmann, 1989; Hartmann e Blank, 1992). Sono inoltre coinvolte altre specie, quali *Agrilus sulcicollis*, *Coraebus undatus* (Veldmann e Kontzog, 2000). La larva scava gallerie a forma zigzagante nel libro e nella zona cambiale. Nella fase iniziale l'attacco può essere fermato dalla pianta, mentre attacchi ripetuti ne determinano il blocco del trasporto idrico, causandone la morte (Hartmann, 1996). Le infestazioni di *Agrilus* sono note da tempo in Europa, ma la sua importanza è stata spesso sottostimata. Esso infatti, può continuare ad attaccare ed uccidere le piante persino se viene a mancare il principale fattore di deperimento (Hartmann e Blank, 1998).

L'azione di coleotteri, quali *Scolytus intricatus* e *Dryocoetes villosus* appare in una fase tarda del deperimento delle querce. Tra i patogeni secondari si annoverano inoltre i coleotteri dei generi *Trypodendron* spp., *Xyleborus* spp., *Plagionotus* spp. E *Cerambyx cerdo* (Oszako, 2000). Alcuni corticicoli svolgono il ruolo di vettori di funghi patogeni, come *Scolytus* e *Xyleborus* possono trasportare *Fusarium* e *Verticillium* (Tiberi, 2000), potrebbero quindi essere coinvolti nel trasporto degli agenti di tracheomicosi.

### I galligeni e fitomizi

Vi è infine un ulteriore gruppo di insetti, la cui presenza è associata a querce in stato deperente. Si tratta dei succhiatori, galligeni e minatori, la cui importanza è stata spesso ignorata (AA. VV., 2006). L'infestazione di *Kermes quercus* L. è stata segnalata in boschi di farnia dell'Ungheria; mentre in querceti deperenti dell'Austria, si sono trovati in elevata densità un cicadelide, *Iassus lanio* L. ed un miriade, *Harpocera toracica* (Schopf e Mitterböck, 1991). Essi si nutrono dei giovani tessuti, colpendo quindi i germogli, i fiori e le gemme. Compiono un'azione di disturbo sull'efficienza fotosintetica della pianta.

Per quanto riguarda la situazione delle querce in Italia si riporta la seguente tabella in cui sono elencati i principali insetti agenti di danno.

<b>INSETTI DEFOGLIATORI</b>	<b>INSETTI XILOFAGI</b>
<i>Tortrix viridana</i> (L.)	<i>Zeuzera pyrina</i> (L.)
<i>Operophtera brumata</i> (L.)	<i>Cossus cossus</i> (L.)
<i>Erannis defoliaria</i> (Clerk)	<i>Sinoxylon</i> spp.
<i>Thaumetopoea processionea</i> (L.)	<i>Agrilus</i> spp.
<i>Lymantria dispar</i> (L.)	<i>Coroebus florentinus</i> (Hbs)
<i>Euproctis chrysorrhoea</i> (L.)	<i>Cerambyx cerdo</i> (L.)
<i>Malacosoma neustria</i> (L.)	<i>Scolytus intricatus</i> (Ratz.)
<i>Gastropacha quercifolia</i> (L.)	<i>Xyleborus dispar</i> (L.)
<i>Haltica quercetorum</i> (Foud.)	<i>Platypus cylindrus</i> (F.)
<b>INSETTI FITOMIZI</b>	
<i>Metcalfa pruinosa</i> (Say)	<i>Phylloxera quercus</i> B.d.F.
<i>Lachnus roboris</i> (L.)	<i>Kermes roboris</i> (Fourcroy)
<i>Diphyllaphis mordvilkoii</i> (Aiz)	<i>Kermes vermilio</i> (Planchon)
<i>Myzocallis boernerii</i> (Str.)	<i>Nidularia pulvinata</i> (Planchon)
<i>Myzocallis schreiberii</i> (H.R.L. e Str.)	

**Tabella 3** : Principali insetti coinvolti nel deperimento delle querce in Italia (Tiberi, 2000)

Tra i fitomizi si annoverano gli afidi, le cocciniglie e la neartica *Metcalfa pruinosa*, che si nutrono dei contenuti cellulari o delle sostanze floematiche. Determinano danni gravi, poiché introducono con la saliva delle sostanze tossiche per la pianta. Inoltre possono emettere melata, causano quindi un'alterazione dei processi fotosintetici.



## I microrganismi

Tra i microrganismi coinvolti nel deperimento delle querce sono state isolate diverse specie batteriche, fungine e virali. In Italia e Romania sono stati isolati alcuni batteri su querce deperenti, quali *Erwinia quercicola* Georges et Bad. Ed *Erwinia valachica* Georges et Bad. (Petrescu, 1974). Inoltre, in Romania sono stati trovati batteri, organismi simili a micoplasmi, MLO- (Ploiae et al., 1987). Mentre in Germania è stato isolato l'unico virus finora identificato su esemplari deperenti di *Q. robur*, *Q. petrea*, e *Q. cerris*: TMV, il virus del mosaico del tabacco (Nienhaus, 1987).

I funghi parassiti sono un fattore predisponente ed aggravante il declino delle piante, possono portare al blocco della crescita vegetativa (Wargo, 1996; Donaubauer, 1998). Le querce ospitano un'elevata varietà di funghi; sulla corteccia sono state individuate più di 400 specie fungine, delle quali un centinaio hanno caratteristiche patogeniche (Franceschini et al., 1993; Muñoz et al., 1995). Sono per la maggior parte funghi dannosi, poiché colpiscono le foglie, determinandone la caduta anticipata, le branche, causandone dieback, e sono agenti di marciume radicale e carie del legno.

**I parassiti delle foglie** attaccano in maniera continua durante tutta la stagione vegetativa, determinando la progressiva defogliazione della chioma. L'attacco inizia con il formarsi di macchie sulla foglia che poi evolvono in aree necrotiche e carbonizzate. È stata dimostrata la loro capacità di attaccare le giovani foglie in formazione, causandone la distorsione; inoltre possono determinare filloptosi (Franceschini et al., 2000). I principali patogeni sono *Cystodendron dryophilum* (Pass) Bubàk, *Apiognomonina quercina* (Kleb.) Höhn, *Lembosia quercina* (Ell. Et G. Martin) Tracy et Earle e *Septogloeum dryophilum*, Marras. A seguito del loro attacco la pianta si trova in uno stato fisiologico e metabolico alterato, diventando più suscettibile al contrarre altre patologie.

**I parassiti delle branche e del tronco** in condizioni normali appartengono alla rizosfera della quercia, mentre diventano aggressivi quando la pianta si trova in condizioni di stress. *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr (Luisi et al., 1993) e *Taphrina kruchii* (Vuill.) causano infezioni localizzate, mentre *Cylindrocarpon candidum* (Link) Wollen., *Diplopia mutila* (Fr.) Mont., *Fusarium eumartii* Carp.,



*Hypoxylon mediterraneum* (De Not.) Ces., *Phoma cavae* Schuelzer e *Phomopsis quercina* (Sacc.) Höhn, hanno una maggior rilevanza. Due specie sono particolarmente dannose nell'area mediterranea, *D. mutila* e *Biscogniauxia mediterranea* (De Not.) O. Kuntze (= *Hypoxylon mediterraneum* (De Not.) Miller). Essi infatti colpiscono querce di qualsiasi età, e diventano rapidamente molto dannosi, grazie alla elevata mole di inoculo ed alla diffusione tramite insetti vettori (Vannini et al., 1996; Tiberi e Ragazzi, 1996). Portano rapidamente a morte la pianta, poiché colonizzano attivamente il tessuto corticale ed una volta raggiunto lo xilema, l'infezione diventa sistemica (Franceschini et al., 1999).

I **parassiti lignicoli** causano alterazioni del tessuto legnoso di varia intensità. I cromogeni determinano un danno estetico al legno, poiché ne mutano il colore. *Ceratocystis coerulescens* (Münch) Bakshi e *Ophiostoma piceae* (Münch) H. et P. Sydow sono i principali cromogeni; *Graphium*, *Pesotum* e *Sporothrix* sono di secondaria importanza (Frisullo et al., 1989; Anselmi e Invernizzi, 1992). E' stato dimostrato che la loro presenza è legata a fenomeni di stress idrico (Franceschini et al., 2000). I lignicoli, che determinano una perdita di consistenza del tessuto legnoso, sono principalmente dei Basidiomiceti, che sono stati inoltre isolati su soggetti in stress o morti. Ad eccezione di *Daedalea quercina* (L.) Fr., *Fomes fomentarius* (Fr.) Kickx, *Inonotus driadeus* (Pers.) Murr e *Stereum gausapatum* (Fr.) Fr. Non attaccano piante sane (Franceschini et al., 2000); non sono tra i fattori attivi di deperimento.

I **parassiti radicali** sono funghi che in condizioni normali si comportano da saprofiti, nutrendosi della sostanza organica presente nel suolo. Essi assumono comportamento patogeno, quando la pianta evidenzia sintomi di generale sofferenza o per la mancanza di nutrienti (Franceschini et al., 2000). La specie più aggressiva è l'*Armillaria mellea*, sia per la sua diffusione che per il suo alto potenziale patogenetico sulle piante stressate (Franceschini et al., 2000). Attacca radici di diametro compreso tra 5 -20 mm, è stata rinvenuta particolarmente in piante di *Q. robur* deperenti in suoli idromorfici; tuttavia non sembra essere coinvolta nei primi stadi del deperimento (Guillamin et al., 1985). In Germania il genere *Armillaria* spp. È stato isolato solo raramente in querce defogliate dall'attacco di insetti. Solo in seguito all'azione del *Agrilus*, sono stati trovati numerosi carpofori di *A. gallica* e *A. cepistipes* in piante

morte. Essa è quindi più un saprofita secondario che un agente di danno primario (Thomas et al., 2002).

*Collybia fusipes* (Bull. Ex Fr.) è causa comune di marciume radicale nel Nord Est della Francia (Marçais et al., 2000). Ha comportamento parassitico e si sviluppa nella parte esterna della corteccia delle radici. E' stato rinvenuto su piante mature di *Q. robur* e *petrea*, eccezionalmente può penetrare all'interno della radici, ma non sembra avere un ruolo attivo nel deperimento delle querce.

In Italia le specie più diffuse appartengono ai generi *Armillaria*, *Collybia*, *Ganoderma* e *Grifola* (Anselmi, 1991; Intini, 1991; Anselmi e Puccinelli, 1993; Grillo e Tirrò, 1993).

Recentemente, il genere *Phytophthora* è stato considerato tra i principali parassiti radicali ed è spesso rinvenuto in querceti deperenti. Nell'area mediterranea la *P. cinnamomi* è tra i responsabili del deperimento di *Q. suber* e *Q. ilex* (Brasier, 1996; Robin et al., 1998); attacca infatti le radici fini in condizioni di siccità. Diverse specie di *Phytophthora* sono state isolate nei suoli di querceti deperenti del Centro, Sud e Sud-Est Europa e sulle radici di querce deperenti. Le specie più frequenti sono *P. quercina* e *P. citricola* (Hansen e Delatour, 1999; Jung et al., 2000).

Tra i fattori biotici coinvolti nel deperimento hanno importanza alcuni funghi endofiti, in grado di comportarsi da patogeni di debolezza. Negli ultimi anni i funghi endofiti hanno assunto crescente importanza nell'evoluzione del deperimento della quercia. Gli endofiti vivono per periodo della loro vita all'interno dei tessuti dell'ospite senza produrre alterazioni (Petrini, 1991). Si è osservato che alcuni parassiti di debolezza, come *Colpoma quercinum*, *Phomopsis* spp., *Pseudovalsa* spp. E *Apiognomonina quercina* (Kleb.) Höhnel. Tra di essi, *Diplodia mutila* e *Biscogniauxia mediterranea* (De Not.) O. Kuntze (= *Hypoxyton mediterraneum* (De Not.) Miller) siano coinvolti nel deperimento della quercia nell'area mediterranea (Luisi et al., 1992). Essi hanno una fase asintomatica nei tessuti vegetali e diventano virulenti in seguito ad un forte stress per la pianta (Anselmi et al., 2000). Nel Centro e Sud Italia è frequente *B. mediterranea*, mentre al Nord assumono importanza altri endofiti, quali *D. mutila* e *Fusarium eumartii* Carp. (Ragazzi, 1993; Ragazzi et al., 1995).

L'attacco dei parassiti di debolezza su piante deperenti determina la morte dell'ospite. Solo in popolamenti stressati dalla siccità ed alterati dall'eccessivo intervento antropico, la patogenicità di *B. mediterranea* si manifesta su piante dominanti. In tale situazione alcuni endofiti potrebbero essere ritenuti fattori di



regolazione delle biocenosi forestali, poiché colpiscono gli individui meno adattati (Anselmi et al., 2000).

## **1.5. Misure di controllo del deperimento**

La gestione dei cedui di *Quercus* è uno dei principali e attuali problemi della ricerca forestale nei Paesi dell'area mediterranea. Nel passato questi popolamenti erano gestiti a ceduo, di solito con turno di 20 anni. Questi boschi avevano un ruolo centrale nella tradizionale economia delle regioni mediterranee, ma progressivamente sono stati abbandonati. Attualmente presentano vari aspetti negativi, fra cui l'elevata densità, una vegetazione che mostra segni di deperimento e la mancanza di produzione di seme. I querceti stanno quindi perdendo i loro benefici economici e sociali (Cañellas et al., 2004).

Tra i possibili metodi per controllare il fenomeno del deperimento della quercia è stato studiato l'impiego di fungicidi, la cui azione si è dimostrata nonché. A due anni dall'iniezione al tronco di potassio fosfato, è stato osservato un aumento significativo della crescita vegetativa delle piante trattate. Inoltre a tre anni dal trattamento si sono ridotti i sintomi del deperimento (Fernandez-Escobar et al., 1999). In campo forestale l'utilizzo di fungicidi è limitato all'ambito vivaistico per gli effetti che potrebbero produrre all'intero ecosistema. Assumono quindi notevole rilevanza gli interventi di carattere selvicolturale, volti alla riduzione delle condizioni che predispongono il deperimento o alla ripresa delle piante deperenti.

Uno studio effettuato da Luisi e Manicone (1991) ha valutato l'efficacia dei tagli sanitari sulla limitazione del deperimento in un popolamento di querce deperenti dell'Italia meridionale (Gravina di Puglia, Bari). Si rilevò che i tagli, se correttamente effettuati, producevano alberi più vigorosi, che sopportavano meglio le stagioni secche. Questo si evidenziò in particolar modo nei cedui invecchiati. Tuttavia, un livello di taglio meno estensivo, in cui erano stati rimossi solo alberi in cui la parte epigea era morta, non aveva effetto sul deperimento.

In passato la conversione dei cedui in fustaia era ritenuta una pratica favorevole, in quanto interessava cedui invecchiati senza ridurre la densità. In realtà questo è accettabile per brevi periodi di rotazione (12-15 anni) e bassa fertilità del suolo, mentre se si ritardano i tagli nei suoli fertili, aumenterà la competizione tra le piante e ne ridurrà la resistenza ai parassiti. Sono perciò necessari diradamenti e cure colturali,



da effettuare quando le piante sono ancora in crescita attiva o almeno non mostrano condizioni di degrado (Luisi e Lerario, 2000).

## 1.6 Le simbiosi micorriziche

Il termine simbiosi è stato introdotto da De Bary nel 1887 per definire la coesistenza permanente di più organismi di taxa diversi (Allen, 1991). Egli distinse vari tipi di simbiosi, quali il parassitismo, il commensalismo, l'amensalismo, il neutralismo e il mutualismo.

Attualmente le simbiosi vengono classificate in tre gruppi: mutualistiche, neutre (commensalismo) ed antagonistiche. In funzione del ciclo biologico del fungo o della pianta varia la natura della simbiosi. Ne sono esempio i funghi endofiti, che restano per un certo periodo di tempo latenti nei tessuti della pianta (simbiosi neutra) per poi passare ad una fase successiva di natura patogena (Graniti, 2000).

Nelle simbiosi mutualistiche entrambi i componenti beneficiano dell'associazione. Appartengono a questo gruppo le simbiosi micorriziche, i licheni, i coralli ed i complessi di azoto fissazione. In generale, gli organismi tendono a contrarre una simbiosi per adattarsi ad ambienti poveri o difficili: l'associazione permette di acquisire nuove capacità, rendendo possibile la sopravvivenza in condizioni altrimenti proibitive per un organismo isolato (Rai et al., 2000).

Con il termine **micorrizza** si definisce la simbiosi mutualistica tra pianta e fungo. Tale termine è stato per la prima volta utilizzato nel 1885 da Frank, che ha coniato la parola "mykorrhiza" come associazione dei vocaboli "fungo-radice". Si devono ad Hartig (1840) la prima vera descrizione dei caratteri strutturali ed ecologici delle micorrize. Egli non capì tuttavia la natura fungina del mantello e del reticolo, che scambiò invece per un periderma persistente ed una parete cellulare di tipo particolare.

In genere, nelle simbiosi micorriziche il simbionte fungino assume dalla pianta composti fissati dalla fotosintesi, mentre la pianta riceve benefici nutrizionali, come una facile assunzione di fosforo e azoto (Harley e Smith, 1983), nonché una più efficace protezione contro i patogeni (Marx, 1969; Smith e Read, 1997; Sen, 2001) e contro lo stress idrico (Garbaye, 2000). Non è comunque chiaro quali siano i reali

benefici per ciascun simbionte, in alcuni casi la relazione può essere neutrale o parassitica. Le conseguenze della simbiosi sull'ospite vegetale non sono di facile previsione in condizioni naturali, in cui possono variare la competizione tra altri organismi, l'età dei simbionti, le condizioni climatiche (Heinonsalo, 2004).

Sulla base delle caratteristiche del simbionte fungino, si distinguono due gruppi principali di micorrize:

- 1) micorrize formate da funghi, spesso aseptati, appartenenti alla classe dei Zigomiceti e all'ordine delle Glomales. Questi funghi fanno parte dei Glomeromycota, un taxa separato da quello degli Zigomiceti (Schußler et al. 2001), caratterizzati dall'essere asessuati (Pawloska e Taylor 2004) e dal formare spore di grandi dimensioni.
- 2) micorrize formate da funghi settati delle classi dei Basidiomiceti e degli Ascomiceti.

Le micorrize di tipo **vescicolo arbuscolare (VA o VAM)** appartengono al primo gruppo. Sono formate da tre strutture: la radice, le strutture fungine che si sviluppano nell'apoplasto delle cellule corticali ed il micelio extraradicale. Esse costituiscono all'interno delle cellule corticale degli arbuscoli o delle vescicole e si distinguono in due tipi a seconda delle modalità di sviluppo dal micelio nei tessuti della pianta ospite:

- tipo Arum, in cui il micelio si sviluppa in senso longitudinale nell'apoplasto dei tessuti corticali per poi ramificarsi dicotomicamente, formando gli arbuscoli;
- tipo Paris, in cui il micelio si sviluppa nel simplasto costituendo dei "gomitoli" di ife, dai quali si formano gli arbuscoli (Smith e Read, 1997)

La formazione degli arbuscoli aumenta notevolmente l'area di contatto tra i due organismi, consentendo un maggiore scambio reciproco di sostanze (Smith e Read, 1997). Essi hanno una durata limitata nel tempo, in quanto una volta degenerati vengono digeriti dalle cellule corticali dell'ospite vegetale.

Secondo Brundrett (2002) questo meccanismo permetterebbe alle piante di esercitare il proprio controllo sul partner fungino, premunendosi da eventuali situazioni di parassitismo.

Il micelio esterno ha struttura a rete, in cui le ife si anastomizzano frequentemente tra di loro (Giovanetti et al., 2001). L'assorbimento delle sostanze



nutritive dal suolo avviene attraverso ife sottili molto ramificate (Read 1992, Smith e Read, 1997). Le VA sono particolarmente efficienti nell'utilizzo del fosforo inorganico del suolo, mentre non attaccano la sostanza organica (Hodge, 2001). Sono dotati di scarsa specificità, per questo sono frequenti nelle praterie o nelle foreste tropicali, in cui è elevata la probabilità di incontrare una pianta compatibile alla simbiosi (Read, 1991; Allen 1991; Smith e Read, 1997).

Sono costituite dalla simbiosi con funghi settati le seguenti associazioni micorriziche: le ectomicorrize, le ectendomicorrize, le micorrize arbutoidi e monotropoidi, le micorrize delle ericoidi, le micorrize delle orchideaceae. Va sottolineato come le micorrize monotropoidi e delle orchidaceae non possano essere definite mutualistiche, poiché determinano maggiori vantaggi per la pianta che per il fungo (Leake, 1994; Smith e Read, 1997, Taylor e Bruns, 1997; Brundrett, 2002).

Per chiarezza si riporta uno schema riassuntivo delle principali simbiosi micorriziche, mentre le ectomicorrize, oggetto del seguente studio, verranno trattate in dettaglio.



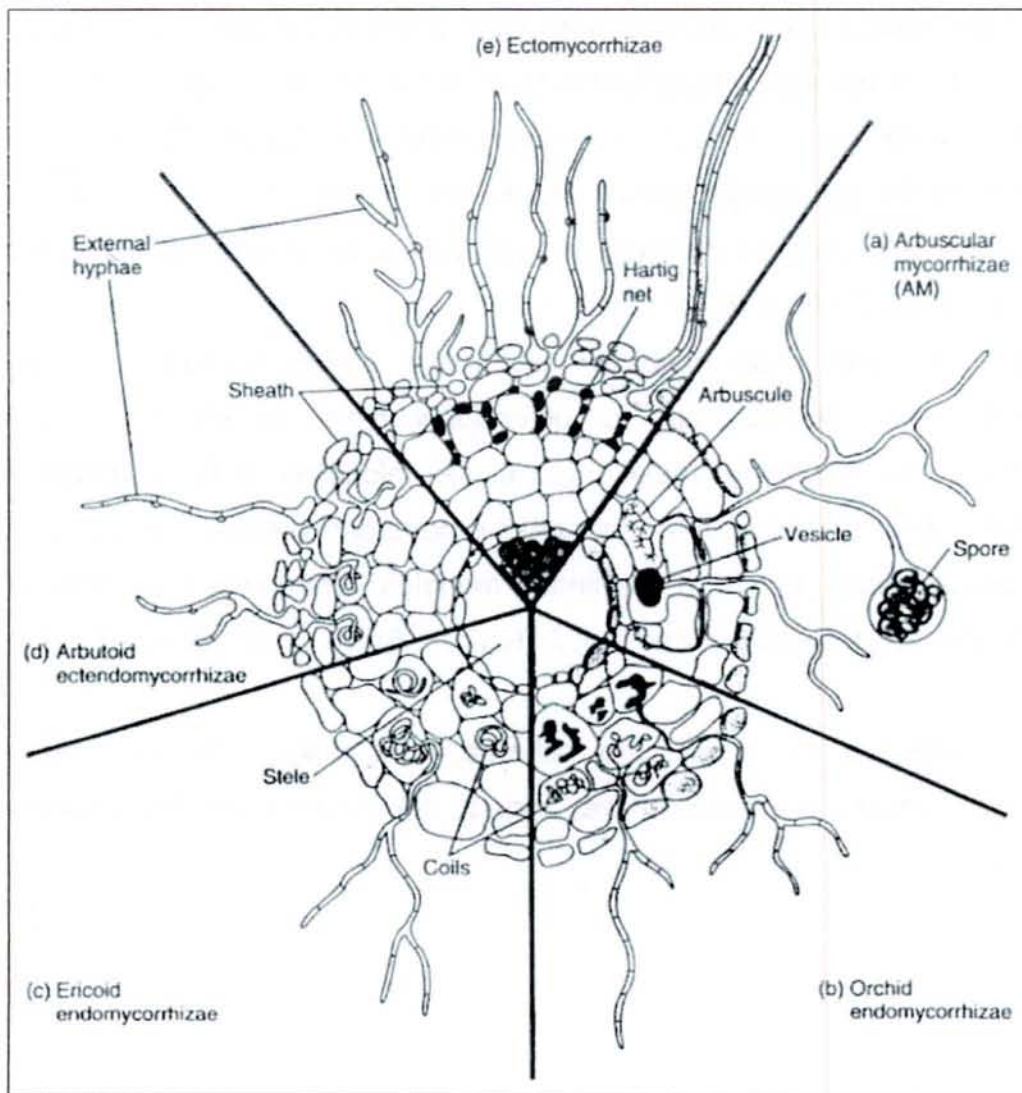


Fig 3: Tipi di micorrize (da [www.ecologischgroen.be/images](http://www.ecologischgroen.be/images))

### 1.6.1 Le ectomicorrize

Il carattere peculiare di questa simbiosi è dato dal fatto che il fungo si mantiene all'esterno della cellula vegetale, accrescendosi nello spazio intracellulare. Sono caratterizzate da due strutture principali: il mantello, che avvolge completamente l'apice radicale, il reticolo di Hartig (Fig. 4), che è costituito da ife che penetrano nei tessuti radicali, restando circoscritte nell'apoplasto. La presenza di queste due strutture è essenziale per diagnosticare una simbiosi ectomicorrizica (Smith e Read, 1997).

Vi è inoltre una terza struttura: il micelio extramateriale, formato da ife o rizomorfe che si sviluppano nel suolo. La morfologia della micorrizza tende ad essere costante

per i diversi funghi in funzione dell'ospite colonizzato. E' quindi possibile identificare il fungo in base alla morfologia della micorrizza (Agerer, 1993).

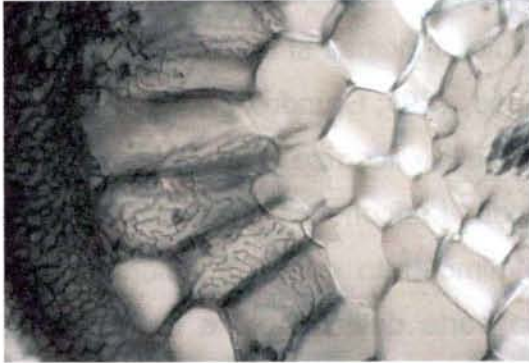


Fig. 4: Sezione trasversale di una ectomicorrizza di *Populus tremuloides*, in cui è evidente la struttura del reticolo di Hartig (ingr. 540x). Tratto da Brundrett, 1996.

Il **reticolo di Hartig**, zona di contatto tra i due simbionti, riveste la massima importanza nella funzione della radice micorrizica (Smith e Read, 1997). La profondità della penetrazione nelle cellule corticali varia in base alla pianta ospite. Nelle Angiosperme il reticolo è confinato allo strato epidermico della radice (Godbout e Fortin, 1983), mentre nelle Gimnosperme la penetrazione interessa diversi strati delle cellule corticali, può raggiungere anche l'endoderma. (Smith e Read, 1997).

Il **mantello**, che rappresenta dal 20 al 40% della biomassa dell'apice micorrizico (Vogt et al., 1982), ha funzioni di accumulo di sostanze di riserva per il fungo (Smith e Read, 1997). La formazione del mantello dipende dal fungo, per questo motivo esso è caratterizzato da una morfologia strettamente dipendente dalla specie fungina, ed ha quindi valore diagnostico per il riconoscimento della specie fungina. Si deve ad Agerer (1999) la descrizione della struttura anatomica e morfologica degli apici micorrizici e delle sue parti costituenti.

Il **micelio extramaticale** ha la funzione di incrementare la superficie assorbente della radice, rappresenta inoltre una fonte di inoculo per la colonizzazione di nuove radici (Deacon e Fleming, 1992). Nella stagione più favorevole al fungo il micelio può crescere fino a 4 mm al giorno (Smith e Read, 1997). Dal mantello si dipartono le ife, che possono accrescersi singolarmente come negli Ascomiceti o aggregarsi per formare le rizomorfe, caratteristiche di molti Basidiomiceti (Smith e Read, 1997).

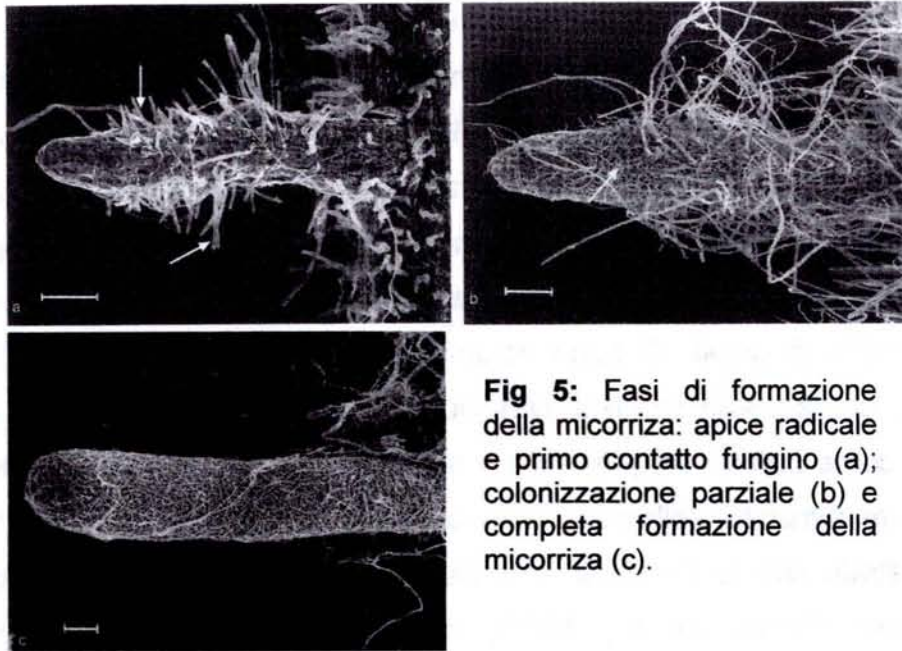


### 1.6.2 *L'instaurarsi della simbiosi*

La micorrizza si forma in seguito alla crescita sincronizzata della radici e del fungo (Brundrett, 1996). Le piante micorrizzate presentano uno schema di ramificazione alterato rispetto alla situazione normale; dalle radici principali si dipartono numerose piccole radici laterali (Brundrett, 1996, Smith e Read, 1997; Brundrett, 2002).

Una serie di eventi portano alla formazione della micorrizza (Fig. 6). In un primo momento l'ifa entra in contatto con un apice radicale, lo riconosce chemiotatticamente ed aderisce alle cellule epidermiche. E' stato dimostrato come la colonizzazione dell'apice radicale sia sotto controllo genico da parte della pianta e del fungo. Si determina infatti una variazione nella concentrazione e nella sintesi di polipeptidi (Smith e Read, 1997) ed una sintesi di proteine specifiche. Ciò avviene solo se i due simbionti sono compatibili. Aumenta inoltre la sintesi di ormoni quali l'auxina, che modifica le modalità di crescita della radice (Brundrett, 2002; Candela et al., 2002). Una volta avvenuto il contatto, il fungo orienta la direzione di crescita delle ife sulla radice, mentre le radici aumentano il tasso di ramificazione e può avvenire la fusione degli apici (Massicotte et al., 1987). In seguito il micelio prolifica, ricopre completamente l'apice fino a differenziarsi per costituire il mantello. Contemporaneamente le ife penetrano tra le cellule epidermiche, nelle Angiosperme, e corticali, nelle Gimnosperme, per formare il reticolo di Hartig.

Entro pochi giorni dal loro emergere le radici fini delle piante ectomicorriziche sono colonizzate dai simbionti fungini (Smith e Read, 1997). La vita delle micorrize dipende dalle condizioni ambientali, solitamente vengono rigenerate su base annuale durante tutta la stagione vegetativa, ma con dei picchi in certi periodi (Dahlberg, 2001). Il reticolo di Hartig deperisce in tempi brevi: la sua attività è legata all'età ed al tasso di accrescimento dell'apice radicale. Il mantello persiste più a lungo, anche quando la micorrizza non è più funzionale (Smith e Read, 1997).



**Fig 5:** Fasi di formazione della micorriza: apice radicale e primo contatto fungino (a); colonizzazione parziale (b) e completa formazione della micorriza (c).

### 1.6.3 Interazioni con le piante simbiotici

La simbiosi micorrizica ha grande rilevanza ecologica, poiché si instaura sulle piante dominanti in molti ecosistemi terrestri (Brundrett, 2002; Read e Perez-Moreno, 2003). Tra le famiglie di piante coinvolte in questa simbiosi si annoverano, nell'emisfero settentrionale, le *Pinaceae* e le *Fagaceae*, in quello meridionale le *Myrtaceae* e le *Dipterocarpaceae* (Smith e Read, 1997). Ci sono inoltre alcuni arbusti ectomicorrizici, *Dryas* (*Rosaceae*) e *Helianthemum* (*Cystaceae*), ed alcune rare specie erbacee *Kobresya myosuroides* (*Cyperaceae monocotiledone*) o *Polygonium viviparum* (Brundrett, 1997).

E' stato stimato che circa l'82% delle piante esistenti forma micorrize, in particolare il 50% forma micorrize vescicolo arbuscolari (Brundrett, 2002). E' difficile dare un quadro chiaro della micorrizzazione facoltativa, obbligata, assente. Sono state comunque identificate le famiglie di piante non micorriziche: *Aizoaceae*, *Amarantaceae*, *Cariofillaceae*, *Chenopodiaceae*, *Comelinaceae*, *Crucifere*, *Cyperaceae*, *Fumariaceae*, *Giuncaceae*, *Nyctaginaceae*, *Phytolacaceae*, *Poligonaceae*, *Portulacaceae*, *Urticaceae* (Gerdemann, 1968). Tuttavia anche all'interno di questo elenco numerose eccezioni portano a stimare un valore variabile dal 13 a 63% di piante micorriziche (Newman e Reddel, 1987). E' noto inoltre che la simbiosi può avere carattere temporaneo ed essere determinata da particolari condizioni ambientali. In habitat difficili, caratterizzati da temperature estreme o da



particolare abbondanza di elementi nutritivi, sono abbondanti le piante non micotrofiche o facoltativamente micorriziche. (Smith e Read, 1997; Brundrett, 2002).

L'ectomicorrizzazione ha una specificità dell'ospite maggiore rispetto alle micorrize vescicolo arbuscolari. Tuttavia, vi sono vari gradi di specificità all'interno del gruppo delle ectomicorriziche: alcune formano simbiosi sia con angiosperme che gimnosperme, altre solo con angiosperme, o solo con gimnosperme, oppure con una singola famiglia di ospiti. Ci sono ectomicorrizze generaliste come il *Cenococcum geophilum*, che entra in simbiosi con più di 200 specie di piante, ed altre specie specifiche, come *Boletus elegans* e *Larix decidua* (Montecchio e Rossi, 2000).

Le ife micorriziche collegano le specie arboree di un popolamento forestale. E' stato dimostrato che la douglasia e la betulla possono condividere gli stessi funghi ectomicorrizici (Jones et al., 1997), mentre i suilloidi collegano solo piante intraspecifiche (Dahlberg, 2001).

#### 1.6.4 Il ruolo dell'ectomicorrizzazione

Gli studi sulla micorrizzazione valutano gli effetti della simbiosi in termini di cambiamenti nella fisiologia o nella produzione delle singole piante. Raramente i due simbionti sono stati studiati separatamente, pur reagendo al medesimo cambiamento ambientale su scale spaziali e temporali diverse.

Gli effetti della micorrizzazione sulla **pianta ospite** sono generalmente positivi. Il fungo, con la sua struttura ad ife, permette di esplorare un volume di suolo più ampio rispetto all'apice radicale. Vi è quindi una maggior disponibilità di risorse per la pianta ospite ed una miglior esplorazione delle nicchie del suolo (Allen, 1991). Grazie allo straordinario sviluppo delle ife che possono raggiungere la lunghezza di diversi metri, le ectomicorrizze sono in grado di trasportare specifici ioni ed una molteplicità di minerali diversi, fra cui N, Ca, Zn, S, P, K (Harley e Smith, 1983). Caratteristica di molti ecosistemi forestali è la scarsa disponibilità di azoto (Tamm, 1991). Le piante possono assorbire direttamente l'azoto inorganico, tuttavia le ectomicorrizze ne rendono l'assunzione più efficiente (Rygielwicz et al., 1984; Martin et al., 2001). E' stato dimostrato che le piante micorrizzate possono accedere all'azoto organico di cui è ricco l'humus forestale (Smith e Read, 1997).



Il trasporto dell'acqua verso la pianta avviene anche attraverso le ife fungine (Dubbridge et al., 1980; Auge et al., 1986). Le ife fungine hanno un diametro inferiore ai 10  $\mu\text{m}$ , mentre le radici assorbenti della pianta superano i 20  $\mu\text{m}$ . Per questa diversa anatomia possono raggiungere i micropori del suolo argilloso ricco di sostanza organica. La micorrizzazione aumenta quindi l'assorbimento di nutrienti e di conseguenza è maggiore la quantità di carbonio fissato dalla pianta. Questa capacità è stata dimostrata anche in condizioni di siccità, in particolare le piante micorrizzate con *Glomus fasciculatue* mantengono gli stomi aperti per 3 giorni in più rispetto alle piante non micorrizzate (Allen e Boosalis, 1983). Vari studi hanno evidenziato come la mortalità delle foglie sia ritardata in piante micorrizzate, soprattutto in condizioni di siccità (Allen e Allen, 1986). In questo modo aumenta l'apporto stagionale di carbonio. Nelle piante perenni questa capacità di mantenere più a lungo le foglie ha un risvolto ecologico, poiché aumenta le possibilità di sopravvivenza della pianta in condizioni estreme (Kormanik, 1985).

Gli apici micorrizzati sono inoltre meno sensibili alle condizioni di siccità del suolo, proteggono quindi la pianta dallo stress idrico e dalle fluttuazioni nella disponibilità idrica del suolo (Garbaye, 2000).

Nello spazio attorno all'apice radicale, la rizosfera, vivono moltissimi microrganismi, alcuni dei quali a carattere parassitario. Le ectomicorrize agiscono inibendone l'abilità parassitica (Marx, 1969). Il meccanismo è di tipo meccanico, in quanto l'apice radicale è circondato dal fungo micorrizico che fisicamente blocca il fungo dannoso. Essi inoltre possono secernere composti tossici e sostenere i microrganismi associati che sono sfavorevoli ai patogeni (Harley e Smith, 1983).

Per descrivere gli effetti della micorrizzazione sul **fungo simbiote** si fa riferimento alle risorse necessarie al fungo fornite dalla pianta ed all'abilità del fungo di ampliarsi ed aumentare la sua fitness. Il fungo dipende obbligatoriamente dalla pianta per le risorse energetiche. Il fungo può associarsi con più specie di piante, mettendole in connessione tra loro. Questa capacità è determinata dalla volontà di massimizzare l'assorbimento del carbonio.

La fitness nei funghi è definita come la capacità di sopravvivenza della popolazione nel tempo senza considerare la discendenza. Essa si può valutare in base a tre diversi parametri: l'abilità di mantenere la colonizzazione di una porzione di suolo, la resistenza e la capacità di reazione agli stress, la capacità di migrare e di



ristabilire la colonia in un habitat diverso (Allen, 1991). Alcuni Basidiomiceti possono mantenere la colonizzazione del suolo per centinaia di anni. E' stata dimostrata la sopravvivenza di *Glomus fasciculatum* in periodi di stress, nei quali non dispone dei fotosintati della pianta. Tuttavia, in queste condizioni non sopravvive oltre due anni se entra in competizione con micorrize arbuscolari (Allen e Boosalis, 1983).

### 1.6.5 La biodiversità ectomicorrizica

Negli ultimi anni è andato aumentando il tasso di estinzione delle specie, così come si è progressivamente ridotta la biodiversità di piante e comunità microbiche, come a seguito dell'inquinamento dell'aria e del suolo, nonché per l'intensificazione dell'agricoltura e delle pratiche selvicolturali (Pimm et al., 1995). Parallelamente è aumentato l'interesse per la valutazione di quali siano gli effetti della biodiversità sul funzionamento dell'ecosistema. Se da un lato è noto che la diversità delle micorrize arbuscolari determina un aumento della produttività e diversità delle specie vegetali (van der Heijden et al., 1998), per le ectomicorrize gli studi in campo sperimentale sono più recenti (Jonsson et al., 2001).

Da vari studi effettuati in laboratorio si evidenzia come ci potrebbe essere una correlazione positiva tra differenti mescolanze di funghi micorrizici e l'assunzione di nutrienti, quali il fosforo (Koide, 2000; Smith et al., 2000). Tuttavia non è possibile trarre considerazioni generali da questi studi, vista l'artificialità delle condizioni sperimentali e degli innumerevoli fattori coinvolti (Leake, 2001). Dahlberg (2001) ha sottolineato come sia importante capire quali legami intercorrano tra l'azione di alcune specie chiave o gruppi funzionali e le funzioni ecologiche, poiché la diversità è data dall'aggregazioni di specie a livello di comunità o ecosistemi.

E' stato stimato che nel mondo esistono più di 6000 specie fungine (Molina et al., 1992), se poi si considera che molte non producono strutture riproduttive evidenti, il numero aumenta notevolmente. Fino agli anni novanta, la stima della struttura della comunità ectomicorrizica era basata sul censimento degli sporocarpi, che però ne fornisce solo un'indicazione indiretta e parziale. La validità di questo metodo è discussa per una serie di motivi: alcuni funghi simbiotici non formano il corpo fruttifero ogni anno, altri hanno sporocarpi ipogei, altri ancora non ne producono per niente, pur essendo dominanti a livello ipogeo, a ciò si aggiunge l'importanza dei fattori ambientali esogeni nel provocare la fruttificazione (Dahlberg, 2001).



Un approccio corretto di identificazione fungina comprende descrizioni morfologiche e strutturali dettagliate degli anatomotipi micorrizici (Agerer, 1987-2002). In alcuni casi la morfologia delle micorrize è specie-specifica e ne permette una chiara identificazione, mentre in altri può solo permettere il raggruppamento in anatomotipi che non rappresentano singole specie. Sono ora disponibili i metodi molecolari ad alta risoluzione che permettono l'identificazione delle singole micorrize (Dahlberg, 2001).

#### 1.6.6 *Ecologia delle comunità ectomicorriziche*

L'assorbimento di acqua e nutrienti da parte di gran parte delle specie legnose che costituiscono le foreste dell'area mediterranea e delle zone temperate e boreali è strettamente dipendente dallo stato ectomicorrizico delle radici. La porzione assorbente dell'apparato radicale è costituita dalle radici fini, che si trovano soprattutto nei primi dieci centimetri di suolo, dove il riciclo degli elementi è più intenso ed è dominante la presenza di simbiosi ectomicorrizica (Prévost e Pargney, 1985; Bakker et al, 2000; Bruns, 1995). I funghi simbiotici sviluppano un'estesa rete di ife fungine che permette alla pianta di migliorare l'assorbimento di acqua e nutrienti (Smith e Read, 1997; Garbaye e Guehl, 1997).

Nel sistema forestale la ricchezza e la diversità delle comunità ectomicorriziche è nettamente in contrasto con il numero di specie legnose : una gran varietà di specie fungine sono comunemente associate ad una singola pianta ed a livello di popolamento misto, in cui sono presenti diverse specie di piante, possono esserci centinaia di tipi ectomicorrizici (Dalberg, 2001; Horton e Bruns, 2001; Jonsson et al, 2001). Questa varietà si manifesta anche sotto l'aspetto morfologico. Il micelio fungino si può differenziare a seconda della specie sotto vari aspetti, quali la composizione-struttura chimica, che può conferire una maggiore o minore affinità con l'acqua, ed aspetti morfologici, come la ramificazione dell'apice o la formazione di aggregati (Voiry, 1981; Agerer, 1987-2002).

Ad oggi rimangono sconosciuti i fattori che permettono il mantenimento di questa varietà e non è stato ancora chiarito cosa guidi le dinamiche delle comunità ectomicorriziche (Buée et al, 2005). Numerosi studi hanno dimostrato come la struttura ectomicorrizica possa essere influenzata da fattori abiotici, quali il fuoco, il pH del suolo, la quantità di azoto presente (Wallenda e Kottke, 1998; Baar et al, 1999;



Erland e Taylor, 2002). A tal riguardo lo studio di Visser (1995) su *Pinus banksiana* ha dimostrato l'esistenza di una successione dei morfotipi con l'età del popolamento.

Ulteriori studi hanno evidenziato come ci sia una diminuzione nella diversità dei tipi ectomicorrizici con la chiusura delle chiome in popolamenti forestali di circa ventisette anni (Dighton et al., 1986; Last et al., 1987). E' inoltre importante considerare i meccanismi che guidano il progressivo sviluppo della flora micorrizica fino al raggiungimento di una stabilità nel tempo. Nei medesimi studi si è visto come esista una relazione tra l'accumulo di sostanza organica nel suolo forestale e l'aumento della biodiversità.

I cambiamenti nella qualità e quantità di substrato sono un fattore di selezione delle ectomicorrize: sopravvivono solo quei funghi che si sono adattati alle mutate condizioni esterne.

C'è quindi la necessità di studiare più nel dettaglio sia la struttura del micelio extracellulare, sia la distribuzione delle radici nel suolo. Perfino dove le micorrize sembrano concentrarsi nell'orizzonte minerale, il fatto che i funghi presenti formino per la maggior parte rizomorfe è un'indicazione di come questi abbiano la possibilità di esplorare lo strato organico e di sfruttarne i nutrienti. Questa preferenza per lo strato organico, rilevata in laboratorio, porta ad ipotizzare che i cambiamenti nella natura fisicochimica dell'orizzonte organico potrebbero anche influenzare il vigore e quindi il potenziale d'inoculo dei funghi simbiotici (Smith e Read, 1997).

La diversità d'attitudine per le condizioni del suolo è evidenziata dalla distribuzione delle simbiosi micorriziche in nicchie ecologiche (Bruns, 1995; Dickie et al., 2002). La ripartizione in nicchie dipende da vari fattori, quali la specificità dell'ospite vegetale (Molina et al., 1992), l'età della pianta (Gibson e Deacon, 1988), la distanza delle radici dal tronco delle piante e il grado di disturbo (Taylor e Bruns, 1999). Se tali agenti possono giustificare la diversità fungina tra diversi popolamenti forestali, non sono tuttavia in grado di dare spiegazione dell'elevata variabilità di funghi individuati all'interno di popolamenti monospecifici e coetanei, in cui vengono a mancare gli aspetti di diversità dell'ospite vegetale, dell'età della pianta o dei fattori di disturbo (Dickie et al., 2002).

Nei popolamenti forestali i funghi ECM hanno un'elevata variazione spaziale e tendono ad avere distribuzione aggregata. In generale si può affermare che, all'interno della comunità ectomicorrizica, pochi taxa sono ampiamente distribuiti ed incidono sulla maggior parte (> 50%) dell'abbondanza delle specie, mentre la maggior parte



delle specie si trovano solo raramente (Gehring et al., 1998; Jonsson et al., 1999; Stendell et al., 1999; Grogan et al., 2000). Questo schema di dominanza di qualche specie e rarità della maggior parte delle altre è carattere comune delle comunità, in qualunque gruppo tassonomico di organismi (Dahlberg, 2001).

Anche all'interno di una foresta monospecifica il suolo può differire spazialmente per la composizione chimica, il livello di umidità, il grado di decomposizione della sostanza organica, la temperatura e numerose altre variabili. Vari studi hanno evidenziato come i funghi ectomicorrizici abbiano diverse preferenze di substrato nutritivo se coltivati *in vitro* (Abuzinadah e Read, 1986), tuttavia non è ancora stato accertato *in situ* che questo possa portare ad una differenziazione verticale in nicchie.

Ulteriori studi in ambiente controllato hanno evidenziato come ci sia una specializzazione e complementarietà tra i morfotipi di una comunità micorrizica, che si manifesta in una serie di effetti positivi per la pianta. Viene infatti incrementato l'assorbimento idrico, vi è una maggior mobilizzazione dei nutrienti e, in conseguenza ad un maggiore assorbimento degli stessi, vengono emessi dei regolatori di crescita che hanno funzione protettiva nei confronti degli organismi patogeni presenti nel suolo (Smith e Read, 1997; Baxter e Dighton, 2001; Dahlberg, 2001).

### 1.6.7 Fattori di disturbo della micorizzazione

Numerosi sono i fattori che determinano una modificazione dello status ectomicorrizico di un popolamento forestale. La struttura della comunità ectomicorrizica è in primo luogo soggetta alle mutazioni degli agenti abiotici. In particolare la temperatura e il grado di umidità del suolo sono noti da tempo essere tra i principali fattori di disturbo (Worley e Hacskeylo, 1959; Fogel, 1980). Lo stress idrico influenza la composizione della comunità ectomicorrizica, poiché i vari morfotipi reagiscono in modo diverso. Si ha quindi una variazione nell'abbondanza dei singoli funghi all'interno della micorizosfera, in particolare è stato osservato uno slittamento di taxa dai basidiomiceti agli ascomiceti in seguito allo stress idrico (Nilson et al., 1998).

I fattori antropici influenzano la diversità microbica della rizosfera, di conseguenza quella delle associazioni ectomicorriziche. L'attività umana provoca notevoli disturbi all'ambiente. Basta pensare all'aumento dell'anidride carbonica atmosferica che si è avuto negli ultimi cinquanta anni, all'eccessiva concentrazione di ozono atmosferico, alla sempre maggior concentrazione di metalli pesanti nel suolo



per avere un'idea degli effetti diretti ed indiretti dell'uomo sulla biodiversità (Baxter et al, 1999; Erland e Taylor, 2002).

Le stesse pratiche selvicolturali hanno notevole impatto sull'ecosistema forestale e, di riflesso, sullo stato micorrizico. Numerosi studi mostrano come il taglio a raso, il passaggio del fuoco, la fertilizzazione azotata e l'aggiunta di calcio al suolo influenzino l'ambiente in tutte le sue componenti (Goodman e Trofymow, 1998; Kranabetter e Wylie, 1998; Bakker et al., 2000; Byrd et al., 2000; Le Tacon et al., 2001).

## **1.7 I boschi planiziali**

Storicamente il bosco di farnia è stato descritto come il modello forestale della Pianura Padana. La sua presenza è legata alla disponibilità d'acqua, infatti la farnia è una specie nativa dell'Europa e dell'ovest dell'Asia che cresce bene in terreni profondi alluvionali (Gellini e Grossoni, 1997) e, secondo vari autori (Bernetti, 1995), ha la capacità di tollerare prolungate inondazioni.

Essa entra a far parte di varie tipologie forestali, a seconda della disponibilità idrica e del tipo di suolo. L'associazione climax della Pianura Padana è stata ricondotta da Pignatti (1953) al *Querceto-Carpinetum boreoitalicum*, mentre Poldini (1988) la identifica nel *Carpino-Quercetum robori*. Le associazioni a *Carpinus betulis* e *Q. robur* hanno una distribuzione molto frammentata, anche a causa della scomparsa di molti habitat a seguito di fenomeni di deforestazione e di bonifica. Inoltre sono boschi di limitata estensione, in quanto il loro areale naturale è stato destinato alle colture agrarie ed agli insediamenti produttivi e abitativi.

Attualmente nelle regioni del Veneto e della Lombardia, molto spesso la presenza della farnia è limitata alle aree protette. Per quanto riguarda il Veneto, sei sono le localizzazioni principali: Carpenedo (Mestre), Olmè (Cessalto), Cavalier (Gorgo al Monticano), Lison (Portogruaro), Fagarè (Cornuda) e Basalghelle (Mansuè). Si tratta di formazioni di cedui invecchiati con prevalenza di individui di età attorno ai 50 anni, a causa della forte utilizzazione durante l'ultima guerra. Il loro grado di naturalità è limitato, frequentemente si notano carenze gestionali (Del Favero e Lasen, 1993).

La destinazione di questi boschi è oggi limitata alla conservazione per il loro pregio naturalistico, tuttavia la loro gestione è problematica poiché presentano scarsa

stabilità floristica. Non è possibile lasciare questi boschi al loro sviluppo naturale, a causa della ridotta capacità di rinnovazione della farnia. Questa situazione è determinata da una serie di cause tra cui l'abbassamento della falda freatica in seguito alle bonifiche, la mancanza di luce, la forte pressione antropica dovuta principalmente al sentieramento, e la superficie ridotta, sulla quale si sentono gli effetti dell'attività agricola limitrofa (Del Favero e Lasen, 1993).

Nei giovani querco-carpineti planiziali la struttura verticale è prevalentemente biplana, con copertura regolare scarsa; nel piano dominante si ha la prevalenza di farnia, mentre in quello dominato si ha il carpino bianco (*Carpinus betulus*). E' una specie relativamente sciafila e miglioratrice del terreno, dotata di una notevole capacità pollonifera e dalla rinnovazione abbondante.

Con l'avanzare dell'età il carpino bianco aumenta il suo raggio d'azione spingendosi negli spazi liberi dei piani superiori, lasciando sguarnito il piano inferiore che a causa della scarsità di luce s'impoverisce della vegetazione arbustiva ed erbacea (Del Favero, 2002).

Il Veneto orientale ed il Friuli meridionale sono caratterizzati dalla presenza di una fitta rete idrografica superficiale. Si distinguono fiumi di origine alpina e di risorgiva, che si sono formati su terreni di diversa composizione granulometrica. I terreni della parte alta della pianura sono di tipo ghiaioso, quindi più permeabili di quelli argillosi di bassa pianura. Per questa ragione, in corrispondenza delle linea delle risorgive si ha l'affioramento delle acque fredde di origine alpina. La penetrazione capillare di tali acque contribuisce ad alterare la temperatura caratteristica dei terreni agricoli e forestali. Queste variazioni di temperatura del suolo, a livello microclimatico sembrano essere alla base della presenza di specie erbacee, che hanno minori esigenze termiche rispetto a quelle tipiche del popolamento mesofilo planiziale (Rossi, 1991). Il clima della Pianura Padana è di tipo continentale, mentre quello della pianura veneta è tecnicamente definito come temperato umido con estate calda. I caratteri di continentalità sono infatti mitigati dalla presenza della barriera prealpina e dalla vicinanza col Mar Adriatico. Gli inverni sono quindi meno rigidi, l'escursione termica annua è più contenuta e ridotte sono le nebbie. Il regime pluviometrico presenta due massimi stagionali con il massimo assoluto in maggio o giugno; lo si definisce quindi come equinoziale primaverile (Rossi, 1991). In base alla classificazione fitoclimatica di Pavari (1916), si tratta quindi della zona del *Castanetum*.



## **1.8 Il bosco di Basalghelle o delle Vizze**

In seguito al recepimento della direttive europee "Uccelli" ed "Habitat" (79/409/CEE e 92/43/CEE), il Bosco di Basalghelle è stato riconosciuto come Sito di Interesse Comunitario e Zona di Protezione Speciale (ZPS), con riferimento alla tutela delle specie faunistiche segnalate dalla Commissione Europea tramite deliberazione di Giunta Regionale n. 2673 del 6 agosto 2004. Nella regione Veneto sono state individuate 67 ZPS, raggruppate in cinque classi omogenee: ambienti alpini e prealpini; sistemi collinari e versanti prospicienti la pianura, ambienti legati ai corsi d'acqua e alle zone umide di pianura, comunità di querceti misti planiziali, ambienti della fascia litoranea. Il Bosco di Basalghelle ricade in uno degli otto obiettivi principali di conservazione, quale il mantenimento e miglioramento dei popolamenti forestali.

### *1.8.1 Inquadramento geografico*

Il bosco di Basalghelle è situato ai confini del Veneto all'estremità orientale della provincia di Treviso, nella zona compresa tra i fiumi Piave e Livenza. L'altitudine media è di 11-12 m.sl.m, mentre le coordinate geografiche sono 45°49'49" di latitudine Nord e 12°31'20" di longitudine Est. Catastralmente è assegnato ai fogli B2 e B8 mappali n° 4-5-79-80-81. La proprietà è privata e si estende per circa 13.2 ettari. Il bosco non è soggetto a vincolo idrogeologico né a vincolo paesaggistico. E' costituito da un corpo unico di forma trapezoidale, con base minore rivolta verso Sud. Il bosco è circondato da colture agrarie (mais, prati, vigneti) ed è ubicato sulla destra orografica del torrente La Fossa (Allegato 1).

Molto probabilmente, il bosco di Basalghelle rappresenta un piccolo lembo di territorio boscato a suo tempo molto più ampio.

### *1.8.2 Parametri stazionali*

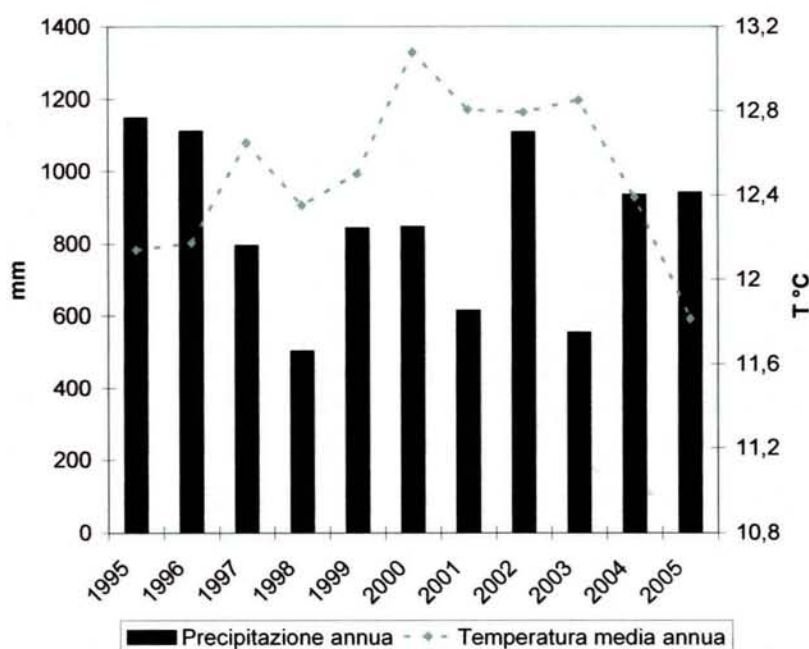
A livello climatico il bosco di Basalghelle s'inquadra nella zona di tensione fra il *Castanetum*, sottozona calda, e il *Castanetum*, sottozona fredda primo tipo (Rossi, 1991). Dall' analisi dei dati meteorologici (periodo 1989-2005) risulta essere stato il

1994 l'anno più caldo, con una temperatura media di 13.4°C; mentre il più freddo il 1991 con 11.9°C. L'annata più piovosa si è riscontrata nel 1995 con 1148 mm, mentre quella più asciutta nel 1991 con 502 mm. Di seguito si riporta una tabella riassuntiva dei principali parametri climatici.

Temperatura	°C
Media annua	12,53
Media dei minimi	7,15
Media dei massimi	18,64
Media dei mesi più caldi	28,65
Media dei mesi più freddi	6,83
Minimo assoluto	-12,3
Massimo assoluto	37,6
Escursione media annua	11,49
Escursione massima annua	32,25
Precipitazione	mm
Media annua	705
Inverno	83,22
Primavera	266,42
Estate	231,51
Autunno	264,35

**Tabella 4:** Indici termici e di precipitazione (elaborazione dei dati meteo del Co.di.TV, Consorzio Difesa Colture Agrarie Avversità Atmosferiche di Treviso)

Nel grafico si osserva l'andamento di temperatura media e di precipitazioni nel periodo 1995 – 2005. Si può notare come ad un aumento lineare della temperatura media annua, corrisponda una diminuzione lineare delle precipitazioni.



**Fig. 5:** Andamento climatico degli anni 1995-2005 (elaborazione dei dati meteo del Co.di.TV).



Dalla studio di Panighel (1985) e dalla successiva verifica nel 2005, dal punto di vista edafica il suolo è costituito da una terra bruna. Esso è caratterizzato dai seguenti orizzonti:

- O: costituito dalla lettiera indecomposta principalmente di farnia e carpino. A causa della densa copertura e del calpestio, in alcune zone del bosco è di lenta decomposizione, per il rallentarsi dei processi di mineralizzazione e di umificazione.

- A : (5 cm) è un orizzonte organico-minerale, è di consistenza molto friabile, colore bruno scuro e tessitura franco-sabbiosa. L'humus è principalmente rappresentato da mull da anellidi. Vi è la formazione di humus micogenico nelle parti più interne del bosco, in cui la densità della vegetazione favorisce il costituirsi di condizioni di minore umidità, con il conseguente peggioramento delle proprietà fisiche e un notevole rallentamento del ciclo biogeochimico degli elementi nutritivi.

- B: è l'orizzonte minerale formato dal progressivo aumento con la profondità nella componente di argilla., il cui spessore raggiunge i 70 cm. Nella parte superficiale è di struttura granulare fine, consistenza molto friabile, colore bruno-giallastro e tessitura argillosa.

Il livello inferiore non è stato rilevato, in quanto non raggiungibile con semplici attrezzature. Probabilmente raggiunge uno sviluppo massimo di 100-120 cm dalla superficie, fino ad essere limitato dalla falda freatica (Rossi, 1991).

Dalle analisi condotte in laboratorio in due zone del Bosco di Basalghelle, si sono identificate le caratteristiche principali degli orizzonti superficiali, riportate di seguito in tabella 5.

		AREA 1			AREA 4		
		O-A	A	B	O-A	A	B
umidità	g/kg	38,2	26,7	34,3	48,6	32,4	32,5
pH	adimens.	6,2	6,2	5,5	6,3	6,3	6,1
Acidità totale	Cmol(+)/kg	5,9	3,7	8,5	6,9	3,3	5,5
CSC	Cmol(+)/kg	40,7	25,4	24,6	46,2	31,4	30,7
Ca scambiabile	Cmol(+)/kg	1,8	0,9	1,0	2,0	1,2	1,2
Mg scambiabile	Cmol(+)/kg	1,0	0,6	0,8	1,3	0,9	0,9
K scambiabile	Cmol(+)/kg	0,2	<0,1	0,1	0,1	<0,1	0,1
Na scambiabile	Cmol(+)/kg	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Tasso saturazione basica	%	7,4	5,9	7,7	7,4	6,7	7,2
C organico	g/kg	42	13	12	40	17	14
N totale	g/kg	3,3	1,0	1,0	3,0	1,5	1,2
Rapporto C/N	adimens.	13	13	12	13	11	12
SO	g/kg	110	52	60	113	62	58

**Tabella 5:** Principali parametri del suolo misurati in due aree del Bosco di Basalghelle nel 2005, secondo il metodo nazionale italiano (Repubblica Italiana, 1999).

Il bosco di Basalghelle non presenta anomalie nel complesso merobiotico, da ricondurre alle terre brune, talvolta con segni di gleyficazione a causa del ristagno idrico. I valori di reazione sono normali ed il contenuto di sostanza organica varia da 52 g/kg a 113 g/Kg, mentre il rapporto C/N è compreso tra un minimo di 11 e un massimo di 13. Le caratteristiche pedologiche giustificano la presenza di un processo umogenetico di tipo zoogenico. Inoltre le condizioni igrometriche non sembrano ostacolare la formazione di mull da anellidi (Rossi, 1991).

### 1.8.3 Parametri vegetazionali

Il bosco di Basalghelle è un tipico quercu-carpinetu planiziale; tuttavia, dal punto di vista fitosociologico risulta semplificato e modificato. I trattamenti effettuati nel passato hanno determinato la condizione attuale della struttura del bosco: pur avendo un aspetto a fustaia, parte del soprassuolo arboreo deriva da rinnovazione agamica. Inoltre, durante il periodo bellico è stato utilizzato il taglio a raso, per questo motivo si presenta come un ceduo invecchiato. In base alla relazione tecnica di Panighel (1985) la densità risultava eccessiva per la farnia.

La composizione e la struttura del piano arboreo è profondamente alterata rispetto al modello climax del quercu-carpinetu; mancano infatti i tigli e la presenza dell'acero è ridotta. A causa della grafiosi l'olmo è limitato a pochi esemplari ed allo strato arbustivo.

Il piano dominante è costituito da polloni di farnia di circa sessant'anni, la cui altezza media è di 26 m ed il diametro di 49 cm. Tutti i soggetti mostrano segni di deperimento più o meno grave. Nel piano dominato è presente il carpino bianco, con esemplari che raggiungono anche altezze paragonabili a quelle della farnia.

Lo strato arbustivo è costituito principalmente da *Staphylea pinnata*, *Corylus avellana*, *Sambucus nigra*. Vi è inoltre la presenza dell'acero, *Acer campestre*. Gli strati arbustivo ed erbaceo sono molto densi, non facilitano quindi la rinnovazione della farnia. La sensibilità delle specie erbacee alle variazioni microclimatiche sono un buon indicatore delle condizioni ambientali ed edafiche.

La discreta umidità è segnalata dalla presenza di *Anemone nemorosa*, *Primula officinalis*, *Lamium orvala* e *Polygonatum multiflorum* (Panighel, 1985). Mentre l'abbondanza di *Allium ursinum* è legata a processi riduttivi del suolo (gleyficazione) in zone di ristagno d'acqua (Del Favero e Lasen, 1993).



In tabella 6 si riportano le specie censite a Basalghelle all'inizio dello studio.

<b>Strato arboreo</b>	1. <i>Acer campestre</i> L.	
	2. <i>Carpinus betulus</i> L.	
	3. <i>Quercus robur</i> L.	
<b>Strato arbustivo</b>	1. <i>Cornus sanguinea</i> L.	10. <i>Rosa arvensis</i> Hudson
	2. <i>Corylus avellana</i> L.	11. <i>Rubus caesius</i> L.
	3. <i>Crataegus monogyna</i> Jacq.	12. <i>Ruscus aculeatus</i> L.
	4. <i>Euonymus europaeus</i> L.	13. <i>Salix alba</i> L.
	5. <i>Frangula alnus</i> Miller	14. <i>Sambucus nigra</i> L.
	6. <i>Hedera helix</i> L.	15. <i>Staphylea pinnata</i> L.
	7. <i>Ligustrum vulgare</i>	16. <i>Tamus communis</i> L.
	8. <i>Prunus avium</i> L.	17. <i>Ulmus minor</i> Miller
	9. <i>Robinia pseudoacacia</i> L.	18. <i>Viburnum opulus</i> L.
<b>Strato erbaceo</b>	1. <i>Ajuga reptans</i> L.	21. <i>Lamium orvala</i> L.
	2. <i>Alliaria petiolata</i> Bieb.	22. <i>Lathyrus vernus</i> L.
	3. <i>Allium</i> sp. L.	23. <i>Leucojum vernum</i> L.
	4. <i>Allium ursinum</i> L.	24. <i>Luzula pilosa</i> L.
	5. <i>Anemone nemorosa</i> L.	25. <i>Lychnis flos-cuculi</i> L.
	6. <i>Arum italicum</i> Miller	26. <i>Lysimachia nummularia</i> L.
	7. <i>Asarum europaeum</i> L.	27. <i>Poa trivialis</i> L.
	8. <i>Asparagus tenuifolius</i> Lam.	28. <i>Polygonatum multiflorum</i> L.
	9. <i>Athirum filix-femina</i> L.	29. <i>Primula vulgaris</i> Hudson
	10. <i>Brachipodium sylvaticum</i> L.	30. <i>Pulmonaria officinalis</i> L.
	11. <i>Campanula trachelium</i> L.	31. <i>Ranunculus auricomus</i> L.
	12. <i>Carex sylvatica</i> Hudson	32. <i>Ranunculus ficaria</i> L.
	13. <i>Colchicum autumnale</i> L.	33. <i>Rumex sanguineus</i> L.
	14. <i>Convolvulus</i> sp. L.	34. <i>Silene alba</i> Miller
	15. <i>Equisetum pratense</i> Ehrh.	35. <i>Silene vulgaris</i> Moench
	16. <i>Euphorbia amygdaloides</i> L.	36. <i>Stellaria media</i> L.
	17. <i>Galium aparine</i> L.	37. <i>Symphytum tuberosum</i> Schur
	18. <i>Geranium nodosum</i> L.	38. <i>Taraxacum officinale</i> L.
	19. <i>Geum urbanum</i> L.	39. <i>Veronica chamaedrys</i> L.
	20. <i>Glechoma hederacea</i> L.	40. <i>Vinca minor</i> L.
		41. <i>Viola reichenbachiana</i> Jordan

**Tabella 6:** Elenco delle specie censite nel bosco di Basalghelle (Rossi, 1991; modificato).

Secondo lo studio di Panighel (1985), la mancanza di rinnovazione della farnia nel bosco in esame era legata a varie cause. Per prima si annoverava l'eccessiva densità dello strato arboreo ed arbustivo, che agiva limitando la disponibilità di luce ai semenzali ed, intercettando le piogge, impediva una rapida mineralizzazione ed umificazione della lettiera. Inoltre è stato rilevato un inaridimento della stazione, probabilmente dovuto all'abbassamento della falda freatica. Si aggiungevano i fenomeni di predazione del seme e danneggiamento dei semenzali da parte della fauna e l'inquinamento dell'acqua piovana e di falda.

I trattamenti effettuati negli ultimi 10 anni da parte del Servizio Forestale del Veneto sono stati indirizzati alla conservazione della naturalità del bosco. Si è quindi proceduto all'asportazione delle sole piante morte o molto deperenti, perché pericolanti.

## 2. Bibliografia

- AA. VV., 2006. Progetto DEPFAR. Indagini diagnostiche sul deperimento della farnia nel bosco del Ticino. Consorzio parco lombardo della valle del Ticino.
- Aber, J. D., Nadelhoffer, K. N., Steudler, P., Melillo, J. M., 1989. Nitrogen saturation in northern forest ecosystems. *Bioscience* 39, 378–386.
- Abuzinadah, R.A., Read, D.J., 1986. The role of proteins in the nitrogen nutrition of ectomycorrhizal plants. In: *Utilization of peptides and proteins by ectomycorrhizal fungi*. *New Phytologist* 103, 481-493
- Agerer, R., 1987–2002. *Colour Atlas of Ectomycorrhizae*. Einhorn-Verlag, Munich.
- Agerer, R., 1993. Ectomycorrhizae of *Hydnellum peckii* on Norway spruce and their chlamydospores. *Mycologia* 85, 74-83.
- Agerer, R., 1999. Anatomical Characteristics of Identified Ectomycorrhizas: An attempt towards a Natural Classification. In: *Mycorrhiza* eds. By A.Varma & B. Hock, 2<sup>nd</sup> ed. Springer Verlag Berlin Heidelberg, pp. 633-682.
- Allen, M.F., 1991. *The ecology of mycorrhizae*. Department of Biology, System Ecology Research Group, Cambridge University Press, San Diego, California
- Allen, M.F., Boosalis, M.G., 1983. Effects of two species of VA mycorrhizal fungi on drought tolerance of winter wheat. *New Phytologist* 93, 67-76
- Allen, M.F., Allen, E.B., 1986. Water relations of xeric grasses in the field. Interaction of mycorrhizae and competition. *New Phytologist* 104, 559-71
- Anic., I, Pernar, N., Seletkovic, Z., 1999. Narrow-leaved ash (*Fraxinus angustifolia*) in the structure of floodplain forest of Croatia Posavina. International Symposium on floodplain forest ecosystems in Europe, Smolenicw, Slovakia, 28 Settembre–2 Ottobre 1998. *Ekologia-Bratislava* 18, 69–81.
- Anselmi, N., 1991. Agenti di marciumi radicali e di carie connessi al deperimento delle querce. Atti del Convegno “Aspetti fitopatologici delle Querce”, Firenze 19-20 novembre 1990, 392-408
- Anselmi, N., Invernizzi, C., 1992. *Ophiostomatales* as sap stain agents in wood of declining forest trees. *Petria* 2, 119-128.
- Anselmi, N., Puccinelli, P., 1993. Studies on *Armillaria* attacks on declining oak trees. Atti del Congresso Internazionale “Recent advances in studies on Oak decline”, Selva di Fasano (Brindisi), Italia, 13-18 settembre 1992, 95-108.



- Anselmi, N., Mazzaglia, A., Tannini, A., 2000. The role of endophytes in oak decline. In: Decline of oak species in Italy. Problems and perspectives. Accademia Italiana di Scienze Forestali, Firenze
- Auge, R.M., Schekel, K.A., Wample, R.L., 1986. Greater leaf conductance of well-watered VA mycorrhizal rose plants is not related to phosphorus nutrition. *New Phytologist* 103 (1), 107-116.
- Aussenac, G., Granier, A., Bréda, N., Cochard, H., 1993. Drought induced dysfunctions of the water transport in oak trees. Proceedings of an International Congress, Recent Advances on Oak Decline, Selva di Fasano (Brindisi), Italy, 13-18 settembre 1992, 413-423.
- Baar, H., Horton, T.R., Kretzer, A.M., Bruns, T.D., 1999. Mycorrhizal colonization of *Pinus muricata* from resistant propagules after a stand-replacing wildfire. *New Phytologist* 143, 409-418.
- Babos, K., 1989. Comparative histological study of diseased and sound *Quercus petraea* stems. *Acta Botanica Hungarica* 35(1-4), 173-184
- Bakker, M.R., Garbaye, J., Nys, C., 2000. Effect of liming on the ectomycorrhizal status of oak. *Forest Ecology and Management* 126, 121-131
- Baxter, J.W., Pickett, S.T.A., Carreiro, M.M., Dighton, J., 1999. Ectomycorrhizal diversity and community structure in oak forest stands exposed to contrasting anthropogenic impacts. *Can. J. Bot.* 77, 771-782.
- Baxter, J.W., Dighton, J., 2001. Ectomycorrhizal diversity alters growth and nutrient acquisition of gray birch (*Betula populifolia*) seedlings in host-symbiont culture conditions. *New Phytologist* 152, 139-149
- Bernetti, G., 1995. *Selvicoltura speciale*. UTET, Torino, IT. 415 pp.
- Bologna, S., Chirici, G., Corona, P., Marchetti, M., Pugliese, A., Munafo, M., 2004. Sviluppo e implementazione del IV livello Corine Land Cover 2000 per i territori boscati e ambienti seminaturali in Italia. VII Conferenza Nazionale ASITA, Roma.
- Brasier, C.M., 1996. *Phytophthora cinnamomi* and oak decline in southern Europe. Environmental constraints including climate change. *Ann. Sci. For.* 53, 347-358.
- Bréda, N., 2000. Water shortage as a key factor in the case of the oak dieback in the Harth Forest (Alsation plain, France) as demonstrated by dendroecological and ecophysiological study. In: *Recent Advances on Oak Health in Europe*. Ed. By Oszako, T.; Delatour, C. Warsaw, Poland: Forest Research Institute, pp. 157-159.

- Brundrett, M., Bougher, N., Dell B., Grave, T., Malajczuk, N. 1996. Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. Australian Center for international Agricultural Research. Monograph 32, Camberra.
- Brundrett, M.C., 1999. Introduction to mycorrhizas (WWW document).URL.
- Brundrett, M.C., 2002. Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants *New Phytologist* 154 (2), 275-304
- Bruns, T.D., 1995. Thoughts on the processes that maintain local species diversity of ectomycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 170, 63-73
- Buée, M., Vairelles, D., Garbaye, J., 2005. Year-round monitoring of diversity and potential metabolic activity of the ectomycorrhizal community in a beech (*Fagus sylvatica*) forest subjected to two thinning regimes. *Mycorrhiza* 15, 235–245.
- Bulletin OEPP/EPPO. 1990, 20, 405-422
- Bussotti, F., Bruschi, P., 2000. Ecology of genus *Quercus* in Italy. In: Decline of oak species in Italy. Problems and perspectives. Accademia Italiana di Scienze Forestali, Firenze
- Byrd, K.B., Parker, V.T., Volger, D., Cullings, K.W., 2000. The influence of clear-cutting on ectomycorrhizal fungus diversity in a lodgepole pine (*Pinus contorta*) stand, Yellowstone National Park, Wyoming, and National forest, Montana. *Can. J. Bot.* 78, 149-156
- Candela, C.V., Hitchin, S., Reddy, M.S., Courmoyer, B., Marmeisse, R., Gay, G., 2002. Characterisation of a *Pinus pinaster* cDNA encoding an auxin up-regulated putative peroxidase in roots. *Tree Physiology* 22(4), 231-238.
- Cañellas, I., Del Rio, M., Roig, S., Montero, G., 2004. Growth response to thinning in *Quercus pyrenaica* Willd. Coppice stands in Spanish central mountain. *Ann. For. Sci.* 61, 243–250.
- Causin, R., Montecchio, L., Mutto Accordi, S., 1996. Probability of ectomycorrhizal infection in a declining stand of common oak. *Ann. Sci. For.* 53, 743-752.
- Cecconi, G., 1912. La tortrice delle querce in Italia (*Tortrix viridana* L.). *Boll. Lab. Zool. Gen. Agri. Portici* 6, 308-319.
- Cecconi, G., 1914. Gravissimi danni della "Tortrice delle querce" nei boschi del Veneto. *L'Alpe*, 233-237.
- Cellerino, G.P., Anselmi, N., Esposito, L., 1991. Deperimento delle querce in Campania: problematiche, agenti fungini connessi, tentativi di interventi



- selvicolture. Atti del Convegno "Aspetti fitopatologici delle Querce", Firenze, 19-20 Novembre 1990, 63-77.
- Cellerino, G.P., Anselmi, N., Esposito, L., 1993. Survey on oak decline in Campania provinces and on relevant silvicultural operations. Proceedings of the International Congress on "Recent Advances in Studies on Oak Decline", Selva di Fasano (Brindisi), Italy, 13-18 Settembre 1992, 329-336
- Cellerino, G.P., Gennaro, M., 2000. Drought as predisposing factor in oak decline. In: Decline of oak species in Italy. Problems and perspectives. Accademia Italiana di Scienze Forestali, Firenze
- Cochard, H., Bréda, N., Granier, A., Aussenac, G., 1992. Vulnerability to air embolism of three European oak species (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl., *Q. pubescens* Willd., *Q. robur* L.). Ann. Sci. For. 49, 225-233.
- Colpi, C., 1986. "Waldsterben": una patologia di nuovo tipo? Estratto da: Criteri forestali nella pianificazione del verde territoriale. A cura di Viola, F. INVET/Franco Angeli.
- Dahlberg, A., 2001. Community ecology of ectomycorrhizal fungi: an advancing interdisciplinary field. New Phytologist 150, 555-562
- Deacon, J.W., Fleming, L.V., 1992. Interaction of Ectomycorrhizal fungi In: "Mycorrhizal functioning". Ed. By Allen M.F. Chapman e Hall, New York. Pp. 358-423.
- Del Favero, R., 2002. I tipi forestali della Lombardia. Cierre, Padova.
- Del Favero, R., Lasen, C., 1993. La vegetazione forestale del Veneto II. Ed. Libreria Progetto Editore, Padova
- Dickie, I.A., Xu, B., Koide, R.T., 2002. Vertical niche differentiation of ectomycorrhizal hyphae in soil as shown by T-RFLP analysis. New Phytologist 156 (3), 527-535
- Dickson, R.E., Tomlinson, P.T., 1996. Oak growth, development and carbon metabolism in response to water stress. Ann. Sci. For. 53, 181-196.
- Dighton, J., Poskitt, J.M., Howard, D.M., 1986. Changes in I of basidiomycete fruit bodies during forest stand development: with specific reference to mycorrhizal species. Transactions of the British Mycological Society Vol 87, 163-171
- Donaubauer, E., 1998. Die Bedeutung von Krankheitserregern beim gegenwärtigen Eichensterben in Europa – eine Literaturübersicht. Eur. J. For. Path. 28, 91-98.

- Dreyer, E., 1994. Water Stress, Xylem Disfunctions and Dieback Mechanisms in European Oak Trees. STEP Research Programme CT90 0050 C, Final Report. Champenoux, France: INRA Nancy.
- Duddridge, J.A., Malibari, A., Read D.J., 1980. Structure and Function of Mycorrhizal Rhizomorphs with Special Reference to their Role in Water Transport. *Nature* 287, 834-836.
- Eichhorn, J., Paar, U., 2000. Oak decline in Europe. Methods and results of assessments in the ICP forests. In: *Recent Advances on Oak Health in Europe*. Ed. By Oszako, T., Delatour, C. Warsaw, Poland: Forest Research Institute. Pp. 41-51.
- Ellenberg, H., 1996. *Vegetation Mitteleuropas mit den Alpen*, V edn. Stuttgart, Germany: Ulmer.
- Epron, D., Dreyer, E., Bréda, N., 1992. Photosynthesis of oak trees (*Quercus petraea* [Matt.] Liebl.) during drought under field conditions: diurnal course of net CO<sub>2</sub> assimilation and photochemical efficiency of photosystem II. *Plant Cell Environ.* 15, 809-820.
- Erland, S., Taylor, A.F.S., 2002. Diversity of ectomycorrhizal communities in relation to the abiotic environment. In: van der Heijden M, Sanders I, eds. *The ecology of mycorrhizas*. Heidelberg, Germany: Springer Verlag, 163-200.
- Fellner R., Caisovà V., 1994. Ecological aspects of mycorrhizae decline and oak dying in the Czech Republic. Estratti del Convegno: "Environmental constraints and oaks: ecological and physiological aspects", Nancy (Francia), 29 agosto-1 settembre 1994
- Fernandez-Escobar, R., Gallego., F.J., Benloch, M., Membrillo, J., Infante, J., Perez de Algaba, A., 1999 Treatment of oak decline using pressurized injection capsules of antifungal materials. *Forest Pathology* 29 (1), 29-38.
- Fogel, R. 1980. Mycorrhizae and nutrient cycling in natural forest ecosystems. *New Phytologist* 86, 199-212
- Franceschini, A., Marras, F., Sechi, C., 1993. Funghi segnalati sulla quercia da sughero (*Quercus suber* L.). *Collana biologica n. 3*, Stazione sperimentare del Sughero, Tempio Pausania, Italia, pp. 138
- Franceschini, A., Corda, P., Marras, F., 2000. Fungi involved in oak decline. In: *Decline of oak species in Italy. Problems and perspectives*. Accademia Italiana di Scienze Forestali, Firenze



## Bibliografia

- Frisullo, S., Mannerucci, F., Luisi, N., 1989. Funghi cromogeni associati al deperimento delle querce. *Micologia Italiana* 18, 33-77.
- Garbaye, J., 2000. The role of ectomycorrhizal symbiosis in the resistance of forests to water stress. *Outlook Agric.* 29, 63-69.
- Garbaye, J., Guehl, J.M., 1997. Le rôle des ectomycorhizes dans l'utilisation de l'eau par les arbres forestiers. *Revue Forestière Française* 49, 110-120
- Gehring, C.A., Theimer, T.C., Whitham, T.G., Keim, P., 1998. Ectomycorrhizal fungal community structure of pinyon pines growing in two environmental extremes. *Ecology* 79, 1562-1572
- Gellini, R. Grossoni, P., 1997. *Botanica Forestale II Angiosperme*. CEDAM, Padova, IT. 373 pp.
- Gellini, R., Grossoni, P., 1998. *Botanica Forestale*. Ed CEDAM, Padova
- Gerdemann, J.W., 1968. Vesicular-arbuscular mycorrhiza and plant growth. *A Rev. Phytopathol.* 6, 397.
- Gibson, F., Deacon, J.W., 1988. Experimental study of establishment of ectomycorrhizas in different regions of birch root systems. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 91 (2), 239-251.
- Giovannetti, M., Fortuna, P., Citeresi, A.S., Morini S., Nuti, M.P., 2001. The occurrence of anastomosis formation and nuclear exchange in intact arbuscular mycorrhizal networks. *New Phytologist* 151 (3), 717-724
- Godbout, C., Fortin, J.A., 1983. Morphological features of synthesised ectomycorrhizae on *Alnus crispa* and *A. rugosa*. *New Phytologist* 94, 249-262.
- Godreau, V., Bornette, G., Frochet, B., Amoros, C., Castella, E., Oertli, B., Chambaud, F., Oberti, D., Craney, E., 1999. Biodiversity in the floodplain of Saône: a global approach. *Biodiversity and Conservation* 8, 839-864.
- Goodman, D.M., Trofymow, J.A., 1998. Comparison of communities of ectomycorrhizal fungi in old-growth and mature stands of douglas fire at two sites on southern Vancouver Island. *Can. J. For. Res.-Rev. Can. Rech. For.* 28 (4), 574-581
- Graniti, A., 2002. L'endofitismo nei funghi: un adattamento ecologico o un modo di vita? In: *Atti del Convegno Nazionale "L'endofitismo di funghi e batteri patogeni in piante arboree e arbustive"*. Sassari, 19-21 Maggio 2002, pp. 11-22.
- Grogan, P., Baar, J., Bruns, T.D., 2000. Below-ground ectomycorrhizal community structure in a recently burned bishop pine forest. *Journal of Ecology* 88, 1-13

- Guillamin, J.J., Bernard, C., Delatour, C., Belgrand M., 1985. Contribution à l'étude du dépérissement du Chêne: pathologie racineire en forêt de Tronçais. Ann. Sci. For. 42 (1), 1-22
- Hansen, E., Delatour, C., 1999. *Phytophthora* species in oak forests of north-east France. Ann. Sci. For. 56, 539–547.
- Harley, J.L., Smith, S.E., 1983. Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press, London, 482 pp.
- Hartmann, G., 1996. Ursachenanalyse des Eichensterbens in Deutschland – Versuch einer Synthese bisheriger Befunde. Mitt. Biol. Bundesanst. Land-u. Forstwirtsch. Berlin-Dahlem 318, 125–151.
- Hartmann, G., Blank, R., Lewark, S., 1989. Eichensterben in Norddeutschland – Verbreitung, Schadbilder, mögliche Ursachen. Forst Holz 44, 475–487.
- Hartmann, G., Blank, R., 1992. Winterfrost, Kahlfraß und Prachtkäferbefall als Faktoren im Ursachenkomplex des Eichensterbens in Norddeutschland. Forst Holz 47, 443–452.
- Hartmann, G., Blank, R., 1993. Etiology of oak decline in northern Germany. Hystory, symptoms, biotic and climatic predisposition, pathology. Atti del Congresso Internazionale "Recent advances in studies on Oak decline", Selva di Fasano (Brindisi), Italia, 13-18 settembre 1992, 277-284.
- Hartmann, G., Blank, R., 1998. Aktuelles Eichensterben in Niedersachsen – Ursachen und Gegenmaßnahmen. Forst Holz 53, 733–735.
- Heinonsalo, J., 2004. The effects of forestry practices on ectomycorrhizal fungal communities and seedling establishment. Department of biological and Environmental Sciences, Division of general Microbiology, Faculty of Biosciences, University of Helsinki
- Hinckley, T.M., Duhme, F., Hinckley, A.R., Richter, H., 1980. Water relations of drought hardy shrubs: osmotic potential and stomatal reactivity. Plant Cell Environ. 3, 131–140.
- Hodge, A., 2001. Arbuscular mycorrhizal fungi influence decomposition of, but not plant nutrient capture from, glycine patches in soil. New Phytologist 151 (3), 725-734.
- Horton, T.R., Bruns, T.D. 2001. The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. Molecular Ecology 10, 1855–1871



## Bibliografia

- Intini, M.G., 1991. Some common fungi on oak in Italy. Atti del Symposium Internazionale: "Oak Decline in Europe", Kornik (Poland), 15-18 maggio 1990, 129-134
- Jones, M.D., Durall, D.M., Harniman, S.M.K., Classen, D.C., Simard SW. 1997. Ectomycorrhizal diversity on *Betula papyrifera* and *Pseudotsuga menziesii* seedlings grown in the greenhouse or outplanted in single-species and mixed plots in southern British Columbia. Can J For Res 27, 1872-1889
- Jonsson, L., Dahlberg, A., Nilsson, M.C., Zackrisson, O., Karen, O., 1999. Ectomycorrhizal fungal communities in late-successional Swedish boreal forests and composition following fire. Molecular Ecology 8, 205-217
- Jonsson, L.M., Nilsson, M.C., Warle, D.A., Zackrisson, O, 2001. Context dependent effects of ectomycorrhizal species richness on tree seedling productivity. OIKOS 93 (3), 353-364
- Jung, T., Blaschke, H., Obwald, W., 2000. Involvement of soilborne *Phytophthora* species in Central European oak decline and the effect of site factors on the disease. Plant Pathology 49, 706-718.
- Klap, J. M., Oude Voshaar, J. H., De Vries, W., Erisman, J. W., 2000. Effects of environmental stress on forest crown condition in Europe. Part IV: statistical analysis of relationships. Water Air Soil Pollut. 119, 387-420.
- Klugmann, K., Roloff, A., 1999. Ökophysiologische Bedeutung von Zweigabsprüngen (Kladoptosis) unter besonderer Berücksichtigung der Symptomatologie von *Quercus robur* L. Forstw. Cbl. 118, 271-286.
- Koide, R.T., 2000. Functional complementarity in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. New Phytologist 147, 233-235
- Kormanik, P.P., 1985. Development of vesicular-arbuscular mycorrhizae in a young sweetgum plantation. Can. J. For. Res. 15 (6), 1061-1064.
- Köstler, J.N., Brückner, E., Bibelriether, H., 1968. Die Wurzeln der Waldbäume. Hamburg, Berlin, Germany: Parey.
- Kozlowski, T.T, Kramer, P.J., Pallardy, S.G., 1991. The Physiological Ecology of Woody Plants. San Diego, CA, USA: Academic Press.
- Kranabetter, J.M., Wylie T., 1998. Ectomycorrhizal community structure across forest opening on naturally regenerated western hemlock seedlings. Mycol. Res. 104, 834-840

- Landmann, G., Becker, M., Delatour, C., Dreyer, E., Dupouey, J.-L., 1993. Oak dieback in France: historical and recent records, possible causes, current investigations. In: *Zustand und Gefährdung der Laubwälder*. Ed. By Bayerische Akademie der Wissenschaften. *Rundgespräche der Kommission für Ökologie* 5. München, Germany: F. Pfeil, pp. 97–113.
- Last, F.T., Dighton, J., Mason, P.A., 1987. Successions of sheathing mycorrhizal fungi. *Trends in Ecology and Evolution* 2, 157-161
- Leake, J.L., 1994. The biology of myco-heterotrophic ("saprophytic") plants. *New Phytologist* 127, 171-216
- Leake, J.R., 2001. Is diversity of ectomycorrhizal fungi important for ecosystem function? *New Phytologist* 152, 1-8
- LeBlanc, D.C., 1998. Interactive effects of acidic depositions, drought, and insect attack on oak populations in the midwestern United States. *Can. J. For. Res.* 28, 1184-1197
- Le Tacon F., Selosse M.A., Gosselin F., 2001. Biodiversité, fonctionnement des écosystèmes et gestion forestière. Deuxième partie: inventions sylvicoles et biodiversité. *Rev. For. Fr.* 53, 56-80
- Lévy, G., Becker, M., Duhamel, D., 1992. Comparison of the ecology of pedunculata and sessile oak: radial growth in the central and northwest of France. *Forest Ecology and Management* 55, 51-63
- Luisi, N., Silletti, G.N., 1989. Danni da siccità in boschi naturali in Basilicata. *Monti e Boschi* 40 (6), 51-55.
- Luisi, N., Manicone, R., 1991. Il deperimento delle querce in Italia meridionale : tentativi di contenimento. *Italia Forestale e Montana*, 46(5), 341-356
- Luisi, N., Lerario, P., Vannini, A., 1992. Recent advances in studies on Oak decline. *Atti del Congresso Internazionale "Recent advances in studies on Oak decline"*, Selva di Fasano (Brindisi), Italia, 13-18 settembre 1992, 541 pp.
- Luisi, N., Lerario, P., Vannini, A. (eds), 1993. *Recent Advances in Studies on Oak Decline*. Bari, Italy: Università degli Studi, Dipartimento di Patologia vegetale.
- Luisi, N., Lerario, P., 2000. Silvicultural practices for oak decline control. In: *Decline of oak species in Italy. Problems and perspectives*. Accademia Italiana di Scienze Forestali, Firenze
- Manion, P.D., 1991. *Tree disease concepts*. Prentice Hall, New Jersey: 402 pp.



## Bibliografia

- Marçais, B., Caël, O., Delatour, C., 2000. Relationship between presence of basidiomes, aboveground symptoms and root infection by *Collybia fusipes* in oaks. For. Path. 30, 7–17.
- Martin, F., Cliquet, J-B., Stewart, G., 2001. Nitrogen acquisition and assimilation in mycorrhizal symbioses. Pp. 147-166. In: Lea PJ, Morot-Gaudry J-F (Eds.) Plant Nitrogen. Springer, Berlin
- Marx, D.H., 1969. Influence of Ectotrophic Mycorrhizal Fungi on Resistance of Pine Roots to Pathogenic Infections. Antagonism of Mycorrhizal Fungi to Root Pathogenic Fungi and Soil Bacteria. Phytopathology 59, 153-163
- Massicotte, H.B., Ackerley, C.A., Peterson, R.L., 1987. The root-fungus interface as a indicator of symbiont interaction in ectomycorrhizae. Can. J. For Res. 17, 846-854.
- Mather, R.A., Freer-Smith, P.H., Savill, P.S., 1995. Analysis of the Changes in Forest Condition in Britain 1989–92. Forestry Commission Bulletin no. 116. London, UK: HMSO Publications Centre.
- Meusel, H., Jäger, E., Weinert, E., 1965. Vergleichende Chorologie der zentraleuropäischen Flora. Jena, Germany: VEB G. Fischer.
- Molina, R., Massicotte, H., Trappe, J.M., 1992. Specificity Phenomena in Mycorrhizal Symbioses: Community-Ecological Consequences and Practical Implications. In: Allen MF (Ed.) Mycorrhizal Functioning, an Integrative Plant-Fungal Process. Chapman & Hall, New York
- Montecchio, L., Rossi, S., 2000. L'ectomicorizzazione: efficace mutualismo tra funghi e piante forestali. Sherwood n. 57.
- Montecchio, L., Causin, R., Rossi, S., Mutto Accordi, S., 2004. Changes in ectomycorrhizal diversity in a declining *Quercus ilex* coastal forest. Phytopathol. Mediterr. 43, 26–34.
- Mosca, E., 2003. Variazione della popolazione ectomicorizica in lecci sani e deperenti. Tesi di Laurea, Dipartimento Territorio e Sistemi Agro-Forestali, Facoltà di Agraria, Corso di Laurea in Scienze Forestali ed Ambientali, Università degli Studi, Padova
- Müller-Edzards, C., De Vries, W., Erisman, J.W. (eds), 1997. Ten Years of Monitoring Forest Condition in Europe. UN/ECE-EC Technical Background Report. Brussels, Geneva: ECUNECE.

- Muñoz López M.C., Cobos Suarez P., Martinez Saavedra G., Soldevilla Puga C., Díaz Llorente M., 1995. Micoflora y patologia del alcornoque (*Quercus suber* L.). M.A.P.A., Madrid. 328 pp.
- Newman, E.I., Reddel, P., 1987. The distribution of mycorrhizas among families of vascular plants. *New Phytologist* 106, 745–751
- Nienhaus, F., 1987. Viruses and bacteria on oak. *Österreichische Forstzeitung* 3, 64-65.
- Nilsen, P., Borja, I., Knutsen, H., Brean, R., 1998. Nitrogen and drought effects on ectomycorrhizae of Norway spruce [*Picea abies* L.(Karst.)]. *Plant Soil* 198 (2), 179-184
- Oszako, T., 2000. Oak decline in Europe's forest: history, causes and hypothesis. In: recent advances on oak health in Europe. Forest Research Institute, Warsaw
- Panighel, E., 1985. Progetto di miglioramento strutturale, provvigionale e di incremento della rinnovazione naturale.
- Pawlowska, T.E., Taylor, J.W., 2004. Organization of genetic variation in individuals of arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 427, 733-737
- Petrescu, M., 1974. Dieback of oak in Romania. *Eur.J.For.Path.* 4, 222-227
- Petrini, O., 1991. Fungal Endophytes in tree leaves. In: Andrews J.H., Hirano S.S., (eds), *Microbial Ecology on the leaves*. Springer Verlag, New York: 179-197.
- Pignatti, S., 1953. Introduzione allo studio fitosociologico della pianura veneta orientale. *Atti Ist. Bot. Univ. Di Pavia*, vol. 11, 92-258
- Pimm, S.L., Russel, G.J., Gittleman, J.L., Brooks, T.M., 1995. The future of biodiversity. *Science* 269, 347-350
- Ploiaie, P.G., Ionica M., Alexe, A., 1987. Oak decline: a disease caused by mycoplasma-like organisms? *Buletinul de Protectia Plantelor* No. 1, 13-21
- Poldini, L., 1988. La vegetazione del Carso isontino e triestino. Ed. Lint, Trieste
- Ponti, F., Baratozzi, L. 2000. Osservazioni sugli impianti di latifoglie di pregio nella pianura Emiliano Romagnola. Il Congress SISEF "Applicazioni e Prospettive per la Ricerca Forestale Italiana", Abstract book.
- Prévost, A., Pargney, J.C. 1995. Comparaison des ectomycorhizes naturelles entre le hêtre (*Fagus sylvatica*) et deux lactaires (*Lactarius blennius* var *viridis* et *Lactarius subdulcis*). Caractéristiques morphologiques et cytologiques. *Ann Sci For* 52, 131–146



- Ragazzi, A., Dellavalle Fedi, I., D'Onofrio, G., 1986. Osservazioni preliminari su un deperimento di *Quercus robur* L., *Quercus cerris* L., e *Quercus frainetto* Ten. In Italia. Atti Giornate Fitopatologiche 2, 241-252
- Ragazzi, A., Mugnai, L., Moricca, S., Vagniluca, S., Della Valle, I., 1993. Requirements and biological aspects of *Fusarium eumartii* and its possible role in oak decline in North-eastern Italian oak forests. Eur. J. For. Path. 23, 171-177
- Ragazzi, A., Vagniluca, S., Moricca, S., 1995. European expansion of oak decline: involved microorganisms and methodological approaches. Phytopathologia Mediterranea 34, 207-226
- Ragazzi, A., Moricca, S., Dellavalle, I., 1998. Status of oak decline studies in Italy and some views of the European situation. In: Disease/Environment Interactions in Forest Decline. Ed. By Cech, T. L.; Hartmann, G.; Tomiczek, C. Proc. Workshop Party IUFRO 7.02.06, March 16–21, 1998, Vienna, Austria. Vienna, Austria: Federal Forest Research Centre, p. 202.
- Ragazzi, A., Dallavalle, I., Moricca, S., Capretti, P., Raddi, P., 2000. Decline of oak species in Italy. Problems and perspectives. Accademia Italiana di Scienze Forestali, Firenze
- Ragazzi, A., Moricca, S., Dallavalle, I., Turco, E., 2000b. Italian expansion of oak decline. In: Decline of oak species in Italy. Problems and perspectives. Accademia Italiana di Scienze Forestali, Firenze
- Rai, A.N., Soderback, E., Bergman, B., 2000. *Cyanobactrium*-plant symbiosis. New Phytologist 147, 448-481
- Read, D.J., 1991. Mycorrhizas in ecosystems – nature's response to the "Law of the Minimum." In: frontiers of mycology (ed. By D.L. Hawksworth). CAB international, Wallingford, UK pp. 101-130
- Read, D.J., 1992. The mycorrhizal mycelium in Allen M.F.: "Mycorrhizal functioning". Chapman e Hall, New York pag. 102-133.
- Read, D.J., Perez-Moreno, J., 2003. Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems – a journey towards relevance? New Phytologist 157, 475-492.
- Reich, P.B., Schöettle, A.W., Stroh, H.F., Amundson, R.G., 1986. Acid rain and ozone influence mycorrhizal infection in tree seedlings. Journal of the Air Pollution Control Association 36, 724-726

- Repubblica Italiana, 1999. Approvazione dei Metodi ufficiali di analisi chimica del suolo. Decreto Ministeriale, 13 settembre 1999. Supplemento ordinario n° 185. Gazzetta Ufficiale n° 248 serie generale, 21 ottobre 1999.
- Robin, C., Desprez-Loustau, M.L., Capron, G., Delatour, C., 1998. First record of *Phytophthora cinnamomi* on cork and holm oaks in France and evidence of pathogenicity. Ann. Sci. For. 55, 869–883.
- Rösel, K., Reuther, M. (eds), 1995. Differential diagnostik der Schäden an Eichen in den Donauländern. Schlußbericht. GSF-Bericht 11 / 95. Neuherberg /München, Germany: GSF.
- Rossi M., 1991. Analisi comparata di alcuni residui boschi nella pianura veneta orientale, Tesi di laurea, Università degli studi di Padova, a.a. 1990-91
- Rygiiewicz, P.T., Bledsoe, C.S., Zasoski, R.J., 1984. Effects of ectomycorrhizae and solution pH on (<sup>15</sup>N)ammonium uptake by coniferous seedlings. Can. J. For. Res. 14, 885-892.
- Sakai, A., Larcher, W., 1987. Frost Survival of Plants. Berlin, New York: Springer.
- Schmieden, U., Wild, A., 1995. The contribution of ozone to forest decline. Physiol. Plant. 94, 371–378.
- Schopf, A., Mitterböck, F. 1991. Kronenverlichtung und Schiidlingsspektrum an Eichen in Wien, Niederosterreich und Burgenland 1987-1990. FIW-Forschungsber. 1991/3, Osterr. Ges. Waldokosystemforsch.exp.Baumforsch., Wien, 199 p.
- Schußler, A., Schwarzott, D., Walker, C., 2001. A new fungal phylum,: the *Glomeromycota* : phylogeny and evolution. Mycol. Research, 105, 1414-1421.
- Schütt, P., 1993. Oak decline in central and eastern Europe. A critical review of a little understood phenomenon. Atti del Congresso Internazionale "Recent Advances in Studies on Oak Decline", Selva di Fasano (Brindisi), Italia, 13-18 settembre 1992, 235-239
- Sen, R., 2001. Multitrophic interactions between a *Rhizoctonia* sp. And mycorrhizal fungi affect Scots pine seedling performance in nursery soil. New Phytologist 152, 543-553
- Siwecki, R., Ufnalski, K., 1998. Review of oak stand decline with special reference to the role of drought in Poland. Eur. J. For. Path. 28, 99–112.
- Skärby, L., Ro-Poulsen, H., Wellburn, F.A.M., Sheppard, L.J., 1998. Impacts of ozone on forests: a European perspective. New Phytologist 139, 109–122.



## Bibliografia

- Smith, S.E., Read, D.J., 1997. *Mycorrhizal Symbiosis*. 2<sup>nd</sup> ed. Academic Press, New York. 605 pp
- Smith, F.A., Jakobsen, I., Smith, S.E., 2000. Spatial differences in acquisition of soil phosphate between arbuscular mycorrhizal fungi in symbiosis with *Medicago truncatula*. *New Phytologist* 147, 357-366.
- Sousa Santos, M.N.D., Moura Martins, A.M., 1993. Cork oak decline. Notes regarding damage and incidence of *Hypoxylon mediterraneum*. In: *Recent Advances in Studies on Oak Decline*. Ed. by Luisi, N.; Lerario, P.; Vannini, A. Bari, Italy: Università degli Studi, Dipartimento di Patologia vegetale, pp. 115–121.
- Stendell E.R., Horton T.R., Bruns T.D., 1999. Early effects of prescribed fire on the structure of the ectomycorrhizal fungus community in a Sierra Nevada ponderosa pine forest. *Mycological Research* 103, 1353-1359
- Tamm, C.O., 1991. Nitrogen in terrestrial ecosystems: Questions of productivity, vegetational changes, and ecosystem stability. *Ecological Studies* 81, Springer, Berlin, 115 pp
- Taylor, L.D., Bruns, T.D., 1997. Independent specialised invasion of ectomycorrhizal mutualism by two non photosynthetic orchids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94, 4510-4515.
- Taylor, D.L., Bruns, T.D., 1999. Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: minimal overlap between the mature forest and resistant propagule communities. *Molecular Ecology* 8 (11), 1837-1850.
- Thomas, F.M., 2000. Growth and water relations of four deciduous tree species (*Fagus sylvatica* L., *Quercus petraea* [Matt.] Liebl., *Q. pubescens* Willd., *Sorbus aria* [L.] Cr.) occurring at Central-European tree-line sites on shallow calcareous soils: physiological reactions of seedlings to severe drought. *Flora* 195, 104–115.
- Thomas, F.M., Runge, M., 1992. Proton neutralization in the leaves of English oak (*Quercus robur* L.) exposed to sulphur dioxide. *J. Exp. Bot.* 43, 803–809.
- Thomas, F.M.; Gausling, T., 2000. Morphological and physiological responses of oak seedlings (*Quercus petraea* and *Q. robur*) to moderate drought. *Ann. For. Sci.* 57, 325–333.
- Thomas, F.M., Blank, R., Hartmann, G., 2002. Abiotic and biotic factors and their interactions as causes of oak decline in Central Europe. *For. Path.* 32, 277–307.

- Tiberi, R., 2000. Insects harmful to oaks in Italy. In: Decline of oak species in Italy. Problems and perspectives. Accademia Italiana di Scienze Forestali, Firenze
- Tiberi, R., Ragazzi, A., 1996. Oak decline studies. Programma di monitoraggio intensivo delle foreste toscane. Progetto CEE "Studies on Forest Damage", concetti, strutture e risultati, 85-87.
- Van der Heijden, M.G.A., Klironomos, J.N., Ursic, M., Moutoglis, P., Streitwolf-Engel, R., Boller, T., Wiemken, A., Sanders, I.R., 1998. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 396, 69-72
- Vannini, A., Valentini, R., Luisi, N., 1996. Impact of drought and *Hypoxyton mediterraneum* on oak decline in the Mediterranean region. *Ann. For. Sci.* 53, 753-760
- Veldmann, G., Kontzog, H.G., 2000. Waldschutzsituation 1999 / 2000 in Sachsen-Anhalt. *Allg. Forst Z./Wald* 55, 353-355.
- Visser, S., 1995. Ectomycorrhizal fungal succession in jack pine stands following wildfire. *New Phytologist* 129, 389-401
- Vivin, P., Aussenac, G., Lévy, G., 1993. Differences in drought resistance among 3 deciduous oak species grown in large boxes. *Ann. Sci. For.* 50, 221-233.
- Vogt, K.A., Grier, C.C., Meier, C.E., Edmonds, R.L., 1982. Mycorrhizal role in net primary production and nutrient cycling in *Abies amabilis* ecosystems in Western Washington. *Ecology* 63 (2), 379-380.
- Voiry, H., 1981. Classification morphologique des ectomycorhizes du chêne et du hêtre dans le nord-est de la Italie. *Eur. J. For. Path.* 11 (5-6), 284-299
- Wachter, H., 1999. Untersuchungen zum Eichensterben in Nordrhein-Westfalen. Teil 1 (1900-1950). Schriftenr. Landesforstverw. Nordrhein-Westfalen 9. Arnsberg / Germany: Forstl. Dokumentationsstelle.
- Wachter, H., 2001. Untersuchungen zum Eichensterben in Nordrhein-Westfalen. Teil 2 (1951-2000). Schriftenr. Landesforstverw. Nordrhein-Westfalen 13. Arnsberg / Germany: Forstl. Dokumentationsstelle.
- Wallenda, T., Kottke, I., 1998. Nitrogen deposition and ectomycorrhizas. *New Phytologist* 139, 169-187
- Wargo, P.M., 1988. Root vitality and mycorrhizal status on different health classes of red spruce trees. *Phytopathology* 78, 1533



## Bibliografia

- Worley, J.F., HacsKaylo, E., 1959. The effects of available soil moisture on the mycorrhizal associations of Virginia pine. *Forest Science* 5, 267-268
- Yakovlev, I.A., 2000. Impact of winter frosts on the state and quality of oak forests in the Middle Povolzhje region of Russia. In: *Recent Advances on Oak Health in Europe*. Ed. By Oszako, T.; Delatour, C. Warsaw, Poland: Forest Research Institute, pp. 193–198.
- Zimmermann, M.H., 1983. *Xylem Structure and the Ascent of Sap*. Berlin, Germany: Springer.

### 3. Obiettivi del lavoro

Il deperimento delle specie forestali è spesso associato a cambiamenti morfologici dell'apparato radicale; l'apparato radicale di una pianta deperente manifesta la presenza di patogeni radicali, una ridotta biomassa e una minor vitalità delle radici fini. Una pianta deperente evidenzia inoltre una variazione dello stato ectomicorrizico, in termini di quantità e vitalità degli apici e di fungo simbionte (Wargo, 1988; Causin et al., 1996; Montecchio et al., 2004).

E' stato dimostrato che la diminuzione degli apici micorrizzati vitali avviene alcuni anni prima del manifestarsi dei fenomeni di deperimento, permettendo così la previsione della sua evoluzione (Fellner e Caisovà, 1994; Causin et al., 1996).

L'ectomicorrizzazione è infatti il risultato di una complessa serie di interazioni dinamiche tra aspetti vegetativi, nutrizionali, fisiologici e fitosanitari ed esiste una relazione positiva tra salute della pianta ed ectomicorrizzazione (Causin et al., 1996; Montecchio et al., 2000). Lo stato micorrizico, inteso come proporzione di apici micorrizzati e specie fungine coinvolte, è un parametro idoneo per valutare la salute di una pianta o di un popolamento forestale (Montecchio e Rossi, 2000).

L'obiettivo del presente lavoro è quello di indagare le dinamiche della popolazione micorrizica associata a farnia in un bosco planiziale a seguito di un taglio di liberazione delle chiome.

Lo studio si è articolato in più fasi volte a determinare gli effetti del trattamento selvicolturale sulle piante oggetto di studio.

In particolare, sono stati monitorati a cadenza trimestrale gli effetti del trattamento sui seguenti parametri:

- vitalità e micorrizzazione degli apici radicali,
- struttura e funzionalità della comunità ectomicorrizica,
- attività enzimatica potenziale di tre anatomotipi dominanti,
- dinamica dei parametri radicali.



#### **4. Materiali e metodi, Risultati e Discussioni**

I materiali e metodi applicati in ciascuna fase del lavoro sono stati descritti in dettaglio nei capitoli da 1 a 4, così come le discussioni. Ogni capitolo è preceduto da un riassunto in italiano e francese del lavoro presentato.

Il primo capitolo è stato sottoposto a "Forest Ecology and Management", il secondo a "Mycorrhiza" e gli ultimi due sono in fase di preparazione per l'invio a riviste ISI.

## 4.1

### *Vitalità e micorrizzazione degli apici radicali*



## **Effetti di breve periodo di un diradamento sulla vitalità degli apici radicali e sulla comunità ectomicorrizica in farnie (*Quercus robur* L.) deperenti.**

### **Riassunto**

Il presente studio è stato indirizzato alla valutazione degli effetti di un trattamento selvicolturale sullo stato delle radici assorbenti in termini di vitalità e micorrizzazione degli apici. In un querceto-carpineteto planiziale deperente, sono state individuati sedici esemplari di quercia di dimensioni analoghe. Tali querce sono state suddivise in due classi di deperimento (moderatamente e severamente deperente) sulla base di un rilievo fitosanitario.

Lo stato delle radici fini, la composizione della comunità micorrizica e la sua struttura sono state analizzate prima e dopo aver alterato la densità del popolamento. Tale intervento selvicolturale è stato effettuato allo scopo di liberare le chiome di quattro piante di ciascuna classe di deperimento dalla competizione delle piante vicine.

In seguito al trattamento, le radici fini delle piante di classe più deperente presentavano una minore vitalità e micorrizzazione degli apici. Nel corso dei due anni di studio si è individuata una ricca comunità ectomicorrizica, caratterizzata dalla presenza di numerose specie rare, un terzo delle quali è stato isolato sia prima sia dopo il trattamento selvicolturale. La ricchezza della comunità micorrizica in generale è aumentata nel corso dei prelievi. Tale comportamento è stato evidenziato anche dagli indici di biodiversità, che però non hanno mostrato una differenza tra piante trattate e non trattate.

L'intervento selvicolturale non ha alterato la biodiversità della comunità ectomicorrizica ma ne ha cambiato la struttura, evidenziata da una parziale sostituzione delle specie fungine. La comunità ectomicorrizica mostra quindi un'elevata adattabilità al disturbo arrecato dall'intervento di diradamento.

## **Effet à court terme de la réduction de la compétition sur le statut ectomycorhizien d'un peuplement dépérissant de chêne pédonculé (*Quercus robur* L.)**

### **Résumé**

L'effet d'un traitement sylvicole (éclaircie) sur la structure de la communauté des ectomycorhizes a été étudié aux quatre saisons de deux années consécutives dans un peuplement dépérissant de *Q. robur* en Italie du nord. Seize chênes dominants, représentatifs de deux classes de dépérissement (huit arbres par classe) ont été choisis. L'état des racines fines, la composition spécifique et la structure des communautés d'ectomycorhizes ont été analysés avant et après avoir profondément modifié la densité locale du peuplement en abattant tous les arbres voisins de quatre arbres dans chacune des deux classes de dépérissement.

Les résultats révèlent une grande richesse de la communauté ectomycorhizienne, avec de nombreuses espèces rares: sur les 64 anatomotypes trouvés, seulement 23 étaient présents à la fois avant et après le traitement d'éclaircie, ce qui démontre que la structure de la communauté change rapidement après une perturbation.

Cependant, après une décroissance initiale, la diversité des symbiotes ectomycorhiziens était revenue à son niveau initial, ce qui montre la forte résilience de la communauté face à la perturbation.



**Short-term effect of removing tree competition on the ectomycorrhizal status of a declining pedunculate oak forest (Quercus robur L.).**

*Elena Mosca\**, *Lucio Montecchio\**, *Luca Sella\**, *Jean Garbaye\*\**

Università degli Studi di Padova, Dipartimento Territorio e Sistemi Agro-Forestali, viale dell'Università 16, I-35020 Legnaro, Italy; \*\* INRA, Interactions Arbres/Microorganismes, F-54280 Champenoux, Nancy, France.

Corresponding author: E. Mosca

fax. +39 049 8272890

e-mail: elena.mosca@unipd.it

**Abstract**

The effects of a silvicultural treatment (thinning) on the ectomycorrhizal community structure and diversity were studied each season for two years in a declining Quercus robur woodland in northern Italy. Sixteen dominant oak trees were chosen as representative of two decline classes (8 per class). Fine root status, ectomycorrhizal community composition and structure were analysed before and after drastically altering tree density by felling all the neighbouring trees of four selected plants in each decline class. The ectomycorrhizal community was found to be extremely rich, with numerous infrequent species: of the 64 anatomotypes found, only 23 were present both before and after the thinning treatment, demonstrating that community structure changes rapidly after disturbance. Following an initial reduction, 10 months after removing competition and independently of health status, the biodiversity had recovered its previous level, demonstrating the high resilience of the ectomycorrhizal community to disturbance.

**Key words**

Ectomycorrhizae; oak decline; silviculture; thinning; pedunculate oak; Quercus robur.

## 1. Introduction

Oak decline has been a well-documented phenomenon in Europe from the beginning of the 20<sup>th</sup> century, and since the 1980s has become a problem worldwide, spreading through Europe, Asia, North and South America (Ragazzi et al., 2000).

It was first reported in Germany and Switzerland in 1739 and 1850, respectively (Ragazzi et al., 1995), then in France in 1875 and 1893 (Delatour, 1983). Subsequently in the 1920s Europe was stricken by a new wave of oak decline; in Italy the regions that suffered most were the Po Plain and Apennine Mountains, where many trees aged around 50-60 years declined and died.

Decline has a complex aetiology due to the dynamic interactions between the host plant and several abiotic and biotic causes. Manion (1991) proposed a model with three categories of factors according to their action. The predisposing factors, acting in the long-term and weakening tree vitality (i.e. tree genetic characteristics, environmental changes). The short-term inciting factors, which have a more intense action leading up to the appearance of decline symptoms (i.e. frost, drought, excessive plant density and competition) and contributing factors, acting in the final stages of decline and emphasising it, such as fungal parasites and bark beetles (Schütt and Cowling, 1985; Manion and Lanchace, 1992).

Decline symptoms are visible both at canopy and trunk levels. Canopy transparency gradually increases because of the yellowing, wilting and fall of leaves, bud abscission, and reduced and delayed new leaf growth. The internodes then shorten, and numerous epicormic twigs appear along the trunk and close to the collar (Oleksin and Przybyl, 1987; Montecchio et al., 2004). In severely declining trees the branches also dry out, longitudinal cracks in the bark appear along the trunk, and several fungal parasites can be detected in both the trunk and root system (Biscogniauxia sp., Diplodia sp., Collybia sp., Armillaria sp., Phytophthora sp.) (Halmschlager, 1998; Marçais and Caël, 2000; Anselmi et al., 2002). Death may also be hastened by weakness caused by fungi that are usually endophytic and asymptomatic on healthy plants (Vannini et al., 1996; Cellerino and Gennaro, 2000).

Among the factors instigating decline, inadequate silvicultural practices that fail to control competition between trees play an important role (Vogt, 1993; Burke and Raynal, 1994; López et al., 1998; Sword et al., 1998a, 1998b), but little is known on their effects in declining oak forests (Luisi and Manicone, 1991), and even less at



root level, where decline is often associated with both a decrease in biomass and vitality of fine roots, and a significant change in the ectomycorrhizal community composition (Zak, 1964; Schütt et al., 1985; Wargo, 1988; Perrin and Estivalet, 1990; Montecchio et al., 2004).

Studies on non-declining oaks demonstrated a marked increase in individual transpiration after thinning, as a consequence of higher water and energy availability (Bréda et al., 1995b), and several researches on non-declining conifers showed that thinning increases tree growth by apportioning the available soil water among fewer trees (Black et al., 1980, Morikawa et al., 1986; Aussenac and Granier, 1988), and also reducing soil water stress as a consequence of a reduction in both canopy interception and stand transpiration (Zahner, 1968).

Many studies also report that the ectomycorrhizal community diversity greatly alters after a silvicultural treatment such as a clear-cut or severe thinning (Harvey et al., 1980; Herr et al., 1994; Hagerman et al., 1999a; Ballard, 2000; Byrd et al., 2000; Jones et al., 2003; Buée et al., 2005; Smith et al., 2005).

The aim of this study was to describe ectomycorrhizal diversity in a declining Quercus robur forest to determine its responses to removing competition from trees. Root tips vitality and their mycorrhization degree were measured each season, and the ectomycorrhizal community composition was examined in trees at two decline levels, in order to determine if its short-term structure and species richness changes according to silvicultural treatment and decline level.

## 2. Materials and methods

### 2.1 Experimental site

The study site was in Bosco di Basalghelle, a 13 ha relict patch of woodland on the flat alluvial plain of the Po River in the province of Treviso (northern Italy, 45° 49' N; 12° 31' E; 11-12 m a.s.l.). This region was at one time covered by forests, but Bosco di Basalghelle is now surrounded by ditch-drained farmland and vineyards. The 60 year-old stand has regenerated from coppice after clear-cutting. The main storey of Quercus robur (pedunculate oak, 42% of total basal area) is accompanied by an understorey of Carpinus betulus (hornbeam, 36%) and miscellaneous hardwood

species. Most oaks show symptoms of decline and dieback, which is a common occurrence in the region (Causin et al., 1996; Montecchio et al., 2004).

Table 1 and Fig. 1 show the mean climate parameters of the site over the past 15 years (1989-2005) and during the investigation period (2004-2006), respectively.

The brown soil with a typical mull-type humus has a 5 cm-thick, dark brown loamy A<sub>1</sub> horizon, on top of a deep clayey and mottled B horizon. Table 2 lists its chemical properties.

#### 2.2 Experimental design and sampling pattern

Sixteen dominant oak trees of similar dimensions (about 50 cm in diameter at breast height and 30 m tall), in a homogenous area of soil, were chosen to represent two contrasting decline classes according to the following criteria: canopy transparency, leaf discoloration, presence and density of epicormic branches, longitudinal cracks in the bark and basidiocarps of *Armillaria* sp. At the base of the trunk (Halmschlager, 1998; Bruhn et al., 2000; Marçais et al., 2000). The two classes were 0 (moderately declining trees) and 1 (severely declining trees).

In July 2004, eight trees (four in each decline class) were freed from competition by felling all neighbouring trees within a radius of 8 m. The experimental design was thus completely factorial, combining two factors at two levels: decline class (1 or 0) · competition-free treatment or not (T or NT), with four replicates (trees).

The fine roots of the 16 studied trees were sampled each season: April, July, October 2004, January, April, July, October 2005 and January 2006 (sampling dates 1 to 8, respectively). For each tree, 12 cylindrical soil cores (10 cm deep, 2.2 cm in diameter) were extracted in the four cardinal directions (N, S, E, W) at three distances from the base of the trunk (0.5, 1 and 1.5 m). On each sampling date, the sampling positions were shifted 10 cm laterally in an anticlockwise direction from the previous holes. The samples were stored frozen in plastic bags at  $-10 \pm 1$  °C, prior to processing as follows: the soil cores were kept at room temperature for 6 hours and then soaked in sodium hexametaphosphate 1% for one hour in order to disperse the clay, then gently washed in tap water on a 2 mm mesh sieve. All recovered fine roots (fragments at least 1 cm long) were submerged in water in Petri dishes and observed under a stereomicroscope (x 10-50).



### 2.3 Quantitative description of the fine root and ectomycorrhizal status of the trees

The first apex of each root piece was examined to determine its vitality, any mycorrhization and, when present, the ectomycorrhizal anatomotype (see below). When the first apex was not fully developed or damaged, the next one was examined. According to their turgidity and compactness, all observed tips were classified as vital, mycorrhizal or not (V), mycorrhizal, vital or not (M) and mycorrhizal vital (MV), as proposed by Agerer (1991) and Baar and De Vries (1995). Ten apexes were examined from each soil core. After counting the total number of tips in each category (V, M, MV), the probability of finding tips “vital, mycorrhizal or not” (pV), “mycorrhizal, vital or not” (pM) and “mycorrhizal vital” (pMV) was determined considering a single tip as a replicate. The sampling pattern provides data with a binomial distribution. The significance of the relationships between the different variables (pV, pM, pMV) was tested by the  $\chi^2$  test with the Yates' correction (SAS Institute, 1999–2001).

To verify the effects of the competition-free treatment and decline class on tip vitality, pV values were transformed with  $\arcsin(x)/100$  to normalise data distribution and then analysed by a mixed model (mixed procedure; SAS System, SAS Institute, Cary, NC, USA). The variables were trees, competition-free treatment, sampling date, decline class and sampling distance. The mixed model took into account a co-variable effect of the repeated measurements (sampling dates) on the same subject (tree\*distance) and it supposed a random effect in each area (block=class\*treatment).

### 2.4 Qualitative description of the ectomycorrhizal status of the trees

Ectomycorrhizal anatomotypes were classified morphologically using the available literature (Agerer, 1987–2002; Agerer and Gronbach, 1988; Brand, 1991; Haug and Pritsch, 1992; Palfner, 1995; Fischer and Agerer, 1996; Goodman et al., 1996–1998; Müller et al., 1996; Agerer, 1997; Jakucs et al., 1997; Jakucs et al., 1998; Cairney and Chambers, 1999; Azul et al., 2001; Jakucs and Beenken, 2001; De Román et al., 2002; Agerer and Rambold, 2004–2005).

For every unidentified anatomotype, 3 apexes were frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C prior to molecular identification. DNA was extracted according to the

Gardes and Bruns protocol (1993). PCR amplification of the Internal Transcribed Spacer (ITS) region of the nuclear ribosomal DNA was performed on a Gene Amp 9600 thermocycler (Perkin-Elmer Instruments, CT, USA) using the fungal-specific primer pair ITS1F and ITS4 (Gardes and Bruns, 1993). In order to detect successful PCR reactions, a 0.9% agarose electrophoresis gel in TBE 1% (Tris buffer EDTA) was stained with ethidium bromide (BET, 2  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ; Roche, France). The molecular weight corresponding to each band was estimated with a 1 kb mass ladder (Gibco BRL, France). The amplification products were purified using the Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (PROMEGA) following the manufacturer's instructions, and sequenced with the primers ITS1F and ITS4. The sequences obtained were compared with those in the NCBI (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST>) and UNITE (<http://unite.ut.ee>) databases. According to Landeweert (2003), sequence taxon categories were assigned as follows: sequence similarity of  $\geq 99\%$ , identification to species level; sequence similarity of 95 to 99%, identification to genus level; sequence similarity of  $< 95\%$ , identification to family or ordinal level.

Anatomotypes unidentified by morphological or molecular tools were classified by an alphanumeric code (Emxx). All specimens were preserved in FEA (ethyl alcohol 50%; glacial acetic acid 100%; formaldehyde 40%) solution and stored in the TeSAF departmental herbarium, University of Padova.

To characterise the ectomycorrhizal community and evaluate the effect of silvicultural treatment on its structure the Simpson and Shannon indexes were calculated. These indexes were obtained using the abundance of each anatomotype for each set of trees (class 0 and class 1 not-thinned and class 0 and class 1 thinned) at each sampling date.

The index differences between treatments, decline class and sampling dates were tested with multifactor ANOVA, and the Tukey test was used to detect differences between means (procedure ANOVA, MEAN statement; SAS System, SAS Institute, Cary, NC, USA).

At each sampling date, the abundance of each anatomotype was calculated for every root sample of each tree as its proportion of the total number of apexes analysed in each sample (10 apexes). This data was statistically analysed as follows: a multivariate analysis (STEPDISC procedure through the stepwise method; SAS System, SAS Institute, Cary, NC, USA) was used to define which ectomycorrhizal anatomotypes best reveal differences among the four sets of trees (two decline



classes - competition-free or not). Another multivariate analysis (CANDISC procedure with canonical discriminant analysis; SAS System, SAS Institute, Cary, NC, USA) was then performed in order to determine the relationships between the presence of the different ectomycorrhizal anatomotypes and decline class or competition status. Test statistical significance was assessed by means of both Wilks' Lambda (likelihood ratio criterion) multivariate analysis and the associated F Fisher test. Mahalanobis' squared distance (Anderson, 1984) was used to compare the means of each set of trees.

## 2. Results

Fig. 2 shows a similar general trend for the three descriptors of root vitality and ectomycorrhizal status pV, pMV and pM. Among untreated trees, the values were usually significantly lower for the most declining trees (five sampling dates out of eight). This was not so among treated trees: when significant, the differences were much lower; a positive difference was even found for pV and pMV in Apr 2005.

The competition-free treatment had a significant negative effect in all cases (except for pM in Oct and Jan 05), the impact generally being higher in the least declining trees and for the variables pV and pMV.

A mixed model analysis of the effects of decline class and treatment on tip vitality rates (pV) is reported in Table 3. The only factors which have significant impact on pV are decline class and thinning treatment, negative in both cases (Fig. 2). The interaction between sampling date and decline class is also significant. These general responses are independent of the direction and sampling distance from the trees (data not shown).

Morphological and molecular investigations revealed a total of 64 anatomotypes. Of these, 18 were assigned to family or ordinal level (Helvellaceae, Pezizaceae, Russulaceae, Sebacinaceae, Thelephoraceae and Tuberales), 21 to genus (Genea sp., Inocybe sp., Peziza sp., Entoloma sp., Russula sp. And Sebacina sp.), 8 to species (Cenococcum geophilum, Clavulina cinerea, Genea hispidula, Sebacina helvelloides, S. incrustans, Tomentella sublilacina, Tuber aestivum and Xerocomus lanatus) and 4 to ectomycorrhizae previously described in detail (Quercirhiza

argenteobrunneola, Q. internangularis, Q. squamosa and Q. stellata), while 13 remained unidentified (Table 4).

The mean relative frequencies of each anatomotype over the two-year period for each set of trees (treatments) is shown in Table 5. Before thinning (i.e. Apr and Jul 04), eight anatomotypes had a relative frequency of more than 5%: in decline class 0 Clavulina cinerea, Inocybe sp. I, Russula sp. I, Tomentella sp. I and T. sublilacina accounted for more than 56% of the mycorrhizal tips. The same species, except for Russulaceae I instead of Russula sp., plus Lactarius sp. I and EM2, accounted for more than 68% of the mycorrhizal tips in decline class 1.

Eight months after thinning (Apr 05 and Jul 05) Clavulina cinerea showed a relative frequency of more than 5% in the untreated trees of both decline classes, but in the treated ones only those of decline class 1. In the untreated trees of decline class 1 Cenococcum geophilum occurred with the same relative frequency than before treatment, but with a higher value (3.18 vs 7.80) in the treated trees of the same class. In general, the occurrence of Inocybe sp. I decreased in the untreated trees of both decline classes. Both Lactarius sp. I and EM2 were observed with a double relative frequency in the treated trees belonging to decline class 1 than in untreated ones of the same class. Tomentella sp. I appeared in all treatments with a high relative frequency, whereas T. sublilacina was more frequent in the treated trees of decline class 0. Russulaceae I and Sebacina helvelloides had a lower relative frequency in the treated trees of decline class 1 than in the untreated ones.

After thinning (i.e. Oct 04, Jan, Apr, Jul and Oct 05 and Jan 06), the anatomotypes with a higher than 5% relative frequency in the treated trees of both decline classes were EM2, Lactarius sp. I, Tomentella sp. I and T. sublilacina. Inocybe sp. I was also observed, but only in plants ascribed to class 0. All these anatomotypes accounted for more than 43 and 47% of the observed mycorrhizal tips in decline class 0 and decline class 1, respectively.

In the untreated trees of decline class 0 Clavulina cinerea, Russulaceae I, Tomentella sp. I and T. sublilacina were responsible for 44% of mycorrhizal tips. These same species, except for Russulaceae I instead of Sebacina helvelloides, plus EM2 and Lactarius sp. I accounted for more than 53% in the untreated trees of decline class 1.

Two anatomotypes (EM4, Genea sp. I) were found in both treatments, but were observed only in the treated trees belonging to class 1.



In Table 6, the anatomotypes which proved to be statistically discriminating in the Stepwise analysis between decline classes and between treatments are indicated with a footnote. The total number of discriminating anatomotypes increased from the first four sampling dates (7, 5, 7 and 8 anatomotypes, respectively) to the last four (14, 18, 20 and 24). One (EM2) was found on all sampling dates and was statistically discriminating on 6 (Apr, Oct 04, Jan, Apr, Jul 05, Jan 06). Russulaceae I and Sebacina helvelloides were discriminating on 5 sampling dates (Jan, Apr, Jul, Oct 05, and Jan 06). Genea hispidula and EM3 characterised only the first sampling date, while Inocybe sp. I was found on all dates, but was discriminating only on Apr 04 and Jan 06. Laccaria sp. And Lactarius sp. I were always present, but never discriminating at the same time.

The Simpson and Shannon indexes mean values at each sampling date are also reported in Table 6. The Simpson index did not change with either decline class or treatment, only the statistical difference between sampling dates being relevant (F value=7.24 and  $P < 0.0002$ ). The Tukey test showed the lowest Simpson's value in Oct 04 (D=0.859) and the highest in Oct 05 (D=0.955).

The Shannon index changed with both sampling date (F=16.43 and  $P < 0.0001$ ) and decline class (F=5.35 and  $P = 0.024$ ). The Tukey test showed the lowest value in Oct 04, but not statistically different from those measured in Apr, Jul 04 and Jan 05. The highest index was measured in Oct 05 (H=4.752), but was not statistically different from the values measured in Apr and Jul 05 and Jan 06. Decline class 0 had a generally higher index value than class 1 (H=4.110 and 3.888, respectively).

Multivariate analysis of variance demonstrated that on each sampling date after the thinning treatment, discriminating anatomotypes occurred in the four treatments with different relative abundance. Wilk's Lambda showed high statistical significance among sets of trees (Oct 04  $\lambda = 0.724$ , Jan 05  $\lambda = 0.630$ , Apr 05  $\lambda = 0.449$ , Jul 05  $\lambda = 0.376$ , Oct 05  $\lambda = 0.634$  and Jan 06  $\lambda = 0.327$ ;  $P < 0.0001$ ). The means of each pair of sets of trees were compared with the Mahalanobis squared distances and are shown in Table 7.

With rare exceptions, both decline class and treatment had a significant effect on the ectomycorrhizal community structure throughout the observation period.

The canonical analysis demonstrated that the 4 treatments were clearly characterised by different ectomycorrhizal community structures, which was more evident on the later sampling dates. The effect of the thinning on the most declining

trees was particularly discriminating along axis 1. Fig. 3a shows this distribution for the last sampling date.

The relative abundance of the discriminating anatomotypes collected on Jan 06 for each treatment is shown in Fig. 3b. Some anatomotypes were common to all treatments but with different relative abundance: Russulaceae I and Inocybe sp. II were most abundant in decline class 0 independently of treatment, while Lactarius sp. I and EM2 were more frequent in trees belonging to the severe decline class. Sebacina helvelloides, Pezizales I and Inocybe sp. IV were observed in the untreated trees of both decline classes. Russulaceae II and Peziza sp. I were detected only in decline class 0, while EM4 and EM12 characterized class 1. In treated trees Thelephoraceae IV was found in both decline classes, whereas Peziza sp. II, Tuber sp., Byssocorticium sp. And Sebacina incrustans were present only in decline class 0 and EM1 only in class 1.

### 3. Discussion and Conclusions

The research, conducted in a declining pedunculate oak woodland to verify if there is a short-term root change in root tips vitality and ectomycorrhization after competition-free treatment and according to decline status, demonstrated that the fine roots of the most declining trees have a lower proportion of vital and ectomycorrhizal tips, confirming the importance of these two descriptors as indicators of root health (Wargo, 1988; Fellner and Caisova, 1994; Causin et al., 1996; Montecchio et al., 2004).

The study also revealed that a thinning treatment to free individual trees from the competition exerted by their neighbours, led to a quantitative reduction in the same descriptors. This result was rather unexpected, as it had been hypothesized that reduced competition for space, water and nutrients would permit the roots to develop better and produce a higher proportion of vital and ectomycorrhizal tips.

This could have three possible explanations, acting alone or combined. Firstly, water and nutrients may not be limiting factors for tree health in this woodland. This is supported by the facts that the soil is eutrophic, most of the rain falls in summer and the water table is shallow, as testified to by the dense network of drainage ditches in the surrounding farmland. Another possible explanation linked to soil water is the



reduction of local evapotranspiration by thinning, and the induction of anoxic conditions that might damage the roots of the remaining trees. In support of this hypothesis, Bréda et al. (1995a) noted that water availability improved in a thinned stand of Quercus petraea because of the decrease in both interception of water by leaves and transpiration.

Secondly, the short time-span of our observations (less than two years after thinning) could reveal the stressed status of the remaining trees prior to reaching a new equilibrium. Unfortunately there are few examples in the literature for comparison. The effects of clear-cutting, fire or thinning (Harvey et al., 1980; Herr et al., 1994; Visser, 1995; Hagerman et al., 1999a; Ballard, 2000; Byrd et al., 2000; Jones et al., 2003; Buée et al., 2005; Smith et al., 2005) was usually studied over several years after the silvicultural treatment. In our study its short-term effect was manifest: a reduction in vitality and mycorrhization became apparent soon after thinning.

Thirdly, the result could be affected by dead roots of neighbouring felled trees in the sampled soil cores. However, this is highly improbable, as live mycorrhizal tips can survive in the roots of cut trees for up to three years after clear-cutting (Hagerman et al., 1999b). Furthermore, tip vitality was found to be unaffected by sampling distance, in contrast to fine root biomass, which is known to decrease with increasing distance from the trunk (Bauhus and Bartsch, 1996; Taskinen et al., 2003).

From a qualitative point of view, the research confirmed that the overall ectomycorrhizal community diversity was consistent with other studies (Montecchio et al., 2004; Buée et al., 2005). In our declining stand, 64 ectomycorrhizal anatomotypes were found over a two-year period, with ectomycorrhizal richness generally being seasonal and at its maximum in October, as observed by Mineo and Majumdar (1996) in two Quercus alba and Q. rubra forests.

The Simpson and Shannon indexes were unaffected by thinning treatment, showing a high resilience of the ectomycorrhizal community to the disturbance. Nonetheless, there were fewer Tomentella sp. I and Thelephoraceae I after the treatment and other rare ectomycorrhizae (Thelephoraceae V, Tomentella sp. III, Tomentella sp. II) were observed, suggesting an ability to adapt to environmental stress (Harley and Smith, 1983; Agerer, 1999; De Román and De Miguel, 2005).

In terms of health status, Shannon's index showed a higher value in the less declining plants, with Cenococcum geophilum, Inocybe sp. II, Russulaceae,

Sebacinaceae and Thelephoraceae dominating all communities. This is consistent with the findings of Dahlberg (2001) and Peter et al. (2001).

The silvicultural treatment therefore altered the relative species abundance in the ectomycorrhizal community mainly according to the health status of the plants. Prior to thinning, the ectomycorrhizal community structure differed in the two decline classes, with higher biodiversity in the less declining trees. Eighteen months later the difference between decline classes persisted only in the untreated trees, while it was no longer significant in the treated ones.

At the same time, the distinction between untreated and treated trees belonging to the severe decline class was significant, demonstrating that the relative abundance of 20 anatomotypes can distinguish between treated and untreated trees.

Furthermore, only 21 of the anatomotypes detected were present in both decline classes, while the occurrence and abundance of those assigned to a particular class changed with the decline status, increasing in number and decreasing in frequency. The results of this study show that the silvicultural treatment did not affect ectomycorrhizal diversity (in terms of the Shannon and Simpson indexes) but changed the community structure, due to several fungal species being replaced by others, which were probably more adapted to the new environmental conditions.

An understanding of the ecological features determining this “adaptive diversity” in ectomycorrhizal communities is thus of major importance for assessing the resilience of ecosystems within the context of global climate change (Dahlberg, 2001).

Further investigations are essential to extend the information on the successional structure of the ectomycorrhizal community of declining pedunculate oaks, and to verify the effect of thinning treatments on decline recovery.

#### Acknowledgements

This work was partially funded by the Marie Curie fellowship Program (contract n° QLK5-CT-2000-60046).



## References

Agerer R., 1987–2002. *Colour Atlas of Ectomycorrhizae*. Einhorn-Verlag, Munich.

Agerer, R., 1997. *Entoloma sinuatum* (Bull.: Fr.) Kummer + *Salix* spec. *Descr. Ectomyc.* 2, 13–18.

Agerer, R., 1991. Characterisation of ectomycorrhizae. In: Norris, J.R., Read, D.J., Varma, A.K., (Eds.), *Methods in Microbiology: Techniques for the Study of Mycorrhiza*, vol 23. Academic Press, London, pp. 25–73.

Agerer, R., Rambold, G., 2004–2005. DEEMY – a DELTA-based system for characterisation and Determination of EctoMYcorrhizae. Institute for Systematic Botany, Section Mycologie, University of München.

Agerer, R., Gronbach, E., 1988. *Cenococcum geophilum*. In: Agerer, R. (Ed.), *Colour Atlas of Ectomycorrhizae*, plate 11. Einhorn Verlag, Schwäbisch Gmünd.

Agerer, R., 1999. Anatomical characteristics of identified ectomycorrhizas: an attempt towards a natural classification. In: Varma, A., Hock, B. (Eds.), *Mycorrhiza. Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology*, 2<sup>nd</sup> ed. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 633–682.

Anderson, T.W., 1984. *An introduction to Multivariate Statistical Analysis*, 2<sup>nd</sup> ed. John Wiley and Sons, New York.

Anselmi, N., Cellerino, G.P., Franceschini, A., Granata, G., Luisi, N., Marras, F., Mazzaglia, A., Mutto Accordi, S., Ragazzi, A., Vannini, A., 2002. Studi sull'endofitismo di patogeni fungini di debolezza implicati nel deperimento delle querce in Italia. In: Franceschini A., Marras F. (Eds.), *Proceeding of SIPaV/AIPP Congress. L'endofitismo di funghi e batteri patogeni in piante arboree ed arbustive*. 19–21 May 2002, Sassari Tempio Pausania, Italy, pp. 6–7.

#### 4.1 Vitalità e micorrizzazione degli apici radicali

Aussenac, G., Granier, A., 1988. Effects of thinning on water stress and growth in Douglas-fir. *Can. J. For. Res.* 18, 100–105.

Azul, A. M., Agerer, R., Freitas, H. 2001. "Quercirhiza internagularis" + Quercus suber L. *Descr. Ectomyc.* 5, 79–83.

Baar, J., De Vries, F.W., 1995. Effects of manipulation of litter and humus layers on ectomycorrhizal colonization potential in Scots pine stands of different age. *Mycorrhiza* 5 (4), 267–272.

Ballard, T.M., 2000. Impact of forest management on northern forest soils. *For. Ecol. Manage.* 133, 37–42.

Bauhus, J., Bartsch, N., 1996. Fine-root growth in beech (Fagus sylvatica) forest gaps. *Can. J. For. Res.* 26, 2153–2159.

Byrd, K.B., Parker, V.T., Bogler, D.R., Cullings, K.W., 2000. The influence of clear-cutting on ectomycorrhizal fungal diversity in a lodgepole pine (Pinus contorta) stand, Yellowstone National Park, Wyoming and Gallatin National Forest, Montana. *Can. J. Bot.* 78, 149–156.

Black, T.A., Tan, C.S., Nnyamah, J.U., 1980. Transpiration rate in Douglas-fir trees in thinned and unthinned stands. *Can. J. Soil Sci.* 60, 625–631.

Brand, F., 1991. Genea hispidula. In: Agerer, R. (Ed.), *Colour Atlas of Ectomycorrhizae*, plate 57. Einhorn Verlag, Schwäbisch Gmünd.

Bréda, N., Granier, A., Aussenac, G., 1995a. Effects of thinning on soil and tree water relations, transpiration and growth in an oak forest (Quercus petraea (Matt.) Liebl.). *Tree Physiol.* 15, 295–306.

Bréda, N., Granier A., Barataud F., Moyne C., 1995b. Soil water dynamics in an oak stand: soil moisture, water potentials and root water uptake. *Plant Soil* 172, 17–27.



Bruhn, J.N., Wetteroff, J.J., Mihail, J.D., Kabrick, J.M. and Pickens, J.B., 2000. Distribution of Armillaria species in upland Ozark Mountain forests with respect to site, overstory species composition and oak decline. *Eur. J. For. Path.* 30, 43–60.

Buée, M., Vairelles, D., Garbaye, J., 2005. Year-round monitoring of diversity and potential metabolic activity of the ectomycorrhizal community in a beech (Fagus sylvatica) forest subjected to two thinning regimes. *Mycorrhiza* 15 (4), 235–245.

Burke, M.K., Raynal, D.J., 1994. Fine root growth phenology, production and turnover in a northern hardwood forest ecosystem. *Plant Soil* 250, 141–153.

Cairney, J.W.G., Chambers, S.M., 1999. Ectomycorrhizal Fungi: key genera in profile. Springer-Verlag, New York, p. 369.

Causin, R., Montecchio, L., Mutto Accordi, S., 1996. Probability of ectomycorrhizal infection in a declining stand of common oak. *Ann. Sci. For.* 53, 743-752.

Cellerino, G.P., Gennaro, M., 2000. Drought as predisposing factor in oak decline. In: Ragazzi, A., Dallavalle, I., Moricca, S., Capretti, P., Raddi, P. (Eds.), *Decline of Oak Species in Italy. Problems and Perspectives*. Università di Firenze, Concilio Nazionale di Ricerca, Accademia Italiana di Scienze Forestali, Firenze, Italy, pp. 157–175.

Dahlberg, A., 2001. Community ecology of ectomycorrhizal fungi: an advancing interdisciplinary field. *New Phytol.* 150, 555–562.

Delatour, C., 1983. Les dépérissement de chênes en Europe. *Rev. For. Fr.* 35, 265–281.

De Román, M., Agerer, R., De Miguel, A., 2002. "Quercirhiza stellata" + Quercus ilex L. Subsp. Ballota (Desf.) Samp. *Descr. Ectomyc.* 6, 19–24.

#### 4.1 Vitalità e micorrizzazione degli apici radicali

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 (6), 471–482.

Fellner, R., Caisová V., 1994. Ecological aspects of mycorrhizae decline and oak dying in the Czech Republic. In: Proceeding of Environmental Constraints and Oaks: ecological and physiological aspects. 29 August–1 September 1994, Nancy, France, p. 142.

Fischer, C. R., Agerer, R., 1996. "Quercirhiza argenteobrunnea" + Quercus ilex L. *Descr. Ectomyc.* 1, 101–105.

Gardes, M., Bruns, TD., 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – applications to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecol.* 2 (2), 113–118.

Goodman, D.M., Durall, D.M., Trofymow, J.A., Berch, S.M. 1996–1998. A manual of concise descriptions of North American ectomycorrhizae: including microscopic and molecular characterization. *Mycologue Publications*, B.C. Min. of For., and the Can. For. Serv., P.F.C, Victoria, B.C.

Hagerman, S.M., Jones, M.D., Bradfield, G.E., Gillespie, M., Durall, D.M., 1999a. Effect of clear-cut logging on the diversity and persistence of ectomycorrhizae at a subalpine forest. *Can. J. For. Res.* 29 (1), 124–134.

Hagerman, S.M., Jones, M.D., Bradfield, G.E., Sakakibara, S.M., 1999b. Ectomycorrhizal colonization of Picea engelmannii x Picea glauca seedlings planted across cut blocks of different sizes. *Can. J. For. Res.* 29 (12), 1856–1870.

Halmschlager, E., 1998. The possible role of Armillaria sp. And Phytophthora sp. In the oak decline complex. In : Cech T, Hartmann G, Tomiczek C. (Eds.), *Proceedings of the Division 7 IUFRO Working Party, Disease/Environmental Interactions in Forest Decline*. 16-21 March 1998, Vienna, Austria, pp. 49–56.



Harley, J.L., Smith, S.E., 1983. Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press, London, p. 482.

Harvey, A.E., Larsen, M.J., Jungensen, M.F., 1980. Partial cut harvesting and ectomycorrhizae: early effects in Douglas-fir-larch forests of northwest Montana. Can. J. For. Res. 10, 436–440.

Haug, I., Pritsch, K., 1992. Ectomycorrhizal types of spruce (Picea abies (L.) Karst.) in the Black Forest. A microscopical atlas. Kernforschungszentrum Karlsruhe.

Herr, D.J., Dunchesne, L.C., Tellier, R., McAlpine, R.S., Peterson, R.L., 1994. Effect of prescribed burning on the ectomycorrhizal infectivity of a forest soil. Int. J. Wildland Fire 4, 95–102.

Jakucs, E., Agerer, R., Bratek, Z., 1997. "Quercirhiza fibulocystidiata" + Quercus spec. Descr. Ectomyc. 2, 67–71.

Jakucs, E., Bratek, Z., Agerer, R., 1998. Genea verrucosa Vitt. + Quercus spec. Descr. Ectomyc. 3, 7–11.

Jakucs, E., Beenken, L., 2001. Xerocomus lanatus (Rostk.) Sing. + Quercus cerris L. Descr. Ectomyc. 5, 221–225.

Jones, M.D., Durall, D.M., Cairney, J.W.G., 2003. Ectomycorrhizal fungal communities in young forest stands regenerating after clearcut logging. New Phytol. 157, 399–422.

Landeweert, R., Leeflang, P., Kuyper, T. W., Hoffland, E., Rosling, A., Wernars, K., Smit, E., 2003. Molecular identification of ectomycorrhizal mycelium in soil horizons. Appl. Envir. Microb. 69 (1), 327–333.

López, B., Sabaté S., Gracia, C.A., 1998. Fine roots dynamics in a Mediterranean forest: effects of drought and stem density. Tree Physiol. 18, 601–606.

Luisi, N., Manicone, R., 1991. Il deperimento delle querce in Italia meridionale: tentativi di contenimento. *Italia Forestale e Montana* 46 (5), 341–356.

Manion, P.D., 1991. *Tree Disease Concepts*. 2<sup>nd</sup> ed. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ, p. 402.

Manion, P.D., Lachance, D., 1992. Forest decline concepts, an overview. In: Manion, P.D., Lachance, D. (Eds.), *Forest Decline Concepts*. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN, pp. 181–190.

Marçais, B., Caël, O., Delatour, C., 2000. Relationship between presence of basidiomes, above-ground symptoms and root infection by Collybia fusipes in oaks. *Eur. J. For. Path.* 30, 7–17.

Mineo, L., Majumdar, S.K., 1996. Ectomycorrhizae in oaks (Quercus alba, Q. rubra) in Northeastern Pennsylvania woodlands: morphology, frequency and implied physiology and ecology. In: Mukerji, K.G. (Ed.), *Concepts in Mycorrhizal Research*. Handbook of Vegetation Science, vol. 19/2. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 315–331.

Montecchio, L., Causin, R., Rossi, S., Mutto Accordi, S., 2004. Changes in ectomycorrhizal diversity in a declining Quercus ilex coastal forest. *Phytopathol. Mediterr.* 43, 26–34.

Morikawa, Y., Hattori, A., Kiyono, Y., 1986. Transpiration of a 31-year-old Chamaecyparis obtusa Endl. Stand before and after thinning. *Tree Physiol.* 2, 105–114.

Müller, W.R., Rauscher, T., Agerer, R., 1996. Tuber aestivum Vitt. + Corylus avellana L. *Descr. Ectomyc.* 1, 167–170.

Oleksyn, J., Przybyl, K., 1987. Oak decline in the Soviet Union. Scale and hypotheses. *Eur. J. For. Path.* 17, 321–336.



Palfner, G., 1995. "Quercirhiza squamosa". In: Agerer, R. (Ed.), Colour Atlas of Ectomycorrhizae, plate 86. Einhorn Verlag, Schwäbisch Gmünd.

Peter, M., Ayer, F., Egli, S., Honegger, R., 2001. Above- and belowground community structure of ectomycorrhizal fungi in three Norway spruce (Picea abies) stands in Switzerland. Can. J. Bot. 79, 1134–1151.

Perrin, R., Estivalet, D., 1990. Mycorrhizal association and forest decline (yellowing of spruce). Agric. Ecosyst. Envir. 28 (1-4), 381–387.

Ragazzi, A., Vagniluca, S., Moricca, S., 1995. European expansion of oak decline: involved micro-organisms and methodological approaches. Phytopathol. Mediterr. 34, 207–226.

Ragazzi, A., Moricca, S., Dellavalle, I., Turco, E., 2000. Italian expansion of oak decline. In: Ragazzi, A., Dellavalle, I. (Eds.), Decline of Oak Species in Italy; Problems and Perspectives, Università di Firenze, Concilio Nazionale di Ricerca, Accademia Italiana di Scienze Forestali, Firenze, Italy, pp. 39–75.

Repubblica Italiana, 1999. Approvazione dei Metodi ufficiali di analisi chimica del suolo. Decreto Ministeriale, 13 settembre 1999. Supplemento ordinario n° 185. Gazzetta Ufficiale n° 248 serie generale, 21 ottobre 1999.

Schütt, P., Cowling, E.B., 1985. Waldsterben, a general decline of forests in central Europe: symptoms, development and possible causes. Pl. Dis. 69, 548–558.

Smith, J.E., McKay, D., Brenner, G., McIver, J., Spatafora, J.W., 2005. Early impacts of forest restoration treatments on the ectomycorrhizal fungal community and fine root biomass in a mixed conifer forest. J. Appl. Ecol. 4, 526–535.

Sword, M.A., Chambers, J.L., Gravatt, D.A., Haywood, J.D., Barnett, J.P., 1998a. Ecophysiological responses of managed loblolly pine to changes in stand environment. In: Mickler, R.A., Fox, S. (Eds.), The Productivity and Sustainability of

Southern Forest Ecosystems in a Changing Environment. Springer Verlag, New York pp. 185–206.

Sword, M.A., Haywood, J.D., Andries, C.D., 1998b. Seasonal lateral root growth of juvenile loblolly pine after thinning and fertilisation on gulf coastal plain site. In: Waldrop, T. A. (Ed.), Proceedings of the Ninth Biennial Southern Sylvicultural Research Conference, Clemson, South Carolina, 25–27 February 1997. General Technical Report SRS-20. U.S. Forest Service, Southern Research Station, Asheville, North Carolina, pp. 194–201.

Taskinen, O., Ilvesniemi, H., Kuuluvainen, T., Leinonen, K., 2003. Response of fine roots to an experimental gap in a boreal Picea abies forest. *Plant Soil* 255, 503–512.

Vannini, A., Valentini, R., Luisi N., 1996. Impact of drought and Hypoxylon mediterraneum on oak decline in the Mediterranean region. *Ann. Sci. For.* 53, 753–760.

Visser, S., 1995. Ectomycorrhizal fungal succession in jack pine stands following wildfire. *New Phytol.* 129, 389–401.

Vogt, K.A., Publicover, D.A., Bloomfield, F., Perez, J.M., Vogt, D.J., Silver, W.L., 1993. Belowground responses as indicators of environmental change. *Environ. Exp. Bot.* 33, 189–205.

Wargo, P.M., 1988. Root vitality and mycorrhizal status on different health classes of red spruce trees. *Phytopathology* 78, 1533.

Zahner, R., 1968. Water deficits and growth of trees. In: Kozolwski, T.T. (Ed.), *Water Deficits and Plant Growth*, vol. 2, Academic Press, New York, pp. 191–254.

Zak, B., Marx, H.D., 1964. Isolation of mycorrhizal fungi from roots of individual slash pines. *For. Sci.* 10, 214.



## Figure Legends

Figure 1: Monthly precipitation and mean temperature from Jan 2004 to Jan 2006 at the Mansuè weather station (4 Km from Bosco di Basalghelle, data from Consorzio Difesa Colture Agrarie Università Atmosferiche).

Figure 2:  $\chi^2$  analysis of the variation of the probabilities of finding vital tips (pV), mycorrhizal vital tips (pMV) and mycorrhizal, vital or not, tips (pM) with both decline class and competition status at the different sampling dates (Fig. 2a, 2b, 2c, respectively). Data followed by the same letter are not statistically different ( $P < 0.05$ ).

Figure 3: Distribution of the samples along canonical variables 1 and 2 (a) and relative abundance of the discriminating anatomotypes in Jan 06 (b). Black triangle: untreated trees of decline class 0 (0 NT); white triangle: competition-free trees of decline class 0 (0 T); black circle: untreated trees of decline class 1 (1 NT); white circle: competition-free trees of decline class 1 (1 T).

## Tables

Table 1: Main climate parameters at Mansuè weather station 1989-2005.

Temperature	°C
Mean annual value	12.53
Mean of minimum values	7.15
Mean of maximum values	18.64
Mean of the hottest month	28.65
Mean of the coldest month	6.83
Absolute minimum	-12.3
Absolute maximum	37.6
Mean annual range	11.49
Maximum annual range	32.25
Precipitation	mm
Mean annual value	705
Winter	83.22
Spring	266.42
Summer	231.51
Autumn	264.35

Table 2: Main soil parameters according to the Italian Official Method (Repubblica Italiana, 1999).

		Soil horizon		
		A <sub>1</sub> 0-5 cm	B 5-15cm	B 15-25 cm
pH( H <sub>2</sub> O)	-	6.25	6.25	5.80
Total acidity	Cmol(H <sup>+</sup> )/kg	64	3.5	7
Total CEC <sup>a</sup>	Cmol(cation)/kg	43.45	28.4	27.65
Exchangeable Ca <sup>2+</sup>	Cmol(Ca <sup>2+</sup> )/kg	1.9	1.05	1.1
Exchangeable Mg <sup>2+</sup>	Cmol(Mg <sup>2+</sup> )/kg	1.15	0.75	0.85
Exchangeable K <sup>+</sup>	Cmol(K <sup>+</sup> )/kg	0.15	<0.1	0.1
Exchangeable Na <sup>+</sup>	Cmol(Na <sup>+</sup> )/kg	<0.1	<0.1	<0.1
Base saturation Ratio	%	7.4	6.3	7.45
Total Organic Carbon	g/kg	41	15	13
Total nitrogen	g/kg	3.15	1.25	1.1
C/N	-	13	12	12

<sup>a</sup>CEC= exchangeable cations capacity



Table 3: Significance (p-values) of sampling date, decline class and treatment effects on tip vitality symbolised by --- (P<0.0001), -- (P<0.01) and · (P<0.05).

	Pr
decline class	0.0256*
sampling date	0.3387
treatment	0.0024**
sampling date*decline class	<0.0001***
treatment*decline class	0.5852
treatment*sampling date	0.4141
treatment*sampling date*decline class	0.3341

Table 4: Ectomycorrhizal anatomotypes and their morphological or molecular identification.

Fungal taxa	Best match sequence	Size (pair)	E value	Similarity	Accession number	Source <sup>a</sup>
<u>Byssocorticium</u> sp.	<u>Byssocorticium atrovirens</u>	639	e-128	96%	UDB000075	UNITE
<u>Cenococcum geophilum</u>	-	-	-	-	-	-
<u>Clavulina cinerea</u>	<u>Clavulina cinerea</u>	1245	e-176	99%	UDB000074	UNITE
<u>Clavulina</u> sp.	<u>Clavulina cristata</u>	1250	0.0	96%	AY292292	BLAST
EM1	-	-	-	-	-	-
EM2	-	-	-	-	-	-
EM3	-	-	-	-	-	-
EM4	-	-	-	-	-	-
EM5	-	-	-	-	-	-
EM6	-	-	-	-	-	-
EM7	-	-	-	-	-	-
EM8	-	-	-	-	-	-
EM9	-	-	-	-	-	-
EM10	-	-	-	-	-	-
EM11	-	-	-	-	-	-
EM12	-	-	-	-	-	-
EM13	-	-	-	-	-	-
<u>Entoloma</u> sp.	-	-	-	-	-	-
<u>Genea hispidula</u>	-	-	-	-	-	-
<u>Genea</u> sp. I	-	-	-	-	-	-
<u>Genea</u> sp. II	-	-	-	-	-	-
<u>Helvellaceae</u>	<u>Helvellaceae</u>	686	e-139	93% <sup>b</sup>	AJ879682	BLAST
<u>Humaria</u> sp.	<u>Humaria hemisphaerica</u>	687	0.0	97%	UDB000988	UNITE
<u>Inocybe</u> sp. I	<u>Inocybe maculata</u>	645	0.0	98%	AJ534933	BLAST
<u>Inocybe</u> sp. II	<u>Inocybe</u> sp.	670	e-106	95%	AY751558	BLAST
<u>Inocybe</u> sp. III	<u>Inocybe calamistrata</u>	655	9e-86	96% <sup>b</sup>	UDB000625	UNITE
<u>Inocybe</u> sp. IV	<u>Inocybe asterospora</u>	652	0.0	98%	AJ889951	BLAST
<u>Laccaria</u> sp.	<u>Laccaria</u> sp.	1241	4e-95	98% <sup>b</sup>	UDB001199	UNITE
<u>Lactarius</u> sp. I	<u>Lactarius quietus</u>	1240	0.0	98%	UDB000889	UNITE
<u>Lactarius</u> sp. II	<u>Lactarius necator</u>	706	0.0	95%	UDB000361	UNITE
<u>Paxillaceae</u>	<u>Paxillus involutus</u>	795	0.0	93%	UDB000754	UNITE
<u>Peziza</u> sp. I	<u>Peziza michelii</u>	642	0.0	98%	UDB000986	UNITE
<u>Peziza</u> sp. II	<u>Peziza succosa</u>	642	2e-58	96% <sup>b</sup>	UDB000984	UNITE



Fungal taxa	Best match sequence	Size (pair)	E value	Similarity	Accession number	Source <sup>a</sup>
<u>Pezizaceae I</u>	<u>Pezizaceae</u>	673	0.0	98%	AY299231	BLAST
<u>Pezizales I</u>	<u>Pezizales</u>	704	e-116	92% <sup>b</sup>	AJ893241	BLAST
<u>Pezizales II</u>	<u>Pezizales</u>	658	4e-43	95% <sup>b</sup>	AJ968671	BLAST
<u>Q. argenteobrunneola</u>	-	-	-	-	-	-
<u>Q. internangularis</u>	-	-	-	-	-	-
<u>Q. squamosa</u>	-	-	-	-	-	-
<u>Q. stellata</u>	-	-	-	-	-	-
<u>Russula sp.</u>	<u>Russula sp.</u>	737	0.0	98%	AF418629	BLAST
<u>Russulaceae I</u>	<u>Russula nigricans</u>	707	9e-86	90% <sup>b</sup>	UDB000338	UNITE
<u>Russulaceae II</u>	<u>Russula heterophylla</u>	870	7e-52	92% <sup>b</sup>	UDB000327	UNITE
<u>Russulaceae III</u>	<u>Russula insignis</u>	684	0.0	92%	UDB000894	UNITE
<u>Sebacina helvelloides</u>	<u>Sebacina helvelloides</u>	625	0.0	100%	AJ966750	BLAST
<u>Sebacina incrustans</u>	<u>Sebacina incrustans</u>	663	0.0	100%	AJ966755	BLAST
<u>Sebacinaceae I</u>	<u>Sebacinaceae sp.</u>	625	0.0	94%	AJ534907	BLAST
<u>Sebacinaceae II</u>	<u>Sebacina sp.</u>	600	0.0	94%	UDB000773	UNITE
<u>Sebacinaceae III</u>	<u>Sebacinaceae sp.</u>	677	0.0	95%	AJ534907	BLAST
<u>Tomentella sublilacina</u>	<u>Tomentella sublilacina</u>	1204	0.0	100%	AJ889982	BLAST
<u>Tomentella sp. I</u>	<u>Tomentella sp.</u>	682	0.0	98%	AY635173	BLAST
<u>Tomentella sp. II</u>	<u>Tomentella umbrinospora</u>	665	8e-83	96% <sup>b</sup>	UDB000233	UNITE
<u>Tomentella sp. III</u>	<u>Tomentella sp.</u>	664	e-180	96%	AJ534911	BLAST
<u>Tomentella sp. IV</u>	<u>Tomentella ellisii</u>	673	0.0	95%	UDB000219	UNITE
<u>Thelephoraceae I</u>	<u>Tomentella lateritia</u>	662	0.0	91%	UDB000267	UNITE
<u>Thelephoraceae II</u>	<u>Tomentella subtestacea</u>	650	e-168	91%	UDB000034	UNITE
<u>Thelephoraceae III</u>	<u>Tomentella galzinii</u>	708	0.0	94%	UDB000260	UNITE
<u>Thelephoraceae IV</u>	<u>Thelephora caryophyllea</u>	1192	0.0	94%	UDB000119	UNITE
<u>Thelephoraceae V</u>	<u>Tomentella badia</u>	676	0.0	93%	UDB000961	UNITE
<u>Tuber aestivum</u>	-	-	-	-	-	-
<u>Tuber sp.</u>	<u>Tuber sp.</u>	628	0.0	96%	AJ879691	BLAST
<u>Tuberales I</u>	<u>Tuber rufum</u>	638	0.0	94%	AY940646	BLAST
<u>Tuberales II</u>	<u>Tuber rapaeodorum</u>	632	1e-91	92% <sup>b</sup>	AJ557521	BLAST
<u>Xerocomus lanatus</u>	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> Additional references are available on the NCBI (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST>) or UNITE (<http://unite.ut.ee>) websites.

<sup>b</sup> Partial sequence only

<sup>c</sup> Quercirhiza

Table 5: Relative anatomotype frequency (%) before and after the thinning treatment.

	Before thinning mean between Apr-Jul 04		after thinning mean between Apr-Jul 05				after thinning mean from Oct 04 to Jan 06			
	CL 0	CL1	CL 0 T	CL 1 T	CL 0 NT	CL 1 NT	CL 0 T	CL 1 T	CL 0 NT	CL 1 NT
<u>C. geophilum</u>	3.45	3.85	4.51	7.80	5.24	3.18	3.30	4.78	3.31	2.51
<u>C. cinerea</u>	8.41	7.54	4.51	5.08	8.10	6.36	2.95	4.15	7.92	7.25
<u>Clavulina sp.</u>	1.95	1.34	-	1.02	4.05	1.96	0.94	1.01	4.23	1.84
<u>EM1</u>	1.65	2.01	2.05	2.03	1.19	1.22	0.83	2.26	1.15	0.58
<u>EM2</u>	3.60	8.88	4.92	14.92	1.67	7.58	6.96	12.58	0.85	5.41
<u>EM3</u>	2.25	0.50	-	-	-	-	0.12	0.13	0.08	0.19
<u>EM4</u>	0.30	-	-	-	0.48	0.24	-	0.13	0.46	0.29
<u>G. hispidula</u>	4.35	2.01	-	0.68	0.71	-	0.59	2.14	0.77	0.29
<u>Genea sp. I</u>	2.40	1.17	-	0.68	2.14	0.24	-	0.25	0.85	0.19
<u>Inocybe sp. I</u>	11.11	7.04	4.51	0.68	1.19	1.22	6.01	3.65	2.38	3.38
<u>Laccaria sp.</u>	2.55	4.52	-	0.34	2.62	3.42	0.47	1.64	2.31	3.00
<u>Lactarius sp. I</u>	2.85	5.70	7.79	12.20	1.90	6.85	7.19	13.71	1.23	9.18
<u>Peziza sp. II</u>	0.90	1.68	-	0.34	-	-	0.71	0.25	0.31	0.58
<u>Pezizales I</u>	3.60	3.18	-	0.3	0.24	0.49	0.59	0.50	1.84	0.97
<u>Russula sp.</u>	5.41	4.19	2.87	0.34	2.38	1.47	4.72	1.89	2.77	2.32
<u>Russulaceae I</u>	4.65	7.37	6.15	1.36	11.43	5.62	3.89	1.76	7.76	2.90
<u>Russulaceae II</u>	1.80	0.17	0.82	-	1.19	0.73	0.71	0.13	1.61	0.29
<u>S. helvelloides</u>	2.25	4.86	-	0.68	-	8.56	0.83	0.38	1.15	6.28
<u>T. sublilacina</u>	13.96	8.54	10.25	8.14	7.38	7.58	11.79	9.81	12.22	10.72
<u>Tomentella sp. I</u>	17.72	23.28	13.93	14.24	15.71	11.25	11.56	11.57	16.22	14.88
<u>Thelephoraceae I</u>	3.90	1.84	4.51	0.34	0.24	1.47	1.77	0.13	0.54	0.58
<u>Thelephoraceae II</u>	0.45	0.17	1.23	1.02	-	-	0.83	0.88	0.15	0.29
<u>Thelephoraceae III</u>	0.45	0.17	0.82	0.68	1.19	-	1.06	1.26	0.69	0.77



Table 6: Relative anatomotype frequency (%) on each sampling date (all decline classes and treatment combinations together).

Fungal species	SAMPLING DATE							
	Apr 04	Jul 04	Oct 04	Jan 05	Apr 05	Jul 05	Oct 05	Jan 06
<u>Byssocorticium</u> sp.	0	0	0	0.19	0.27 <sup>a</sup>	0	0.77 <sup>a</sup>	0.39 <sup>a</sup>
<u>Cenococcum geophilum</u>	4.64	2.57	3.23	3.05	5.83	4.13	2.94	1.29
<u>Clavulina cinerea</u>	9.75	6.10 <sup>a</sup>	3.80 <sup>a</sup>	2.67	7.05	5.40 <sup>a</sup>	6.27 <sup>a</sup>	8.62 <sup>a</sup>
<u>Clavulina</u> sp.	2.48 <sup>a</sup>	0.80	0.57	4.76 <sup>a</sup>	2.85 <sup>a</sup>	1.11	2.69	1.67
EM1	3.25	0.32	1.33 <sup>a</sup>	2.67	1.22	1.90	0.38	0.13 <sup>a</sup>
EM2	6.19 <sup>a</sup>	5.94	5.50 <sup>a</sup>	2.29 <sup>a</sup>	7.05 <sup>a</sup>	6.67 <sup>a</sup>	3.20	8.49 <sup>a</sup>
EM3	2.63	0.16	0	0.19	0	0	0.51	0
EM4	0	0.32	0.19	0	0	0.48	0.51	0.26 <sup>a</sup>
EM5	0	0	0	0	0.68	0	1.15 <sup>a</sup>	1.93
EM6	0	0	0.57	0.19	0.14	0.32	0.26 <sup>a</sup>	0
EM7	0	0	0	0	0	0.32	0.26 <sup>a</sup>	0.13
EM8	0	0	0	0.95	0	0.63	0	0
EM9	0	0	0	0.19	0.81 <sup>a</sup>	0.79 <sup>a</sup>	0.26	0.26
EM10	0	0	0	1.33	0.27	0.48 <sup>a</sup>	0.64	0.13
EM11	0	0	0	0	1.76	1.90	2.43	1.54 <sup>a</sup>
EM12	0	0	0	0	0	0.32	0.51	0.39 <sup>a</sup>
EM13	0	0	0	0	0.95	0.48	0.77 <sup>a</sup>	0.90
<u>Entoloma</u> sp.	-	0	0	0.19	0.19	0.14	0.79	0
<u>Genea hispidula</u>	2.01 <sup>a</sup>	4.49	2.66	0.95	0	0.79	0.26	1.16
<u>Genea</u> sp. I	1.08	2.73 <sup>a</sup>	0.19	0	0.68 <sup>a</sup>	1.11 <sup>a</sup>	0.26	0
<u>Genea</u> sp. II	-	0	0	0	0.95	1.08	1.27	0.51
<u>Helvellaceae</u>	0	0	0	0.19	0.54	0.16 <sup>a</sup>	0.77	0.13
<u>Humaria</u> sp.	0	0	1.33	0.57	1.49 <sup>a</sup>	1.27 <sup>a</sup>	1.66	1.80
<u>Inocybe</u> sp. I	8.36 <sup>a</sup>	10.27	5.50	4.19	1.49	1.90	3.07	6.18 <sup>a</sup>
<u>Inocybe</u> sp. II	0	0	0	2.10	3.93 <sup>a</sup>	1.27	1.15	1.93
<u>Inocybe</u> sp. III	0	0	0	0	2.17	1.43	0.51 <sup>a</sup>	1.80
<u>Inocybe</u> sp. IV	0	0	0	0	0	0.79 <sup>a</sup>	1.28	0.77 <sup>a</sup>
<u>Laccaria</u> sp.	3.41	3.53	2.28	1.90	2.03 <sup>a</sup>	1.75 <sup>a</sup>	2.30	1.54
<u>Lactarius</u> sp. I	2.79	5.62 <sup>a</sup>	8.35	9.14 <sup>a</sup>	4.88 <sup>a</sup>	8.73	6.78	5.79 <sup>a</sup>
<u>Lactarius</u> sp. II	0	0	0	0	0.41	1.27	0.13	0.39
<u>Paxillaceae</u>	0	0	0	0	0.41 <sup>a</sup>	1.27 <sup>a</sup>	1.28 <sup>a</sup>	0
<u>Peziza</u> sp. I	0	0	0	0	0	0	2.17	0.39 <sup>a</sup>
<u>Peziza</u> sp. II	2.01	0.48	1.71	0.57	0.14	0	0.38	0.26 <sup>a</sup>
<u>Pezizaceae</u> I	0	0	0	0.57	0.68	0.63	0.90 <sup>a</sup>	1.42 <sup>a</sup>
<u>Pezizales</u> I	3.87	2.89	2.09 <sup>a</sup>	2.67 <sup>a</sup>	0.54	0	0.77	1.03 <sup>a</sup>
<u>Pezizales</u> II	0	0	0	0	1.76	0	0.90	1.80
<u>Q. argenteobrunneola</u>	0	0	0	0	0.81	0.32	0	0.26
<u>Q. internangularis</u>	0	0	0	0	0	0	2.81	0.13
<u>Q. squamosa</u>	0	0	0	1.33	1.76	1.27	1.53	2.19
<u>Q. stellata</u>	0	0	0	0	0.81	3.65 <sup>a</sup>	2.43	0
<u>Russula</u> sp.	2.48	7.22	5.50	9.14	2.17	1.27	0.38	1.42
<u>Russulaceae</u> I	8.20	3.53	1.14	3.05 <sup>a</sup>	5.69 <sup>a</sup>	7.62 <sup>a</sup>	3.32 <sup>a</sup>	5.15 <sup>a</sup>
<u>Russulaceae</u> II	0.62	1.44 <sup>a</sup>	0.38 <sup>a</sup>	2.10	0.81	0.63	0.90	0.13
<u>Russulaceae</u> III	0	0	0	0.57 <sup>a</sup>	1.63	2.06 <sup>a</sup>	3.07	2.45
<u>Sebacina helvelloides</u>	4.33	2.57	1.71	2.67 <sup>a</sup>	2.57 <sup>a</sup>	2.86 <sup>a</sup>	2.17 <sup>a</sup>	1.67 <sup>a</sup>
<u>Sebacina incrustans</u>	0	0	0	0	1.63	1.90	2.81 <sup>a</sup>	1.54 <sup>a</sup>
<u>Sebacinaceae</u> I	0	0	0	0.57	0.41	0.79	1.15 <sup>a</sup>	0.90
<u>Sebacinaceae</u> II	0	0	0	0	0.14	0.32	0.51 <sup>a</sup>	0.77 <sup>a</sup>
<u>Sebacinaceae</u> III	0	0	0	0	0	0.63 <sup>a</sup>	2.30 <sup>a</sup>	1.42
<u>Thelephoraceae</u> I	3.87	1.93	0.76	0	1.90 <sup>a</sup>	0.79	0.51	0.26
<u>Thelephoraceae</u> II	0	0.64	0.95	0.57	0.27	0.63	0.13	0.51
<u>Thelephoraceae</u> III	0.31	0.32	0	0	0.54 <sup>a</sup>	0.79	0.90	2.57
<u>Thelephoraceae</u> IV	0	0	3.04	0.38	0	0.48 <sup>a</sup>	0	0.51 <sup>a</sup>
<u>Thelephoraceae</u> V	0	0	0	0	0.41	0.63 <sup>a</sup>	1.15	0.90 <sup>a</sup>

#### 4.1 Vitalità e micorrizzazione degli apici radicali

<u>Tomentella sp. I</u>	22.14 <sup>a</sup>	18.62	23.53 <sup>a</sup>	20.76 <sup>a</sup>	14.36	13.02 <sup>a</sup>	7.29 <sup>a</sup>	9.91
<u>Tomentella sp. II</u>	0	0	0	0.38	0.41	0.32 <sup>a</sup>	0.51	0.39
<u>Tomentella sp. III</u>	0	0	0	0	1.76	0.32	1.28 <sup>a</sup>	0.77
<u>Tomentella sp. IV</u>	0	0	0	0	0	2.06	2.43	0.77
<u>Tomentella subliilacina</u>	5.57 <sup>a</sup>	17.50 <sup>a</sup>	22.96 <sup>a</sup>	14.67	10.70	5.08	9.21 <sup>a</sup>	8.62
<u>Tuber aestivum</u>	0	0	0	1.33	0	0	0.38 <sup>a</sup>	0.13
<u>Tuber sp.</u>	0	0	0.57	0	0	2.06	0	0.26 <sup>a</sup>
<u>Tuberales I</u>	0	0	0	0	0	1.11	0.38	0.51
<u>Tuberales II</u>	0	0	0	0	0	0	3.70 <sup>a</sup>	1.54
<u>Xerocomus lanatus</u>	0	0	0	0	0	0	0.13	0.64
Total num of ECM apexes	646	623	527	525	738	630	782	777
Shannon's index <sup>b</sup>	3.646b	3.531b	3.350b	3.591b	4.272a	4.386a	4.752a	4.465a
Simpson's index <sup>b</sup>	0.899a	0.893a	0.859d	0.887a	0.931b	0.934b	0.955a	0.939b

<sup>a</sup>Statistically discriminating anatomotypes by the Stepwise analysis for each sampling date.

<sup>b</sup>Values followed by different letters are significantly different from one another at  $P < 0.05$  (Tukey test).



Table 7: Multivariate analysis of variance between treatments on each sampling date. The significance of the probability of Mahalanobis' distance between treatments is symbolised by \*\*\* ( $P < 0.0001$ ), \*\* ( $P < 0.01$ ) and \* ( $P < 0.05$ ).

Sampling date	Prob>Mahalanobis' Distance referring to the squared distance between sets of trees			
1-Apr 04	CL 0	CL 1 ***		
2-Jul 04	CL 0	CL 1 **		
3-Oct 04	CL 1 NT CL 1 T CL 0 NT	CL 0 T *** ** ns	CL 0 NT ** *	CL 1 T **
4-Jan 05	CL 1 NT CL 1 T CL 0 NT	CL 0 T *** * ns	CL 0 NT *** *	CL 1 T ***
5-Apr 05	CL 1 NT CL 1 T CL 0 NT	CL 0 T *** ** ***	CL 0 NT *** ***	CL 1 T ***
6-Jul 05	CL 1 NT CL 1 T CL 0 NT	CL 0 T *** ns ***	CL 0 NT *** **	CL 1 T ***
7-Oct 05	CL 1 NT CL 1 T CL 0 NT	CL 0 T *** * *	CL 0 NT *** ***	CL 1 T ***
8-Jan 06	CL 1 NT CL 1 T CL 0 NT	CL 0 T *** * ***	CL 0 NT *** ***	CL 1 T ***

Fig. 1

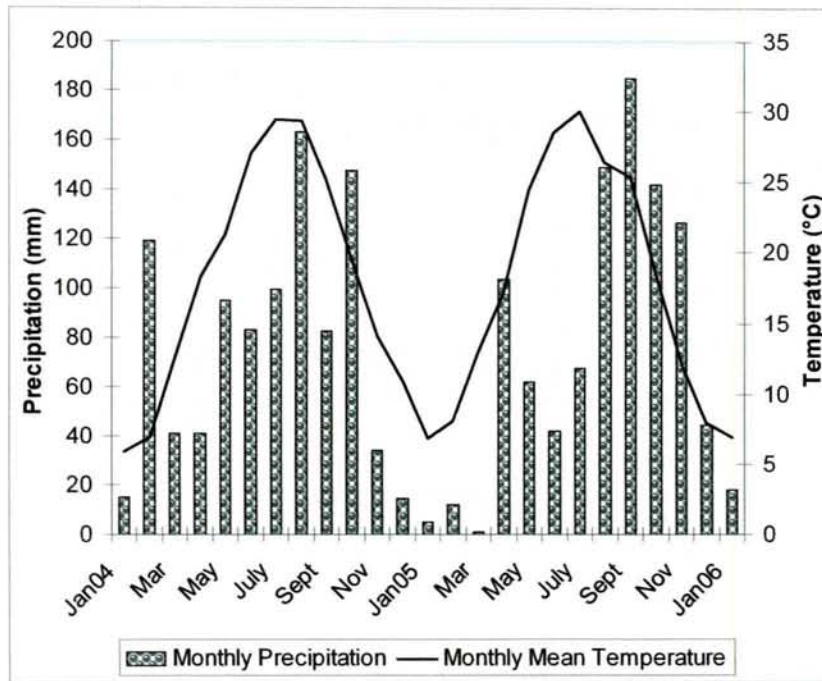
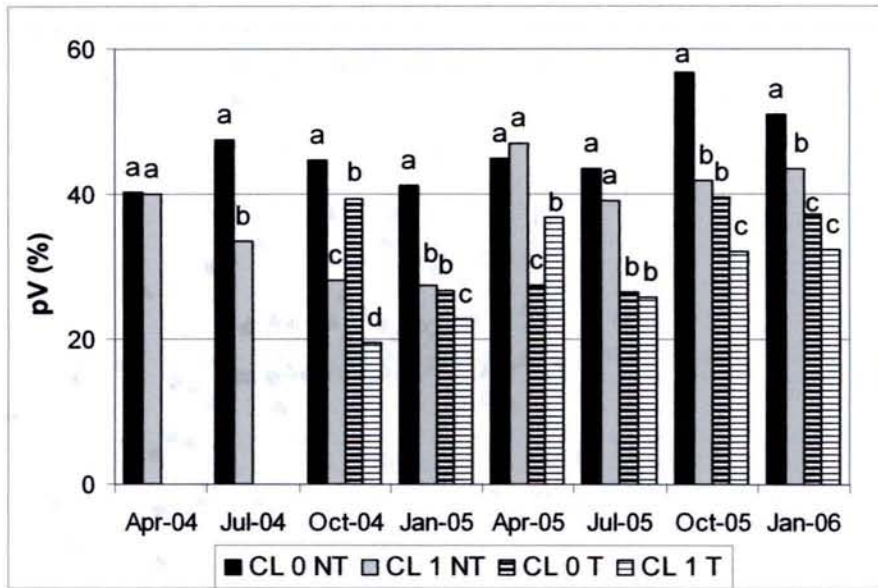
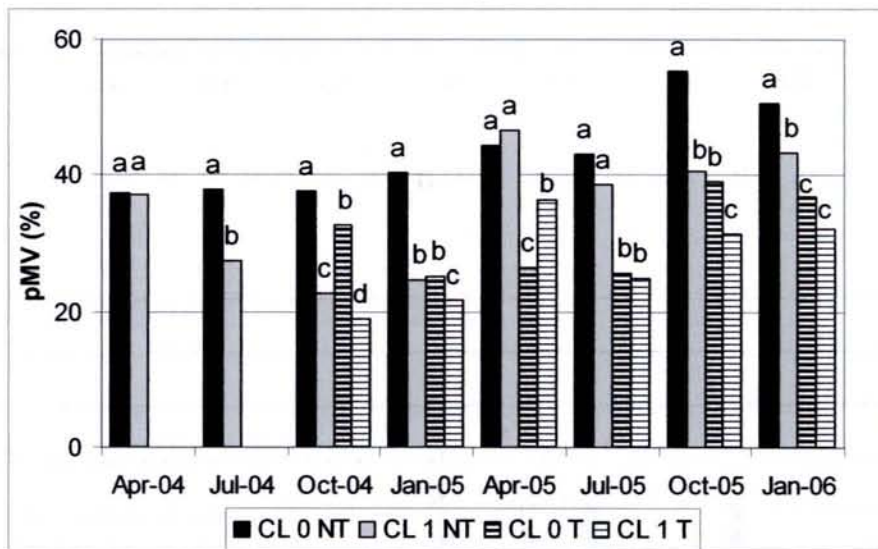




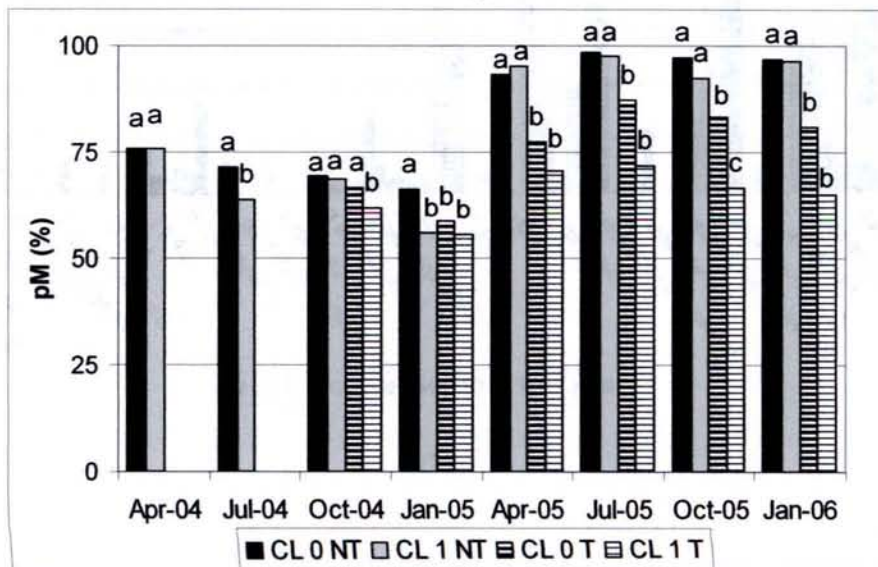
Fig. 2



a



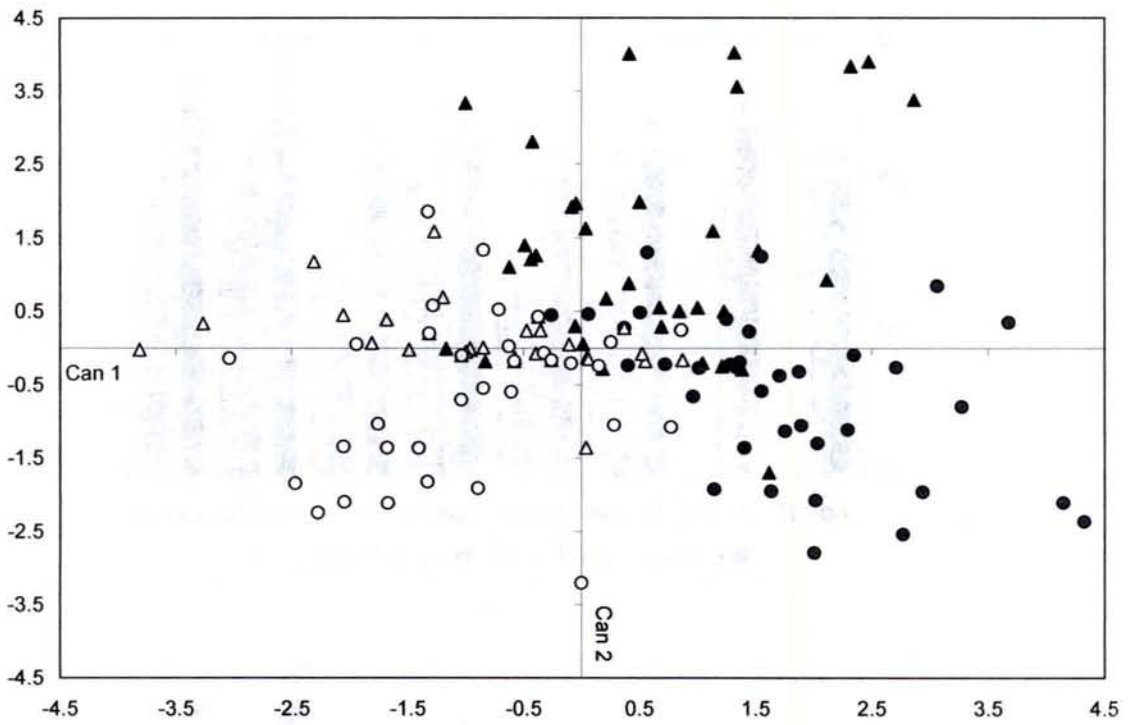
b



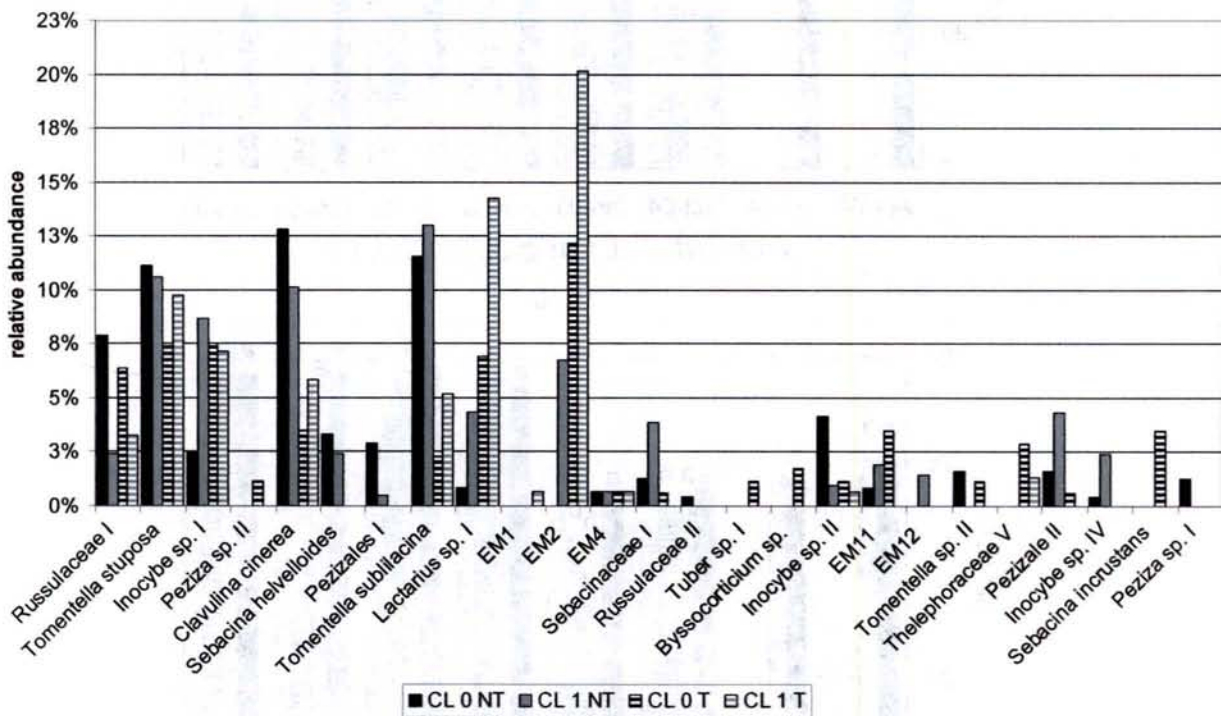
c

4.1 Vitalità e micorrizazione degli apici radicali

Fig. 3



a



b



## 4.2

### *Struttura e funzionalità della comunità ectomicorrizica*

## **Effetto del diradamento sulla struttura e funzionalità della comunità ectomicorrizica in un popolamento di farnie (*Quercus robur* L.) deperenti in due anni di studio.**

### **Riassunto**

Lo studio è stato realizzato in un popolamento di farnie deperenti, nel quale è stato effettuato un trattamento silvicolturale di diradamento con la conseguente liberazione delle chiome dei soggetti rimanenti.

La struttura della comunità ectomicorrizica è stata monitorata prima e dopo il trattamento, per un periodo di due anni di studio, per valutare l'eventuale supposto cambiamento in seguito al disturbo arrecato. La comunità è stata valutata in termini di specie fungine e di "tipi esplorativi", questi ultimi distinti in base all'abilità più o meno spiccata di ciascun anatomotipo di esplorare il suolo.

Nel corso del periodo di studio sono stati isolati 64 anatomotipi, che sono stati rinvenuti con abbondanza relativa diversa a seconda dello stato di salute della pianta e del trattamento silvicolturale.

E' stato inoltre evidenziato come la struttura della comunità ectomicorrizica delle piante trattate si sia spostata verso gli anatomotipi appartenenti al tipo esplorativo di "lunga distanza". Questo comportamento è stato segnalato prima sulle piante severamente deperenti, e solo in seguito su quelle moderatamente deperenti.

Le piante trattate sembrano quindi reagire al disturbo favorendo all'interno della propria comunità ectomicorrizica gli anatomotipi che le permettono di aumentare l'abilità esplorativa del suolo, ed ampliare conseguentemente di ampliare la possibilità di assunzione dei nutrienti.



## **Effet de la réduction de la compétition entre arbres sur la structure spécifique et fonctionnelle de la communauté des ectomycorhizes dans un peuplement de chêne pédonculé (*Quercus robur* L.)**

### **Résumé**

Cette étude a été réalisée dans un peuplement de chênes pédonculés dépérissants, avec une éclaircie destinée à réduire la compétition entre arbres.

La structure de la communauté des ectomycorhizes a été suivie pendant deux ans avec l'hypothèse que cette structure change à la suite d'une perturbation anthropique. La structure de la communauté a été évaluée à la fois en termes d'espèces fongiques et de mode d'exploration du sol.

Soixante quatre anatomotypes différents d'ectomycorhizes ont été trouvés pendant toute la durée de la période d'étude, et leur abondance relative changeait à la fois en fonction du degré de dépérissement des arbres et du traitement sylvicole.

Une dérive de la structure de la communauté vers davantage de mycorhizes appartenant au groupe d'exploration à longue distance s'est produite chez les arbres éclaircis, particulièrement chez les plus dépérissants.

Ce résultat suggère que les arbres éclaircis réagissent à la perturbation en augmentant leur capacité à explorer le sol par l'intermédiaire de leurs champignons symbiotiques.

**Impact of competition release on the ectomycorrhizal community structure and functionality in a declining oak (*Quercus robur* L.) stand over a two-year period.**

*Elena Mosca\**, *Jean Garbaye\*\**, *Lucio Montecchio\**

Università degli Studi di Padova, Dipartimento Territorio e Sistemi Agro-Forestali, viale dell'Università 16, I-35020 Legnaro, Italy; \*\* INRA, UMR1136 Interactions Arbres/Microorganismes, F-54280 Champenoux, France.

Corresponding author: E. Mosca

fax. +39 049 8272890

e-mail: elena.mosca@unipd.it

**Abstract**

The ectomycorrhizal community structure was monitored over a two-year period in a declining pedunculate oak woodland to verify if it changed following a competition release treatment. The community structure was evaluated in terms of species and their ability to explore the soil (exploration types). Over the study period 64 anatomotypes were recorded; their relative abundance changed according to both tree health status and silvicultural treatment. A shift in the community structure to anatomotypes of the long-distance exploration type occurred in the thinned trees, with the severely declining ones showing this substitution earliest. This suggests that thinned trees react to disturbance by increasing their capacity to explore the soil.

**Key words**

Ectomycorrhizae, *Quercus robur*, Community structure, Exploration type



## 1. Introduction

Interest in the ectomycorrhizal community structure has increased in recent years and several studies have concentrated on determining which factors are involved (Dahlberg, 2001; Horton and Bruns, 2001; Taylor, 2002).

Species composition and their relative abundance in the community may act on ecosystem functions in terms of nutrient cycling, transpiration and decomposition (Duddridge et al., 1980; Smith and Read, 1997; Koide and Wu, 2003).

The below-ground ectomycorrhizal community consists of a few common fungal species that colonise 50-70% of the available, vital fine roots and a larger number of uncommon species. Human interference usually results in a shift in the ectomycorrhizal community structure: there may be an increase in species dominance, a decrease in richness and new species may appear. Such changes should be treated with caution, because community spatial distribution is not completely understood (Erland and Taylor, 2002).

Mycorrhizal fungi play an important role in plant nutrient uptake and tree growth promotion. They differ in this ability and in transfer capacities because of the extent of root colonization and their hyphae development in the soil (Colpaert et al., 1992; Read, 1992).

The mycelium structure depends mainly on the taxonomic group the mycorrhizal fungus belongs to (Allen, 1991), and the extramatrical mycelium (mainly emanating hyphae and rhizomorphs) is probably the part most sensitive to environmental changes (Erland and Taylor, 2002).

Fungi are known to be biogeochemical agents influencing weathering through physical and chemical processes (Duddridge et al., 1980; Smith and Read, 1997; Banfield et al., 1999; Sterflinger, 2000), and direct weathering and nutrient uptake by ectomycorrhizal fungi colonising mineral particles has been suggested as a possible pathway for element uptake by forest trees (Landeweert et al., 2001).

Changes in ectomycorrhizal community structure following disturbance (i.e. a disease or silvicultural treatment) may therefore correspond to changes in the global mycorrhizal efficiency. According to Agerer (2001) the mycelium distribution and its differentiation could be useful parameters to separate the ectomycorrhizal community into "exploration types", probably corresponding to different foraging strategies.

The main aim of this research, performed on declining pedunculate oaks, was to verify if the ectomycorrhizal community structure, in terms of both species and exploration types, can be modified by a competition release treatment.

## **2. Materials and Methods**

### 2.1 Study site

Sampling was carried out in "Bosco di Basalghelle", a 13 ha declining stand in northern Italy (45° 49' N; 12° 31' E; 11-12 m a.s.l.). The climate is wet temperate with warm summer. Annual mean temperature is 12.53 °C. The rainfall regime is typically equinoctial with two maxima in spring and autumn (266.42 mm and 264.35 mm); mean annual rainfall is 705 mm.

The vegetation type is *Carpino-Quercetum roboris* (Poldini, 1988); it regenerated from coppice after clear-cutting 60 years ago. The site is dominated by *Quercus robur*, which covers 42% of the total basal area, *Carpinus betulus* covers 36% and there are several other hardwood species. The forest floor is covered by shrubs: *Staphylea pinnata*, *Corylus avellana*, *Sambucus nigra*.

The brown soil has typical mull-type humus, a dark brown loamy A<sub>1</sub> horizon, above a deep clayey and mottled B horizon.

### 2.2 Sampling

Sixteen oak trees with similar dimensions were chosen in April 2004. They were divided into two decline classes (class 0, moderately declining trees; class 1, severely declining ones) according to their canopy transparency, leaf discoloration, presence and density of epicormic branches, longitudinal cracks in the bark and basidiocarps of *Armillaria* sp. At the base of the trunk (Halmschlager, 1998; Bruhn et al., 2000; Marçais et al., 2000). In July 2004, four trees of each decline class were freed from the competition exerted by neighbouring trees (Mosca et al., submitted).

The site was visited each season between April 2004 and January 2006, when 12 soil samples were collected for each tree in the four cardinal directions (N, S, E, W) and at three distances from the base of the trunk (0.5, 1 and 1.5 m). Fine roots were



placed in plastic bags, stored at 4 °C and processed within ten days; remaining samples were frozen at  $-10 \pm 1$  °C.

### 2.3 Laboratory analysis

Frozen samples were kept at room temperature for 6 hours, then soaked in 1% sodium hexametaphosphate for one hour before passing through a 2 mm mesh sieve. Roots were observed under a stereomicroscope (x 10-50) in order to randomly sample ten root fragments with at least one mycorrhizal tip. The first apex of each root fragment was analysed to determine if it was vital and mycorrhized.

Each ectomycorrhizal tip was described according to its morphological and anatomical features. It was then compared with the available literature in order to identify the fungal symbiont (Agerer, 1987–2002; Agerer and Gronbach, 1988; Agerer, 1991; Brand, 1991; Haug and Pritsch, 1992; Palfner, 1995; Fischer and Agerer, 1996; Goodman et al., 1996–1998; Müller et al., 1996; Agerer, 1997; Jakucs et al., 1998; Cairney and Chambers, 1999; Azul et al., 2001; Jakucs and Beenken, 2001; De Román et al., 2002; Agerer and Rambold, 2004–2005).

When the anatomotype was not recognised by its anatomical and morphological features, identification was made through DNA extraction followed by PCR and sequencing of the rDNA ITS region according to the Gardes and Bruns protocol (1993). The sequence identification level was assigned according to Landeweert (2003), to species level for similarity of  $\geq 99\%$ , to genus level for 95 to 99%, to family or ordinal level for  $< 95\%$ , using Genbank and Unite databases.

If the anatomotype could not be identified either morphologically or molecularly, an alphanumeric code was assigned (Emx).

Each anatomotype was classified in one of the six exploration types defined by Agerer (2001). All the anatomotypes with a smooth mantle and few emanating hyphae were placed in the “contact exploration type” (GR1). The second group (GR2) was characterised by mycorrhizae with “short-distance exploration” features: the presence of many emanating hyphae without forming any rhizomorph. The ectomycorrhizae that form rhizomorphs belong to the “medium-distance exploration type”. According to the rhizomorph structure, this group is divided into “fringe subtype” (GR3a), “mat subtype” (GR3b) and “smooth subtype” (GR3c). Mycorrhizae

with highly differentiated rhizomorphs belong to the “long-distance exploration type” (GR4).

## 2.4 Data analyses

Trees belonging to the same decline class and silvicultural treatment were merged into a single group. For each sampling date, anatomotype relative abundance for each of the 4 groups was calculated at sampling plot level.

A detrended correspondence analysis (DCA) and a canonical correspondence analysis (CCA) were performed to investigate the effect of decline class, silvicultural treatment and sampling date on the ectomycorrhizal community structure (Lepš and Šmilauer, 1999). An initial DCA of the dataset was done to test what kind of relationship occurred among fungal taxa and environmental parameters. When the length of the main gradient indicated a unimodal relationship (ter Braak, 1994), CCA was chosen.

The analysis was performed with Canoco for Windows (version 4.53), considering sampling date, 2 decline classes, presence or absence of the silvicultural treatment, and sampling plot as variables.

The relative abundance data were  $\log(x+1)$  transformed. The influence of rare species on the analysis was reduced by checking the “Downweighting of rare species” box (Canoco for Windows 4.5 On-line Help, I 1997-2002 Biometris, Wageningen). Here, the considered environmental variables were sampling date, decline class, silvicultural treatment and its relation with the first two variables, while sample plot was used as covariable.

The statistical significance of each environmental variable and all variables constrained together was assessed through Monte Carlo simulations with 499 permutations of the residuals. Generalized linear models (GLM) were also used to evaluate if the changes in anatomotype relative abundance along the primary CCA-defined constrained axis were statistically relevant (Edwards et al., 2004).

The same analyses were performed using “exploration types” instead of anatomotypes in the first matrix (species).



### 3. Results

A total of 1536 root samples were collected over the eight sampling dates. The total number of mycorrhizal tips was 5242, assigned to 64 anatomotypes.

Eight anatomotypes were identified at species level (*Cenococcum geophilum*, *Clavulina cinerea*, *Genea hispidula*, *Sebacina helvelloides*, *S. incrustans*, *Tomentella sublilacina*, *Tuber aestivum* and *Xerocomus lanatus*), 21 at genus (*Genea* sp., *Inocybe* sp., *Peziza* sp., *Entoloma* sp., *Russula* sp. And *Sebacina* sp.), 18 were assigned to a family or ordinal level (*Helvellaceae*, *Pezizaceae*, *Russulaceae*, *Sebacinaceae*, *Thelephoraceae* and *Tuberales*), and 4 to ectomycorrhizae previously described in detail (Palfner, 1995; Fischer and Agerer, 1996; Azul et al., 2001; De Román et al., 2002) in *Quercus* sp. (*Quercirhiza argenteobrunneola*, *Q. internangularis*, *Q. squamosa* and *Q. stellata*), while the remaining 13 were unidentified (Table 1).

In order to summarise the ectomycorrhizal community structures throughout the whole study period, the mean relative abundance of each anatomotype was calculated in each treatment (Table 2). Only two anatomotypes (*Thelephoraceae* I and *Thelephoraceae* V) showed a mean relative abundance higher than 5% in all treatments. *Clavulina cinerea* accounted for more than 6% of the mycorrhizal tips in the non-thinned groups of both decline classes, while the most frequent type in class 0 was *Russulaceae* I (6.9%), and *Sebacinaceae* II (5.8%), EM6 (5.8%) and *Lactarius* sp. I (9.4%) in class 1. The presence of the last two anatomotypes increased in the thinned group of both decline classes, while *Inocybe* sp. I and *Russula* sp. Were also frequently collected in class 0 (6.1% and 5.4%, respectively).

The ectomycorrhizal community in the Basalghelle forest was therefore dominated by the *Thelephoraceae* family, with a frequency of 35% in the moderately declining trees and 33% in the severely declining ones. The genus *Tomentella* was found with a frequency of 30% in the untreated trees independently of their health status, while it had a lower frequency in the thinned ones (27.3% and 23.8% in class 0 and 1, respectively). The *Russulaceae* occurred with higher frequency in the thinned trees than in the control ones, with the highest value in class 1 (20%). The genus *Inocybe* generally occurred more frequently in class 0 than class 1, with frequency increasing with the silvicultural treatment (from 7.31% to 10.99%). On the contrary, in the untreated trees *Sebacinaceae* were detected mostly in class 1 (7.91%).

The CCA (Fig.1) showed Eigenvalues for the first three axes of 0.141, 0.108 and 0.060, respectively, with the first axis explaining 36.1% of the species – environment relationship. Sampling date had a positive correlation with both the first and second axis ( $p=0.002$ ). Sylvicultural treatment and its interactions with decline class and sampling date were negatively correlated with the second axis and positively with the first ( $p=0.002$ ).

Fig. 1 shows the same relevant correlation between anatomotype relative abundance and decline class ( $p=0.002$ ), while the interactions between decline class and sampling date were less significant ( $p=0.09$ ).

According to the variance explained by a single variable, which showed the highest  $\lambda-1$  and  $\lambda-A$  values, sampling date and its interaction with sylvicultural treatment were the environmental variables which most influenced species distribution.

The general linear model indicated highly significant relationships ( $p<0.001$ ) between the relative abundance of *Tomentella* sp. I, *T. sublilacina*, *Russula*, *Pezizales* I, *Genea* sp. I with the first canonical axis and between several anatomotypes with the second canonical axis (Fig. 2), from which *Byssocorticium* sp., EM2, EM11, *Quercirhiza internangularis*, *Q. squamosa* and *Q. stellata*, *Sebacina incrustans*, *Sebacinaceae* III, *Tuberales* I and II, *Thelephoraceae* II and V, *Xerocomus lanatus* were highly significant.

Table 3 shows the relative abundance of the five “exploration types” over the study period in both decline classes and sylvicultural treatments. The “contact” (GR1) and “short- distance exploration” types (GR2) were always recorded in all groups of trees on all sampling dates. In July 05 the “medium-distance exploration, fringe subtype” (GR3a) was found only in the unthinned trees independently of their decline status, while from October 05 it also appeared in the thinned trees. The “smooth subtype” (GR3c) was found with the highest relative abundance in October 04 in the thinned trees belonging to class 1. The “long-distance exploration” type (GR4) appeared in April 05 only in the thinned trees of class 1, and later in all the remaining treatments.

Fig. 3 shows the CCA biplot diagram that had Eigenvalues for the first three axes of 0.014, 0.008 and 0.007, respectively. The species-environment relationship was explained by the first canonical axis accounting for 48.7%.

The environmental variables which mainly explained the relative abundance of the distribution of exploration types were sampling date, sylvicultural treatment and their



interaction. These variables presented the highest  $\lambda$ -1 and  $\lambda$ -A values and were negatively correlated with axis 1 and positively with axis 2 ( $p=0.002$ ).

Health status had no correlations with the distribution of the relative abundance of exploration types, nor with the interaction with sampling date. From the same diagram, the “medium-distance exploration, fringe subtype” (GR3a, in the bottom right corner of the diagram) have no correlation with the environmental variable.

The general linear model (Fig. 4) also indicated no significant correlation between GR3a relative abundance and the first two canonical axes. The first exploration type (GR1) showed highly significant and positive correlation with axis 2 ( $p<0.001$ ), whereas the fourth (GR4), second (Gr2) and third (Gr3c) types were positively correlated with axis 1, with a statistical significance of 0.001, 0.01 and 0.05, respectively.

#### 4. Discussion and conclusions

In accordance with previous research by other authors in various types of forest (Horton et al., 1999; De Román and De Miguel, 2002; Glen et al., 2002; Selosse et al., 2002; Tedersoo et al., 2003; Richard et al., 2005), the ectomycorrhizal community in the studied oak stand appeared to be dominated by ectomycorrhizal species belonging to the genus *Tomentella* and, to a lesser extent, by the genera *Inocybe* and *Russula*, as well as by *Sebacinaceae*. *Cenococcum geophilum* was not observed to be among the ECM fungi with the highest dominance and frequency, but was present in all treatments, confirming its high resilience and ubiquity (Lilleskov et al., 2004).

As expected (Kovacs et al., 2000; Montecchio et al., 2004), the ECM community structure before the silvicultural treatment differed significantly in terms of anatomotype relative abundance depending on the health status of the trees. *Genea hispidula*, *Inocybe* sp. I and *Tomentella sublilacina* occurred with higher mean relative abundance in the moderate decline class, whereas in the severe decline one EM2, *Lactarius* sp. I, *Russulacea* I and *Tomentella* sp. I were frequently recorded.

After thinning, the number of vital mycorrhizal tips recorded decreased over time (Mosca et al., submitted) and the ECM community continued to change. However, the abundance of Thelephoroid anatomotypes did not change. Nevertheless, some differences were detected at genus level, where the occurrence of *Tomentella* sp.

Decreased and other Thelephoroid anatomotypes such as *Tomentella* sp. II, *Tomentella* sp. III and *Thelephoraceae* V increased, probably due to their higher adaptive behaviour to environmental stresses (Agerer, 1999; De Romàn and De Miguel, 2005).

The *Russulaceae* increased independently of the decline status of the trees. *Pezizales* and *Sebacinaceae* remained constant in the moderately declining trees, with changes at genus or species level, while *Cortinariaceae* increased.

Conversely, in the most declining class the treatment caused an increase in *Sebacinaceae* and *Pezizales*, which are often related to disturbed environments (Baar et al., 1999; Grogan et al., 2000; Mah et al., 2001; Tedersoo et al., 2005).

The ECM community therefore changed over time according to both decline status and silvicultural treatment.

Independently of the community composition in terms of species, the classification of ECM anatomotypes into exploration types revealed that, after thinning, the anatomotypes considered able to explore the mycorrhizosphere more efficiently (Agerer, 2001) than the others, increased.

While, the “contact-distance” and “short-distance” exploration groups together accounted for more than 90% of the ectomycorrhizal tips in unthinned trees, following the treatment there was a partial substitution with anatomotypes belonging to the “medium-distance exploration, smooth subtype” (GR3c).

The “long-distance” exploration type was first recorded in the thinned, severely declining trees, appearing later in the less declining ones.

Although our survey dealt with the effect of a silvicultural treatment in the short-term, some exploration types, including some ECM fungi, resulted as being influenced by thinning. The shift in the ectomycorrhizal community structure to anatomotypes belonging to the “long-distance” exploration type suggests that thinned trees increase their ability to explore the soil as a reaction to disturbance, mainly shown by the severely declining trees, where the silvicultural treatment accelerated the substitution of some species belonging to “contact-distance” and “short-distance” types with others more efficient in soil exploration by means of their external ectomycorrhizal mycelia (EEM), the essential role of which in soil nutrient dynamics is well-known (Simard et al., 2002; Godbold et al., 2006).



An understanding of the ecological features determining this “adaptive diversity” in ectomycorrhizal communities is thus of major importance for assessing the resilience of ecosystems within the context of global climate change (Dahlberg, 2001).

### **Acknowledgements**

This work was partially funded by the Marie Curie fellowship Program (contract n° QLK5-CT-2000-60046). The authors thank the Servizio Forestale Regionale di Treviso for technical assistance.

### **References**

Agerer R (1987–2002) Colour Atlas of Ectomycorrhizae. Einhorn-Verlag, Munich

Agerer R (1991) Characterisation of ectomycorrhizae. In: Norris JR, Read DJ, Varma AK, (eds), *Methods in Microbiology: Techniques for the Study of Mycorrhiza*, vol. 23. Academic Press, London, pp 25–73

Agerer R (1997) *Entoloma sinuatum* (Bull.: Fr.) Kummer + *Salix* spec. Descr. *Ectomycorrhiza* 2: 13–18

Agerer R (1999) Anatomical characteristics of identified ectomycorrhizas: an attempt towards a natural classification. In: Varma A, Hock B (eds), *Mycorrhiza. Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology*, 2<sup>nd</sup> ed, Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 633–682

Agerer R (2001) Exploration types of ectomycorrhizae. A proposal to classify ectomycorrhizal mycelial systems according to their patterns of differentiation and putative ecological importance. *Mycorrhiza* 11: 107-114

Agerer R, Gronbach E (1988) *Cenococcum geophilum*. In: Agerer R (ed) *Colour Atlas of Ectomycorrhizae*, plate 11. Einhorn Verlag, Schwäbisch Gmünd, Germany

Agerer R, Rambold G (2004–2005) DEEMY – a DELTA-based system for characterisation and Determination of EctoMYcorrhizae. Institute for Systematic Botany, Section Mycologie, University of Munich, Germany

Allen MF (1991) The Ecology of Mycorrhizae. Department of Biology, System Ecology Research Group, Cambridge University Press, San Diego, CA, pp 12–16

Azul AM, Agerer R, Freitas H (2001) “*Quercirhiza internangularis*” + *Quercus suber* L. Descr. Ectomycorrhizae 5: 79–83

Baar H, Horton TR, Kretzer AM, Bruns TD (1999) Mycorrhizal colonization of *Pinus muricata* from resistant propagules after a stand-replacing wildfire. New Phytol 143: 409–418

Banfield JK, Berker WW, Welch SA, Tauton A (1999) Biological impact on mineral dissolution: application of the lichen model to understanding mineral weathering in the rhizosphere. Proc Nat Acad Sci, USA 96: 3404-3411

ter Braak CJF (1994) Canonical community ordination. Part I: Basic theory and linear methods. Ecoscience 1: 127–140.

Brand F (1991) *Genea hispidula*. In: Agerer R (ed) Colour Atlas of Ectomycorrhizae, plate 57. Einhorn Verlag, Schwäbisch Gmünd, Germany

Bruhn JN, Wetteroff JJ, Mihail JD, Kabrick JM, Pickens JB (2000) Distribution of *Armillaria* species in upland Ozark Mountain forests with respect to site, overstorey species composition and oak decline. Eur J For Path 30: 43–60

Cairney JWG, Chambers SM (1999) Ectomycorrhizal Fungi: key genera in profile. Springer-Verlag, New York, p 369

Colpaert JV, van Assche JA, Luijters K (1992) The growth of the extramatrical mycelium of ectomycorrhizal fungi and the growth response of *Pinus sylvestris* L. New Phytol 120: 127-135



Dahlberg A (2001) Community ecology of ectomycorrhizal fungi: an advancing interdisciplinary field. *New Phytol* 150: 555–562

De Román M, Agerer R, De Miguel A (2002) “*Quercirhiza stellata*” + *Quercus ilex* L. Subsp. *Ballota* (Desf.) Samp. *Descr. Ectomycorrhizae* 6: 19–24

De Román M, De Miguel AM (2002) Post-fire dynamics of the ectomycorrhizal community in a *Quercus ilex* subsp. *Ballota* forest. In: Trabaud L, Prodon R (eds) *Fire and Biology Processes*. Backhuys, Leiden, The Netherlands, pp 131–136

De Román M, De Miguel AM, (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

Duddridge JA, Malibari A, Read DJ (1980) Structure and function of mycorrhizal rhizomorphs with special reference to their role in water transport. *Nature* 287: 834–836

Edwards IP, Cripliver JL, Gillespie AR, Johnsen KH, Scholler M, Turco RF (2004) Nitrogen availability alters macrofungal basidiomycete community structure in optimally fertilized loblolly pine forests. *New Phytol* 162: 755–770

Erland S, Taylor AFS (2002) Diversity of ectomycorrhizal communities in relation to the abiotic environment. In: van der Heijden M, Sanders I (eds) *The Ecology of Mycorrhizas*. Springer Verlag, Heidelberg, Germany, pp 163–200

Fischer CR, Agerer R (1996) “*Quercirhiza argenteobrunneola*” + *Quercus ilex* L. *Descr. Ectomycorrhizae* 1: 101–105

Gardes M, Bruns TD (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – applications to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecol.* 2 (2): 113–118

Glen M, Tommerup IC, Bougher NL, O'Brien PA (2002) Are *Sebacinaceae* common and widespread ectomycorrhizal associates of *Eucalyptus* species in Australian forests? *Mycorrhiza* 12: 243–247

Godbold DL, Hoosbeek MR, Lukac M, Cotrufo MF, Janssens IA, Ceulemans R, Polle A, Velthorst EJ, Scarascia-Mugnozza G, Angelis PD, Miglietta F, Peressotti A (2006) Mycorrhizal hyphal turnover as a dominant process for carbon input into soil organic matter. *Plant Soil* 281: 15–24

Goodman DM, Durall DM, Trofymow JA, Berch SM (1996–1998) A manual of concise descriptions of North American ectomycorrhizae: including microscopic and molecular characterization. Mycologue Publications, B.C. Min. of For., and the Can. For. Serv., P.F.C, Victoria, B.C.

Grogan P, Baar J, Bruns TD (2000) Below-ground ectomycorrhizal community structure in a recently burned bishop pine forest. *J Ecol* 88: 1051–1062

Halmschlager E (1998) The possible role of *Armillaria* sp. And *Phytophthora* sp. In the oak decline complex. In : Cech T, Hartmann G, Tomiczek C (eds), Proceedings of the Division 7 IUFRO Working Party, Disease/Environmental Interactions in Forest Decline. 16-21 March 1998, Vienna, Austria, pp 49–56

Haug I, Pritsch K (1992) Ectomycorrhizal types of spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) in the Black Forest. A microscopical atlas. Kernforschungszentrum Karlsruhe, Germany

Horton TR, Bruns TD (2001) The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. *Molecular Ecol* 10: 1855–1871

Horton TR, Bruns TD, Parker VT (1999) Ectomycorrhizal fungi associated with *Arctostaphylos* contribute to *Pseudotsuga menziesii* establishment. *Can J Bot* 77: 93–102

Jakucs E, Beenken L (2001) *Xerocomus lanatus* (Rostk.) Sing. + *Quercus cerris* L. *Descr Ectomycorrhizae* 5: 221–225



Jakucs E, Bratek Z, Agerer R (1998) *Genea verrucosa* Vitt. + *Quercus* spec. Descr. Ectomycorrhizae 3: 7–11

Koide RT, Wu T (2003) Ectomycorrhizas and retarded decomposition in a *Pinus resinosa* plantation. *New Phytol* 158: 401–407

Kovacs G, Pausch M, Urban A (2000) Diversity of ectomycorrhizal morphotypes and oak decline. *Phyton –Annales Rei Botanicae* 40: 109–116

Landeweert R, Hoffland E, Finlay RD, Kuyper TW, van Breemen N (2001) Linking plants to rocks: ectomycorrhizal fungi mobilize nutrients from minerals. *Trends Ecol Evol* 16 (5): 248–254

Landeweert R, Leeflang P, Kuyper TW, Hoffland E, Rosling A, Wernars K, Smit E (2003) Molecular identification of ectomycorrhizal mycelium in soil horizons. *Appl Envir Microb* 69 (1): 327–333

Lepš J, Šmilauer P (1999) *Multivariate Analysis of Ecological Data*. Faculty of Biological Sciences, University of South Bohemia. České Budejovice, Czech Republic

Lilleskov EA, Bruns TD, Horton TR, Taylor DL, Grogan P (2004) Detection of forest stand-level spatial structure in ectomycorrhizal fungus communities. *FEMS Microbiol Ecol* 49: 319–332

Mah K, Tackaberry LE, Egger KN, Massicotte HB (2001) The impacts of broadcast burning after clear-cutting on the diversity of ectomycorrhizal fungi associated with hybrid spruce seedlings in central British Columbia. *Can J For Res* 31: 224–235

Marçais B, Caël O, Delatour C (2000) Relationship between presence of basidiomes, above-ground symptoms and root infection by *Collybia fusipes* in oaks. *Eur J For Path* 30: 7–17

Montecchio L, Causin R, Rossi S, Mutto Accordi S (2004) Changes in ectomycorrhizal diversity in a declining *Quercus ilex* coastal forest. *Phytopathol Mediterr* 43: 26–34

Mosca E, Montecchio L, Sella L, Garbaye J (submitted) Short-term effect of removing tree competition on the ectomycorrhizal status of a declining pedunculate oak forest (*Quercus robur* L.)

Müller WR, Rauscher T, Agerer R (1996) *Tuber aestivum* Vitt. + *Corylus avellana* L. *Descr. Ectomycorrhizae* 1: 167–170

Palfner G (1995) “Quercirhiza squamosa”. In: Agerer R (ed) *Colour Atlas of Ectomycorrhizae*, plate 86. Einhorn Verlag, Schwäbisch Gmünd, Germany

Poldini L (1988) *La Vegetazione del Carso Isontino e Triestino*. Lint, Trieste, Italy

Read DJ (1992) The mycorrhizal mycelium. In: Allen MF (ed) *Mycorrhizal Functioning*. Chapman and Hall, New York, pp 102-132

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 Phytol* 166: 1011-1023

Selosse M-A, Bauer R, Moyersoen B (2002) Basal hymenomycetes belonging to the Sebacinaceae are ectomycorrhizal on temperate deciduous trees. *New Phytol* 155: 183–195

Simard SW, Jones MD, Durall DM (2002) Carbon and nutrient fluxes within and between mycorrhizal plants. In: van der Heijden MGA, Sanders IR (eds) *Mycorrhizal Ecology*. Springer, Berlin, Germany pp 33–74

Smith SE, Read DJ (1997) *Mycorrhizal Symbiosis*, 2<sup>nd</sup> ed. Academic Press, London

Sterflinger K (2000) Fungi as geological agents. *Geomicrobiology J* 17 (2): 97-124



Taylor AFS (2002) Fungal diversity in ectomycorrhizal communities: sampling effort and species detection. *Plant Soil* 244: 19-28

Tedersoo L, Hansen K, Brian A, Kjølner PR, (2006) Molecular and morphological diversity of pezizalean ectomycorrhiza. *New Phytol* 170: 581–596

Tedersoo L, Kõljalg U, Hallenberg N, Larsson K-H (2003) Fine scale distribution of ectomycorrhizal fungi and roots across substrate layers including coarse woody debris in a mixed forest. *New Phytol* 159: 153–165b

### Figure legends

**Fig. 1:** Species biplot based on a canonical correspondence analysis. The model sampling date (y), silvicultural treatment (t), decline class I and their interactions (y\*t; y\*c; c\*t) explain 36.1% of the variance of anatomotype relative abundance. The effects of all the environmental variables are statistically significant (P=0.002). Abbreviations of anatomotype names are given in Table 2.

**Fig. 2:** GLM-fitted response curve for anatomotypes showing a response to the primary CCA-defined constrained axis. All the anatomotype curves have a significant correlation (P<0.001).

**Fig. 3:** Species biplot based on a canonical correspondence analysis. The model sampling date (y), silvicultural treatment (t), and their interactions (y\*t) explain 48.7% of the variance in exploration types relative abundance.

**Fig. 4:** GLM-fitted response curves for exploration type showing a response to the primary CCA-defined constrained axis. “Contact” (GR1), “short-distance” (GR2), “medium-distance smooth subtype” (GR3c), “long-distance” (GR4) exploration types. Significant correlations are indicated: \* P<0.10, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001).

Table 1: Ectomycorrhizal anatomotypes and their morphological or molecular identification.

Fungal taxa	Best match sequence	Size (pair)	E value	Similarity	Accession number	Source <sup>a</sup>
<i>Byssocorticium</i> sp.	<i>Byssocorticium atrovirens</i>	639	e-128	96%	UDB000075	UNITE
<i>Genococcum geophilum</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Clavulina cinerea</i>	<i>Clavulina cinerea</i>	1245	e-176	99%	UDB000074	UNITE
<i>Clavulina</i> sp.	<i>Clavulina cristata</i>	1250	0.0	96%	AY292292	BLAST
EM1	-	-	-	-	-	-
EM2	-	-	-	-	-	-
EM3	-	-	-	-	-	-
EM4	-	-	-	-	-	-
EM5	-	-	-	-	-	-
EM6	-	-	-	-	-	-
EM7	-	-	-	-	-	-
EM8	-	-	-	-	-	-
EM9	-	-	-	-	-	-
EM10	-	-	-	-	-	-
EM11	-	-	-	-	-	-
EM12	-	-	-	-	-	-
EM13	-	-	-	-	-	-
<i>Entoloma</i> sp.	-	-	-	-	-	-
<i>Genea hispidula</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Genea</i> sp. I	-	-	-	-	-	-
<i>Genea</i> sp. II	-	-	-	-	-	-
Helvellaceae	Helvellaceae	686	e-139	93% <sup>b</sup>	AJ879682	BLAST
<i>Humaria</i> sp.	<i>Humaria hemisphaerica</i>	687	0.0	97%	UDB000988	UNITE
<i>Inocybe</i> sp. I	<i>Inocybe maculata</i>	645	0.0	98%	AJ534933	BLAST
<i>Inocybe</i> sp. II	<i>Inocybe</i> sp.	670	e-106	95%	AY751558	BLAST
<i>Inocybe</i> sp. III	<i>Inocybe calamistrata</i>	655	9e-86	96% <sup>b</sup>	UDB000625	UNITE
<i>Inocybe</i> sp. IV	<i>Inocybe asterospora</i>	652	0.0	98%	AJ889951	BLAST
<i>Laccaria</i> sp.	<i>Laccaria</i> sp.	1241	4e-95	98% <sup>b</sup>	UDB001199	UNITE
<i>Lactarius</i> sp. I	<i>Lactarius quietus</i>	1240	0.0	98%	UDB000889	UNITE
<i>Lactarius</i> sp. II	<i>Lactarius necator</i>	706	0.0	95%	UDB000361	UNITE
Paxillaceae	<i>Paxillus involutus</i>	795	0.0	93%	UDB000754	UNITE
<i>Peziza</i> sp. I	<i>Peziza michelii</i>	642	0.0	98%	UDB000986	UNITE
<i>Peziza</i> sp. II	<i>Peziza succosa</i>	642	2e-58	96% <sup>b</sup>	UDB000984	UNITE



Fungal taxa	Best match sequence	Size (pair)	E value	Similarity	Accession number	Source <sup>a</sup>
<i>Pezizaceae</i> I	<i>Pezizaceae</i>	673	0.0	98%	AY299231	BLAST
<i>Pezizales</i> I	<i>Pezizales</i>	704	e-116	92% <sup>b</sup>	AJ893241	BLAST
<i>Pezizales</i> II	<i>Pezizales</i>	658	4e-43	95% <sup>b</sup>	AJ968671	BLAST
<i>Q. argenteobrunneola</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Q. internangularis</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Q. squamosa</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Q. stellata</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Russula</i> sp.	<i>Russula</i> sp.	737	0.0	98%	AF418629	BLAST
<i>Russulaceae</i> I	<i>Russula nigricans</i>	707	9e-86	90% <sup>b</sup>	UDB000338	UNITE
<i>Russulaceae</i> II	<i>Russula heterophylla</i>	870	7e-52	92% <sup>b</sup>	UDB000327	UNITE
<i>Russulaceae</i> III	<i>Russula insignis</i>	684	0.0	92%	UDB000894	UNITE
<i>Sebacina helvelloides</i>	<i>Sebacina helvelloides</i>	625	0.0	100%	AJ966750	BLAST
<i>Sebacina incrustans</i>	<i>Sebacina incrustans</i>	663	0.0	100%	AJ966755	BLAST
<i>Sebacinaceae</i> I	<i>Sebacinaceae</i> sp.	625	0.0	94%	AJ534907	BLAST
<i>Sebacinaceae</i> II	<i>Sebacina</i> sp.	600	0.0	94%	UDB000773	UNITE
<i>Sebacinaceae</i> III	<i>Sebacinaceae</i> sp.	677	0.0	95%	AJ534907	BLAST
<i>Tomentella sublilacina</i>	<i>Tomentella sublilacina</i>	1204	0.0	100%	AJ889982	BLAST
<i>Tomentella</i> sp. I	<i>Tomentella</i> sp.	682	0.0	98%	AY635173	BLAST
<i>Tomentella</i> sp. II	<i>Tomentella umbrinospora</i>	665	8e-83	96% <sup>b</sup>	UDB000233	UNITE
<i>Tomentella</i> sp. III	<i>Tomentella</i> sp.	664	e-180	96%	AJ534911	BLAST
<i>Tomentella</i> sp. IV	<i>Tomentella ellisii</i>	673	0.0	95%	UDB000219	UNITE
<i>Thelephoraceae</i> I	<i>Tomentella lateritia</i>	662	0.0	91%	UDB000267	UNITE
<i>Thelephoraceae</i> II	<i>Tomentella subtetacea</i>	650	e-168	91%	UDB000034	UNITE
<i>Thelephoraceae</i> III	<i>Tomentella galzinii</i>	708	0.0	94%	UDB000260	UNITE
<i>Thelephoraceae</i> IV	<i>Thelephora caryophyllea</i>	1192	0.0	94%	UDB000119	UNITE
<i>Thelephoraceae</i> V	<i>Tomentella badia</i>	676	0.0	93%	UDB000961	UNITE
<i>Tuber aestivum</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Tuber</i> sp.	<i>Tuber</i> sp.	628	0.0	96%	AJ879691	BLAST
<i>Tuberales</i> I	<i>Tuber rufum</i>	638	0.0	94%	AY940646	BLAST
<i>Tuberales</i> II	<i>Tuber rapaeodorum</i>	632	1e-91	92% <sup>b</sup>	AJ557521	BLAST
<i>Xerocomus lanatus</i>	-	-	-	-	-	-

Table 2: Mean relative abundance of each sylvicultural treatments in both decline classes over the study period.

ECM Anatomotypes	Abbr. <sup>a</sup>	no-thinned		thinned	
		Class 0	Class 1	Class 0	Class 1
<i>Byssocorticium</i> sp.	<i>Byssoc</i>	-	-	0.013	-
<i>Cenococcum geophilum</i>	<i>CenGeo</i>	0.035	0.028	0.032	0.045
<i>Clavulina cinerea</i>	<i>ClavuCin</i>	0.079	0.067	0.030	0.038
<i>Clavulina</i> sp.	<i>Clavul</i>	0.037	0.017	0.009	0.009
EM1	EM1	0.014	0.008	0.009	0.026
EM2	EM2	0.003	0.001	0.011	0.005
EM3	EM3	0.006	0.010	0.019	0.014
EM4	EM4	0.001	0.003	0.001	0.001
EM5	EM5	0.005	0.004	0.007	-
EM6	EM6	0.015	0.058	0.066	0.123
EM7	EM7	0.007	0.002	0.002	0.001
EM8	EM8	0.004	0.002	-	0.001
EM9	EM9	0.007	0.006	0.003	-
EM10	EM10	0.001	0.002	0.003	0.004
EM11	EM11	0.001	0.002	-	-
EM12	EM12	0.003	0.004	-	-
EM13	EM13	0.004	0.002	0.002	0.005
<i>Entoloma</i> sp.	<i>Entoloma</i>	0.003	0.001	0.003	-
<i>Genea hispidula</i>	<i>GeneaHis</i>	0.012	0.004	-	0.002
<i>Genea</i> sp. I	<i>GeneaA</i>	0.010	0.007	-	0.006
<i>Genea</i> sp. II	<i>GeneaB</i>	0.017	0.008	0.006	0.024
<i>Helvellaceae</i>	<i>Helvell</i>	0.003	0.001	0.002	0.005
<i>Humaria</i> sp.	<i>Humaria</i>	0.013	0.011	0.005	0.013
<i>Inocybe</i> sp. I	<i>InocybeA</i>	0.046	0.044	0.061	0.038
<i>Inocybe</i> sp. II	<i>InocybeB</i>	0.014	0.008	0.033	0.011
<i>Inocybe</i> sp. III	<i>InocybeC</i>	0.006	0.006	0.016	0.010
<i>Inocybe</i> sp. IV	<i>InocybeD</i>	0.007	0.003	0.001	0.001
<i>Laccaria</i> sp.	<i>Laccar</i>	0.024	0.033	0.004	0.017
<i>Lactarius</i> sp. I	<i>LactarA</i>	0.017	0.094	0.070	0.142
<i>Lactarius</i> sp. II	<i>LactarB</i>	0.002	0.003	0.007	0.002
<i>Paxillaceae</i>	<i>Paxillac</i>	0.006	0.005	-	0.003
<i>Peziza</i> sp. I	<i>PezizaA</i>	0.006	0.001	0.006	-
<i>Peziza</i> sp. II	<i>PezizaB</i>	0.005	0.010	0.006	0.002
<i>Pezizaceae</i> I	<i>Pezizace</i>	0.008	0.004	0.003	0.007
<i>Pezizales</i> I	<i>PezizalA</i>	0.024	0.016	0.006	0.005
<i>Pezizales</i> II	<i>PezizalB</i>	0.003	0.012	0.003	0.003
<i>Q.<sup>b</sup> argenteobrunneola</i>	<i>QuerArg</i>	0.002	0.002	0.003	0.001
<i>Q.<sup>b</sup> internangularis</i>	<i>QuerInt</i>	0.002	0.001	0.013	0.004
<i>Q.<sup>b</sup> squamosa</i>	<i>QuerSqu</i>	0.010	0.004	0.024	0.011
<i>Q.<sup>b</sup> stellata</i>	<i>QuerSte</i>	0.003	0.012	0.006	0.023
<i>Russula</i> sp.	<i>Russula</i>	0.036	0.033	0.054	0.024
<i>Russulaceae</i> I	<i>RussulA</i>	0.069	0.037	0.039	0.017
<i>Russulaceae</i> II	<i>RussulB</i>	0.016	0.002	0.008	0.002
<i>Russulaceae</i> III	<i>RussulC</i>	0.015	0.012	0.015	0.014
<i>Sebacina helvelloides</i>	<i>SebacHel</i>	0.013	0.014	0.005	0.008
<i>Sebacina incrustans</i>	<i>SebacInc</i>	0.006	0.006	0.008	0.001
<i>Sebacinaceae</i> I	<i>SebacA</i>	0.007	0.001	0.013	0.005
<i>Sebacinaceae</i> II	<i>SebacB</i>	0.014	0.058	0.008	0.004
<i>Sebacinaceae</i> III	<i>SebacC</i>	-	0.001	0.011	-
<i>Tomentella sublilacina</i>	<i>TomentSb</i>	0.014	0.008	0.019	0.001
<i>Tomentella</i> sp. I	<i>TomentA</i>	0.006	0.005	0.010	0.012
<i>Tomentella</i> sp. II	<i>TomentB</i>	0.002	0.004	0.009	0.009
<i>Tomentella</i> sp. III	<i>TomentC</i>	0.007	0.002	-	0.021



#### 4.2 Struttura e funzionalità della comunità ectomicorrizica

<i>Tomentella</i> sp. IV	<i>TomentD</i>	0.002	0.001	0.012	0.005
<i>Thelephoraceae</i> I	<i>ThelephA</i>	0.172	0.186	0.126	0.113
<i>Thelephoraceae</i> II	<i>ThelephB</i>	0.003	0.003	0.002	0.002
<i>Thelephoraceae</i> III	<i>ThelephC</i>	0.008	0.005	0.006	0.003
<i>Thelephoraceae</i> IV	<i>ThelephD</i>	0.002	0.005	0.019	0.010
<i>Thelephoraceae</i> V	<i>ThelephE</i>	0.129	0.107	0.120	0.110
<i>Tuber aestivum</i>	<i>TuberAe</i>	-	0.001	0.009	0.015
<i>Tuber</i> sp.	<i>Tuber</i>	0.001	-	0.002	0.010
<i>Tuberales</i> I	<i>TuberalA</i>	0.001	-	0.009	0.005
<i>Tuberales</i> II	<i>TuberalB</i>	0.011	0.002	0.011	0.005
<i>Xerocomus lanatus</i>	<i>XeroCLan</i>	-	0.001	0.003	0.002

<sup>a</sup>Abbr., abbreviations used in Fig. 1 and 2.

<sup>b</sup>*Quercirhiza*

Table 3: Mean relative abundance of the five “exploration types” over the studying period in both decline classes and silvicultural treatments.

Sampling date	Decline class	Silvicultural treatment	GR1	GR2	Gr3a	GR3c	GR4
Apr 04	0	NT	0.487	0.493	0.020	-	-
	1	NT	0.576	0.376	0.047	-	-
Jul 04	0	NT	0.414	0.542	0.036	0.008	-
	1	NT	0.545	0.409	0.043	0.004	-
Oct 04	0	NT	0.448	0.486	0.033	0.033	-
		T	0.500	0.473	0.021	0.007	-
	1	NT	0.615	0.321	0.018	0.046	-
		T	0.396	0.473	0.033	0.099	-
Jan 05	0	NT	0.560	0.383	0.031	0.026	-
		T	0.545	0.436	0.009	0.009	-
	1	NT	0.678	0.297	0.025	-	-
		T	0.510	0.471	0.010	0.010	-
Apr 05	0	NT	0.479	0.484	0.023	0.014	-
		T	0.302	0.667	0.016	0.016	-
	1	NT	0.455	0.464	0.058	0.022	-
		T	0.480	0.474	0.011	0.017	0.017
Jul 05	0	NT	0.401	0.483	0.077	0.024	0.014
		T	0.576	0.364	-	0.034	0.025
	1	NT	0.384	0.546	0.027	0.011	0.032
		T	0.550	0.433	-	0.017	-
Oct 05	0	NT	0.404	0.468	0.03	0.034	0.068
		T	0.440	0.497	-	0.029	0.034
	1	NT	0.335	0.586	0.042	0.026	0.010
		T	0.477	0.430	0.046	0.026	0.020
Jan 06	0	NT	0.347	0.574	0.021	0.037	0.021
		T	0.509	0.382	0.012	0.064	0.035
	1	NT	0.341	0.596	0.034	0.024	0.005
		T	0.513	0.396	0.013	0.052	0.026





Fig. 2

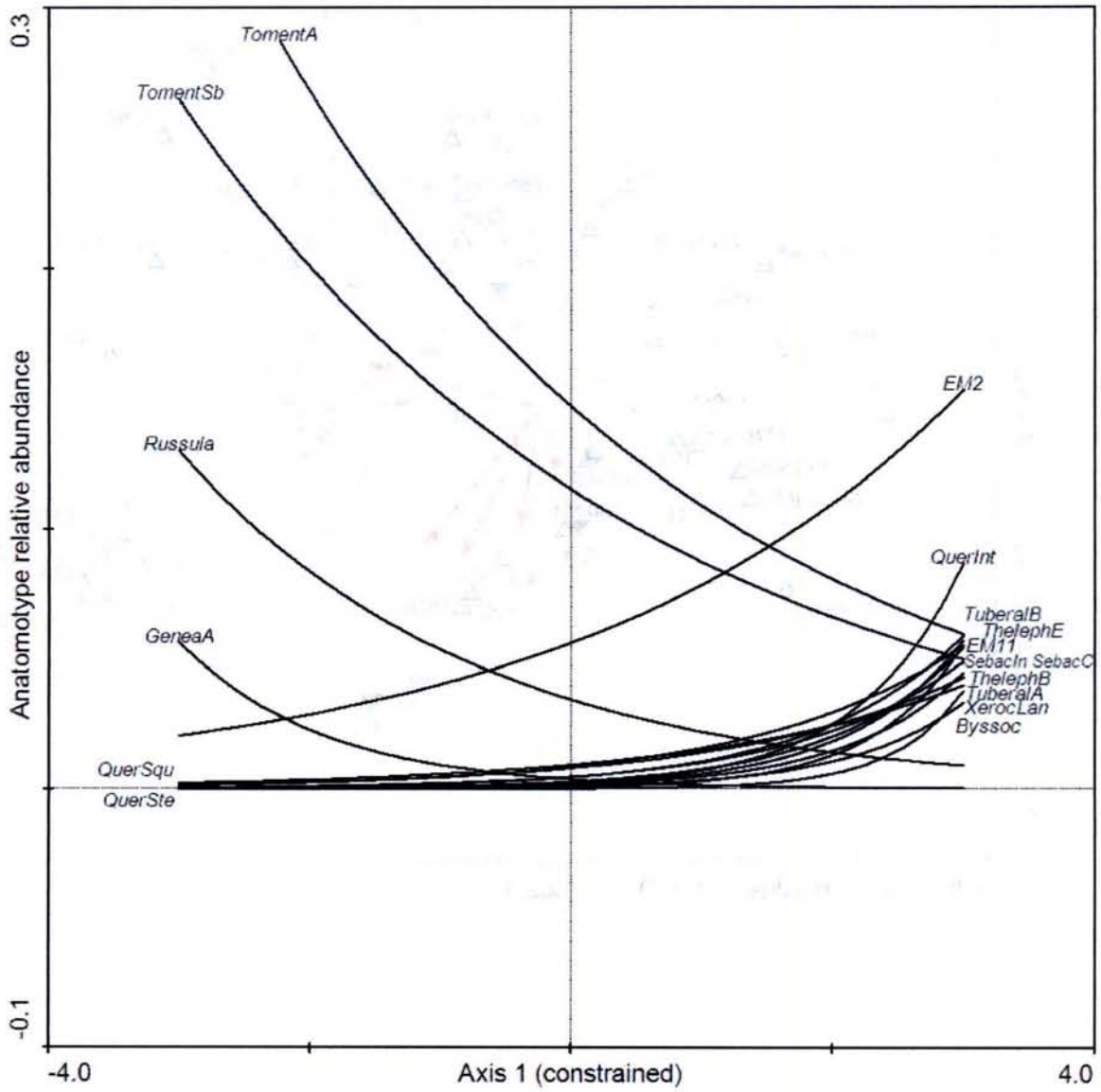


Fig. 3

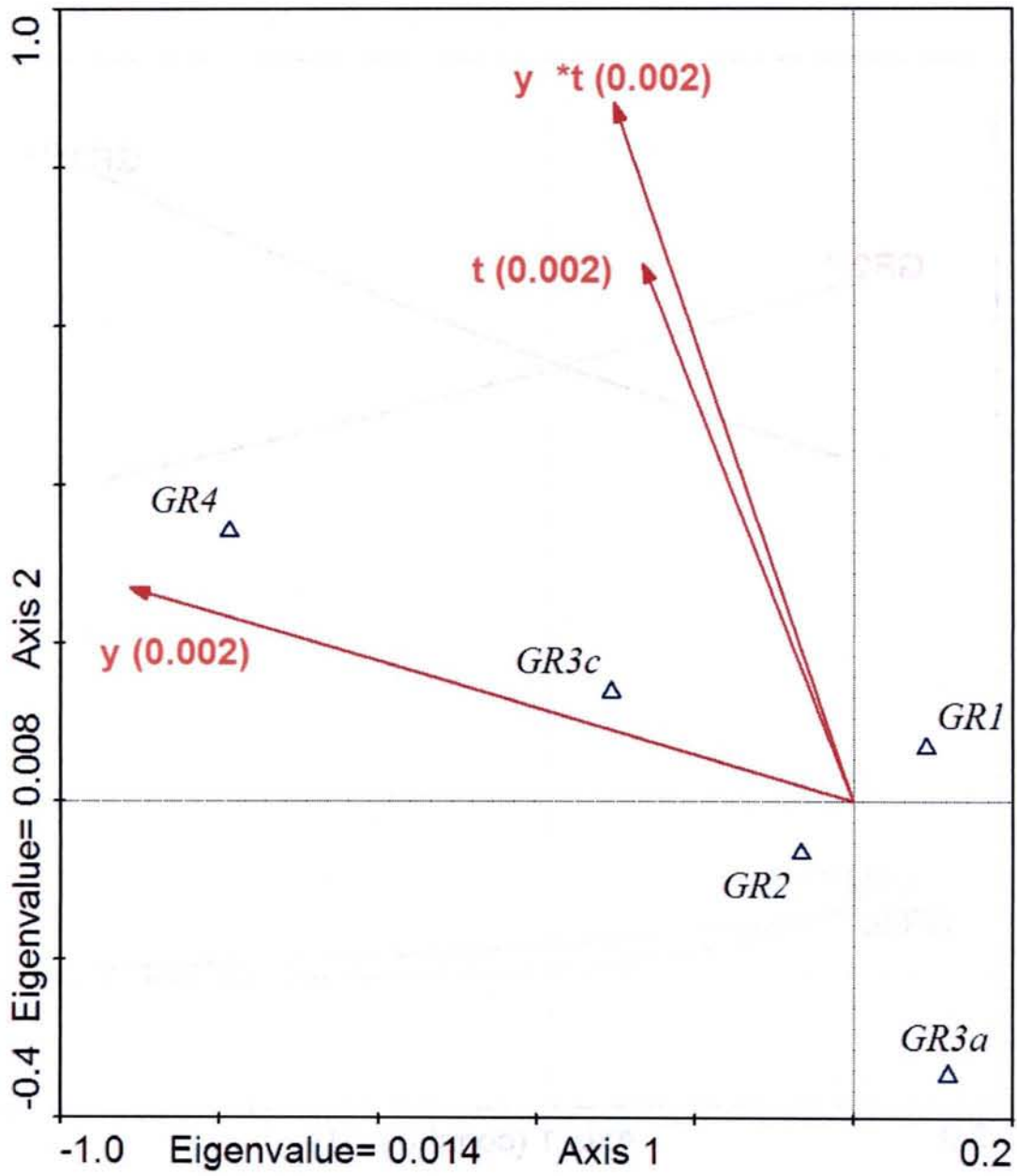
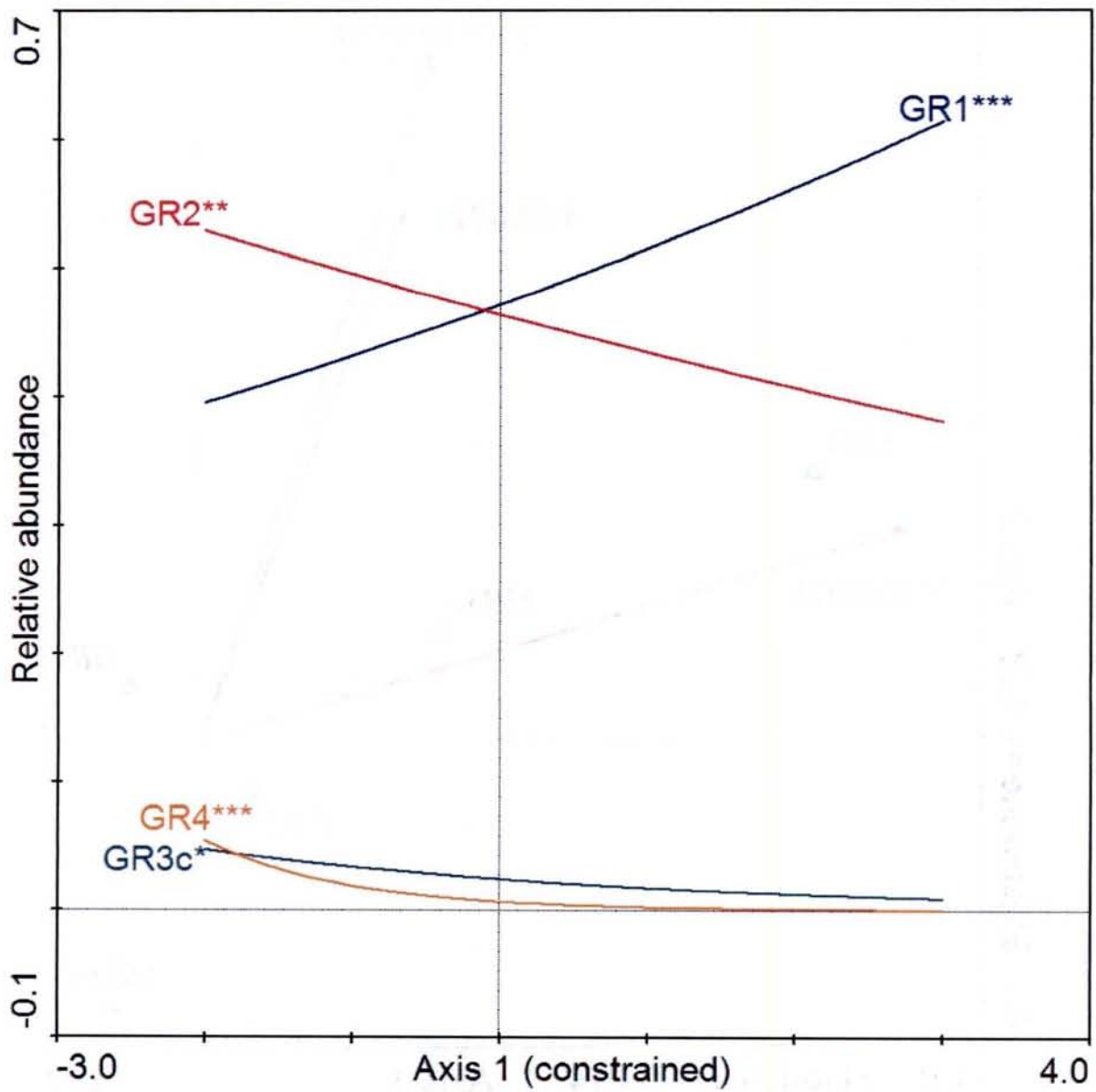




Fig. 4



## 4.3

*Attività enzimatica potenziale  
di tre anatomotipi dominanti*



## **Attività enzimatiche di tre anatomotipi ectomicorrizici di *Quercus robur* L. in relazione allo stato di salute delle piante e al diradamento.**

### **Riassunto**

Nell'agosto del 2004 è stato realizzato un diradamento in un popolamento di querce deperenti. A seguito del trattamento, la struttura della comunità ectomicorrizica è stata monitorata per un periodo di diciotto mesi.

All'interno dell'intera comunità ectomicorrizica si sono identificati tre anatomotipi dominanti: *Clavulina cinerea*, *Tomentella subilacina* e *Russula* sp.

Le attività enzimatiche potenziali dei tre anatomotipi sono state misurate, con i metodi fluorometrici e colorimetrici, nell'inverno e nella primavera del 2006.

In generale i valori ottenuti in inverno sono stati più elevati che in primavera.

In particolare, le attività invernali della fosfatasi e  $\beta$ -glucosidasi sono state influenzate dalla classe di deperimento e dal trattamento silviculturale, mentre in primavera ciascun anatomotipo presentava un diverso profilo di attività enzimatica, dipendente dallo stato di salute delle piante.

Questi risultati suggeriscono come un trattamento silviculturale induca un cambiamento nell'attività enzimatica potenziale delle ectomicorrize. Esse reagiscono probabilmente al disturbo antropico, adattandosi alla nuova disponibilità di risorse.

## **Activités enzymatiques de trois anatomotypes d'ectomycorhizes de *Quercus robur* L. en relation avec le degré de dépérissement et l'éclaircie**

### **Résumé**

Une éclaircie a été réalisée en août 2004 dans un peuplement de chêne pédonculé. Après le traitement, la structure de la communauté des ectomycorhizes a été suivie pendant un an et demi.

La communauté était dominée par *Clavulina cinerea*, *Tomentella sublilacina* et *Russula* sp. Les activités enzymatiques potentielles de ces trois anatomotypes ont été mesurées en hiver et au printemps 2006 par des méthodes fluorimétriques et photométriques en plaques de micro-titration.

Les valeurs mesurées en hiver étaient dans l'ensemble supérieures à celles mesurées au printemps. En particulier, les activités phosphatase acide et  $\beta$ -glucosidase étaient différentes selon le degré de dépérissement des arbres et le traitement sylvicole. Au printemps, chaque anatomotype présentait des profils enzymatiques différents selon le degré de dépérissement des arbres.

Ces résultats suggèrent que les activités enzymatiques potentielles des ectomycorhizes changent après un traitement sylvicole et réagissent à cette perturbation anthropique en s'ajustant à la nouvelle structure de la ressource.



## **Enzymatic activities of three ectomycorrhizal anatomotypes of *Quercus robur* L. in relation to tree decline and thinning.**

### **Abstract**

In a declining oak woodland, a thinning treatment was carried out in August 2004. Following the treatment, the ectomycorrhizal community structure was monitored for one year and a half. The whole ectomycorrhizal community was dominated by *Clavulina cinerea*, *Tomentella sublilacina* and *Russula* sp. The potential enzymatic activities of these three anatomotypes were measured in winter and spring 2006 using microplate photometric and fluorogenic methods. The values recorded in winter were generally higher than in spring. In particular, phosphatase and  $\beta$ -glucosidase activities changed according to both decline class and silvicultural treatment. In spring, each anatomotype displayed different enzymatic profile according to the decline class. These results suggest that the potential activity of ectomycorrhizae change following the silvicultural treatment and probably reacts to the anthropic disturbance by adjusting to the new resource structure.

### **Keywords**

Ectomycorrhizae; Enzymatic profile; Oak decline; *Quercus robur*; Thinning.

## 1 Introduction

The main part of organic C is not available for plant uptake, it is bound as organic residue (Kilham, 1994). Soil microorganism are involved in several processes that allow to maintain quite constant amount of C and their high biodiversity is crucial to preserve soil functionality (Emmerling et al., 2002). Fungi are one of the most representative groups involved in the carbon cycle. According to their nutritional attitude, they can be divided into three groups: saprophytes, symbionts, and parasites. Their mycelial structure is really adapted to soil exploration and their production of oxidative exo-enzymes reach organic matter fractions not accessible for other organisms. Therefore, they are implicated in the formation and decomposition of soil organic matter (Chefetz et al., 1998; Read and Perez-Moreno, 2003). Soil organic matter is principally oxidated by laccases, lignine, and manganese peroxidases (Gramss et al., 1998; Chen et al., 2003).

One third of the microbial biomass in forest soil is constituted by ECM fungi (Högberg and Högberg, 2002) which are associated with roots of many plants in temperate and boreal forests. Ectomycorrhizal fungi have a great importance in plant nutrition due to their anatomical features that can improve soil exploration and several mechanisms that allow mineral complex desegregation. They are able to weathering mineral, to mobilize organic and mineral phosphorus, to transport iron and release nitrogen, kept in organic molecules by production of several extra-cellular enzymes (Smith and Read, 1997). Additionally, it was evaluated that they can transfer of 10-20% of the global photo-assimilates from plants into soils (Smith and Read, 1997). Therefore, fungi realise a quick and extensive exploration of soil and colonise nutrient patches (Boddy 1999).

Anyway, the role of ECM in ecosystems is still discussed; it is difficult to assess the contribution of mycorrhizal fungi to the soil microbial community, since it is necessary to distinguish them from other mycorrhizal fungi, saprotrophic fungi and other decomposers (Högberg and Högberg, 2002).

The ECM community structure associated to a host plant changes with forest ageing (Lastet al., 1987) and following a disturbance such as fire (De Román and De Miguel, 2005) or nitrogen deposition (Lilleskov et al., 2002) or a thinning (Jones et al., 2003; Buée et al., 2005). To evaluate which are the effects of fungal symbiosis on the



ecosystem, it should be identify the factors that influence the fungal symbiosis establishment and their maintenance into the soil (Guidot, 2003).

Several studies were carried out to analyse the structure and the dynamic of ECM community (Tedersoo et al., 2003; Buée et al., 2005; Toljander et al, 2006). Nevertheless, it is necessary to describe the functionality of ECM community to evaluate which is the role of the community within a forest ecosystem and of individual fungi within the community.

Fungi can produce a great range of enzymes and several studies were performed with the aim to valuate their enzymatic activity. Some ECM fungi growing in axenic culture have partially dehydrogenated polymers of lignin monomers (Trojanowski et al. 1984; Haselwandter et al. 1990).

To evaluate the ecological role of enzymatic activity in the mycorrhizosphere, several researches concentrated their attention on the enzymatic activities in extracts of ECM mycelia in the soil matrix (Bending and Read 1995; Colpaert and Van Laere 1996; Gramms, 1997). Therefore, the real involvement of ECM fungi, independently to the soil microorganism, was not demonstrated (Burke and Cairney, 2002). By using agar spot tests for tyrosinase, laccase, polyphenol oxidase and peroxidase Gramss et al (1998) demonstrated that mycorrhizal fungi grown asymbiotically can release extracellular oxidase enzymes.

Recently, a new method was assessed to evaluate the ECM functionality in forest. This method is based on the direct measure of the metabolic activities of a single etomycorrhizal tip. Jany et al. (2003) has monitored glucose respiration of *Lactarius* sp. And *Cenococcum geophilum* in vitro by trapping [<sup>14</sup>C]-CO<sub>2</sub> from radiolabelled glucose to evaluate their response to soil water status. Then, Buée et al. (2004) has monitored the enzymatic activity of phosphatase and laccase for one year using a microplate, showing that enzymatic activities of the dominant fungal species change with species, season, temperature and soil water potential. The microplate assay was developed for measuring potential enzymatic activity of a singular ECM root tip by Pritsch et al (2004), who applied methylumbelliferone (MU)-labelled fluorescent substrates. This method was achieved for β-glucosidase, chitinase and acid phosphatase measurements which are three of the mainly relevant enzymes involved in soil organic matter turnover. To minimize ECM tips damage during the test assay, a microsieve was constructed and adopted.

This method was improved by Courty et al. (2005), who tried to increase the number of enzymatic activities tested without raising the amount of ECM tips used in the measure. With this method eight enzymatic activities, involved in the carbon turnover and in the release of N and P from organic complexes, were monitored in two forests of central Europe. It was found that each ECM types has an own enzymatic activity profile, due to their specialisation in some of the eight tested activities.

The aim of the present work is to evaluate if the biodiversity of an ECM community is related to their functionality in terms of enzymatic activity. After two years of studying the dynamics of ECM community in a declining woodland (Mosca et al., submitted), the study was concentrated on the dominant ECM types to evaluate if after an anthropic disturbance their functionality changes and therefore, if there is a change in the functionality of the whole community.

## **2 Material and Methods**

### **2.1 Site and sampling**

Ectomycorrhizae were sampled in a declining woodland in the north of Italy which has been described in detail (Mosca et al., submitted). The forest is dominated by pedunculate oak, *Quercus robur*, while *Carpinus betulus* is present in the forest understorey. Starting from April 2004 the ECM community dynamics were investigated into two homogeneous areas of the forest. In each area four trees were chosen in a moderate decline status and four in a severe one. In August 2004 a silvicultural treatment (thinning) was carried out in one area to free trees from the neighbour competition.

Sampling was performed around six trees in the treated area and four trees in the control one. In each area, the same number of trees for each decline class was considered.

On the 27<sup>th</sup> of January 2006 four root samples were collected at 1.5 m from the base of the trunk of each tree by cutting blocks of 20 x 20 cm width and 10 cm deep, where most fine roots are concentrated (Agerer, 1991). Soil samples were placed in a plastic box and stored at 4°C for not more than 4 days. Sampling was repeated on



the 8<sup>th</sup> of May 2006 in the same way. A total of 40 samples were obtained at each sampling date.

Fig. 1 shows the mean daily temperature and moisture in a nearby (4 Km) weather station over the investigation period.

## 2.2 Laboratory analysis

Roots were removed from soil, soaked in water and gently washed. Live mycorrhizal tips were observed with stereomicroscope.

The three dominant anatomotypes of the whole ectomycorrhizal community, *Clavulina cinerea*, *Tomentella sublilacina* and *Russula* sp. Were isolated from root samples. Fourteen mycorrhizal tips of each anatomotype were taken from each sample. These dominant anatomotypes were submitted to the enzymatic test.

Seven mycorrhizal tips of the same dimension (4 mm) and in good physiological status were placed in the wells of a clean, flat bottom microtitration plate, leaving the eighth well of the row empty as a control (reference).

To limit the mycorrhizal tip damage during transfer from plate to plate, the microsieves were constructed according to the method described in Pritsch et al. (2004) and Courty et al (2005). The microsieves consisted of a row of eight polymerase chain reaction tubes (200 µl volume), which were modified by cutting their bottom and replacing them by a fine Nylon mesh.

The microsieves were used to transfer seven tips from one row of a 96-well microplate to another one.

Six enzymatic activities were measured following the procedure described by Courty et al. (2005). Four enzyme substrates were based on 4-methylumbelliferone (MU): MU-β-D-glucopyranoside (MU-G) for β-glucosidase, MU-N-acetyl-β-D-glucosaminide (Mu-NAG) for chitinase, MU-β-D-glucuronide hydrate (MU-GU) for glucuronidase, xylopyranoside (MU-X) for xylosidase, MU-cellobioside (MU-C) for cellobiohydrolase, and one substrate based on 7-amino-4-methylcoumarin, leucine-AMC (Leu-AMC) for leucine aminopeptidase activities. All chemicals were purchased from Sigma Aldrich Logistik (Schnelldorf, Germany).

The experimental scheme was designed using two kinds of plates: a clear flat bottomed 96-well plate for incubation or rinsing and a black 96-well microtitration plate for stopping and reading. Root tips were incubated at the temperature of 25°C

#### 4.3 Attività enzimatica potenziale di tre anatomotipi dominanti

and placed on a horizontal oscillator. The incubation time in the black 96-well plate changed depending on the substrate from 20 min for MU-NAG and MU-G, to 40 min for MU-C or 60 min for Leu-AMC, MU-X and MU-GU. Measurements were carried out with fluorescence spectrophotometer (SPECTRAfluor, TECAN, Virginia) microplate reader with an excitation wavelength of 360 nm and an emission wavelength of 465 nm.

The determination of acid phosphatase activity was performed according to the procedure described in Buée et al. (2004). Seven mycorrhizal tips for each sample and anatomotype were placed in 12 rows of a 96-well microtitration plate. Each well of the plate contained 100 µl of acetate buffer (pH=5), 50 µl para-nitro-phenyl phosphate (pNPP) solution (30mM). After incubation time of 30 min at 25°C, in order to stop the reaction 50 µl of NaOH 1 M were added in each well. The measurement of  $A_{405}$  was performed with a fluorescence spectrophotometer (SPECTRAfluor, TECAN, Virginia).

After rinsing in acetate buffer, the same mycorrhizal tips were submitted to photometric assay of laccase activity. Laccase activity was determined using the same method of Courty et al. (2005). After incubating each ECM tip in a well containing 100 µl of Tris-acid buffer (pH=4.5) and 50 µl of 2,2-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate (ABTS) 2mM solution, 150 µl was transferred to a new plate and the absorption were measured with fluorescence spectrophotometer (SPECTRAfluor, TECAN). As described in Courty et al. (2005) the absorption measurement was converted into enzymatic activities by using the relation  $\epsilon_{425} = 3.6 \cdot 10^{-4} \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ .

#### 2.3 Data analysis

The measurements of enzymatic activity were reported against the project area of individual ECM tips, determined with the automated image analysis software WINRHIZO 2003b (Regent Instruments, Inc., Quebec, Canada), after transfer of the ECM tips to a clean plate using tweezers.

For each one of the four samples per tree, the measures of enzymatic activities were calculated as the mean of the seven tips. The normality of data was tested with Univariate procedure (SAS System, The SAS Institute, Cary, NC, USA) and data



were log-transformed to normalise the distribution of the residuals and stabilize the variance.

In order to assess the effect of the declining class and thinning on the potential functionality of the dominant anatomotypes, the measurement of the enzymatic activities was compared between treatments by using univariate analysis of variance performed for each sampling date with General Linear Model (GLM, SAS System, The SAS Institute, Cary, NC, USA). The effect of decline class and thinning was tested based on a nested model with sample considered as the experimental unit and tree, nested in decline class and thinning, the error term for testing the effect of decline class and thinning. Differences among treatments were performed by using the Bonferroni test. The model was checked by testing the evidence of non-normality in residual distribution and by comparing the plots of residual against predicted values.

Firstly, this analysis was performed to check differences among the anatomotypes, then to test difference among treatments for each anatomotype.

### 3. Results

Sixty-four different anatomotypes were found in the declining oak woodland throughout the whole study period. The community structure was dominated by four fungal families: *Thelephoraceae*, *Russula* and *Sebacinaceae*, as well as member of *Cortinariaceae*, which represented 34.3 %, 18.2%, 4.5% and 7.6% of the total, respectively (Mosca et al., submitted). The dominant anatomotype at the genus level s were identified as *Tomentella subilacina*, *Russula* sp. And *Clavulina cinerea*, which accounted for 11.6%, 3.7%, 5.3%, respectively and were studied in the present work. The identification of fungi symbiont was performed with morphological description of the main features and with the extraction of DNA (Table 1).

The measurement carried out in January 2006 showed a low variability among the anatomotypes tested. The only significant difference occurred for leucine-aminopeptidase activity, which was higher ( $p$ -value<0.05) for *Tomentella subilacina* than for the other anatomotypes.

Generally for all three anatomotypes, laccase activity was higher in the treated trees than in the others ( $p$ -value=0.0414). The effect of thinning was significant ( $p$ -value=0.0428) for the chitinase activity; the thinned trees showed an activity higher

than the others (Bonferroni test,  $p$ -value=0.0030). For the glucoronidase the test demonstrated that all factors have a significant effect and their significance increased from decline class ( $p$ -value=0.0696), thinning ( $p$ -value=0.0058) and their interaction ( $p$ -value=0.0036). Bonferroni test showed that both the moderate decline class and thinned trees have a glucoronidase activity higher than the other class and the control, with the significance of 0.0113 and 0.0001, respectively.

The analysis performed for each anatomotype demonstrated that phosphatase activity of *Clavulina cinerea* was significantly higher in the moderate decline class ( $p$ -value=0.0049) and in the unthinned trees as well ( $p$ -value=0.0317). The highest activity was found in unthinned trees belonging to the moderate decline class ( $p$ -value=0.0115). In *Russula* sp. A significant ( $p$ -value=0.0277) effect of the interaction between decline class and thinning rose, but Bonferroni test did not evidence any difference among treatments.

Laccase activity was only influenced by decline class ( $p$ -value=0.0496) for *Clavulina cinerea*. Bonferroni showed that the activity was higher in the moderate decline class ( $p$ -value=0.0107). Moreover, the interaction between decline class and thinning evidenced that the moderately declining thinned trees had the highest activity value ( $p$ -value=0.0154).

Chitinasi activity was almost the same in all treatments and for all anatomotypes.

For *Clavulina cinerea*  $\beta$ -glucosidase activity was significantly affected by decline class ( $p$ -value=0.0446), thinning ( $p$ -value=0.0421) and their interaction ( $p$ -value=0.0028). Comparing the means of each class or treatment, it was found that the moderate decline class had higher activity ( $p$ -value=0.0108) and thinned trees ( $p$ -value=0.0043) as well. The highest activity occurred in the moderately declining thinned trees (253.32  $\mu\text{mol mm}^{-2} \text{min}^{-1}$ ); this value was strongly ( $p$ -value<0.0001) different from the other treatments.

For *Tomentella sublilacina* the interaction between thinning and decline class had a significant ( $p$ -value=0.0160) effect on  $\beta$ -glucosidase activity. The thinned trees had an activity around 234.90  $\mu\text{mol mm}^{-2} \text{min}^{-1}$ , significantly ( $p$ -value=0.0214) higher from the unthinned ones. The moderately declining thinned trees had the highest  $\beta$ -glucosidase activity (352.68  $\mu\text{mol mm}^{-2} \text{min}^{-1}$ ), while the unthinned trees of the same class had the lowest one (90.43  $\mu\text{mol mm}^{-2} \text{min}^{-1}$ ).

For *Russula* sp. The effect of decline class, thinning and their interaction were significant on  $\beta$ -glucosidase activity ( $p$ -value=0.0367, 0.0005 and 0.0117,



respectively). The thinned trees had an activity double than the unthinned ones ( $p$ -value=0.0006). Moreover, the moderately declining thinned trees had a significantly ( $p$ -value<0.05) higher activity ( $233.74 \text{ pmol mm}^{-2} \text{ min}^{-1}$ ) from all others treatments.

Cellobiohydrolase activity did not change among treatments, only for *Clavulina cinerea* the moderately decline trees showed higher activity ( $p$ -value=0.0439).

For *Clavulina cinerea*, leucina-aminopectidase activity was higher in the moderately declining trees ( $p$ -value=0.0327), while glucoronidase activity was generally the same in all treatments for all anatomotypes.

In general, the enzymatic activities measured in May 2006 were highly differentiated among the anatomotypes. *Tomentella sublilacina* showed a lower activity than the others for all tests with the exception of phosphatase activity. In general, *Clavulina cinerea* and *Russula* had the same activity profile; once *Clavulina cinerea* showed higher cellobiohydrolase activity. For phosphatase activity all factors (anatomotype, decline class, thinning and the interaction of the last two) were strongly significant ( $p$ -value<0.0001). The moderate decline class showed lower activity than the other one ( $p$ -value<0.0001), independently from the thinning treatment ( $p$ -value<0.001). Also for laccase activity the influence of the factors was highly significant ( $p$ -value<0.0001). By comparing means with Bonferroni test, the activity was lower in both the moderate decline class and the unthinned trees ( $p$ -value<0.0001,  $p$ -value=0.0266, respectively). For chitinase and glucosidase activities, a difference between treatments occurred according to Bonferroni test: the thinned trees had higher activity than the other ones ( $p$ -value<0.001 and  $p$ -value<0.0001, respectively). The highest chitinase activity was found in the severely declining thinned trees; while the highest glucosidase activity occurred in the thinned trees, independently from the decline class. Cellobiohydrolase activity was higher in the thinned trees ( $p$ -value=0.0072); the severely decline thinned trees showed significantly higher activity than the other treatments ( $p$ -value=0.0186). The severe decline class demonstrated significantly higher activity for both leucine-aminopectidase and xylosidase activities ( $p$ -value=0.0072 and  $p$ -value= 0.0704, respectively). The severely declining thinned trees showed higher glucoronidase activity than the unthinned ones of the same class ( $p$ -value=0.0634).

The GLM analysis and means multiple comparisons were carried out for each anatomotype. For *Clavulina cinera*, phosphatase activity was influenced only by the decline class ( $p$ -value=0.0032): the moderate decline class had higher activity ( $p$ -

value=0.0005), independently from the thinning treatment. For *Tomentella sublilacina*, all factors were significant (p-value=0.0001). Comparing the decline class means, the moderate decline one showed lower phosphatase activity (p-value<0.0001); whereas the thinned trees had higher activity (p-value<0.0436), independently from the decline class.

For *Russula* sp. The decline class and its interaction with thinning influenced phosphatase activity (p-value=0.0010 and p-value=0.0619, respectively). The moderate decline trees had lower (p-value<0.0001) activity than the others, independently from the thinning.

For *Clavulina cinerea* laccase activity was influenced by decline class (p-value=0.0150) and its interaction with thinning (p-value=0.0017). The moderate decline class showed higher activity than the other (p-value=0.0442), while thinned trees had a lower activity than the unthinned ones (p-value=0.0023). The highest value was measured in the severely decline unthinned trees (p-value<0.0377). For *Tomentella sublilacina* all factors had an effect on laccase activity (p-value<0.0001). The severe decline class demonstrated a lower activity (p-value=0.0002) than the other one. For *Russula* sp. Both decline class and thinning significantly influenced laccase activity (p-value=0.0082 and p-value=0.0420, respectively). The activity was higher in the moderately declining trees (p-value=0.0103).

Chitinase activity was higher (p-value<0.0001) in the thinned trees, only for *Clavulina cinerea*

The  $\beta$ -glucosidase activity was influenced by thinning (p-value=0.0577) for *Clavulina cinerea*. The activity was higher in the thinned trees (p-value<0.0001), independently from their decline status. The same occurred for *Tomentella sublilacina* (p-value=0.0030).

For *Clavulina cinerea* Bonferroni test showed that both cellobiohydrolase and leucina activities were lower in the unthinned trees (p-value=0.0018; p-value=0.0658, respectively). Leucina activity of *Russula* sp. Was higher in the severe decline class (p-value=0.0132). For *Clavulina cinerea*, glucoronidase activity was lower (p-value=0.0533) in the unthinned trees than in the others.

For each sampling date, the relative activities of each anatomotype were calculated dividing the mean activity of each treatment for the mean activity of all treatments and ECM anatomotypes. Fig. 2a and b shows the enzymatic activity profiles of



*Clavulina cinerea*, *Tomentella sublilacina* and *Russula* sp., in January and May 2006, respectively.

In January 2006, the anatomotypes displayed homogeneous activity profiles. Not so many differences were present among the anatomotypes, whereas there were remarkably differences among treatments. Two tests were particularly interesting because they had the same tendency in all anatomotypes. Phosphatase activity in moderately decline unthinned trees was higher than in the others treatments, while glucoronidase activity was higher in the thinned trees of the same class.

In May 2006, the anatomotypes displayed different activity profiles. *Clavulina cinerea* showed a lower enzymatic activity independently from the treatments, while the profile of *Tomentella sublilacina* was characterised by the dominance of phosphatase activity in the moderately declining trees thinned and of laccase in the unthinned trees belonging to the same class. *Russula* sp. Displayed different enzymatic profile according to tree health status: in the moderate decline class unthinned trees showed higher chitinase, xylosidase, glucoronidase activities, whereas in the severe decline one the thinned trees were more actives in laccase, chitinase and phosphatase.

#### 4. Discussions and conclusions

The functionality of the three dominant anatomotypes were measured in winter and spring 2006 to evaluate the effects of tree declining status and thinning.

In January 2006 the activity profiles were almost the same for the tree anatomotypes, with the exception of leucine-aminopeptidase. *Tomentella sublilacina* showed the highest leucine-aminopeptidase activity. This enzyme is involved in the desegregation of proteins, and is a good marker of the protease activity (Vepsäläinen et al., 2001). Abuzinadah and Read (1986) divided fungi in two categories according their ability to produce protease enzyme. This result suggests that *Tomentella sublilacina* could belong to the protease fungi category.

In winter the phosphatase activity of all anatomotypes was higher than in spring. This result confirmed the study on *Lactarius quietus*, *Cortinarius anomalus* and *Xerocomus chrysenteron* (Courty et al., 2006), which found an increase in phosphatase activity during the winter. The three dominant anatomotypes displayed a phosphatase activity significantly higher in the unthinned trees belonging to the

moderate decline class. In particular for *Clavulina cinerea* both decline class and thinning influenced the phosphatase potential activity. This result was consistent with what was found by Buée et al. (2004) in a beech forest subjected to two thinning treatments. All three anatomotypes displayed a significant effect of the decline class and thinned interaction. Phosphatase activity was higher in the moderately declining unthinned trees, while in the other class this behaviour was shown by the thinned trees. This activity changes according to some soil features, such as the concentration of phosphor, the pH and the temperature (Tibett et al., 1998a; 1998b; Alvarez et al., 2003).

Another interesting result of the study is the evidence of positive thinning effect for  $\beta$ -glucosidase activity in winter. The result was probably connected with the fact that sampling was done after frost (Fig. 1) and probably the increase in soil temperature acts positively in the degradation of vegetal residues.

All anatomotypes showed higher  $\beta$ -glucosidase activity in the moderately declining thinned trees. There was also an effect on the health status of trees, as the severe decline class did not show any difference between silvicultural treatments.  $\beta$ -glucosidase is involved in the degradation of celluloses and hemicelluloses. It is plausible to suppose a change in the cellulose substrate availability around the thinned trees and a better reaction of the moderately declining trees against that change.

*Clavulina cinerea* was particularly active in winter, as was reported for another *Clavulina* sp. By Buée et al. (2004). It also displayed the highest values in the moderately decline thinned trees for laccase, chitinase and leucine-aminopeptidase.

In spring the three anatomotypes displayed different activity profiles, which were characterised by the dominance of some activities depending on the treatment. *Tomentella sublilacina* showed lowest activity for all tests, with the exception of phosphatase. Generally, the potential activity found in spring was lower than what was measured in winter. In particular, laccase did not show the increase in activity that would be expected because of its involvement in the mobilisation of N, as reported by Courty et al. (2006).

Phosphatase activity was strongly influenced by the decline class; all anatomotypes featured a lower activity in the moderate decline one. The thinned trees displayed higher activity for chitinase,  $\beta$ -glucosidase, cellobiohydrolase and leucine-aminopeptidase; while laccase was higher in the unthinned ones.



The three anatomotypes reacts differently to thinning depending on their decline class. Comparing the two decline classes unthinned, *Clavulina cinerea*, *Russula* sp. And *Tomentella sublilacina* displayed higher activity for phosphatase, laccase and leucina aminopectinase in the severely decline trees.

Regarding the potential effect of thinning on ECM functionality some common aspects were found. In the severely declining thinned trees both *Clavulina cinerea* and *Russula* sp. Displayed the highest activity for all tests, with the exception of xylosidase. For the moderate decline class both *Tomentella sublilacina* and *Russula* sp. Seem to change their potential phosphatase activity according to the thinning treatment. For the severe decline class *Tomentella sublilacina* appeared specialised in laccase activity for the unthinned trees, while in  $\beta$ -glucosidase for the thinned ones.

These changes in the potential enzymatic activities of the dominant anatomotype lead to suppose that a change in the ECM community also occurs following an anthropic disturbance. After monitoring the dynamics of the ECM community for more than one year, a shift in the community structure was found. This study tried to explore if the anatomotype occurrences correspond with a real importance in terms of their functionality. Some of our results suggest an adjustment of the mycorrhizae to the changed situation. Therefore, this may suppose that the whole community reacts against the disturbance by changing the anatomotype functionality in a complementary way.

These considerations about ECM functionality should be considered against several facts. First, only the dominant anatomotypes were taken into account and their potential activity were measured at two dates. It might be interesting to monitor even longer the enzymatic activity in order to split the effect of an anthropic disturbance from the seasonal changes. Then, we should be aware that enzymatic activity in the soil arises from the combination of root tissues, symbiotic fungus and the ECM – associated bacteria (Frey-Klett et al., 2005).

## References

- Abuzinadah, R.A., Read, D.J., 1986. The role of proteins in the nitrogen nutrition of ectomycorrhizal plants. I. Utilization of peptides and proteins by ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist* 103, 481-493.
- Alvarez, M., Härtel, S., Godoy, R., Heyser, W., 2003. New perspectives on the determination of phosphatase activity in ectomycorrhizae *Nothofagus obliqua* forests in southern Chile, Guyana. *Botanica* 60: 41-46.
- Bending, G.D., Read, D.J., 1995. The structure and function of the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. VI. Activities of nutrient mobilising enzymes in birch litter colonised by *Paxillus involutus* (Fr.) Fr. *New Phytologist* 130, 411-417.
- Boddy, L., 1999. Saprotrophic chord forming fungi: meeting the challenge of heterogeneous environments. *Mycologia* 91, 13-32.
- Buée, M., Vairelles, D., Garbaye, J., 2005. Year-round monitoring of diversity and potential metabolic activity of the ectomycorrhizal community in a beech (*Fagus sylvatica*) forest subjected to two thinning regimes. *Mycorrhiza* 15, 235-245.
- Burke, R., Cairney, J., 2002. Laccases and other polyphenol oxidases in ecto- and ericoid mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 12 (3), 105-116
- Chen, D.M., Bastias, B.A., Taylor, A.F.S., Cairney, J.W.G., 2003. Identification of laccase-like genes in ectomycorrhizal Basidiomycetes and transcriptional regulation by nitrogen in *Piloderma byssinum*. *New Phytologist* 157, 547-554.
- Chefetz, B., Chen, Y., Hadar, Y., 1998. Purification and characterization of laccase from *Chaetomium thermophilum* and its role in humification. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 3175-3179.



Colpaert, J.V., Van Laere, A., 1996. A comparison of the extracellular enzyme activities of two ectomycorrhizal and a leaf-saprotrophic basidiomycete colonizing beech leaf litter. *New Phytologist* 133, 133–141.

Courty, P.E., Pritsch, K., Schloter, M., Hartmann, A., Garbaye, J., 2005. Activity profiling of ectomycorrhiza communities in two forest soils using multiple enzymatic tests. *New Phytologist* 167, 309–319.

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 (6), 471–482.

Dighton, J., Kooistra, M., 1993. Measurement of proliferation and biomass of fungal hyphae and roots. *Geoderma* 56, 317– 330.

Emmerling, C., Schloter, M., Hartmann, A., Kandeler, E., 2002. Functional diversity of soil organisms—a review of recent research activities in Germany. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 165, 408– 420.

Frey-Klett, P., Chavatte, M., Clause, M.L., Courier, S., Le Roux, C., Raaijmakers, J., Martinotti, M.G., Pierrat, J.P., Garbaye, J., 2005. Ectomycorrhizal symbiosis affects functional diversity of rhizosphere fluorescent pseudomonads. *New Phytologist* 165, 317–328.

Gramms, G., 1997. Activity of oxidative enzymes in fungal mycelia from grasslands and forest soils. *J Basic Microbiol* 6, 407–423.

Gramss, G., Guenther, T., Fritsche, W., 1998. Spot tests for oxidative enzymes in ectomycorrhizal, wood-, and litter decaying fungi. *Mycological Research* 102, 67– 72.

Haselwandter, K., Bobleter, O., Read, D.J., 1990. Degradation of <sup>14</sup>C labelled lignin and dehydropolymer of coniferyl alcohol by ericoid and ectomycorrhizal fungi. *Arch Microbiol* 153, 352–354.

Högberg, M.N., Hogberg, P., 2002. Extramatrical ectomycorrhizal mycelium contributes one-third of microbial biomass and produces, together with associated roots, half the dissolved organic carbon in a forest soil. *New Phytologist* 154, 791–795.

Jany, J.L., Martin, F., Garbaye, J., 2003. Respiration activity of ectomycorrhizas from *Cenococcum geophilum* and *Lactarius* sp. In relation to soil water potential in five beech forests. *Plant and Soil* 255, 487–494.

Jones, M.D., Durall, D.M., Cairney, J.W.G., 2003. Ectomycorrhizal fungal communities in young forest stands regenerating after clearcut logging. *New Phytologist* 157, 399–422.

Killham, K., 1994. *Soil Ecology*. Cambridge University Press. 260 pp.

Pritsch, K., Raidl, S., Marksteiner, E., Blaschke, H., Agerer, R., Schloter, M., Hartmann, A., 2004. A rapid and highly sensitive method for measuring enzyme activities in single mycorrhizal tips using 4-methylumbelliferone-labelled fluorogenic substrates in a microplate system. *J. Microbiological Methods* 58, 233–241.

Read, D.J., Perez-Moreno, J., 2003. Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems—a journey towards relevance? *New Phytologist* 157, 475–492.

Sit, V., 1995. *Analysing ANOVA Designs*. Biom. Info. Hand. 5. Res. Br., B.C., Min. For., Victoria, B.C. Work. Pap. 07/1995.

Smith, S.E., Read, D.J., 1997. *Mycorrhizal Symbiosis* (2<sup>nd</sup> ed.). Academic Press, San Diego. 605 pp.

Tedersoo, L., Kõljalg, U., Hallenberg, N., Larsson, K.H., 2003. Fine scale distribution of ectomycorrhizal fungi and roots across substrate layers including coarse woody debris in a mixed forest. *New Phytologist* 159 (1), 153–165.



Thorn, G., 1997. The fungi in soil. In: van Elsag, J.D., Trevors, J.T., Wellington, E.M.H. (Eds.), *Modern Soil Microbiology*. Marcel Dekker, New York, pp. 63– 128.

Tibett, M., Sanders, F.E., Cairney, J.W.G., 1998a. The effect of temperature and inorganic phosphorus supply on growth and acid phosphatase production in arctic and temperate strains of ectomycorrhizal *Hebeloma* spp. In axenic culture. *Mycological Research* 102, 129-135.

Tibett, M., Chambers, S.M., Cairney, J.W.G., 1998b. Methods for determining extracellular and surface-bound phosphatase activities in ectomycorrhizal fungi. In: *Mycorrhizal manual*. (Ed. Warma, A.), chapter 14, Springer Verlag, Heidenberg, Germany.

Trojanowski, J., Haider, K., Hüttermann, A., 1984. Decomposition of <sup>14</sup>C-labelled lignin holocellulose and lignocellulose by mycorrhizal fungi. *Arch Microbiol* 139, 202–206.

Toljander, J.F., Eberhardt, U., Toljander, Y.K., Paul, L.R., Taylor, A.F.S., 2006. Species composition of an ectomycorrhizal fungal community along a local nutrient gradient in a boreal forest. *New Phytologist* , 170, 873–884

Vepsäläinen, M., Kukkonen, S., Vestberg, M., Sirviö, H., Niemi, M., 2001. Application of soil enzyme activity test kit in a field experiment. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 1665-1672.

### Figure legends

Fig 1: Mean daily temperature (black circle) and mean daily moisture (white triangle) measured at Mansuè weather station in January and May 2006.

Fig. 2: Enzymatic activity profiles of *Clavulina cinerea*, *Tomentella sublilacina* and *Russula* sp. Sampled in January (a) and May 2006 (b). The graphs were drawn from the treatment relative activities normalised over the mean value of all samples. Black lines are for severely decline class, grey lines for moderately decline one and dotted line are for thinned trees.



Table 1: Description of the main features of the dominant anatomotypes in Basalghelle forest and their molecular identification.

<b>ECM anatomotype</b>	<b>Macroscopic description</b>	<b>Outer mantel</b>	<b>Inner mantel</b>	<b>Emanating hyphae</b>	<b>Best match sequence</b>	<b>Similarity</b>	<b>Accession number</b>
<i>Clavulina cinerea</i>	Pinkish white; monopodial-pinnate; cottony	Transitional type between plectenchymatous and pseudoparenchymatous, irregularly shaped hyphae form a coarse net	Plectenchymatous, hyphae arranged net-like, repeatedly and squarrosely branched	White; with clamps; open H-shaped anastomosis	<i>Clavulina cinerea</i>	99%	UDB000074
<i>Russula sp.</i>	Yellowish white to pinkish white; in old parts light brown; monopodial pinnate; smooth	Plectenchymatous; hyphae arranged net like, repeatedly and squarrosely branched	Transitional type between plectenchymatous and pseudoparenchymatous irregularly shaped hyphae form a coarse net	Scarce; hyaline	<i>Russula sp.</i>	98%	AF418629
<i>Tomentella sublilacina</i>	Light to dark brown; irregularly pinnate; smooth	Pseudoparenchymatous mantle with epidermoid cells	Plectenchymatous, hyphae rather irregularly arranged	Colourless; with clamps; open H-shape anastomosis Y-shape ramification	<i>Tomentella sublilacina</i>	100%	AJ889982

4.3 Attività enzimatica potenziale di tre anatomotipi dominanti

Fig. 1

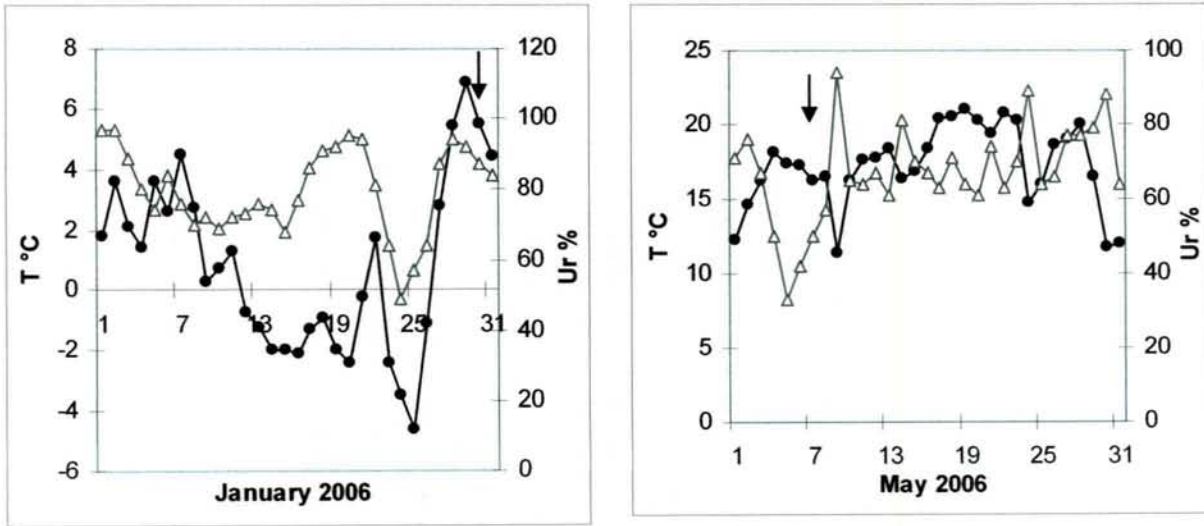




Fig. 2a

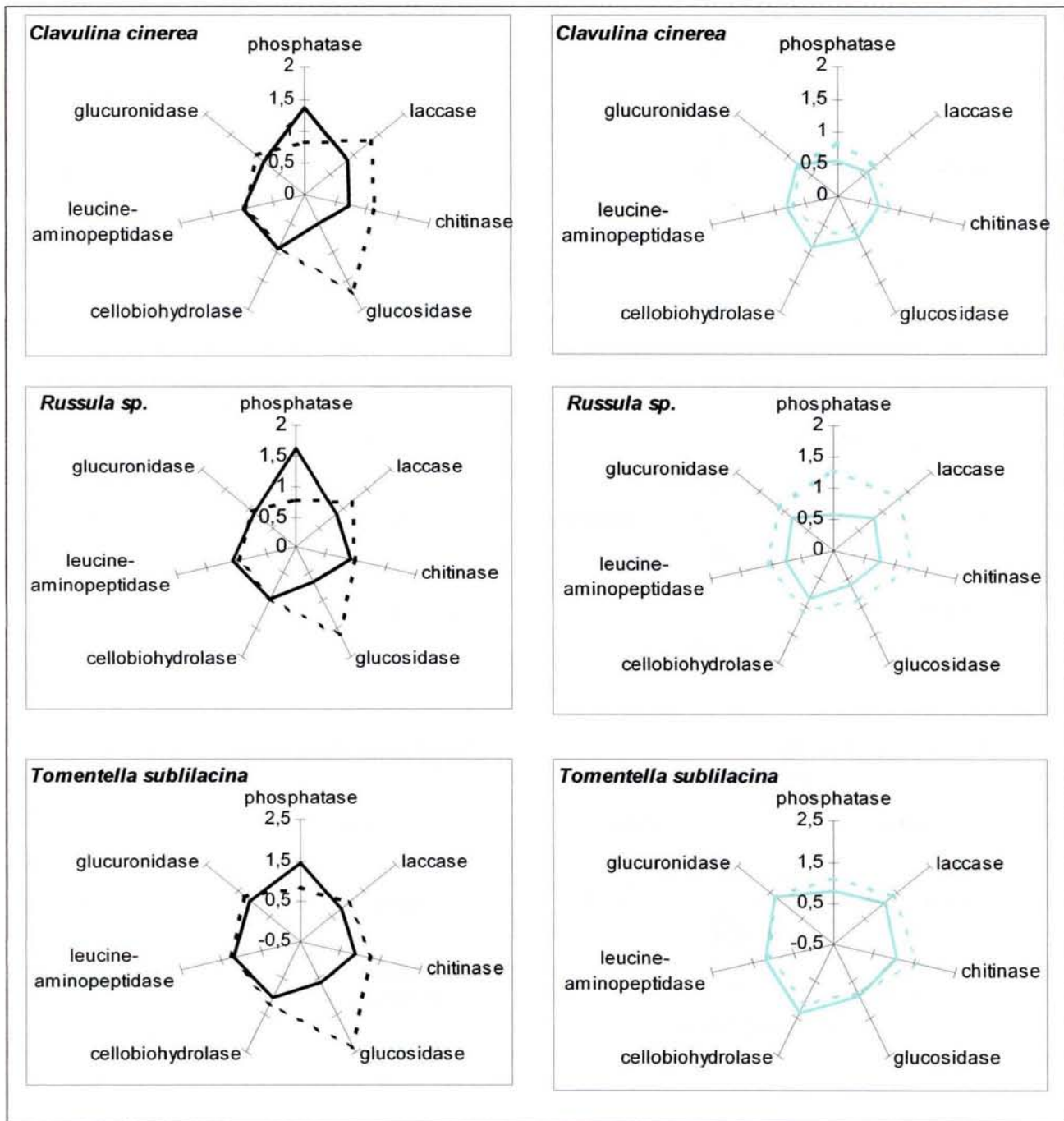
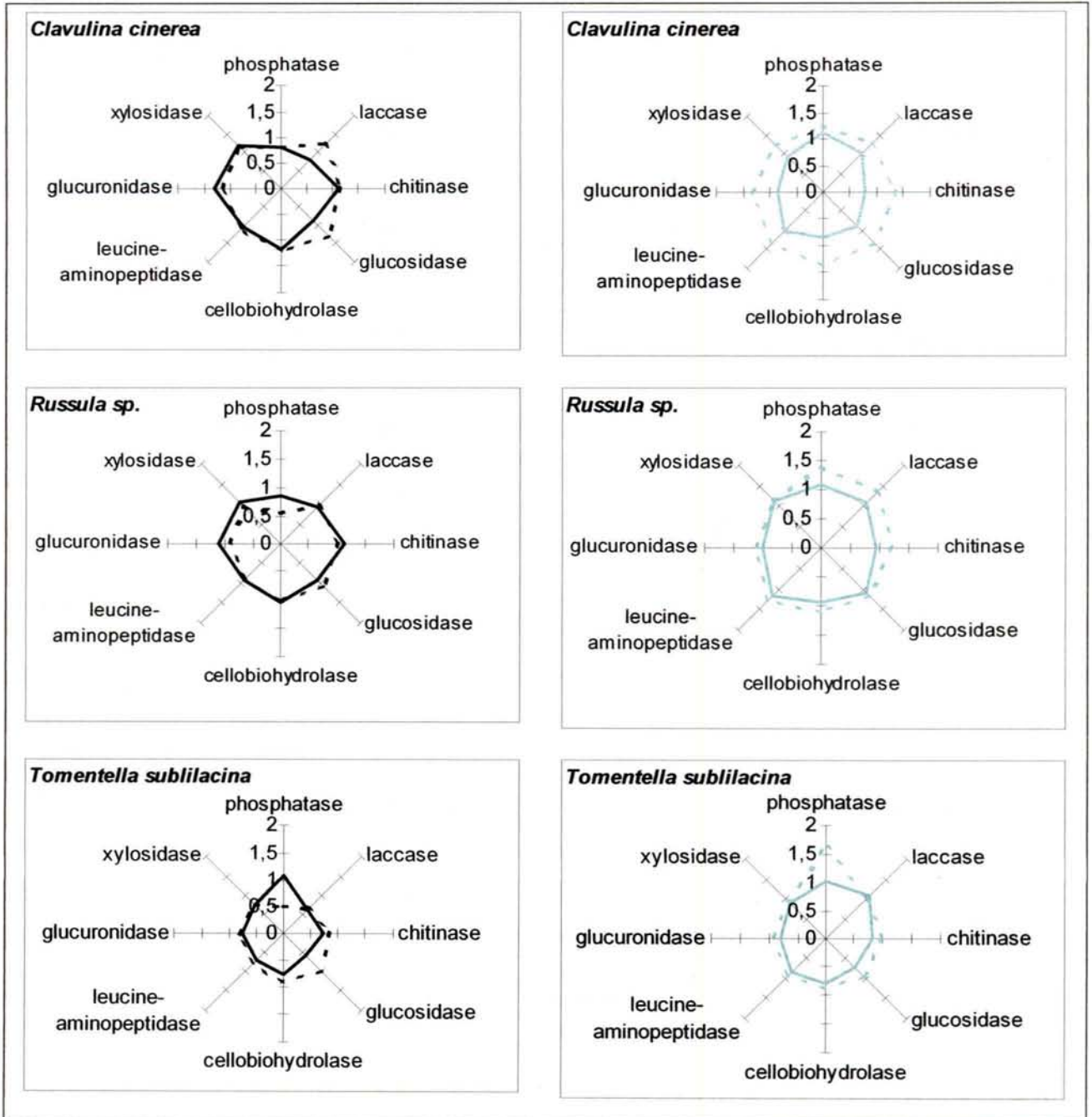


Fig. 2b





#### 4.3 Attività enzimatica potenziale di tre anatomotipi dominanti

Means multiple comparisons made by Bonferroni test with the probability (\* P<0.05; \*\* P<0.01; \*\*\* P<0.001) calculated using plant nested into decline class and thinning as an error term (January 2006). Values followed by the same letter are not statistically different.

ECM		Phospat.	Laccase	Chitinase	Glucosid.	Cellohydr.	Leuc-am.	Glucuron.
<i>Clavulina cinerea</i>		4.41	580.13	139.59	127.25	124.38	126.44B *	151.37
<i>Tomentella subliilacina</i>		5.28	628.24	194.44	178.56	168.59	167.32A	223.43
<i>Russula sp.</i>		5.28	640.52	159.68	135.44	139.98	138.82 B	166.86
decline class	thinning	Phospat.	Laccase	Chitinase	Glucosid.	Cellohydr.	Leuc-am.	Glucuron.
0		5.78	609.02	159.38	183.51A **	145.19	153.56	177.05
1		4.20	623.57	169.75	110.66B	143.44	134.83	184.07
	0	5.39	507.1B	136.58B	98.64B	146.16	143.99	171.86
	1	4.58	725.5A**	192.56A**	195.53A***	142.46	144.40	189.25
0	0	7.57A*	503.50	137.83B	87.11C	142.26	155.70	167.76
0	1	3.99B	714.54	180.94A	279.91A***	148.12	151.43	186.34
1	0	3.22B	510.69	135.33A	110.17B	150.06	132.27	175.98
1	1	5.18B	736.45	204.17A *	111.14B	136.81	137.38	192.16

#### *Clavulina cinerea*

decline class	thinning	Phospat.	Laccase	Chitinase	Glucosid.	Cellohydr.	Leuc-am.	Glucuron.
0		5.51A**	672.82A*	148.80	163.58A**	135.16A *	142.2 A*	159.11
1		2.97B	402.84B	116.47	93.17B	106.56B	105.27B	131.38
	0	4.88A*	443.83B	114.07	90.39B	133.17	131.48	145.25
	1	3.61	631.83A**	151.20	166.36A**	108.55	115.99	145.24
0	0	6.99A**	535.64AB	118.84	73.84B***	136.05	144.59	146.91
0	1	4.03B	810.00A**	178.76	253.32A	134.27	139.80	171.32
1	0	2.76B	352.02B	109.30	106.95B***	130.28	118.38	143.60
1	1	3.18B	453.66AB	123.64	79.40B***	82.83	92.17	119.15

#### *Tomentella subliilacina*

decline class	thinning	Phospat.	Laccase	Chitinase	Glucosid.	Cellohydr.	Leuc-am.	Glucuron.
0		5.78	542.26	172.94	221.55	161.01	169.39	211.02
1		4.81	745.45	211.67	124.27	176.92	166.35	239.26
	0	5.69	554.04	154.08	110.92	172.85	172.36	219.02
	1	4.90	733.67	230.52	234.90A**	165.08	163.37	231.25
0	0	7.40	452.19	142.01	90.43B	149.83	168.19	197.49
0	1	4.16	632.33	203.87	352.68A**	172.20	176.53	224.54
1	0	3.98	655.89	166.16	131.41AB	195.87	170.58	240.55
1	1	5.64	835.01	257.18	117.13B	157.96	156.16	237.97

#### 4.3 Attività enzimatica potenziale di tre anatomotipi dominanti

<i>Russula sp.</i>								
Decline class	thinning	Phosphat.	Laccase	Chitinase	Glucosid.	Cellohydr.	Leuc-am.	Glucuron.
0		6.05	611.99	156.42	165.40A*	139.40	146.14	161.01
1		4.59	643.05	166.71	113.39	141.11	132.39	172.03
	0	5.64	519.06	140.44	95.07	133.80	132.39	152.42
	1	5.00	735.97	182.69	183.71A***	146.71	146.14	180.61
0	0	8.31	522.68	152.64	97.06B	140.91	154.32	158.87
0	1	3.79	701.30	160.20	233.74A**	137.89	137.95	163.15
1	0	2.97	515.44	128.24	93.09B	126.68	110.46	145.98
1	1	6.20	770.65	205.17	133.69B	155.54	154.33	198.07

Means multiple comparisons made by Bonferroni test with the probability (\* P<0.05; \*\* P<0.01; \*\*\* P<0.001) calculated using plant nested into decline class and thinning as an error term (May 2006). Values followed by the same letter are not statistically different.

ECM		Phosphat.	Laccase	Chitinase	Glucosid.	Cellohydr.	Leuc-am	Glucuron.	Xylos.
<i>Clavulina cinerea</i>		2.51B***	220.43A	84.93A	88.09A**	84.12A	81.02A**	90.93A	85.84A*
<i>Tomentella subililacina</i>		2.64A	163.01B***	62.68B	63.10B	59.49C	56.46B	63.96B	61.13B
<i>Russula sp.</i>		2.46B	225.36A	79.66A	81.97B	73.89B	71.29A	80.34A	78.35A
decline class	thinning	Phosphat.	Laccase	Chitinase	Glucosid.	Cellohydr.	Leuc-am	Glucuron.	Xylos.
0		1.92	174.03B	74.33	74.64	73.07	62.27B	77.99	71.12B
1		3.15A***	231.84A***	77.18	81.40	71.93	76.91A***	78.83	79.09A*
	0	2.51	188.05B	68.49B	65.65B	66.78B	65.87B	75.31	74.00
	1	2.56	217.82A**	83.02A***	90.39A***	78.23A**	73.31A*	81.51	76.21
0	0	2.29B	158.81B	73.56B	61.52B	71.22AB	61.45B	81.83AB	73.60
0	1	1.54B	189.24B	75.10B	87.76A	74.93AB	63.09B	74.15B	68.64B
1	0	2.73AB	217.28A**	63.41B	69.77B	62.34B	70.29BA	68.78B	74.41
1	1	3.58A***	246.40A	90.94A**	93.02A**	81.52A*	83.52A*	88.87A*	83.78A*
<i>Clavulina cinerea</i>									
decline class	thinning	Phosphat.	Laccase	Chitinase	Glucosid.	Cellohydr.	Leuc-am	Glucuron.	Xylos.
0		1.93B	197.58B	83.89	85.11	85.92	73.04B	94.96	86.32
1		3.07A***	236.72A***	84.39	88.65	80.71	88.18A*	85.44	83.87
	0	2.47	185.88B	70.84B	67.22B	72.57B	71.77B	83.15B	79.64
	1	2.54	248.43A**	97.44A***	106.54A***	94.07A**	89.45A*	97.26A*	90.54
0	0	2.05B	163.27B	83.05B	67.36B	84.38B	72.45B	100.39A**	87.99
0	1	1.82B	231.90A	84.73B	102.87A***	87.47B	73.62B	89.53B	84.64
1	0	2.88AB	208.48A	58.63C	67.09B	60.77C	71.08B	65.90B	71.29
1	1	3.27A**	264.96A*	110.16A**	110.21A	100.67A**	105.27A*	104.99A	96.45



#### 4.3 Attività enzimatica potenziale di tre anatomotipi dominanti

<i>Tomentella subliilacina</i>									
decline class	thinning	Phosphat.	Laccase	Chitinase	Glucosid.	Cellohydr.	Leuc-am.	Glucoron.	Xylos.
0		1.96	124.53***	58.82	61.57	59.31	51.44*	61.03	54.44
1		3.32***	209.51	67.12	66.41	60.28	61.79	66.63	67.90
	0	2.63	172.19	57.16	51.57***	55.58	53.67	60.09	60.24
	1	2.65	161.85	68.78	76.41	64.00	59.55	67.57	62.10
0	0	2.70B	125.19	53.69	45.50B	53.71	48.62	58.45	54.33
0	1	1.23C	123.88B	63.96	77.63A*	64.90	54.26	63.61	54.54
1	0	2.56B	219.20***	60.64	57.63	57.45	58.73	61.72	66.15
1	1	4.08***	199.82	73.60	75.18	63.11	64.84	71.53	69.66

<i>Russula sp.</i>									
decline class	thinning	Phosphat.	Laccase	Chitinase	Glucosid.	Cellohydr.	Leuc-am.	Glucoron.	Xylos.
0		1.85***	199.96**	80.27	77.24	73.98	62.33**	77.98	72.61
1		3.07	249.29	80.73	89.55	75.14	81.78	84.51	85.71
	0	2.43	206.07	77.46	78.14	72.17	72.16	82.69	82.13
	1	2.49	243.18	83.54	88.64	76.95	71.94	79.81	76.19
0	0	2.13B	187.97B	83.94	71.70	75.55	63.27	86.65	78.48
0	1	1.58B	211.94	76.60	82.78	72.42	61.38	69.31	66.74
1	0	2.74A	224.17	70.97	84.59	68.79	81.06	78.72	85.77
1	1	3.39A**	274.42**	90.49	94.50	81.48	82.50	90.30	85.65





## 4.4

*Dinamica*

*dei parametri radicali*

## **Dinamiche dei parametri radicali in un popolamento di farnia (*Quercus robur* L.) deperente del nord Italia: effetti di un trattamento silvicolturale**

### **Riassunto**

In un querceto deperente sono stati scelti otto esemplari di farnia, suddivisi in due classi di deperimento in base ad un rilievo fitosanitario.

Due esemplari di ciascuna classe sono stati sottoposti ad un trattamento silvicolturale di liberazione delle chiome. Gli altri sono stati lasciati tal quali, come parametro di confronto.

Le radici sono state prelevate stagionalmente dalle otto piante prima e dopo il trattamento. Lo scopo del lavoro era valutare se lo stato delle radici assorbenti dipenda dallo stato di salute delle piante e se ci sia una variazione a seguito del trattamento.

Si sono quindi misurati e calcolati quattro parametri radicali a livello di campione di suolo: la densità di lunghezza radicale, la densità degli apici, il diametro medio e l'indice di ramificazione. Dall'analisi dei dati ottenuti, la densità di lunghezza radicale si è rivelata essere un buon parametro per discriminare tra le classi di deperimento e tra le piante trattate e controllo.

Si sono inoltre calcolati i due parametri radicali di vitalità e micorrizzazione degli apici a livello di campione radicale, rapportando il numero di apici vivi o micorrizzati sull'intera lunghezza radicale. La vitalità si è dimostrata essere notevolmente influenzata dalla data di prelievo, mentre non sembra in alcun modo influenzata dall'appartenenza ad una certa classe di deperimento o dal trattamento silvicolturale subito.

La micorrizzazione è in generale cambiata con la data di prelievo, mentre solo nell'estate e nell'inverno del secondo anno di studio si sono evidenziate delle differenze tra le classi di deperimento ed i base ai diversi trattamenti subiti.



## **Dynamique des racines fines dans une forêt de chênes (*Quercus robur* L.) dépérissants en Italie du nord : effet de la mise hors compétition**

### **Résumé**

Dans une forêt de chênes dépérissants, les racines fines ont été périodiquement prélevées avant et après un traitement d'éclaircie autour de huit arbres appartenant à deux classes de dépérissement.

Afin d'évaluer si le statut racinaire des arbres avait été modifié par le traitement sylvicole, quatre descripteurs ont été utilisés: densité de longueur de racines fines, densité des apex, diamètre moyen et indice de ramification.

La densité de longueur s'est révélé être le descripteur répondant le mieux à la fois à la classe de dépérissement et au traitement sylvicole.

La vitalité et le statut ectomycorhizien des apex ont été estimés par le rapport entre le nombre d'apex d'aspect sain et turgescents, ou d'apex ectomycorhizés, par la longueur des racines dans l'échantillon.

Le premier de ces descripteurs composites a été fortement affecté par la date de prélèvement, sans effet de la classe de dépérissement ni de l'éclaircie.

Le descripteur de la mycorhization a été significativement modifié par la date de prélèvement, alors que des différences dues à la classe de dépérissement ou à l'éclaircie n'ont été significatives qu'à quelques dates de prélèvement pendant les deux années d'étude.

## **Root dynamics in a declining oak (*Quercus robur* L.) forest in northern Italy: effects of removing tree competition.**

### **Abstract**

In a declining oak woodland the fine roots were periodically sampled both before and after a thinning treatment around eight trees belonging to two decline classes. In order to evaluate if root status significantly changed following a silvicultural treatment, four descriptors were taken into account: root length density; root tip density; average diameter and branching index. Root length density was the descriptor most impacted by both decline class and silvicultural treatment.

Two composite descriptors of root tip vitality and mycorrhization were calculated by dividing the number of vital or mycorrhizal tips by root length. The first one of these two descriptors was strongly influenced by the sampling date, with no effect of decline class nor thinning treatment. The mycorrhization descriptor was significantly affected by the sampling date, while differences induced by thinning or decline class occurred only at some sampling dates throughout the two-year period of the study.

### **Keywords**

Oak decline; Thinning; Fine root dynamics; Ectomycorrhizae



## 1. Introduction

In plants, the water and nutrient uptake occurs through the youngest parts of the root system, characterised by thinness, high permeability and unsubsiderization (De Silva et al., 1999). Rootlets with a diameter lower than 2 mm are called "fine roots" (Bönm, 1979).

Several studies have demonstrated that root demographic processes are involved in the carbon and nutrient balance at ecosystem level (Cox et al., 1978; Hendrick and Pregitzer, 1993a; Gill and Jackson, 2000). Jackson et al. (1997) estimated that fine root turnover accounts more than 33 % of the global annual net primary production (NPP). They constitute a considerable part of the total belowground NPP, which may represent the 50% of total NPP (Nadelhoffer and Raich, 1992). Therefore, forest soils represent a great carbon sink within terrestrial ecosystems. Roots are also involved in the regulation of plant growth, as well they are able to adapt to several soil and clima conditions (Atkinson, 1991; Eissenstat et al., 2000). Anyway, the knowledge on fine root dynamics in reference to plant species, its age and environmental conditions are exiguous.

Root functional importance leads to investigate the distribution of fine root density (RLD;  $\text{cm cm}^{-3}$ ) into the soil. The presence of fine root is influenced by several factors, such as the geometry of root system, the type of rootstock and its age (Atkinson, 1980; De Silva et al., 1999).

In literature root sampling method is still discussed, as well as the way to calculate root biomass and production, because these measurements are often biased by the applied method (Steele et al. 1997, Rytter 1999, Hertel and Leuschner 2002).

Methods usually belongs to two categories: the direct methods, including sequential soil coring, ingrowth cores, and minirhizotrons, which directly measure the root descriptors and the indirect ones, such as carbon fluxes or nitrogen budget approaches (Vogt et al, 1998). The manly drawback of the direct methods depends on the fact that the sampling place is altered, therefore it is not possible to monitor consecutively the same point (Mc Michael and Taylor, 1987). They do not estimate fine root production, longevity and mortality (Kurz and Kimmins, 1987; Santantonio and Grace, 1987).

On oak, the minirhizotron method is well known (Lopez et al., 2001; Ponti et al., 2004), and many studies focused on the application of the minirhizotron technique

compared with the soil coring and ingrowth core methods. Majdi (1996) concluded that the quantification of root dynamics, in terms of root-length production, mortality and longevity should be conducted by combining soil core data (biomass, root length and nutrient content) and minirhizotron data (length production and mortality).

Recently, Hertel and Leuschner (2002) compared four different approaches to determine annual fine root production of forest in a mixed *Fagus sylvatica*–*Quercus petraea* stand. They applied the sequential soil coring, the ingrowth core method and the position of root chamber *in situ*, concluding that to have an appropriate measure of root production the method should be chosen according to the study objective.

Several studies demonstrated that root health status is the earliest stress indicator, as roots show decline symptoms before than canopy (Vogt et al., 1993), and Clemensson-Lindell and Persson (1995) observed that damages at root level occurred as reduction of fine root amount and increase in root mortality.

In this study, root dynamics in *Quercus robur* is quantified by using soil core method. The present study is carried out to evaluate the possible effects of tree health status and silvicultural treatment on the dynamics of root descriptors. A second aim of this work is to find an indirect parameter of root vitality and mycorrhization, both of them related to root length.

## 2. Materials and Methods

### 2.1 Sampling collection

The experiment was carried out in a declining oak woodland in northern Italy. In this forest 8 trees were choose as representing two decline status. According to their physiological aspect both at canopy and truck levels and to the presence of wood-rot fungi, four were assigned to a moderately decline class (class 0) and four to a severely decline one (class 1). The sampling site is described in detailed in Mosca et al. (submitted).

Around each trees, 12 soil cores (3 cm diameter X 10 cm deep) were collected. Samples were seasonally taken starting from July 2004 until January 2006. In August 2004 a silvicultural treatment was performed around four trees to free their canopy



from their neighbours' competition. Samples were then stored in plastic bags at  $4 \pm 1$  °C until to be processed.

#### 2.2 Laboratory analysis

Each sample was placed in a beaker containing 1% sodium hexametaphosphate for 1 h and washed over a 2 mm mesh sieve; all the roots were then collected and observed under a dissecting microscope. The roots of plants different from *Q. robur*, occasionally recorded, were discarded. After observing vitality and mycorrhization of 10 root fragments, all fine roots were stored in a 50% ethylic alcohol water solution at  $4 \pm 1$  °C.

Root length (cm), number of tips, soil core average diameter (mm) and the number of forks were determined by the automated image analysis software WINRHIZO 2003.b (Regent Instruments, Inc., Quebec, Canada).

#### 2.3 Data analyses

Root length was expressed as root length density (RLD,  $\text{cm cm}^{-3}$ ), and the number of tips were reported against soil volume (RTD, root tip density  $\text{cm}^{-3}$ ). The average diameter was expressed in  $\mu\text{m}$ . For each sample the branching index (BI) was calculated as number of forks per length unit of root.

In order to evidence differences from the first sampling date in root descriptors dynamics, data was normalised by dividing values at each sampling date per the value of the first sampling date.

The effect of decline class and silvicultural treatment was tested by using model fitting approach and by using multivariate and univariate methods. The experimental set-up provide for a nested model, in which the effect of two fixed factors (decline class and thinning) was tested considering sample as the experimental unit and tree, nested in decline class and thinning, the error term.

Prior to running the analysis, to satisfy the assumptions of ANOVA data were checked for normality (Kolmogorov, Smirnov test). Then, data were log-transformed to increase homogeneity of variance if needed.

A univariate ANOVA of the pre-treatment data was carried out to determine whether or not there were any significant differences between decline class.

Due to repeated measures on the same variables over time (sampling dates), the effects of both decline class and silvicultural treatment were tested by applying repeated measure analyses of variance (GLM, SAS System, The SAS Institute, Cary, NC, USA) testing the following 3 hypotheses: no factor (decline class or thinning) \* time interaction; no factor effect, and no time effects. The analyses was assessed separately for each root descriptors.

The effect of the sampling distance from the collar was tested with the same analyses, to evaluate if each descriptor can be represented as the mean of all the tree samples.

Data of tip vitality and mycorrhization accounted for each root sample were divided per sample root length (cm), and arcsine transformed to normalise their distribution. Then, the repeated measures analysis was carried out to check the difference among treatments.

### 3. Results

The sampling distance did not significantly affected the root descriptors.

Fig. 1 shows the mean values of the four root descriptors at each sampling date, normalised by the pre-thinning values. Root length density (RLD) dynamics is displayed in the Fig. 1a; in October 2004 and January 2005 the four treatments did not differ from the values measured before thinning. Starting from April 2005 the situation changed: each treatment displayed a different behaviour. RLD measured in the unthinned trees belonging to class 0 was not affected by time; while the value recorded in class 1 of the same treatment quickly decreased in July 2005, then progressively increased. In the thinned trees there was a difference between decline classes: in April 2005 the class 1 had the highest value, then they decrease in a similar way until October 2005. In January 2006 the severely declining thinned trees increased RLD, while the other class continued to decrease. Root tip density (RTD) displayed a similar dynamic as RLD (Fig. 1b), with the exception of July 2005 when no difference occurred between thinned and unthinned trees belonging to class 1. Fig 1c shows that average diameter (AD) varied among treatments in January 2005, while starting from July 2005 it decreased independently from both decline status and silvicultural treatment. In Fig. 1d the branching index (BI) did not display relevant differences between treatments in the severe decline class, whereas trees belonging



to the moderate decline class showed two independent behaviours, with the exception of the last sampling date.

These considerations were verified with the statistical analyses; Fig. 2 showed the mean values of each root descriptors at each sampling date with the statistical error.

The pre-treatment univariate analysis on the RLD demonstrated that decline class, silvicultural treatment and their interaction did not influence the tested variable (p-value=0.7253; 0.7668; 0.9271, respectively).

The test of hypotheses displayed that time had significant effect (p-value<0.0001) on RLD cm<sup>-3</sup>. In addition, the time\*decline class\*thinning interaction and time\*thinning were significant (p-value=0.0020 and 0.0018). This means that the effect of time on the RLD was different for the four decline class\*thinning combinations studied.

The repeated measures analysis of variance for between-subject effects showed that there was a significant effect for class (p-value=0.0032), thinning (p-value=0.0009) and plant, nested to them (p-value<0.0001). The interaction between decline class and thinning was not significant (p-values=0.0704).

The repeated measures analysis of variance for within-subject effects and related interactions had the same result as for the tests of hypotheses: there was a significant effect of sampling date, the interactions time\*thinning, time\*decline class\*thinning and time\*plant, nested into decline class and thinning (p-values<0.0001). The interaction between sampling date and decline class was not significant (p-values=0.4629).

The analysis tested by using plant nested into decline class and thinning as error term confirmed no class effect on RLD (p-value=0.6351) and the influence of thinning (p-value=0.0370) and the partial effect of decline class\* thinning interaction (p-value=0.0832).

In Fig. 2a the RLD cm<sup>-3</sup> is reported for the four treatments at each sampling date. Bonferroni test did not display any difference among treatments.

The univariate analysis, which was made for each sampling date, displayed that in July 2004 the RLD did not change neither between decline class nor thinning treatments, the only significant effect was found on plant factor (p-value=0.0013). In October 2004 decline class, thinning and plant factors significantly influenced RLD (p-value=0.0683; 0.0160 and <0.0001, respectively). In January 2005 thinning, its interaction with decline class and plant had a significant effect (p-value=0.0063; 0.0328 and <0.0001, respectively). In April 2005 decline class, thinning and plant

significantly affected RLD (p-value=0.0793; 0.0046 and <0.0001). In July 2005 only thinning effect was significant (p-value=0.0138), while in October 2005 all factors significantly influenced the tested variable (p-value=0.0002; 0.0046; 0.0019; <0.0001). In January 2006 thinning, its interactions with both decline class and plant were significant (p-value=0.0005; 0.0188; 0.0005).

The partial correlation among the RLD means of each sampling date showed some statistical differences among values. Firstly, the RLD measured in July 04 was different from the value in October 2004 (p-value=0.0051), April 2005 and July 2005 (p-value=0.0083 and 0.0173). RLD measured in October 2004 differed from April and October 2005 (p-value=0.0092; 0.0328 respectively).

The pre-treatment univariate analysis on root tip density (RTD  $\text{cm}^{-3}$ ) did not evidence any difference between decline classes and silvicultural treatments. Only the plant factor had an effect on RTD (p-value=0.0083).

The test of hypotheses showed that time significantly (p-value<0.0001) influenced RTD, while time\*decline class interaction had no effect. In addition, both time\*thinning and time\*decline class\*thinning interactions were significant (p-value=0.0020 and <0.0001).

The repeated measures analysis of variance for between subjects effect showed that thinning and plant had a strongly significant (p-value<0.0001) effect on tip number, while the decline class was not relevant. The interaction decline class\*thinning had a significantly affected tip number (p-value=0.0139).

The repeated measures analysis of variance for within-subject effects and related interactions displayed that time\* thinning and decline class\*thinning interactions and plant factor were highly significant (p-value<0.0001); whereas the time\*decline class interaction has no effect.

The analysis tested with plant as error term, evidenced no decline class neither thinning effect, only the interactions of the two factor was weakly significant (p-value=0.0927).

In Fig 2 b RTD is displayed; no difference among treatments were found with Bonferroni test. The partial correlation among the means of RTD at each sampling date evidenced some differences. RTD measured in July 2004 significantly differed from the value found both in October 2004 and July 2005 (p-value=0.0089 and 0.0409). The value in October 2004 was generally higher than what was recorded in



April and October 2005 (p-value=0.0292 and 0.0153). In July 2005 the value was lower than January and April 2005 (p-value=0.0100 and 0.0388).

The pre-treatment univariate analysis on average diameter (AD) displayed a significant difference between decline classes (p-value=0.0206) and the silvicultural treatments (p-value=0.0006).

The univariate test of hypotheses showed a significant effect of time on AD (p-value<0.0001). The test evidenced that this descriptor was more strongly influenced by time\*thinning interaction (p-value<0.0001) than by time \* decline class one (p-value= 0.0476).

The repeated measures analysis of variance for between-subject effects revealed a significant effect of thinning (p-value<0.0001) and plant (p-value=0.0112). The decline class and its interaction with thinning were not significant (p-values=0.0688 and 0.0695).

The tests of hypotheses for within-subject effects and related interactions evidenced a significant time effect (p-value<0.0001), while time\*decline class interaction and plant were weakly relevant (p-value=0.0447 and 0.0132, respectively). Anyway, time\*decline class\*thinning interaction was not significant (p-value=0.3649).

That analysis tested with plant, nested into decline class and thinning, evidenced that decline class did not affected average diameter (p-value=0.1419). Whereas, AD was influenced by thinning and its interaction with decline class (p-value=0.0033; 0.0845).

In Fig. 2 c shows the AD mean values for each treatment at each sampling date. Significant differences were found between thinning treatments for the AD values measured in October 04 (p-value=0.0294), July 2005 (p-value<0.0001) and October 2005 (p-value=0.0002), when also the decline classes were strongly different (p-value=0.0019). In January 2006 the AD was influenced by the interaction between decline class and thinning (p-value=0.0112).

The pre-treatment univariate analysis on the branching index (BI) did not evidence any difference between decline classes or silvicultural treatments.

The tests of hypotheses showed that BI was strongly influenced by time, its interactions with both thinning and decline class (p-value<0.0001). The interactions with thinning and decline class had lower effect (p-value= 0.0003 and 0.0004).

The repeated measures analysis of variance for between-subject effects evidenced a strong significant effect on BI for plant (p-value<0.0001), while thinning and its

interaction with decline class were moderately significant ( $p$ -values=0.0188 and 0.0140).

A significant time effect ( $p$ -value<0.0002) was demonstrated by the tests of hypotheses for within-subject effects; moreover, time\*decline class and time\* thinning interactions were significant ( $p$ -value=0.0046 and <0.0001, respectively). In addition, the time \*decline class \*thinning interaction significantly ( $p$ -value<0.0001) influenced the BI.

The analysis tested with plant, nested into decline class and thinning, showed that decline class, thinning and their interaction did not influence BI ( $p$ -value=0.8223, 0.4361 and 0.6293, respectively).

The BI values measured in each four treatments are displayed in Fig. 2 d. The partial correspondence analysis showed that the mean value found in January 2005 was significant different from the value measured in April 2005 ( $p$ -value= 0.0818). The value calculated for April 2005 differed from July 2005 ( $p$ -value= 0.0009).

In Fig. 3a and Fig. 3b the two indirect parameters of tip vitality (L-RTD) and mycorrhization (M-RTD) are shown for each treatments at each sampling date.

The pre-treatment univariate analysis on the L-TRD demonstrated that a difference among treatments occurred: thinning had a significant effect ( $p$ -value=0.0068). Anyway, testing with the error term (plant nested into decline class and thinning) no significant effect was found. L-RTD was significantly influenced by time ( $p$ -value=0.0146), according to the test of hypotheses. The interactions between time and all factors were in particular significant with decline class, thinning and both of them ( $p$ -value=0.057; <0.0001; 0.051).

The repeated measures analysis of variance for between-subject effects showed that decline class and plant significantly affected L-RTD ( $p$ -value=0.0241 and <0.0001, respectively). This analysis testing the within-subject effects and related interactions had the same result as for the tests of hypotheses: there was a significant effect of sampling date ( $p$ -values=0.0430), its interactions with thinning ( $p$ -values=0.0003) and with plant ( $p$ -values=0.0045).

The analysis tested by using plant as error term did not evidence any significant effect on L-RTD by decline class or thinning ( $p$ -value=0.4429 and 0.2919). The partial correspondence analysis among sampling dates evidenced some significant differences. In general, L-RTD measured in January 2005 was statistically different from April, July 2005 and January 2006 ( $p$ -value=0.0446; 0.0021; 0.0396). The



highest value was measured in October 2005, which was the only sampling date statistically different from the pre-treatment value ( $p$ -value=0.0017).

The pre-treatment analysis on mycorrhization parameter (M-RTD) showed no difference between decline classes and between silvicultural treatments. M-RTD was strongly influenced by time and its interactions with both decline class and thinning ( $p$ -value<0.0001), as resulted from the test of hypothesis. Moreover, time interaction with decline class and plant was significant ( $p$ -value=0.0014). The repeated measures analysis of variance for between-subject effects evidenced that plant, decline class and thinning significantly influenced M-RTD ( $p$ -value<0.0001; 0.0046; 0.0183). The analysis tested by applying plant as error term demonstrated that both thinning and decline class did not affect M-RTD ( $p$ -value=0.6432; 0.8814). The same analysis, testing the within-subject effects showed that time and its interactions with plant and both decline class and thinning influenced M-RTD ( $p$ -value<0.0001; 0.0005; 0.0001). Moreover, time\*decline class interaction was significant ( $p$ -value=0.0202). The ANOVA analysis made at each sampling date, evidenced several significant effects of decline class in July and October 2005 ( $p$ -value=0.0262; 0.0002), of thinning in April 2005 ( $p$ -value=0.0223) and of both factors in July 2005 and January 2006 ( $p$ -value=0.0225; 0.0070). Anyway, the Bonferroni test showed that decline classes were significantly different in April and October 2005 ( $p$ -value=0.0685; 0.0565). The partial correspondence analysis among sampling dates, evidenced that the value found in July and October 2005 were significantly different from the others. In general, M-RTD measured in July 2005 differed from July, October 2004 and January 2005 ( $p$ -value=0.0144; 0.001; 0.0128). The value recorded in October 2005 was significantly different from October 2004 and January 2005 ( $p$ -value<0.0001; 0.0049).

#### **4. Discussion and conclusions**

The potential effects of the decline status and the thinning treatment on four root descriptors were studied. Firstly, it was stated that the sampling distance doesn't affect the information on the root descriptors.

To evidence difference between two decline classes we focused on the pre-treatment situation. Before thinning the root length density (RLD) did not differ between decline

classes. The difference becomes significant over time, the moderately declining trees always displayed higher RLD than the severely declining ones.

Another aspect is the evidence of a time effect on RLD. Looking at the difference among sampling dates, seasonal dynamics were found (Fig. 2): the maximum RLD occurred in spring, while in winter the lowest RLD was recorded. This dynamics was already found by Cheng et al. (2002) who investigated the seasonal effects on oak fine root production at three blue oak (*Quercus douglasii* Hook and Arn.) sites.

Root tip density (RTD) did not evidence any difference between decline classes: a mean number of 6 tips was accounted in each  $\text{cm}^{-3}$  of soil volume. The repeated analysis underlines no decline class effect over time. Therefore, this suggest that RTD is not a good indicator of the health status of the trees in the studied forest.

The pre-treatment analysis on average root diameter (AD) evidenced significant difference between decline classes. Trees belonging to the moderate decline class displayed an average diameter significantly higher than the severely decline ones.

Anyway, the repeated analysis did not evidence an effect of class on AD; while it occurred with time. Root recorded in July 2004 had an AD significantly higher than in October 2004. In addition, higher value were found in the two summer date.

The branching index did not differ between decline classes before thinning. This suggest that root structure was almost the same. After treatment, the effect of decline class increased, especially in January, April and October 2005. The excellent high value found in January 2005 is due to the fact that RLD was low and the number of forks high at this date.

The second aim of this work was to test the significant role of the four root descriptors in evidencing the effect of a silvicultural treatment.

The RLD significantly changed with silvicultural treatment. The thinned trees, independently from their health status, displayed a lower RLD compared with the control ones. The interaction thinning\*decline class was also partially significant: the values found in thinned trees belonging to the moderate decline class were most of the time higher than the other class. This suggest that RLD is a good parameter to evidence if the tree is subjected to drastic environmental change induced by the removal of neighbours trees.

Several researchers believe that root length per unit soil volume is one of the best descriptors for calculation of water uptake by plant roots (Molz, 1971; Taylor and Klepper, 1973; 1975).



The number of tips per soil volume (RTD) displayed higher value in the control trees, but the effect of thinning was significant only with the interaction with time. The first two sampling dates did not show differences among treatments, whereas starting from July 2005 the unthinned trees belonging to the moderate decline class always displayed the highest number of tips. Therefore, the RTD dynamics was influenced by thinning. Nevertheless, it is important to evaluate this result considering the used instrumentation. WinRhizo counts all ECM branches as tip number; consequently, our root data is divided into two different scales and it is clear that a number of tips measured with WinRhizo should not be confused with a real tip, as several mycorrhizal tips are highly branched.

In this study the average diameter (AD) did not seem a good discriminating descriptor, because it evidenced differences among treatments before thinning. However, after thinning this difference disappeared since all treatments had the same average diameter.

The ramification index (BI) was influenced by decline class and thinning interaction. After thinning, the moderately declining trees displayed the highest BI value in most sampling dates. This descriptor is influenced by thinning only in the moderately declining trees: in this treatment it counted a low number of forks and a short root length. Root are shorter and greatly branched in the severely decline trees, independently from the thinning.

A common aspect of all root parameters was the strong effect of plant factor. It seems that each tree reacts in a different way to the silvicultural treatment. However, tree dynamics were not the same for all root descriptors. The RDL and TDL dynamics were the same for the two trees belonging to the same treatment, but the pre-thinning value was different for the moderately declining thinned trees, evidencing that original trees status affected the response to thinning. The AD dynamics was very similar for all trees, with the exception of the two severely declining thinned trees, which showed an increase in AD in the summer of the second studied year. In the severely declining trees, the BI dynamics differed from summer and autumn of the second studied year.

Therefore, the assumption made for RDL and TDL can be generalised about all trees belonging to the same treatment, while for AD and BI it should be better to speak differently depending on tree.

The analysis of the indirect vitality parameter (L-RTD) evidenced that sampling date has the strongest effect on the value. Moreover, L-RTD showed that the severely declining unthinned trees progressively reduced root descriptors, while the vitality was almost the same (Mosca et al., submitted). Therefore, this parameter did not evidenced any difference between tree decline status and between thinning treatments. The mycorrhization parameter (M-RTD) was discriminating between decline classes only in the unthinned trees in two sampling dates. It showed that number of mycorrhizal tips per root length was higher in the severely decline class. Furthermore, plant factor strongly affected both parameters, underlining the variability among trees.

Several aspects of this study should be more deeply investigated. Firstly, the alive and dead root were not discriminated, therefore no conclusion may be presented about the vitality of sampled root. Secondly, the analysis was concentrated on the first 10 cm of the soil, where is concentrated the 80% of the total root (Prévost and Pargney, 1985; Bakker et al., 2000; Bruns, 1995). Anyway, following a disturbance, it is also probable that the distribution of roots among the soil horizons is modified.

Further studies on root status should be carry out by taking into account their distribution across soil horizons and by discriminating between vital or dead root.

## References

Atkinson, D., 1980. The distribution and effectiveness of the roots of tree crops. *Horticulture Review* 2, 424-490.

Atkinson, D., 1991. *Plant Root Growth an Ecological Perspective*. Blackwell Sci. Publ., Oxford, UK. 478 pp.

Böhm W 1979 *Methods for studying root systems* Springer, Berlin Heidelberg New York.

Bakker, M.R., Garbaye, J., Nys, C., 2000. effect of liming on the ectomycorrhizal status of oak. *Forest Ecology and Management* 126, 121-131.



Clemensson-Lindell, A., Persson, H., 1995. Fine-root vitality in a Norway spruce stand subjected to varying nutrient supplies. *Plant and Soil* 168/169, 167-172.

Cheng, X., Bledsoe, C.S., 2002. Seasonal and Site Effects on Oak Fine Root Production and Ectomycorrhizal Colonization in California Oak Woodland. USDA Forest Service Gen. Tech. Rep. PSW-GTR-184, 99-106.

Cox, T.L., Harris, W.F., Asmus, B.S, Edwards, N.T., 1978. The role of fine roots in biogeochemical cycles in eastern deciduous forest, NH. *Pedobiologia* 18, 264–271.

De Silva, H.N., Hall, A.J., Tustin, D.S., Gandar, P.W., 1999. Analysis of Distribution of Root Length Density of Apple Trees on Different Dwarfing Rootstocks. *Annals of Botany* 83, 335-345.

Eissenstat, D.M., Wells, C.E., Yani, R.D., Whitbeck, J.L., 2000. Building roots in a changing environment: implications for root longevity. *New Phytol.* 147, 33–42.

Gill, R.A., Jackson, R.B., 2000. Global patterns of root turnover for terrestrial ecosystems. *New Phytol.* 147, 13–31.

Godbold, D.L., Fritz, H.W., Jentscheke, G., Meesenburg, H., Rademacher, P., 2003. Root turnover and root necromass accumulation of Norway spruce (*Picea abies*) are affected by soil acidity. *Tree Physiology* 23, 915–921.

Hendrick, R.L., Pregitzer, K.S., 1992a. The demography of fine roots in a northern hardwood forest. *Ecology* 73, 1094–1104.

Hertel, D., Leuschner, C., 2002. A comparison of four different fine root production estimates with ecosystem carbon balance data in a *Fagus–Quercus* mixed forest. *Plant and Soil* 239, 237–251.

Jackson, R.B., Mooney, H.A., Schulze, E.D., 1997. A global budget for fine root biomass, surface area, and nutrient contents. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 94, 7362–7366.

Kurz, W.A., and Kimmins, J.P. 1987. Analysis of some sources of error in methods used to determine fine root production in forest ecosystems: a simulation approach. *Can. J. For. Res.* 17: 909– 912.

Lopez, B., Sabaté. S., Gracia, C.A., 2001. Annual and seasonal changes in fine root biomass of a *Quercus ilex* L. forest. *Plant and Soil* 230, 125–134.

Majdi, H., 1996. Root sampling methods – applications and limitations of the minirhizotron technique. *Plant and Soil* 185, 255–258.

Mc Michael, B.L., Taylor, H.M., 1987. Applications and limitations of rhizotrons and minirhizotrons, p 1-4. In: Taylor, H.M. (Eds) *Minirhizotrons observations tubes: Methods and applications for measuring rhizosphere dynamics*. Amer. Soc. Agron., Madison, Wis., Spec. Publ. 50

Molz, F.J., 1971. Interaction of water uptake and root distribution. *Agronomy Journal* 63, 608-610.

Nadelhoffer, K.J., Raich, J.W., 1992. Fine root production estimates and belowground carbon allocation in forest ecosystems. *Ecology* 73, 1139–1147.

Ponti, F., Minotta, G., Cantoni, L., Bagnares, U., 2004. Fine root dynamics of pedunculate oak and narrow-leaved ash in a mixed-hardwood plantation in clay soils. *Plant and Soil* 259, 39–49.

Prévost, A., Pargney, J.C. 1995. Comparaison des ectomycorrhizes naturelles entre le hêtre (*Fagus sylvatica*) et deux lactaires (*Lactarius blennius* var *viridis* et *Lactarius subdulcis*). Caractéristiques morphologiques et cytologiques. *Ann Sci For* 52, 131–146.

Rytter, R.M., 1999. Fine-root production and turnover in a willow plantation estimated by different calculation methods. *Scand. J. For. Res.* 14, 526-537.



#### 4.4 Dinamica dei parametri radicali

Santantonio, D., Grace, J.C., 1987. Estimating fine-root production and turnover from biomass and decomposition data: a compartment-flow model. *Can. J. For. Res.* 17, 900–908.

Taylor, H.M., Klepper B., 1973. Root density and water extraction patterns for corn (*Zea mays* L.). *Agron. J.* 65, 965-968.

Taylor, H.M., Klepper B., 1975. Water uptake by cotton root systems: An examination of assumptions in the single root model. *Soil Science* 120, 57-67

Vogt, K.A., Publicover, D.A., Bloomfield, J., Perez, J.M., Vogt, D.J., Silver, W.L., 1993. Belowground responses as indicators of environmental change. *Environ. Exp. Bot.* 33, 189–205.

Vogt, K.A., Vogt, D. J., Bloomfield, J., 1998. Analysis of some direct and indirect methods for estimating root biomass and production of forests at an ecosystem level. *Plant and Soil*, 200, 71–89.

#### **Figures legends**

Fig 1: Dynamics of root length density (RTD; Fig. 1a), root tip number per soil volume (RTD; Fig 1b), average root diameter (AD; Fig. 1c) and branching index (BI; Fig. 1d), normalised by the pre-thinning values.

Fig 2: Mean values of root length density (RTD; Fig. 2a), root tip number per soil volume (RTD; Fig 2b), average root diameter (AD; Fig. 2c) and branching index (BI; Fig. 2d) at each sampling date with their statistical error.

Fig 3: Mean values of the number of living root tips (L-RDT; Fig. 3a) and mycorrhizal root tips (M-RTD; Fig. 3b) per root length, calculated for all treatments at each sampling date and their statistical error.

Fig. 1

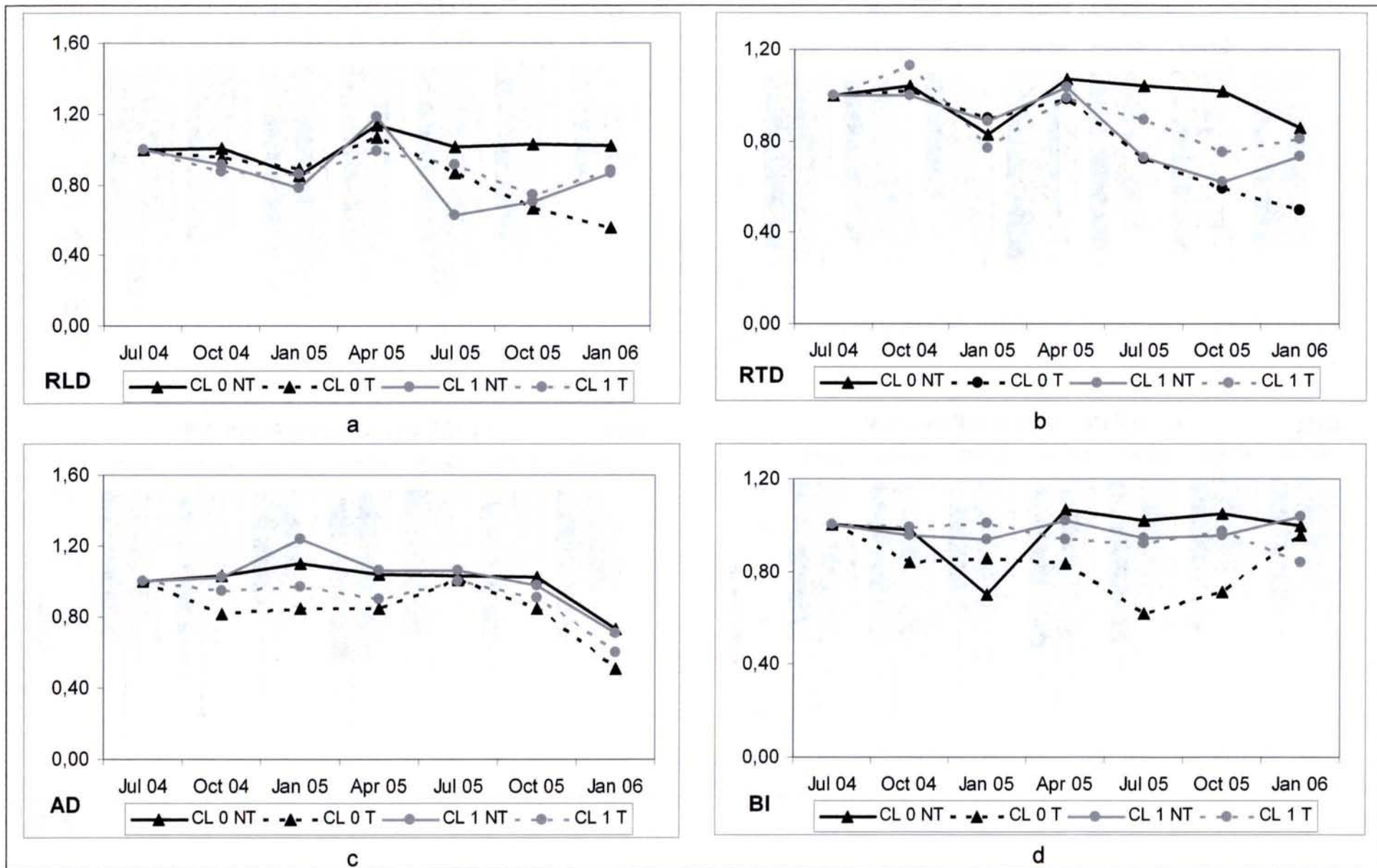




Fig. 2

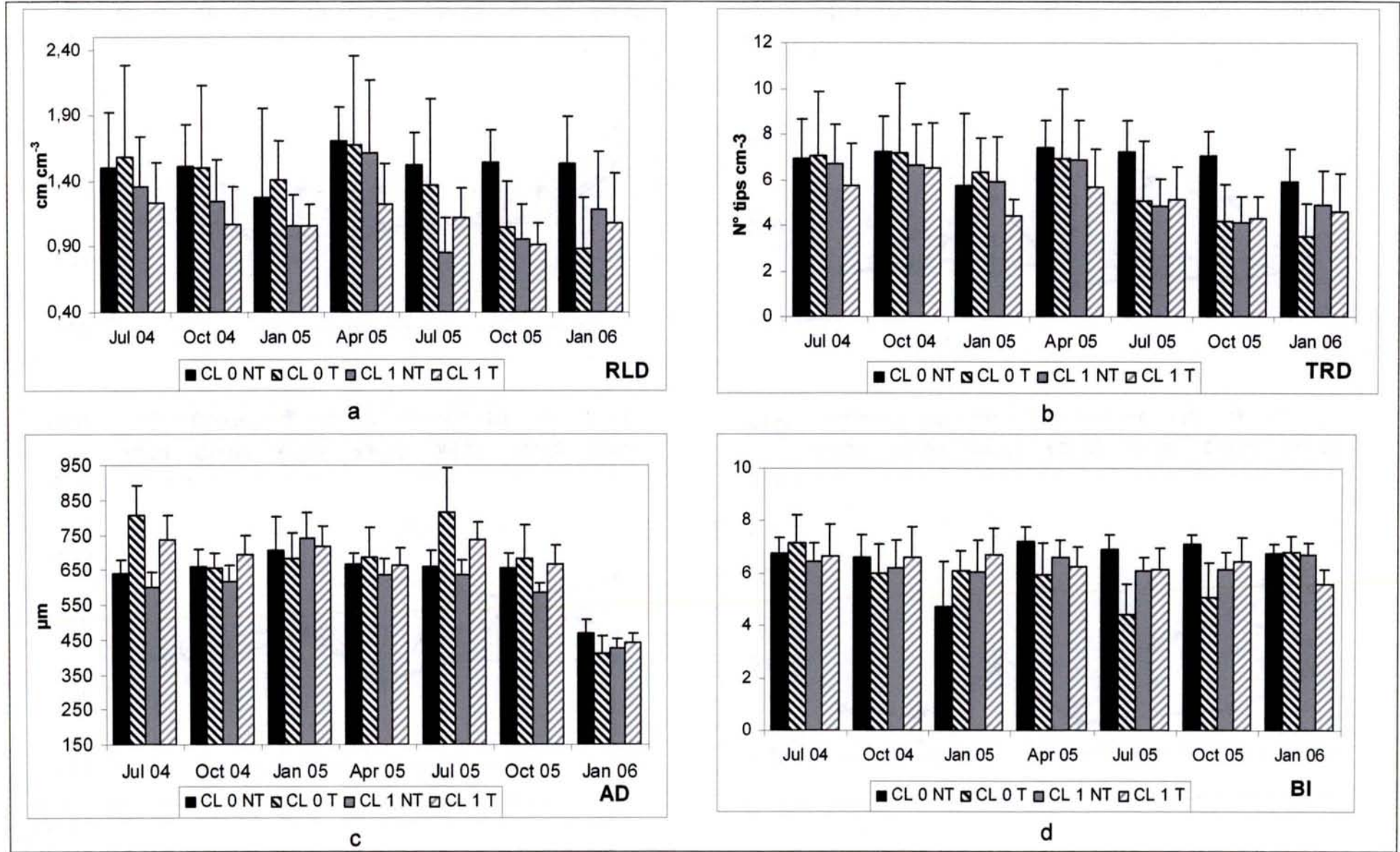
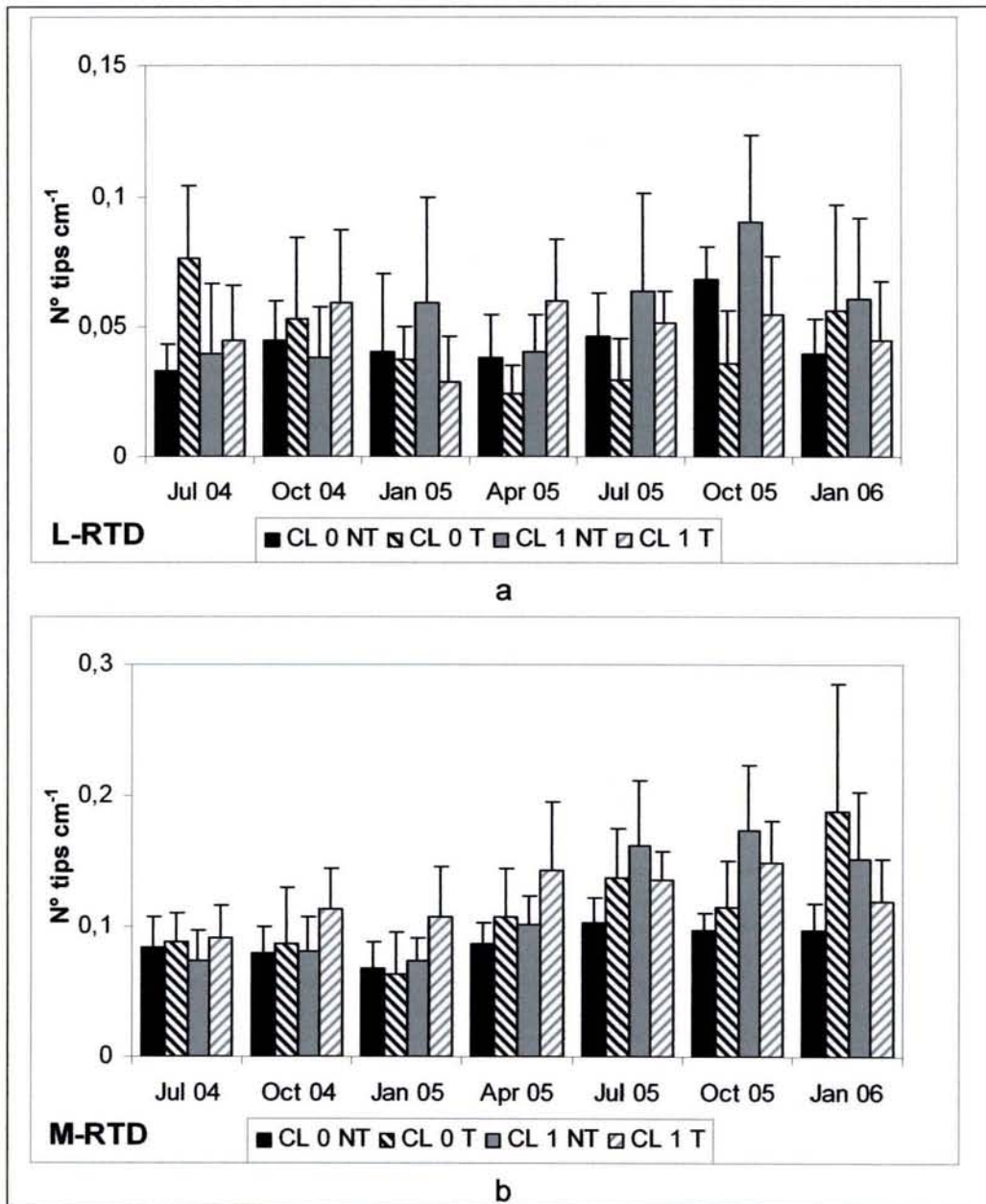


Fig. 3







## 5. Conclusioni

Lo studio condotto nel bosco di Basalghelle ha evidenziato come lo stato degli apici radicali siano un buon indicatore della salute delle piante, a conferma di quanto già riportato in bibliografia (Wargo, 1988; Fellner and Caisova, 1994; Causin et al., 1996; Montecchio et al., 2004). In particolare, la vitalità e la micorrizzazione degli apici sono i parametri che hanno confermato la distinzione delle piante in diverse classi di deperimento. Infatti, nella classe più deperente i due parametri hanno dimostrato valori più bassi rispetto alla classe meno deperente.

Al contrario, i parametri radicali non hanno evidenziato differenze riconducibili al solo stato di salute delle piante, mostrando una dinamica fortemente legata alla data di prelievo. Tuttavia, la densità di lunghezza radicale si è dimostrata essere influenzata dall'interazione dei fattori "classe di deperimento" e "trattamento selvicolturale", confermando la sua utilità nel caratterizzare lo stato radicale di piante soggette ad una perturbazione (Molz, 1971; Taylor e Klepper, 1973; 1975).

Gli effetti del trattamento selvicolturale sono stati indagati sotto vari aspetti. Il risultato più inaspettato riguarda sicuramente l'effetto negativo del diradamento sulla vitalità degli apici. Nel corso dei due anni di studio le radici delle piante trattate hanno presentato una ridotta vitalità. Non si sono inoltre evidenziate differenze riconducibili allo stato di salute delle piante nelle piante trattate.

Tra le possibili ragioni di questo risultato vi è sicuramente un legame con la disponibilità idrica del suolo (Bréda et al., 1995). Il diradamento determina una maggior disponibilità di acqua al suolo, che può aver indotto condizioni di anossia, dannose per le radici. L'acqua gioca un ruolo centrale nel predisporre la pianta al deperimento. Il bosco di Basalghelle è circondato da terreni agricoli, nei quali la fitta rete di canali superficiali determina delle variazioni nella profondità della falda.

Lo studio si è incentrato sugli effetti di breve periodo del diradamento e purtroppo non sono molti i lavori paragonabili in letteratura. Due sono i motivi: l'impiego dello stato dell'apparato radicale come indice di vitalità dell'intera pianta e la brevità dello studio. Tuttavia, l'effetto negativo del diradamento sulla vitalità e micorrizzazione si è manifestato fin dal primo prelievo, ma potrebbe trattarsi di una fluttuazione iniziale nell'evoluzione del bosco.

E' interessante considerare i risultati ottenuti dell'analisi qualitativa della comunità ectomicorrizica. Le famiglie dominanti l'intera comunità ectomicorrizica



sono state *Thelephoraceae*, *Russula*, *Sebacinaceae* e *Cortinariaceae*, mentre i generi più rappresentati sono stati *Tomentella*, *Inocybe*, *Russula*, e *Clavulina*.

Nei due anni di studio è stata individuata una ricca comunità ectomicorrizica, caratterizzata dalla presenza di alcune specie dominanti e molte specie rare. Nel corso dei prelievi la ricchezza è andata aumentando, evidenziando un chiaro fenomeno di "sampling effort" (Taylor, 2002). Gli indici ecologici di Simpson and Shannon hanno evidenziato variazioni solo temporali, mentre il diradamento non li alterati. La comunità ectomicorrizica sembra quindi molto resiliente al disturbo arrecato dal diradamento. Tale risultato è stato dimostrato dalle analisi statistiche che hanno confermato come prima del diradamento l'abbondanza relativa dei singoli anatomotipi fosse legata allo stato di salute della pianta ospite (Kovacs et al., 2000; Montecchio et al., 2004).

Il trattamento selvicolturale ha indotto una variazione all'intero della comunità ectomicorrizica a livello di singoli anatomotipi. Infatti la frequenza di rinvenimento delle famiglie fungine dominanti non ha subito variazioni nel tempo, dimostrandone la loro capacità di sopravvivenza o di rapido recupero a seguito di un disturbo (Smith et al., 2005). Tuttavia vi è stata una sostituzione parziale con specie probabilmente più adatte alle nuove condizioni microambientali (Agerer, 1999; De Romàn and De Miguel, 2005). Nella classe più deperente trattata è aumentata l'abbondanza relativa dei funghi appartenenti alle *Sebacinaceae* e *Pezizales*, la cui presenza è spesso collegata a fenomeni di disturbo (Baar et al., 1999; Grogan et al., 2000; Mah et al., 2001; Tedersoo et al., 2006).

La funzionalità della comunità ectomicorrizica è stata studiata con due approcci diversi, ma complementari. Si è valutato dapprima la morfologia del micelio extramatriciale per suddividere gli anatomotipi in tipi esplorativi (Agerer, 2001). Il micelio extramatriciale è infatti la struttura micorrizica più sensibile ai cambiamenti ambientali (Erland e Taylor, 2002). Inoltre l'assorbimento di acqua e nutrienti avviene attraverso le ife e le rizomorfe. La comunità ectomicorrizica era caratterizzata da gruppi esplorativi di contatto o di breve distanza esplorativa. Il diradamento ha indotto una parziale sostituzione con anatomotipi di media e lunga distanza esplorativa, dapprima nelle piante più deperenti trattate.

Sembra quindi che le piante trattate reagiscano al trattamento, dotandosi di adatti simbionti fungini in grado di migliorarne l'approvvigionamento dell'acqua e dei nutrienti.

Il secondo approccio per la valutazione della funzionalità ectomicorrizica ha interessato solo tre anatomotipi dominanti all'interno della comunità. Si sono evidenziati dei cambiamenti nell'attività enzimatica dei singoli apici ectomicorrizici, in funzione sia dello stato di salute della pianta che del diradamento.

La micorrizzazione sembra quindi in grado di modulare la propria attività enzimatica in funzione di una nuova disponibilità di sostanza organica. Ciò può far supporre che l'intera comunità ectomicorrizica possa reagire al disturbo antropico, cambiando la funzionalità in modo complementare. Tali considerazioni sono comunque limitate dal fatto di non aver analizzato l'associazione micorriza-batteri simbiotici (Frey-Klett et al., 2005) e dall'aver simulato in laboratorio una condizione ambientale ben più complessa.

La comunità ectomicorrizica nel suo complesso ha evidenziato una certa plasticità nei confronti del disturbo causato dal diradamento. Le variazioni a livello della struttura e della funzionalità della comunità sono di centrale importanza per valutare la resilienza degli ecosistemi all'interno del contesto di cambiamento climatico (Dahlberg, 2001).

Restano tuttavia numerosi aspetti da indagare, fra cui sicuramente gli effetti del trattamento silvicolturale su piante deperenti nel lungo periodo e la valutazione dei cambiamenti "successionali" nella struttura delle comunità ectomicorriziche associate ai querceti deperenti.



Faint, illegible text, possibly bleed-through from the reverse side of the page. The text is arranged in several paragraphs and is too light to transcribe accurately.

## 6. Bibliografia

- Agerer, R., 1999. Anatomical characteristics of identified ectomycorrhizas: an attempt towards a natural classification. In: Varma, A., Hock, B. (Eds.), *Mycorrhiza. Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology*, 2<sup>nd</sup> ed. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 633–682.
- Agerer, R., 2001. Exploration types of ectomycorrhizae. A proposal to classify ectomycorrhizal mycelial systems according to their patterns of differentiation and putative ecological importance. *Mycorrhiza* 11, 107–114
- Baar, J., De Vries, F.W., 1995. Effects of manipulation of litter and humus layers on ectomycorrhizal colonization potential in Scots pine stands of different age. *Mycorrhiza* 5 (4), 267–272.
- Bréda, N., Granier, A., Aussenac, G., 1995. Effects of thinning on soil and tree water relations, transpiration and growth in an oak forest (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.). *Tree Physiology* 15, 295–306.
- Causin, R., Montecchio, L., Mutto Accordi, S., 1996. Probability of ectomycorrhizal infection in a declining stand of common oak. *Ann. Sci. For.* 53, 743–752.
- Dahlberg, A., 2001. Community ecology of ectomycorrhizal fungi: an advancing interdisciplinary field. *New Phytologist* 150, 555–562.
- 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 (6), 471–482.
- Erland, S., Taylor, A.F.S., 2002. Diversity of ectomycorrhizal communities in relation to the abiotic environment. In: van der Heijden M, Sanders I (eds.) *The ecology of mycorrhizas*. Heidelberg, Germany: Springer Verlag, pp 163–200
- Fellner, R., Caisová V., 1994. Ecological aspects of mycorrhizae decline and oak dying in the Czech Republic. In: *Proceeding of Environmental Constraints and Oaks: ecological and physiological aspects*. 29 August–1 September 1994, Nancy, France, p. 142.
- Frey-Klett, P., Chavatte, M., Clause, M.L., Courier, S., Le Roux, C., Raaijmakers, J., Martinotti, M.G., Pierrat, J.P., Garbaye, J., 2005. Ectomycorrhizal symbiosis affects functional diversity of rhizosphere fluorescent pseudomonads. *New Phytologist* 165, 317–328.



## Bibliografia

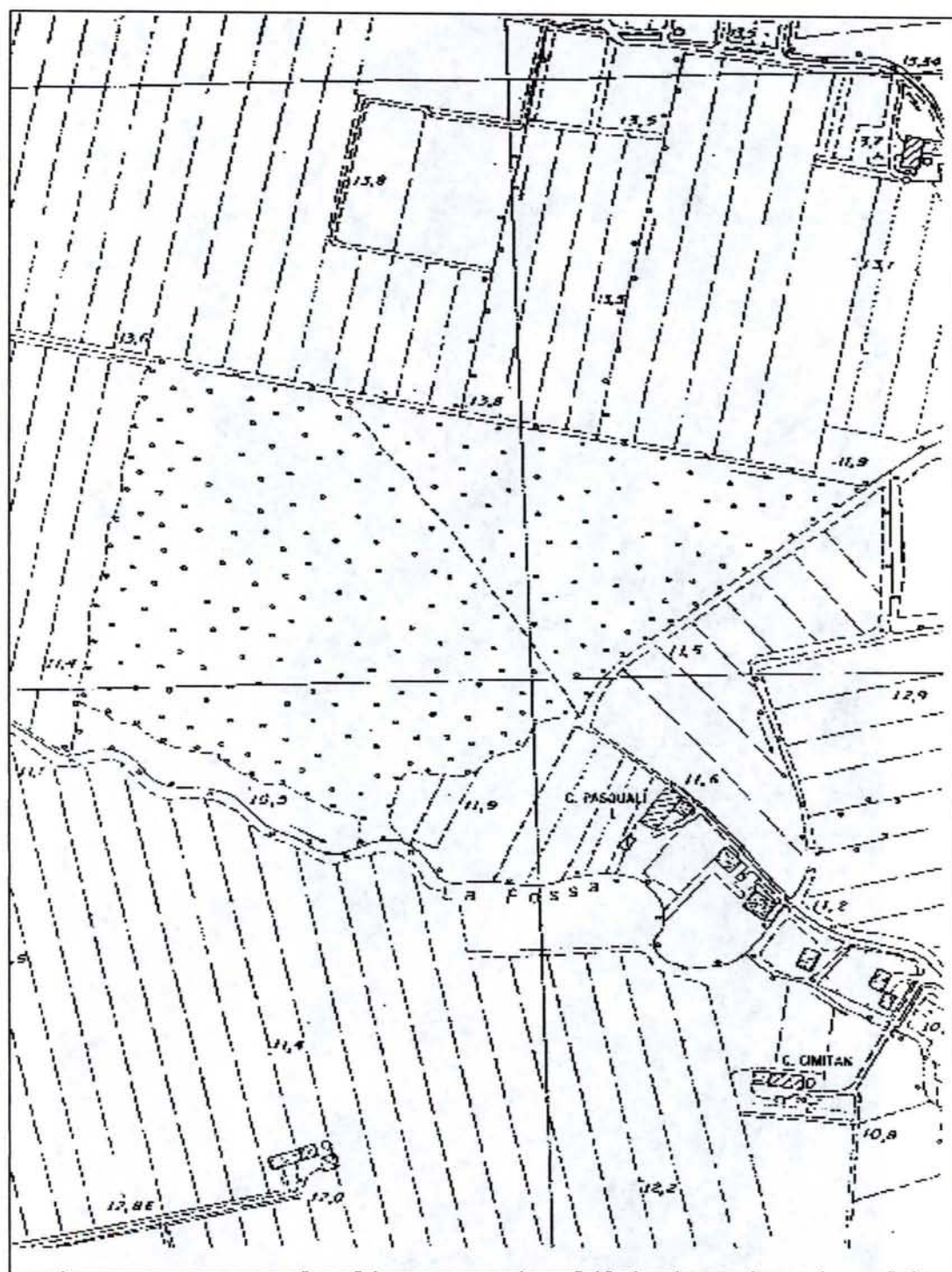
- Grogan, P., Baar, J., Bruns, T.D., 2000. Below-ground ectomycorrhizal community structure in a recently burned bishop pine forest. *Journal of Ecology* 88, 1-13
- Kovacs, G, Pausch M, Urban A., 2000. Diversity of ectomycorrhizal morphotypes and oak decline. *Phyton –Annales Rei Botanicae* 40, 109–116
- Mah, K., Tackaberry, L.E., Egger, K.N., Massicotte, H.B., 2001. The impacts of broadcast burning after clear-cutting on the diversity of ectomycorrhizal fungi associated with hybrid spruce seedlings in central British Columbia. *Can. J. For. Res.* 31, 224–235
- Molz, F.J., 1971. Interaction of water uptake and root distribution. *Agronomy Journal* 63, 608-610.
- Montecchio, L., Causin, R., Rossi, S., Mutto Accordi, S., 2004. Changes in ectomycorrhizal diversity in a declining *Quercus ilex* coastal forest. *Phytopathol. Mediterr.* 43, 26–34.
- Smith, J.E., McKay, D., Brenner, G., McIver, J., Spatafora, J.W., 2005. Early impacts of forest restoration treatments on the ectomycorrhizal fungal community and fine root biomass in a mixed conifer forest. *Journal of Applied Ecology* 42, 526 – 535
- Taylor, H.M., Klepper B., 1973. Root density and water extraction patterns for corn (*Zea mays* L.). *Agron. J.* 65, 965-968.
- Taylor, H.M., Klepper B., 1975. Water uptake by cotton root systems: An examination of assumptions in the single root model. *Soil Science* 120, 57-67
- Taylor, A.F.S. 2002 Fungal diversity in ectomycorrhizal communities: sampling effort and species detection. *Plant and Soil* 244, 19–28
- Tedersoo L, Hansen K, Brian A, Kjøller PR, (2006) Molecular and morphological diversity of pezizalean ectomycorrhiza. *New Phytologist* 170: 581–596
- Wargo, P.M., 1988. Root vitality and mycorrhizal status on different health classes of red spruce trees. *Phytopathology* 78, 1533.

# ALLEGATO 1

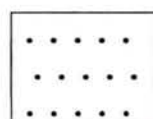
## *Cartografia*



## Cartografia del Bosco di Basalghelle



Scala 1: 5000



Area occupata dal bosco (13.2 ha)

## Foto aerea del bosco



Scala 1: 6500 m



## ALLEGATO 2

*Immagini degli anatomotipi*

Anatomotype	Macroscopic description	Fig.	Outer mantel	Fig.	Inner mantel	Fig.	Emanating hyphae	Fig.	Cystidia	Rhizomorphs
<i>Byssocorticium</i> sp.	Greenish bleu; monopodial pyramidal; shiny and cottony	1	Plectenchymatous, with gelatinous matrix between hyphae	4	Plectenchymatous, hyphae rather irregularly arranged	3	Greenish; rectangular branching; open H-shape anastomosis	2	Lacking	Lacking
<i>Clavulina</i> sp.	Pinkish white; unramified; monopodial-pinnate;	5 6	Plectenchymatous with ring-like arrangement of hyphal bundles	7	Plectenchymatous, hyphae arranged net-like, repeatedly and squarrosely branched	8	White; with clamps; diffused		Lacking	Lacking
EM1	Tobacco brown; irregularly pinnate; shiny and woolly	9	Pseudoparenchymatous, transitional type between mantel with angular to epidermoid cells	10 11	Plectenchymatous, hyphae rather irregularly arranged	12	Yellowish, with septa and clamp		Lacking	Lacking
EM2	Brownly orange to orange; monopodial ramified; grainy	13 14	Pspeudoparenchymatous, with angular, star like arranged cells	15 16	-		Scarce; white		Lacking	Lacking
EM3	Brown to yellowish light brown; monopodial pyramidal; grainy	17 18	Pseudoparenchymatous with angular cells	19 20	Pseudoparenchymatous with angular cells		Scarce; colourless; without clamp		Lacking	Lacking
EM4	White; irregularly ramified; stringy	21 22	Pseudoparenchymatous; mantle with angular cell bearing a delicate hyphal net	23	Pseudoparenchymatous with angular cells	24	Abundant; white; with septa		Lacking	White; undifferentiated
EM5	Whitish yellow; unramified; reticulate; bent	25 26	Pseudoparenchymatous with angular cells	28	Pseudoparenchymatous with angular cells	27	Colourless; scarce; with septa; without clamps		Lacking	Restricted point connection with mantel
EM6	Brown leather like; unramified or monopodial pyramidal ramified	29	Pspeudoparenchymatous, with angular, star like arranged cells	31 32	-		Colourless; short	30	Awl-shaped, bristle-like with enlarged bottom	Lacking
EM7	Unramified; whitish yellow to light brown; long spiny	33	Transitional type between plectenchymatous and pseudoparenchymat., irregularly shaped hyphae form a coarse net	34 35	-		Abundant; colourless; long; without clamps	36	Lacking	Lacking
EM8	Yellowish grey; irregularly pinnate, grainy	37 38	Pseudoparenchymatous, mantle with epidermoid cells	39	Pseudoparenchymatous, transitional type between mantel with angular to epidermoid cells	40	Scarce; short; white		Lacking	Lacking



Anatomotype	Macroscopic description	Fig.	Outer mantel	Fig.	Inner mantel	Fig.	Emanating hyphae	Fig.	Cystidia	Rhizomorphs
EM9	Orangish light brown; unramified; smooth	41	Pseudoparenchymatous, mantle with epidermoid cells	42 43	Pseudoparenchymatous, transitional type between mantel with angular to epidermoid cells	44	Lacking		Lacking	Lacking
EM10	Silver- grey; unramified or monopodial pinnate; grainy	45	Plectenchymatous, hyphae rather irregularly arranged	45 48	Transitional type between pseudoparenchymatous with angular and epidermoid cells	47	Lacking		Lacking	Lacking
EM11	Golden brown; monopodial pinnate; reticulate	49 50	Pseudoparenchymatous, mantle with epidermoid cells	51	Transitional type between pseudoparenchymatous with angular and epidermoid cells	50	Lacking		Lacking	Lacking
EM12	Dark brown; unramified; short spiny	53	Pseudoparenchymatous with angular cells	55	Plectenchymatous, hyphae rather irregularly arranged	56	Scarce; colourless	54	Capitate (N)	Lacking
EM13	Greenish ligh brown; monopodial pinnate; shiny	57 58	Pseudoparenchymatous with angular cells	59	Pseudoparenchymatous with angular cells	60	Short spiny; colourless; with clamp		Lacking	Lacking
<i>Entoloma</i> sp.	White; irregularly pinnate; trasparent	61	Plectenchymatous, hyphae rather irregularly arranged	64	Plectenchymatous, hyphae rather irregularly arranged	63	Lacking	62	Lacking	White; undiff., hyphae compacted arranged, uniform diameter
<i>Genea</i> sp. I	Brown; orange in the apical parts; monopodial pyramidal; grainy; woolly	65	Pseudoparenchymatous with angular cells	67	Transitional type between plectenchymatous and pseudoparenchymatous	68	Yellowish; without clamp	66	Lacking	Lacking
<i>Genea</i> sp. II	Orangish brown; unramified; grainy; woolly	69	Pseudoparenchymatous with angular cells bearing mounds of roundish cell	71	Transitional type between plectenchymatous and pseudoparenchymatous	72	Brownish; septa without clamp; open H-shaped anastomosis	70	Lacking	Lacking
<i>Helvellaceae</i>	Yellow with brown spots; dichotomous or monopodial pinnate; grainy	73 74	Transitional type between plectenchymat. and pseudoparenchymat., irregularly shaped hyphae form a coarse net	75	Pseudoparenchymatous, mantle with epidermoid cells	76	Scarce; colourless to white; without clamps		Lacking	Lacking

Anatomotype	Macroscopic description	Fig.	Outer mantel	Fig.	Inner mantel	Fig.	Emanating hyphae	Fig.	Cystidia	Rhizomorphs
<i>Humaria</i> sp.	Orangish brown; monopodial pyramidal; grainy and shiny	<b>77</b>	Pseudoparenchymatous with angular cells	<b>79</b> <b>80</b>	Transitional type between plectenchymatous and pseudoparenchymatous		Scarce; long and ramified; septa without clamp; warty	<b>78</b>	Lacking	Lacking
<i>Inocybe</i> sp. I	Brown to light brown; unramified; short spiny	<b>81</b> <b>82</b>	Plectenchymatous, hyphae arranged net-like, repeatedly and squarrosely branched	<b>83</b>	Transitional type between plectenchymatous and pseudoparenchymatous, irregularly shaped hyphae form a coarse net	<b>84</b>	White; scarce; ramified; with septa		Awl-shaped, bristle-like	Lacking
<i>Inocybe</i> sp. II	White to yellow ochre, monopodial pyramidal	<b>85</b> <b>86</b>	Plectenchymatous, hyphae rather irregularly arranged	<b>87</b>	Transitional type between plectenchymat. and pseudoparenchymat., irregularly shaped hyphae form a coarse net	<b>88</b>	White; with clamp; open H-shape anastomosis		Lacking	Lacking
<i>Inocybe</i> sp. III	Olive-green; monopodial pinnate; smooth	<b>89</b>	Plectenchymatous, hyphae arranged net-like, repeatedly and squarrosely branched	<b>91</b>	Pseudoparenchymatous with angular cells	<b>92</b>	Scarce; white	<b>90</b>	Lacking	Lacking
<i>Inocybe</i> sp. IV	White to dirty white; irregularly pinnate; stringy	<b>93</b> <b>94</b>	Plectenchymatous, hyphae arranged net-like, repeatedly and squarrosely branched	<b>95</b>	Pseudoparenchymatous, mantel with cells bearing a delicate hyphal net	<b>96</b>	White; with septa; anastomosis between middle part of a hyphal cell and a clamp		Lacking	Lacking
<i>Laccaria</i> sp.	Whitish light grey; smooth irregularly pinnate;	<b>97</b>	Plectenchymatous, hyphae rather irregularly arranged	<b>99</b>	Transitional type between plectenchymatous and pseudoparenchymatous, irregularly shaped hyphae form a coarse net	<b>100</b>	Scarce; white	<b>98</b>	Lacking	Lacking
<i>Lactarius</i> sp. I	Orange to light brown; irregularly pinnate; smooth	<b>101</b> <b>102</b>	Pseudoparenchymatous with angular cells	<b>103</b>	Plectenchymatous	<b>104</b>	Colourless; septa; scarce		Awl-shaped, bristle-like	Lacking
<i>Lactarius</i> sp. II	Greyish white; unramified; smooth	<b>105</b> <b>106</b>	Pseudoparenchymatous, mantle with epidermoid cells	<b>107</b>	Pseudoparenchymatous, mantle with epidermoid cells	<b>108</b>	White; long		Lacking	Lacking
<i>Paxillaceae</i>	White; monopodial pyramidal; wolly	<b>109</b> <b>110</b>	Plectenchymatous with ring-like arrangement of hyphal bundles	<b>111</b>	Plectenchymatous; hyphae arranged net like, repeatedly and squarrosely branched	<b>112</b>	White; without septa and clamp		Bottle-shaped with a straight neck	Lacking



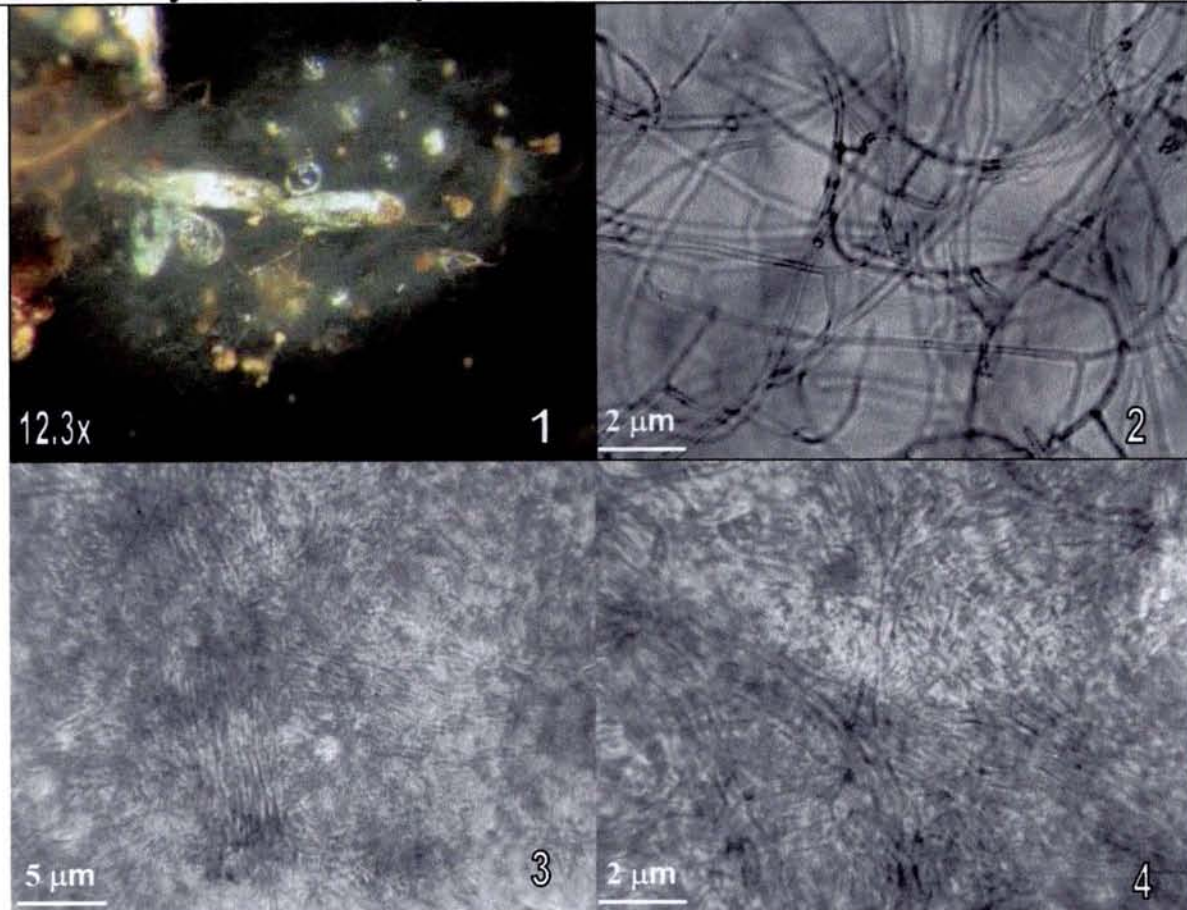
Anatomotype	Macroscopic description	Fig.	Outer mantel	Fig.	Inner mantel	Fig.	Emanating hyphae	Fig.	Cystidia	Rhizomorphs
<i>Peziza</i> sp. I	Yellowish to greenish light brown; monopodial-pyramidal; smooth	113 114	Pseudoparenchymatous with angular cells	115	Pseudoparenchymatous with angular cells	116	Scarce; with to colourless; with septa		Lacking	Lacking
<i>Peziza</i> sp. II	Dark brown to white; irregularly pinnate; grainy and shiny	117	Pseudoparenchymatous with angular cells	119	Pseudoparenchymatous with angular cells	120	Abundant on the top; white; Y-shape ramification; with septa	118	Lacking	Lacking
<i>Pezizaceae</i> I	Brown, yellowish, brown in the apical part; monopodial pyramidal; wolly	121	Pseudoparenchymatous with angular cell	123 124	Pseudoparenchymatous with angular cell		Yellowish; abundant; Y-shaped ramification; septa	122	Lacking	Lacking
<i>Pezizales</i> I	Ligh yellow; monopodial pinnate; smooth	125 126	Pseudoparenchymatous with angular cell	127	Pseudoparenchymatous with angular cell smaller than in outer mantel		Lacking		Lacking	Lacking
<i>Pezizales</i> II	Yellowish light brown; unramified or monopodial-pyramidal; smooth	128	Pseudoparenchymatous with angular cell	130	Transitional type between pseudoparenchymatous with angular and epidermoid cells	131	Infrequent; colourless; with septa	129	Lacking	Lacking
<i>Russula</i> sp. I	Yellowish white to pinkish white; in old parts light brown; monopodial pinnate; smooth	132	Plectenchymatous; Hyphae arranged net like, repeatedly and squarrosely branched	134 135	Transitional type between plectenchymat. and pseudoparenchymat., irregularly shaped hyphae form a coarse net	133	Scarce; hyaline		Lacking	Lacking
<i>Russulaceae</i> I	Yellowish withe; irregularly pinnate; cottony	136 137	Plectenchymatous, with ring like arrangement of hyphae bundles	138	Plectenchymatous, hyphae rather irregularly arranged	139	Whitish, cottony		Lacking	Lacking
<i>Russulaceae</i> II	Yellowish grey; unramified; short spiny	140	Plectenchymatous, gelatinous matrix between the hyphae	142	Plectenchymatous, hyphae rather irregularly arranged	143	Hyaline; without clamp	141	Ramified	Lacking
<i>Russulaceae</i> III	Greysh withe ; pinkish in the younger parts, yellowish in the older ones; monopodial-pyramidal; grainy	144	Plectenchymatous, gelatinous matrix between the hyphae	146	Plectenchymatous, hyphae rather irregularly arranged, growing in longitudinal direction	147	White; stringy	145	Bottle-shaped with a straight neck	Lacking

Anatomotype	Macroscopic description	Fig.	Outer mantel	Fig.	Inner mantel	Fig.	Emanating hyphae	Fig.	Cystidia	Rhizomorphs
<i>Sebacinaceae</i> I	Pinkish to yellowish white; monopodial pinnate; wolly	148 149	Plectenchymatous with ring-like arrangement of hyphal bundles	150	Transitional type between plectenchymat. and pseudoparenchymat., irregularly shaped hyphae form a coarse net	151	Abundant; white; with clamps		Lacking	Lacking
<i>Sebacinaceae</i> II	Golden yellow to brown; unramified; cottony and shiny	152 153	Plectenchymatous, hyphae arranged net-like, repeatedly and squarrosely branched	154	Plectenchymatous, with gelatinous matrix between hyphae	155	Colourless; with clamps and septa		Lacking	Lacking
<i>Sebacinaceae</i> III	White; monopodial pyramidal; cottony	156	Plectenchymatous, hyphae arranged net-like, repeatedly and squarrosely branched	158	Transitional type between plectenchymatous and pseudoparenchymatous, irregularly shaped hyphae form a coarse net	159	White; short; with clamps	157	Lacking	Highly differentiated
<i>Tomentella</i> sp. I	Reddish to dark brown; irregularly pinnate; short spiny	160	Pseudoparenchymatous with angular cell, star like arranged cells	162 163	Pseudoparenchymatous		Lacking	161	Bottle-shaped with a straight neck	Lacking
<i>Tomentella</i> sp. II	Whitish to brown; monopodial pyramidal; reticulate	164 165	Pseudoparenchymatous with angular cell	167	-		Scarce; long; colourless; with clamp	166	Lacking	Undifferentiated (B)
<i>Tomentella</i> sp. III	Whitish to dirty white with darker spots; monopodial pinnate; wolly	168	Pseudoparenchymatous with angular cell	171	Plectenchymatous, hyphae rather irregularly arranged	170	White; septa; Y-shaped ramification	169	Lacking	Lacking
<i>Tomentella</i> sp. IV	White to yellowish; transparent and smooth; monopodial pyramidal	172 173	Plectenchymatous, hyphae rather irregularly arranged	174	Plectenchymatous, hyphae arranged net-like, repeatedly and squarrosely branched	175	White; with clamps		Lacking	Lacking
<i>Thelephoraceae</i> I	Blackish brown; unramified; shiny; wolly	176	Pseudoparenchymatous with angular cell	178	Pseudoparenchymatous with angular cell	179	Colourless, ramified, with septa and H-shape open anastomosis	177	Lacking	Lacking
<i>Thelephoraceae</i> II	Yellowish light brown; monopodial pinnate or unramified; short spiny	180	Pseudoparenchymatous with angular cell	182	Pseudoparenchymatous with angular cell	183	Abundant; colourless; with septa and clamps	181	Lacking	Lacking

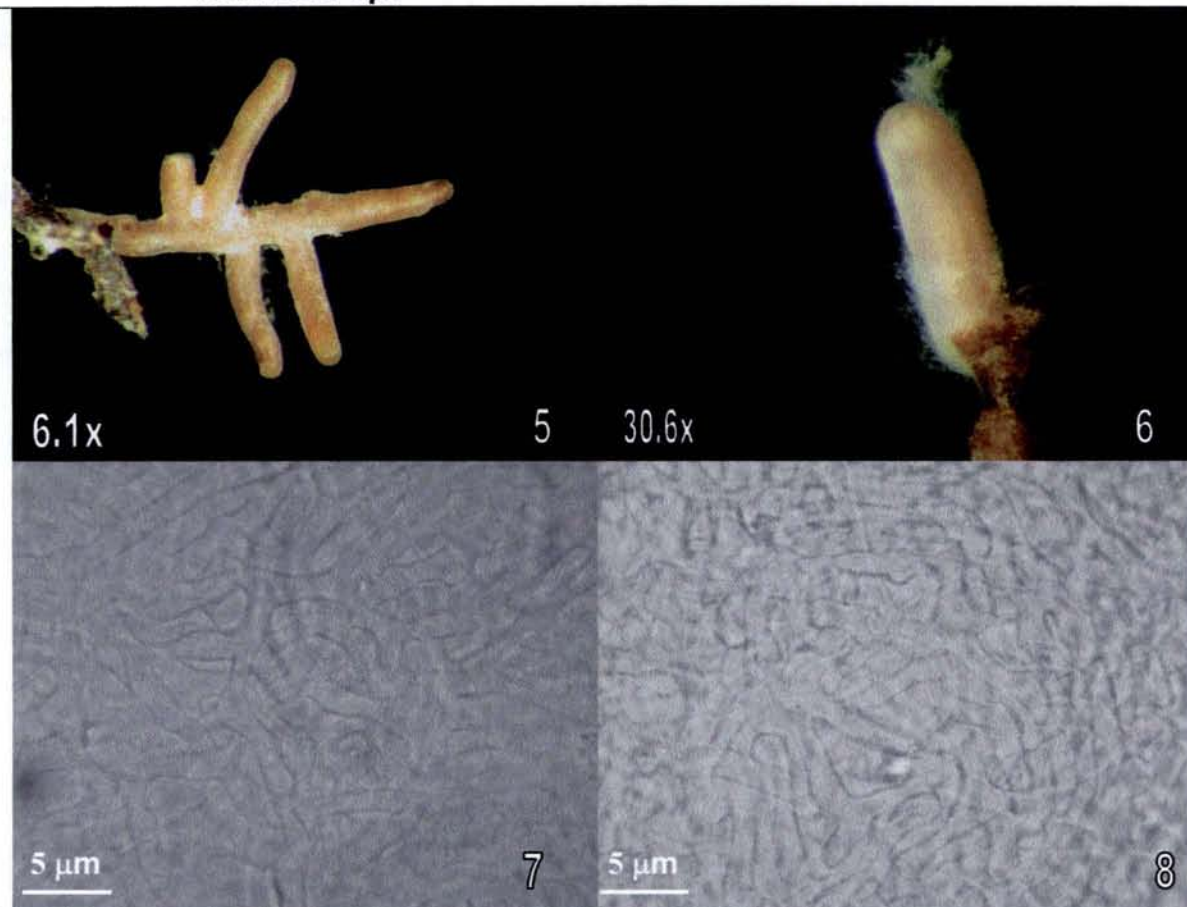


Anatomotype	Macroscopic description	Fig.	Outer mantel	Fig.	Inner mantel	Fig.	Emanating hyphae	Fig.	Cystidia	Rhizomorphs
<i>Thelephoraceae</i> III	Greenish brown; short spiny	<b>184</b>	Pseudoparenchymatous with angular cell	<b>186</b> <b>187</b>	Transitional type between plectenchymatous and pseudoparenchymatous		Hyaline to yellowish; with clamps and secondary septa	<b>185</b>	Awl-shaped with clamp; basal cell yellow	Undifferentiated, hyphae loosely woven
<i>Thelephoraceae</i> IV	Brown; monopodial pyramidal; short spiny	<b>188</b>	Plectenchymatous; hypha arranged star-like	<b>191</b>	-		Yellow; scarce; with clamp	<b>189</b> <b>190</b>	Awl-shaped, bristle-like; bent or curved	Undifferentiated (A)
<i>Thelephoraceae</i> V	Greenish brown; short spiny	<b>192</b>	Pseudoparenchymatous with angular cell	<b>195</b>	Transitional type between plectenchymatous and pseudoparenchymatous, irregularly shaped hyphae form a coarse net (H)	<b>194</b>	Scarce; colourless	<b>193</b>	Capitate with clamps	Undifferentiated; hyphae compacted arranged and of uniform diameter
<i>Tuber</i> I sp.	Orange to yellowish light brown; irregularly ramified; short spiny	<b>196</b>	Pseudoparenchymatous with angular cell with prominent cystidia	<b>198</b>	Pseudoparenchymatous, mantle with epidermoid cells	<b>199</b>	Lacking	<b>197</b>	Awl-shaped, bristle like with hook-like end	Lacking
<i>Tuberales</i> I	White to yellowish ligh brown; unramified to monopodial pinnate; smooth and trasparent	<b>200</b> <b>201</b>	Pseudoparenchymatous, mantle with epidermoid cells	<b>202</b>	Pseudoparenchymatous, mantle with epidermoid cells with irregular shape	<b>203</b>	Lacking		Lacking	Lacking
<i>Tuberales</i> II	Yellowish brown to greenish yellow; unramified or monopodial pyramidal; smooth	<b>204</b>	Pseudoparenchymatous, mantle with epidermoid cells	<b>205</b> <b>207</b>	Pseudoparenchymatous, mantle with epidermoid cells	<b>206</b>	Scarce; colourless; short; concentrate on the top		Scarce	Lacking

***Byssocorticium* sp.**

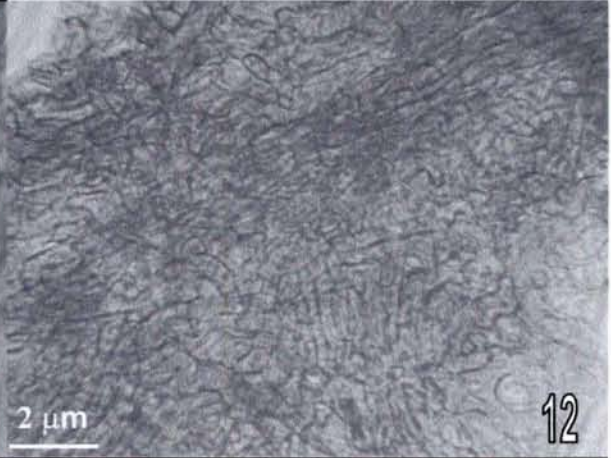
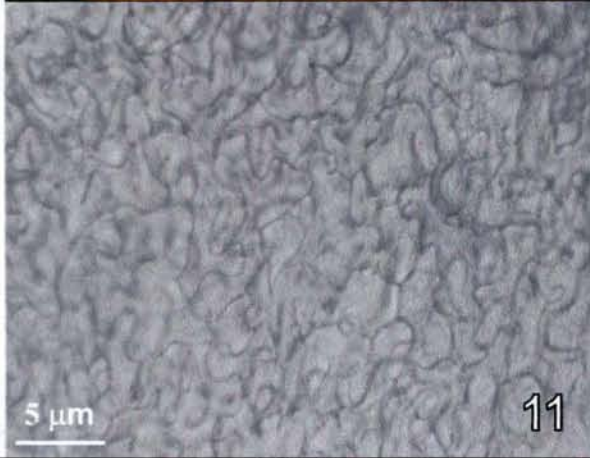
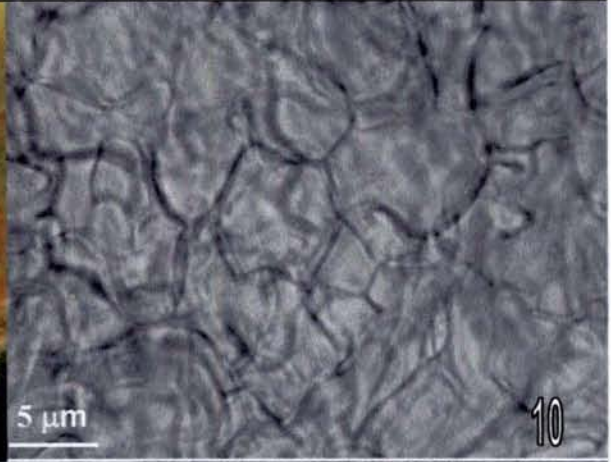


***Clavulina* sp.**

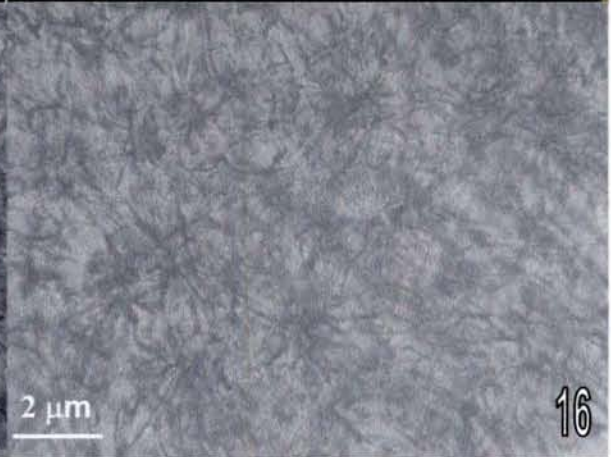
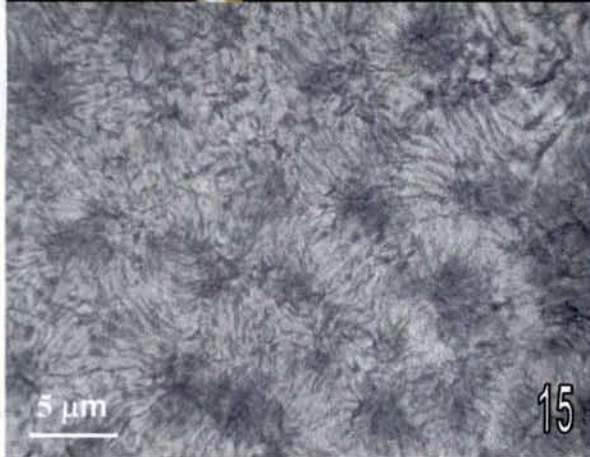




**EM 1**

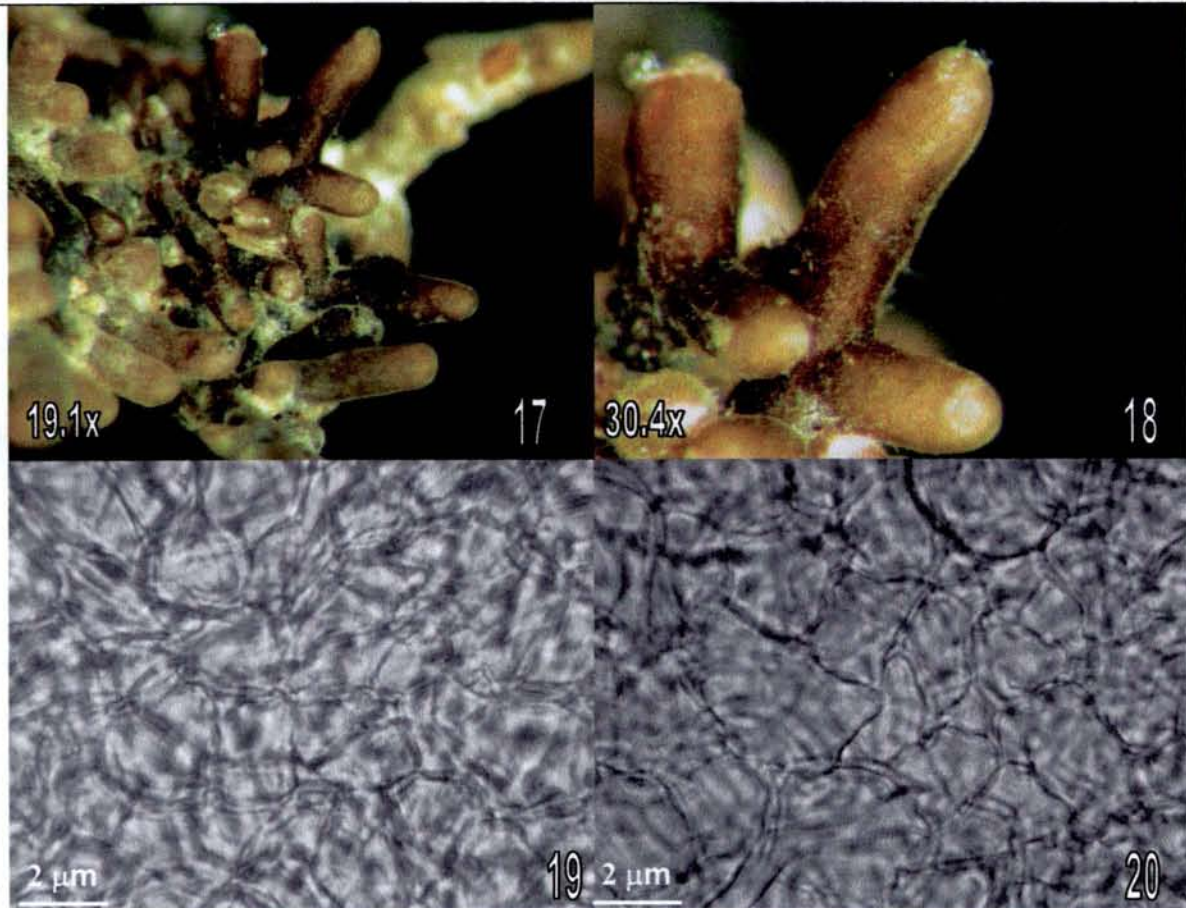


**EM 2**

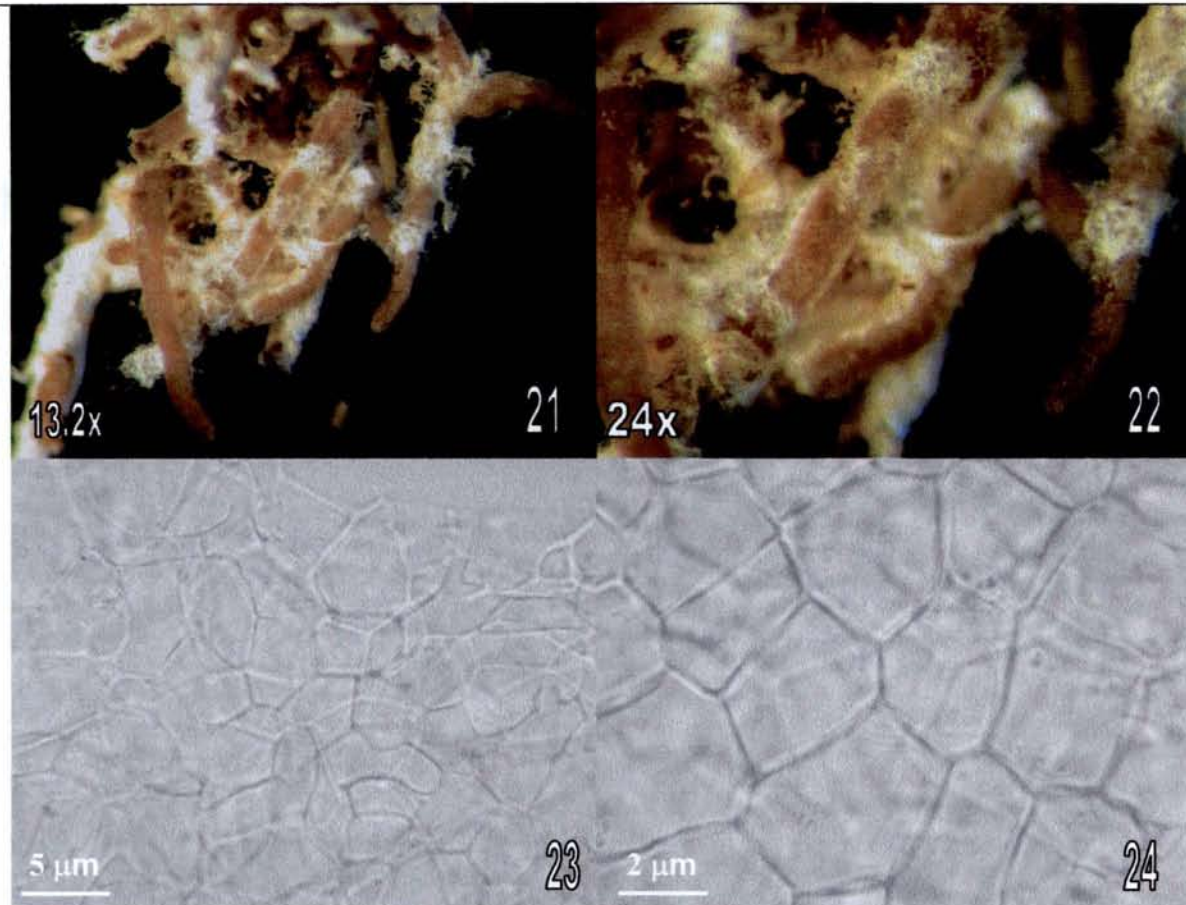




EM 3

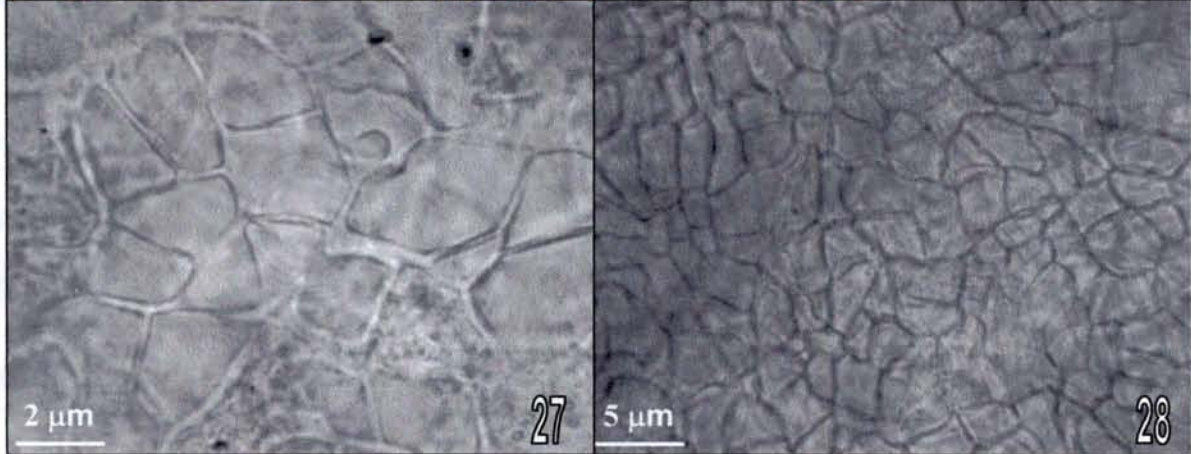
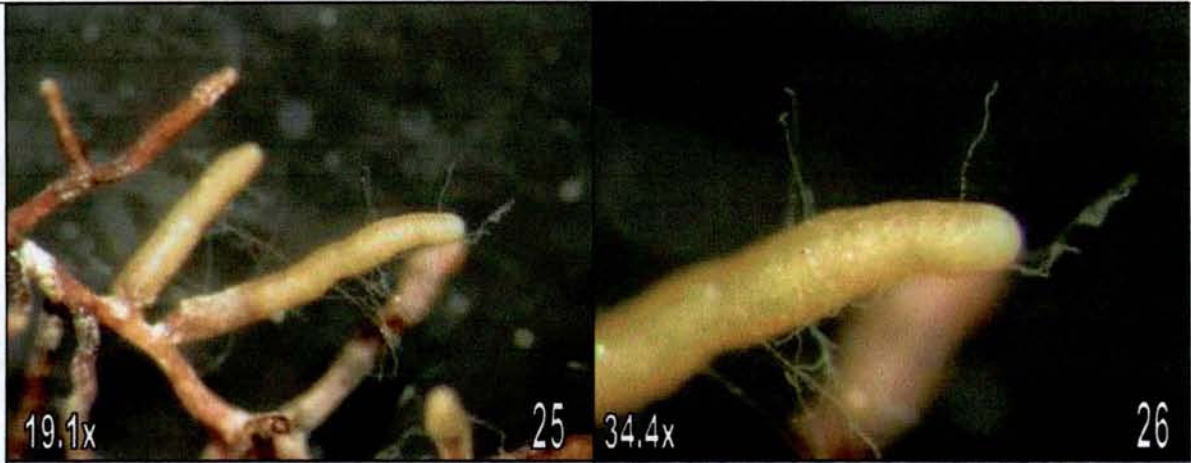


EM 4

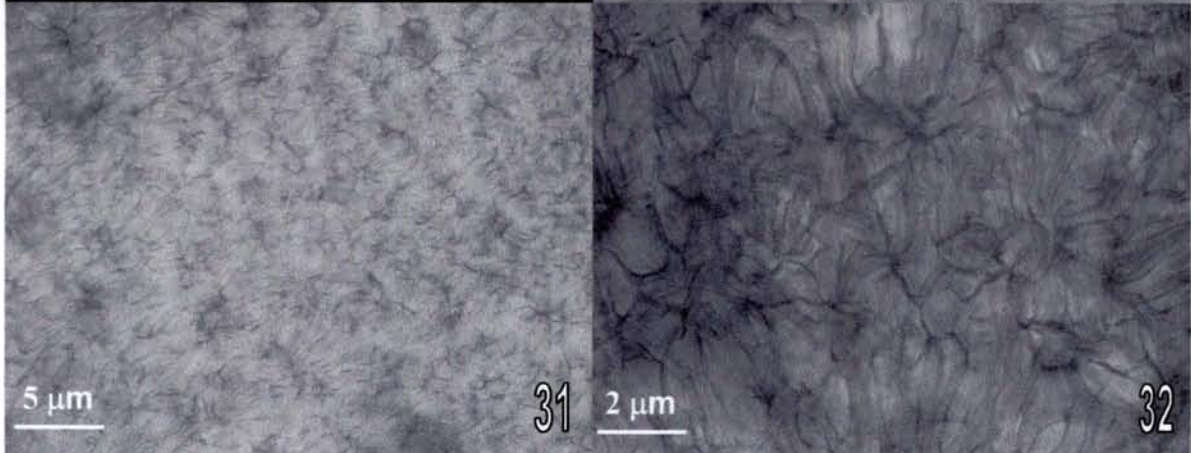
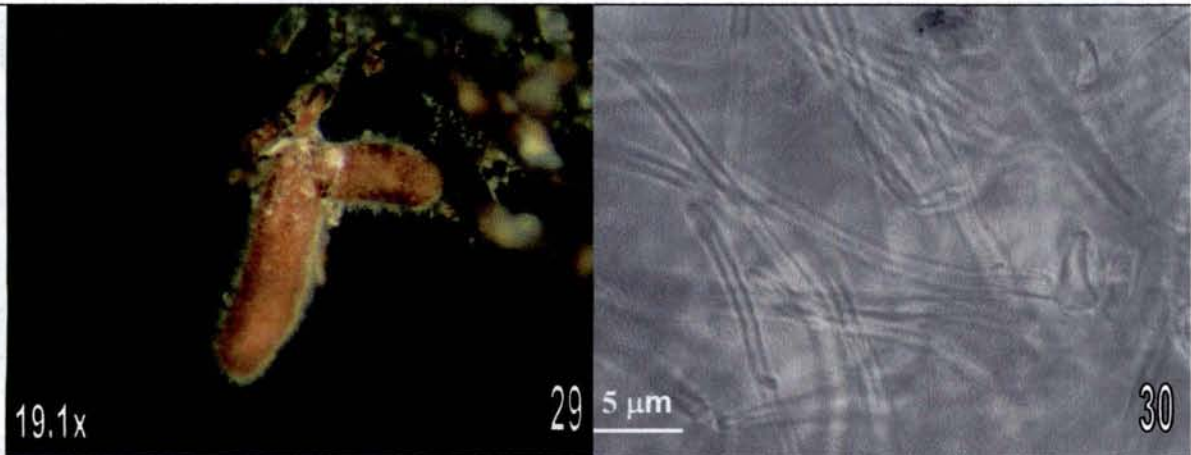




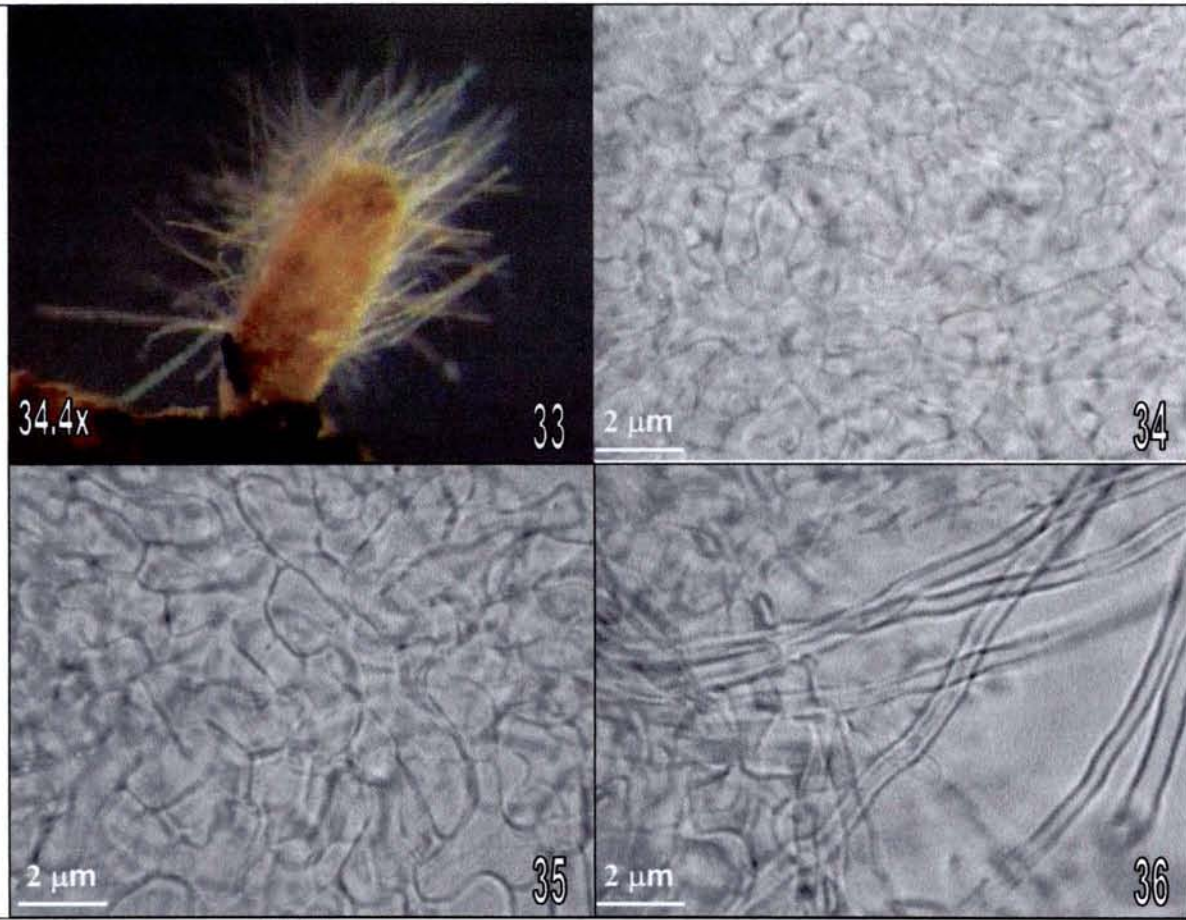
**EM 5**



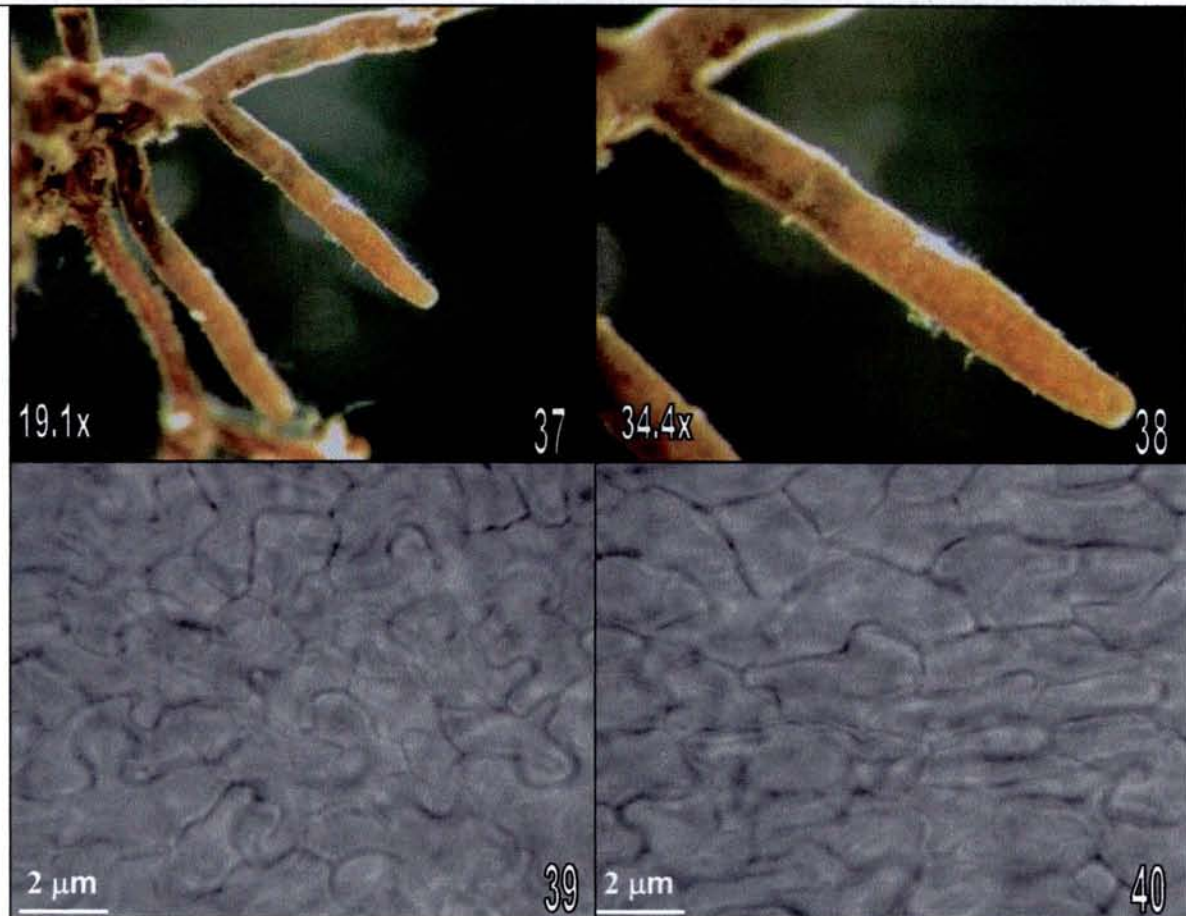
**EM 6**



EM 7

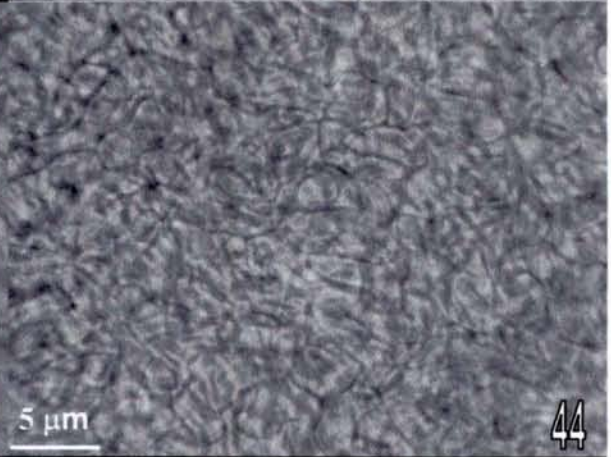
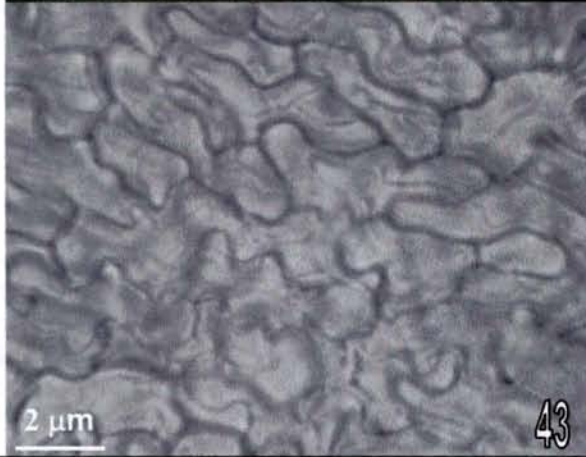
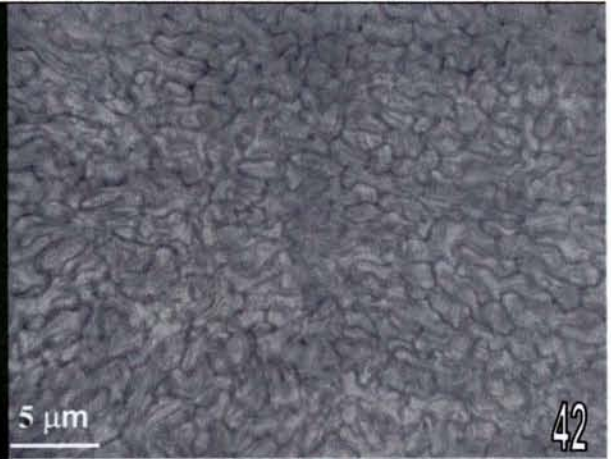


EM 8

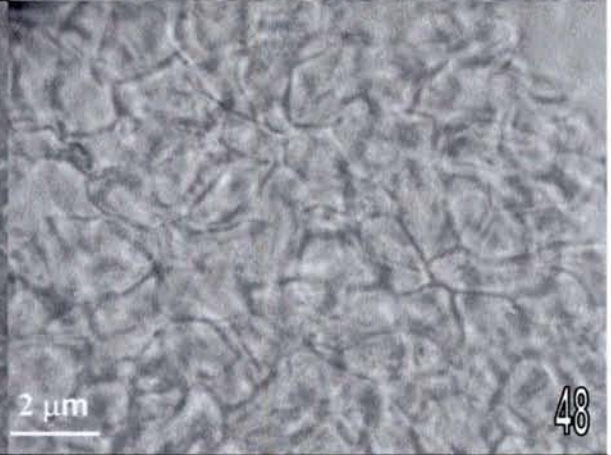
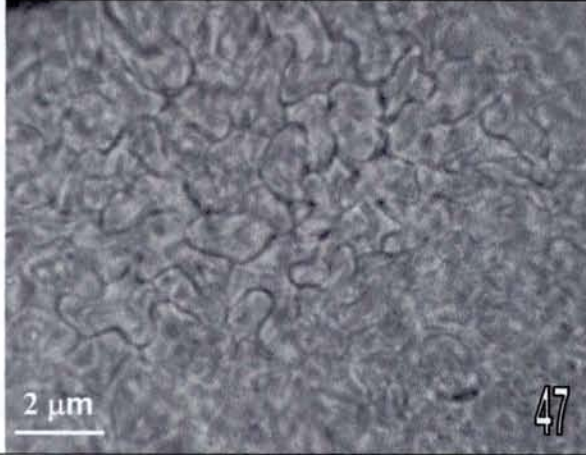
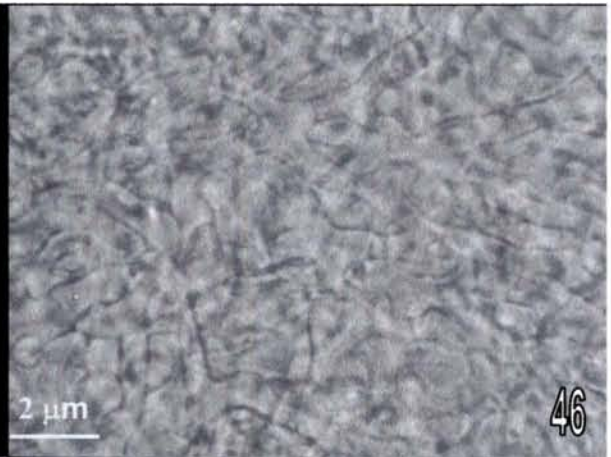
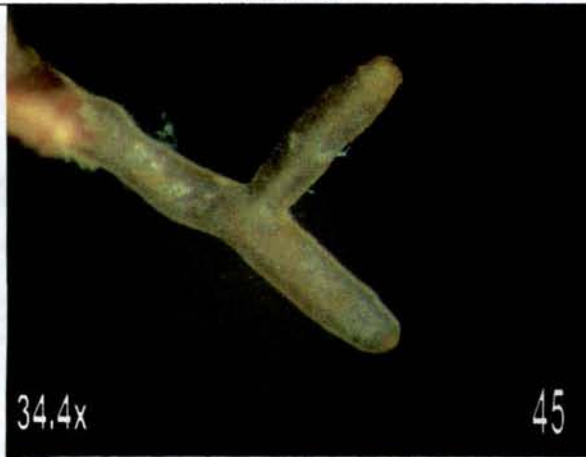




EM 9

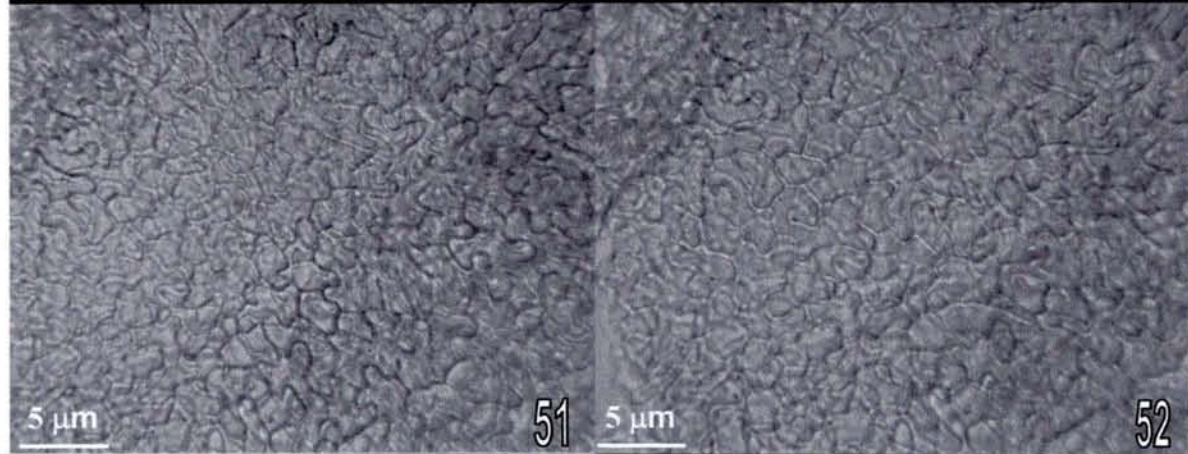
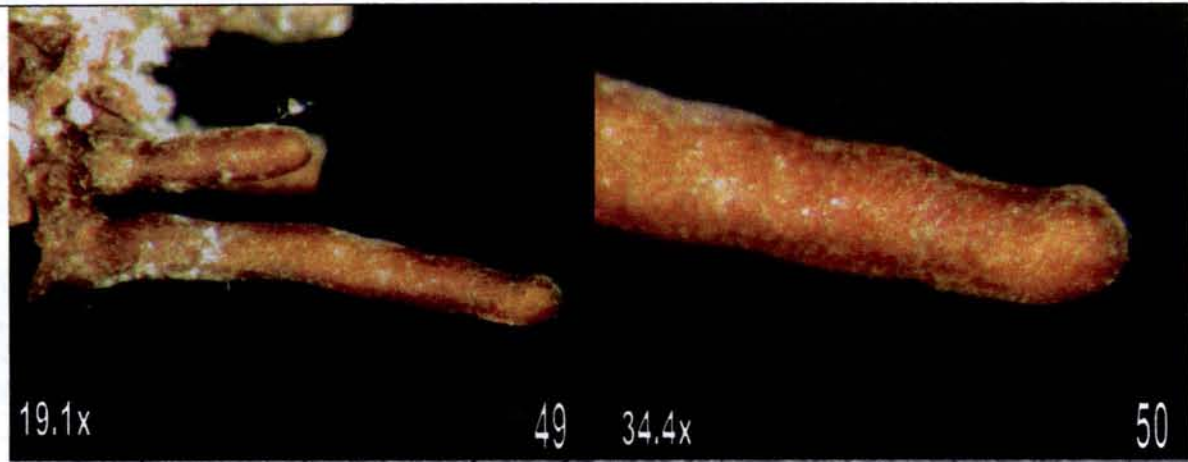


EM 10

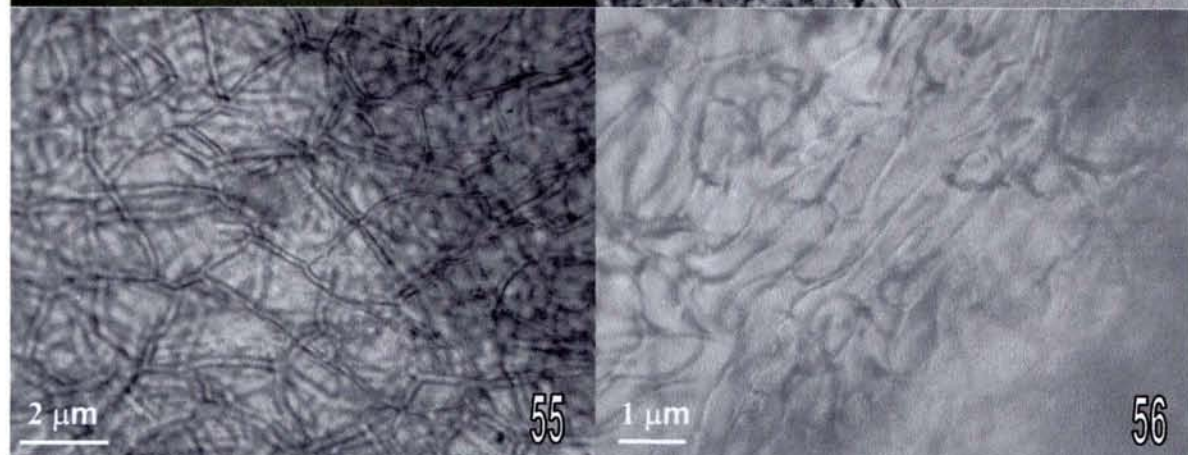
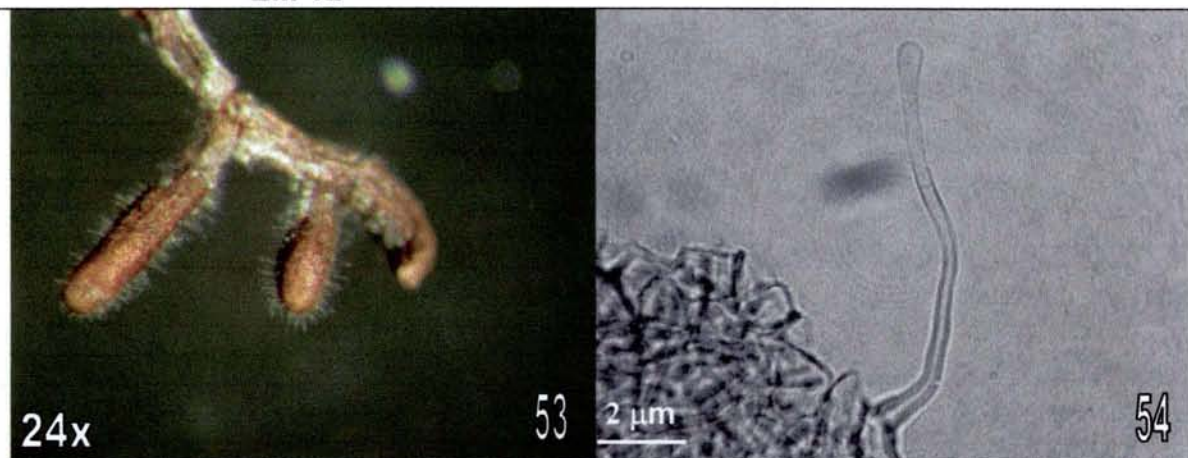




EM 11

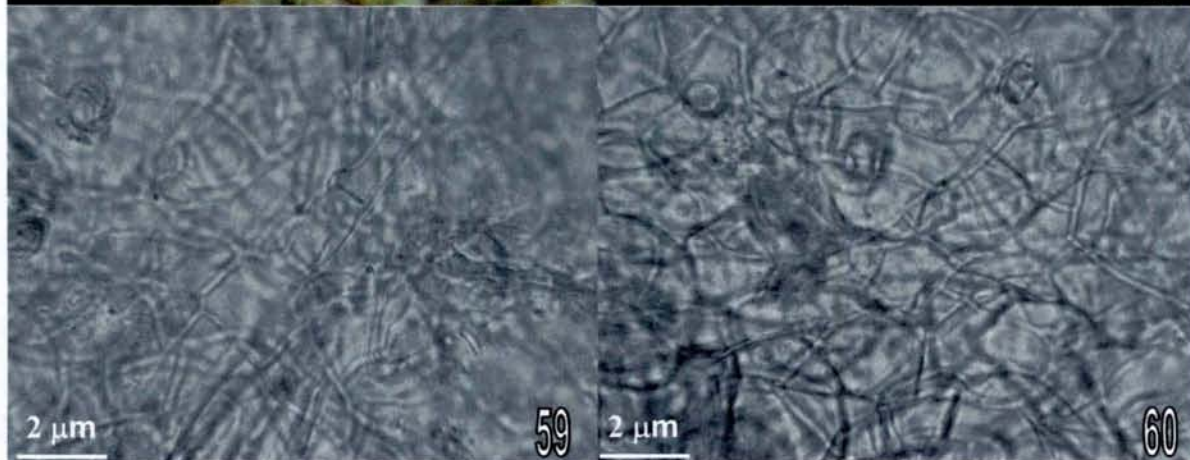


EM 12

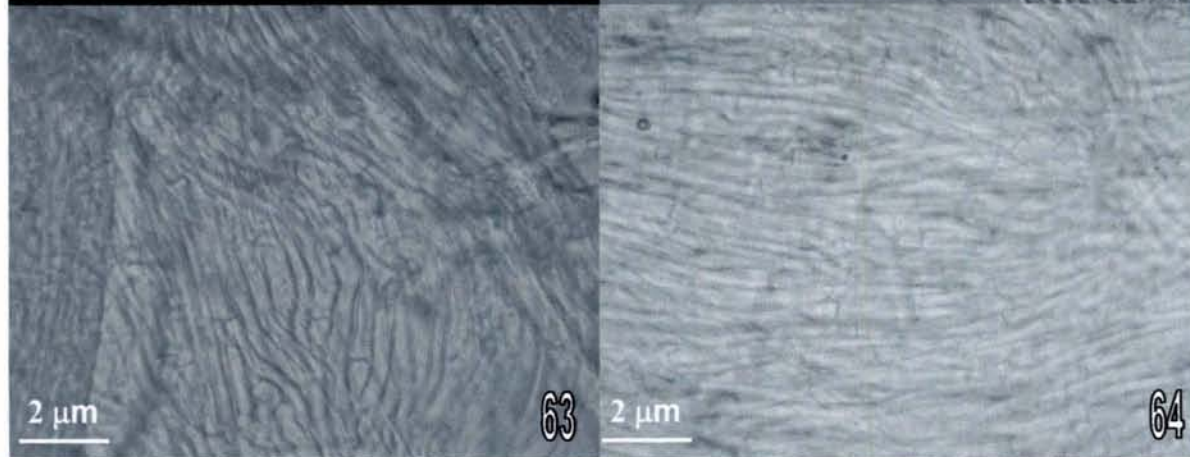
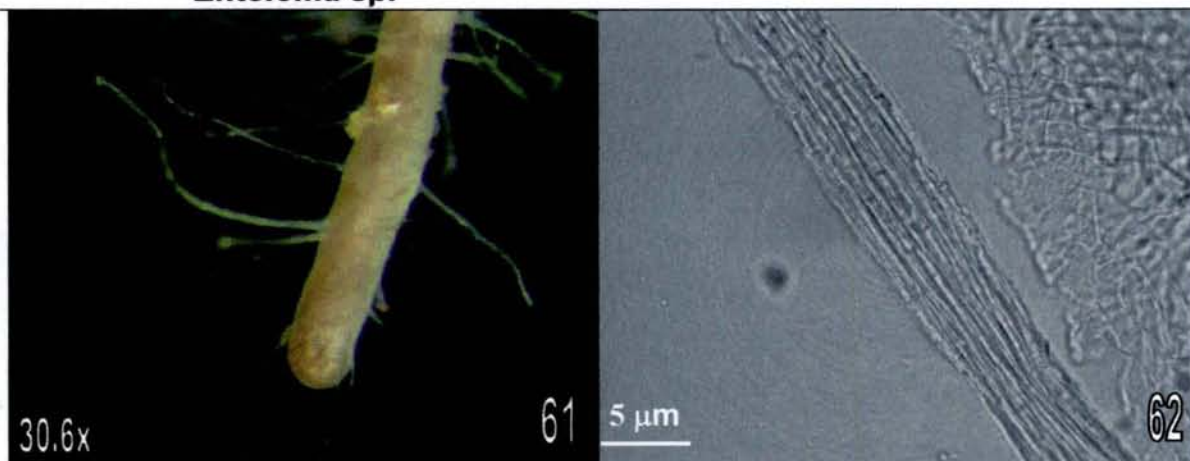




EM 13

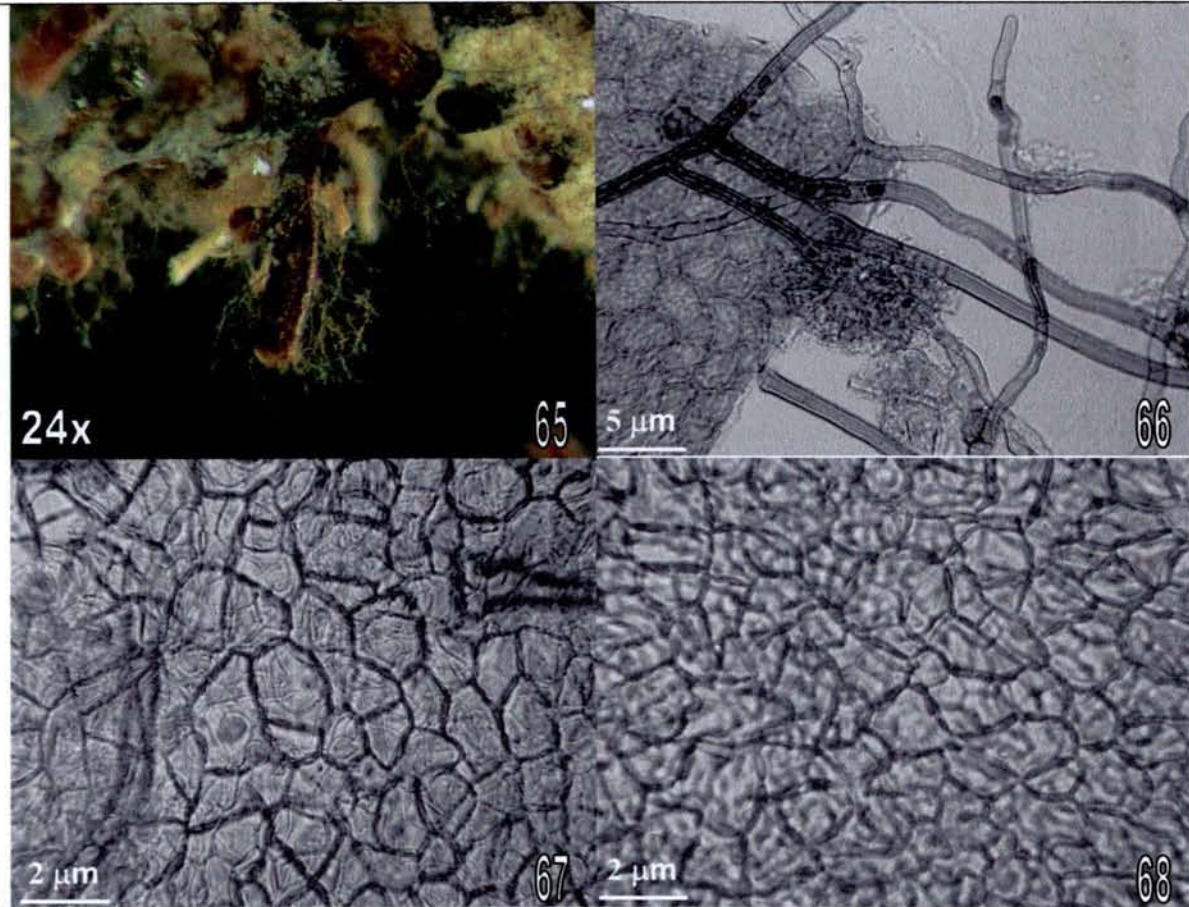


*Entoloma* sp.

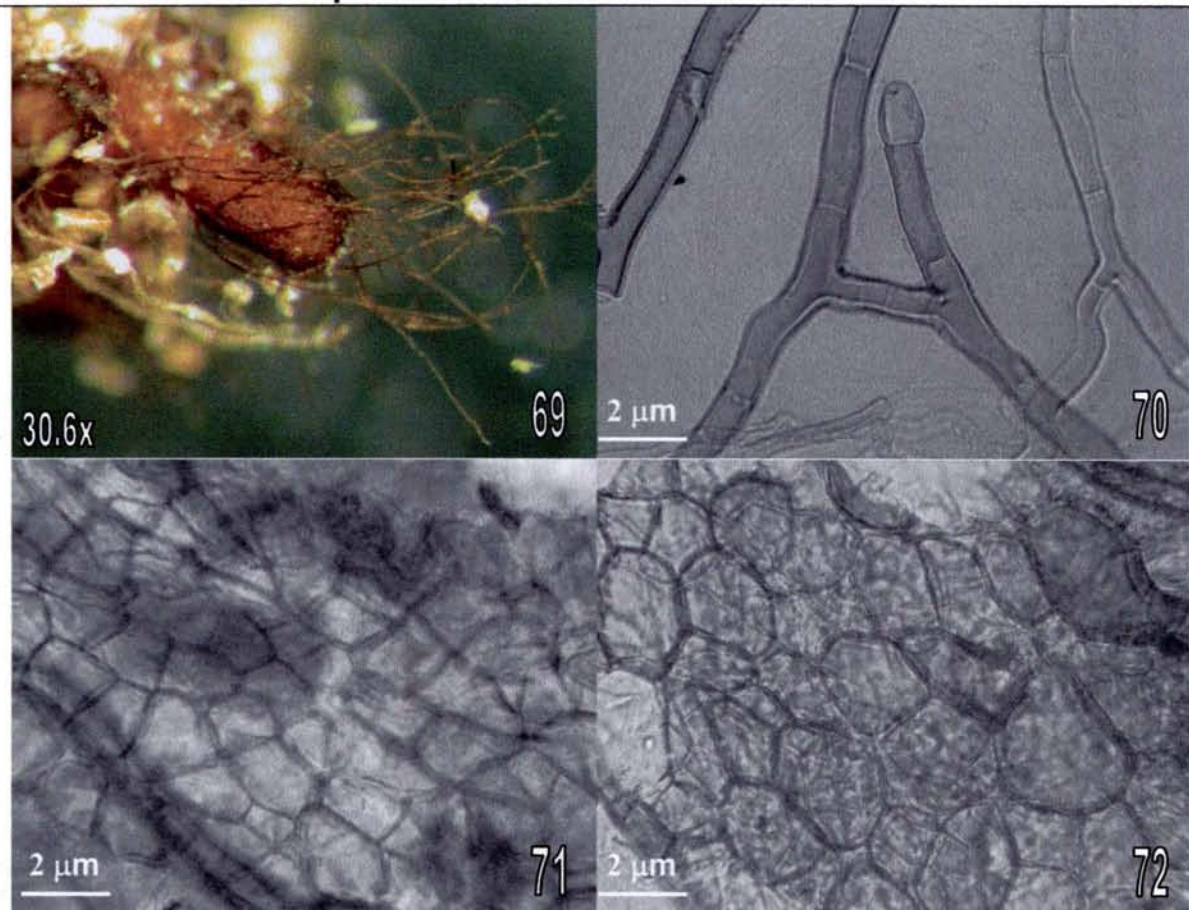




**Genea sp. I**

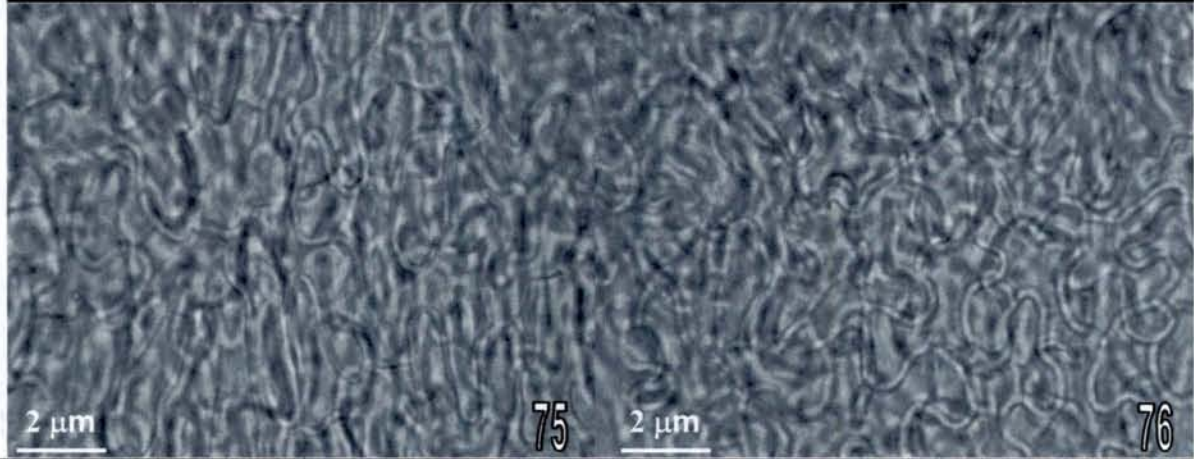
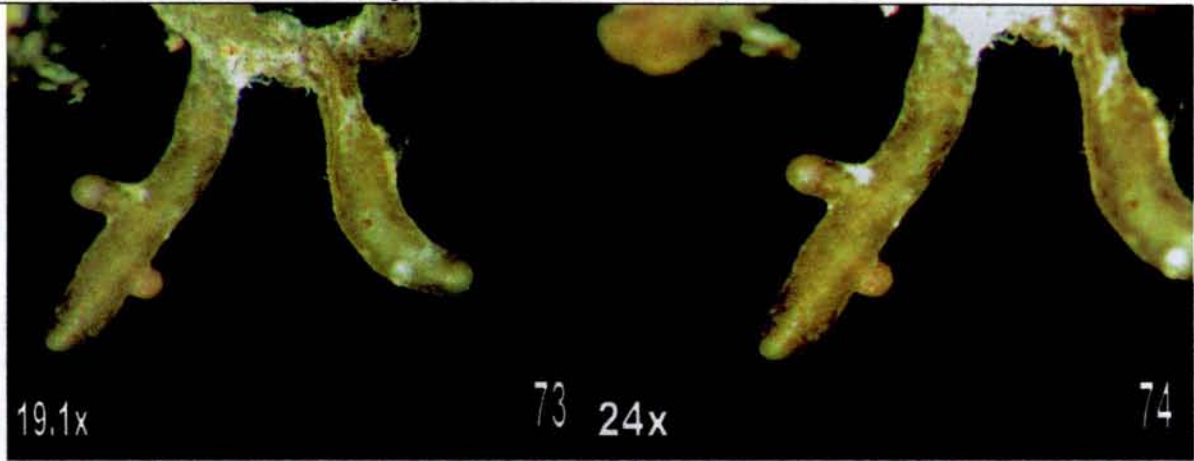


**Genea sp. II**

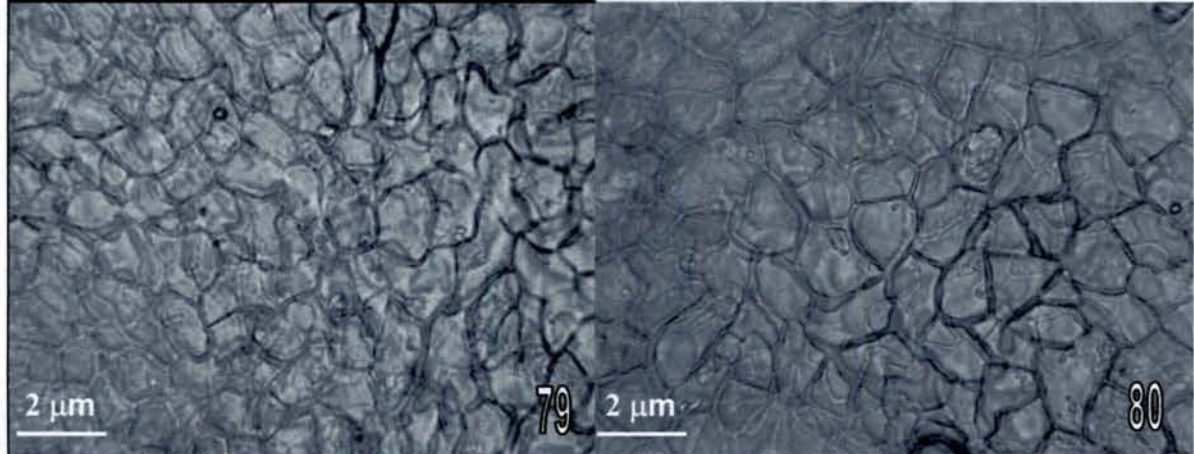
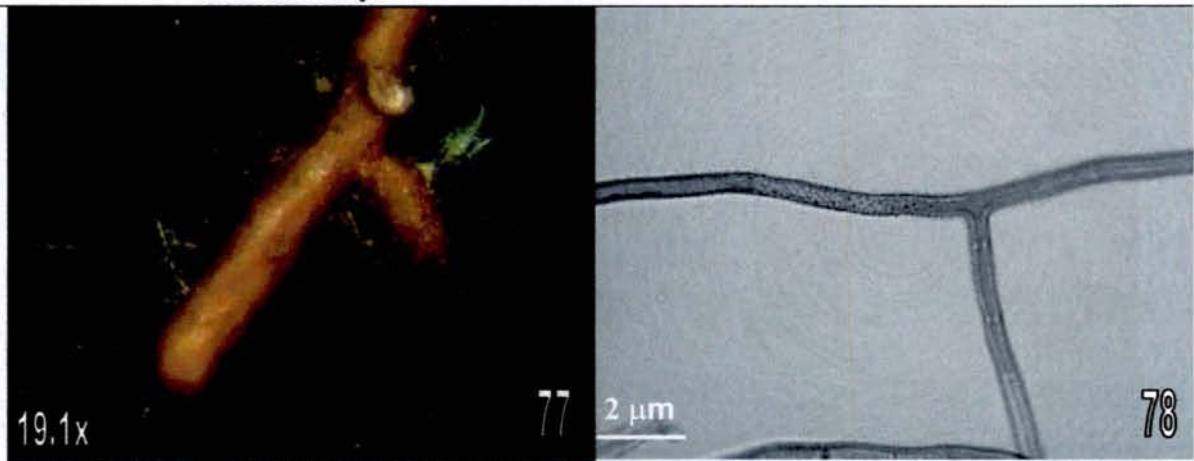




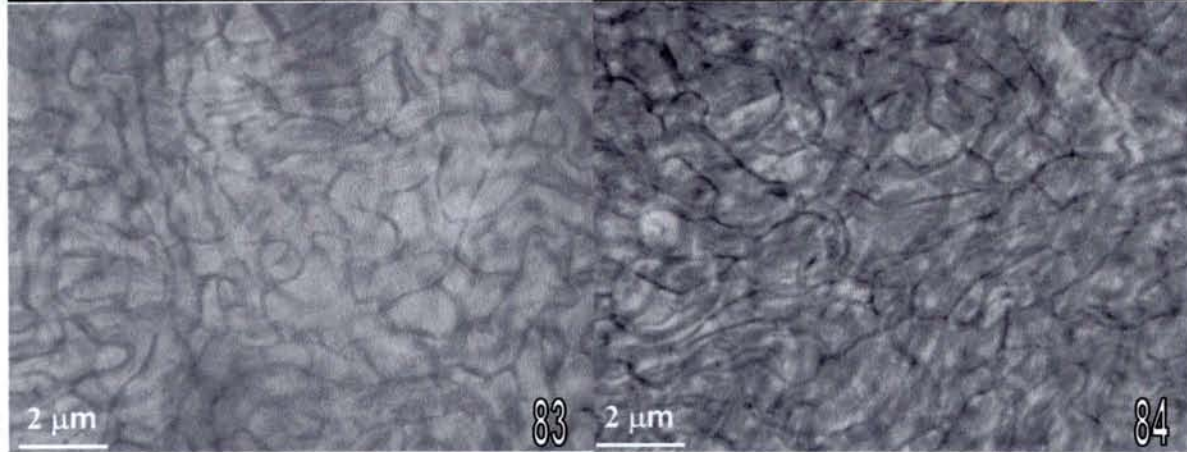
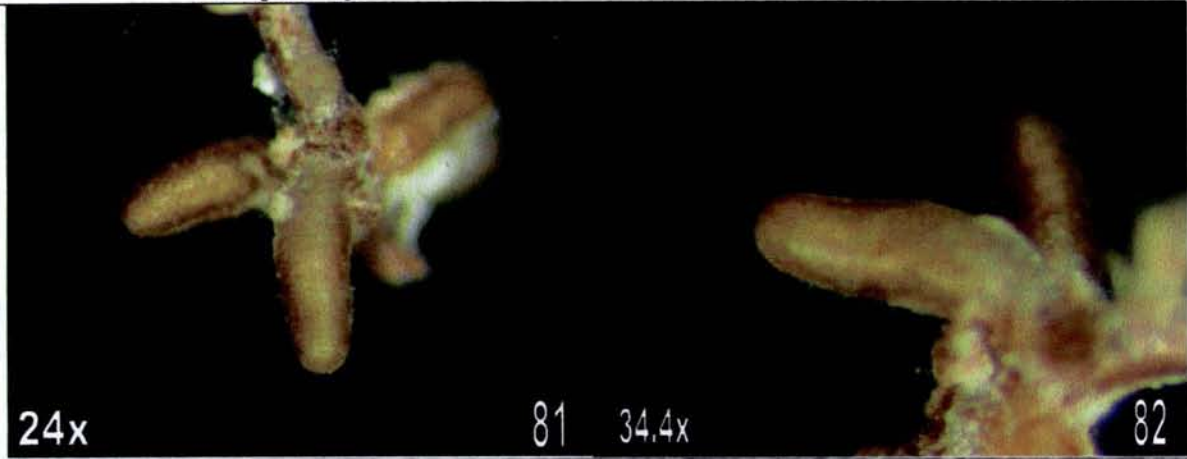
***Helvellaceae* sp.**



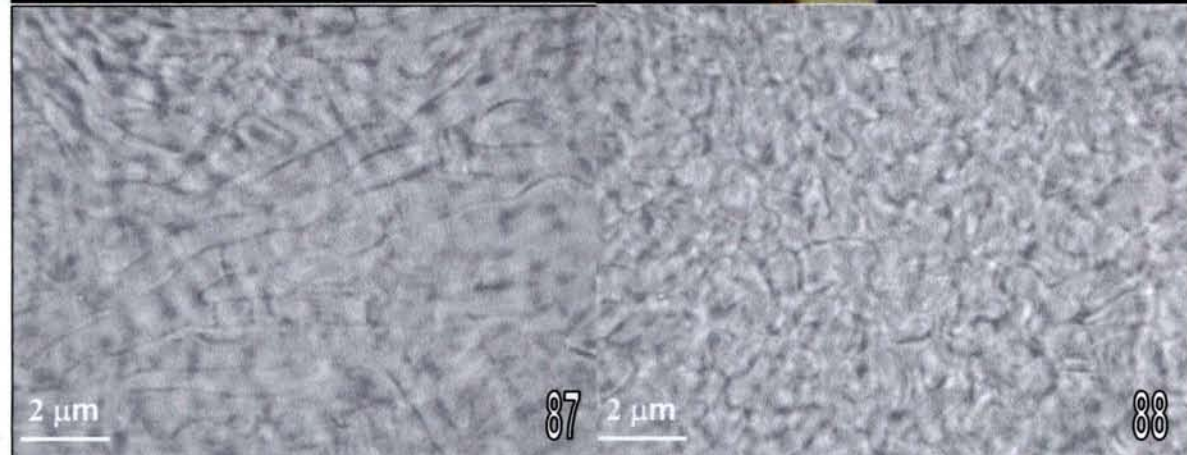
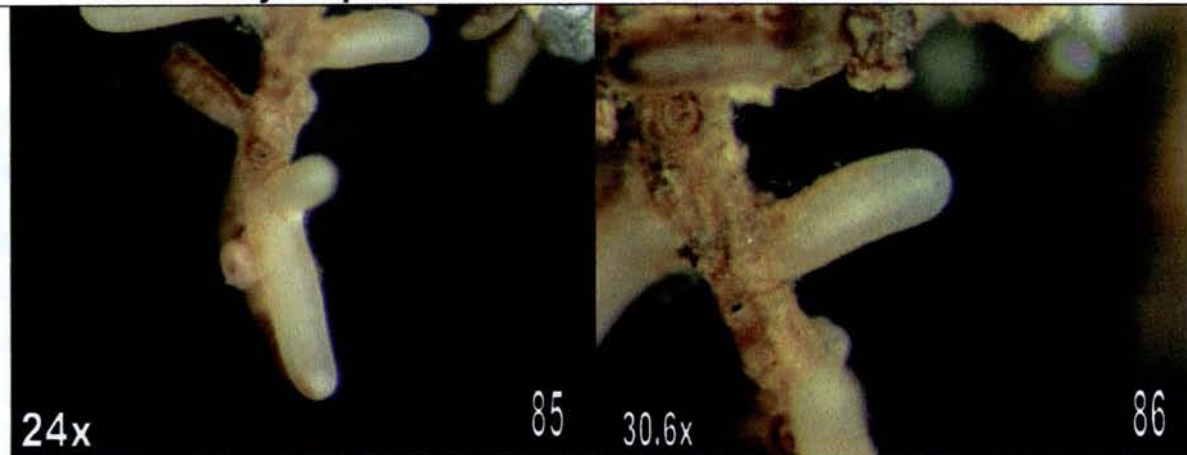
***Humaria* sp.**



*Inocybe sp. I*

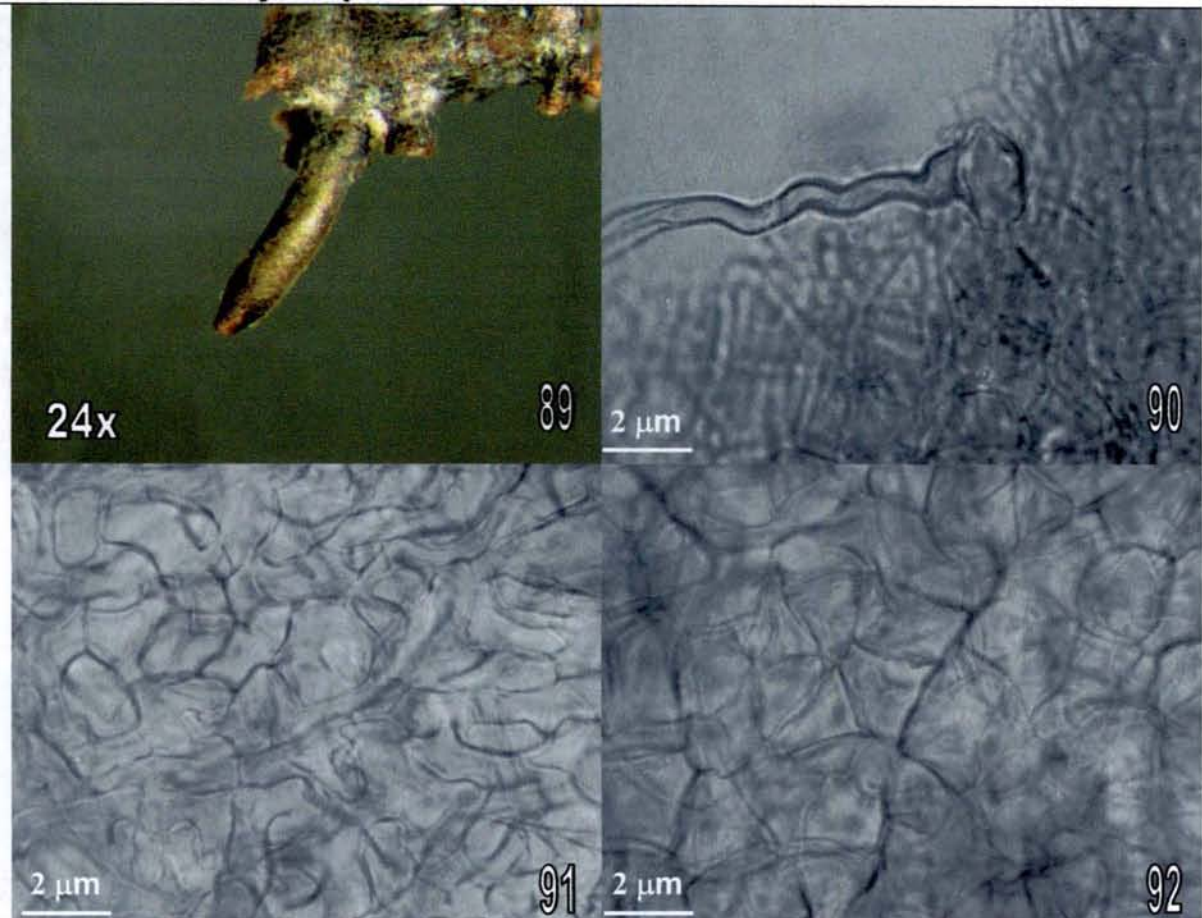


*Inocybe sp. II*

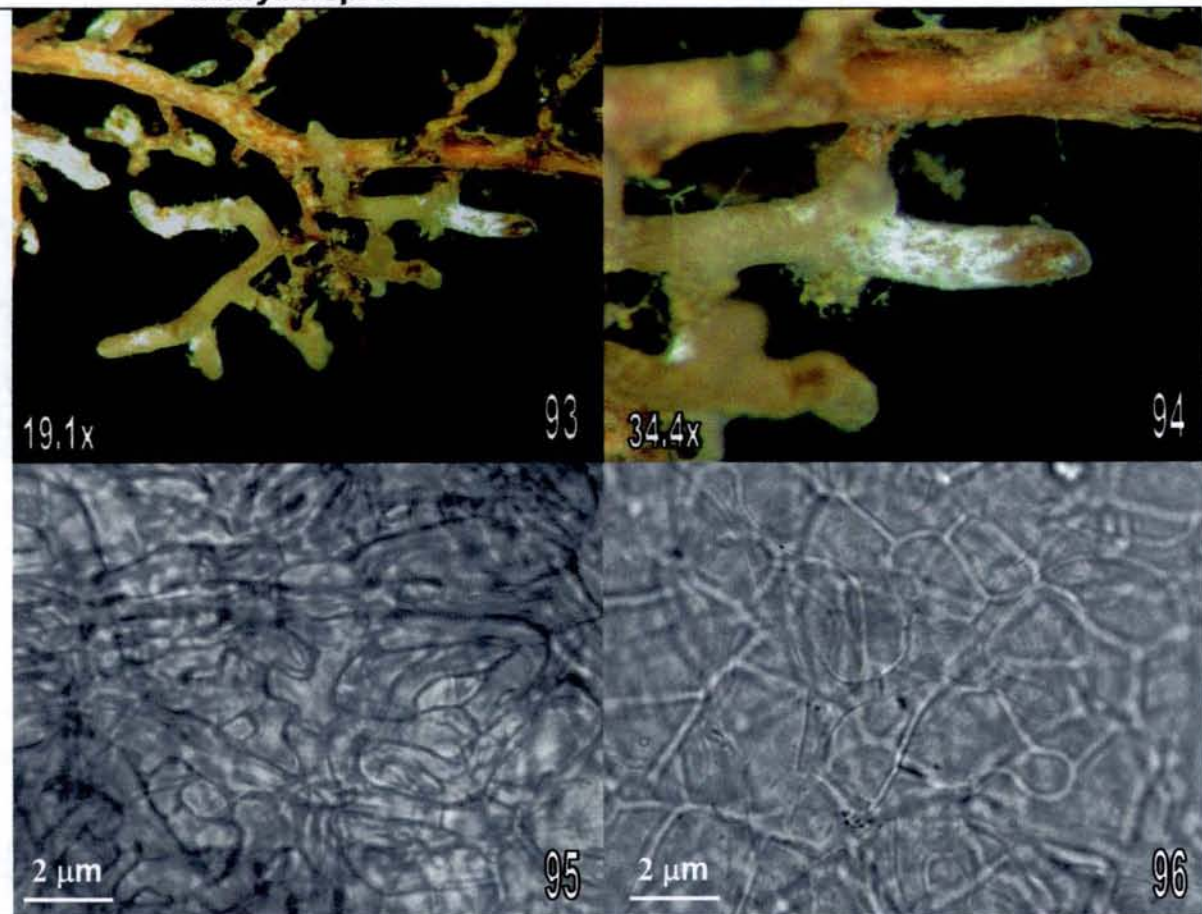




*Inocybe sp. III*

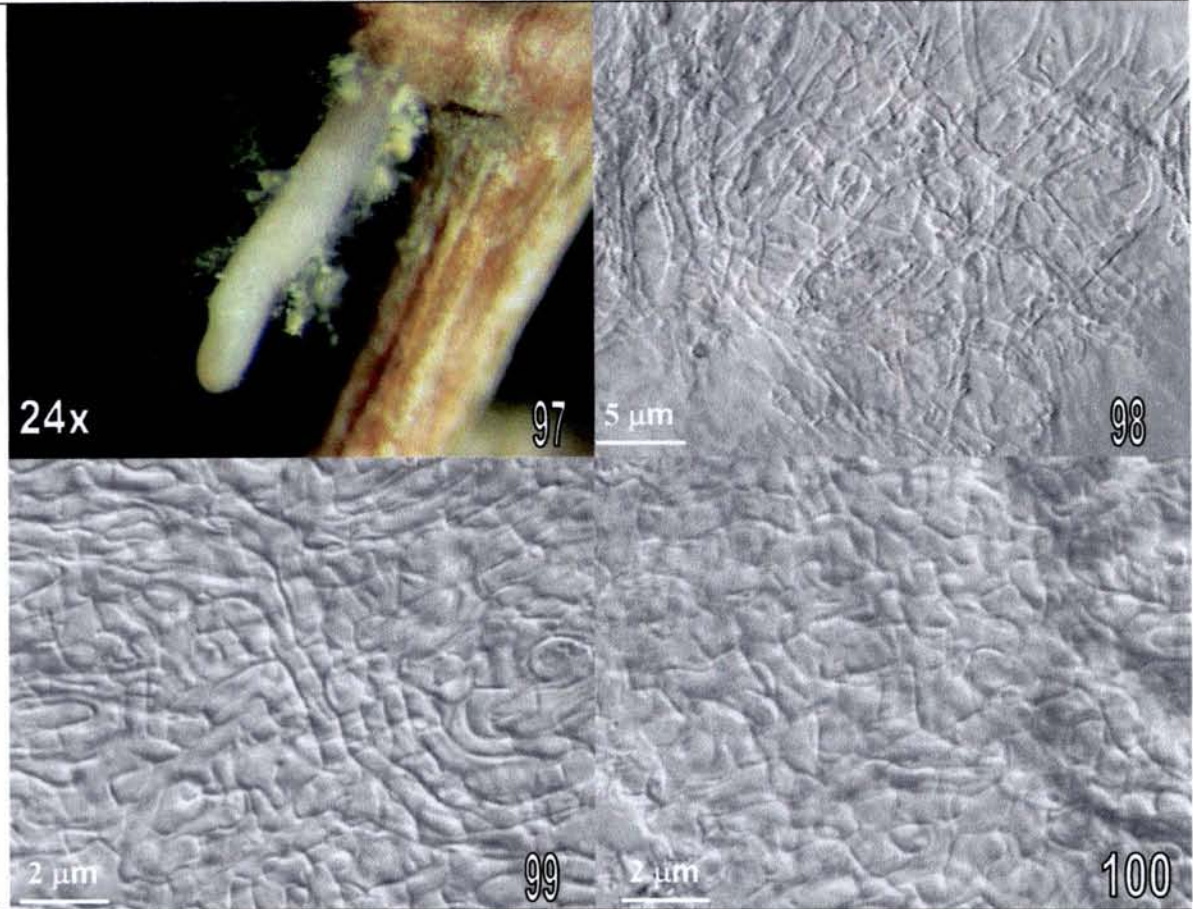


*Inocybe sp. IV*

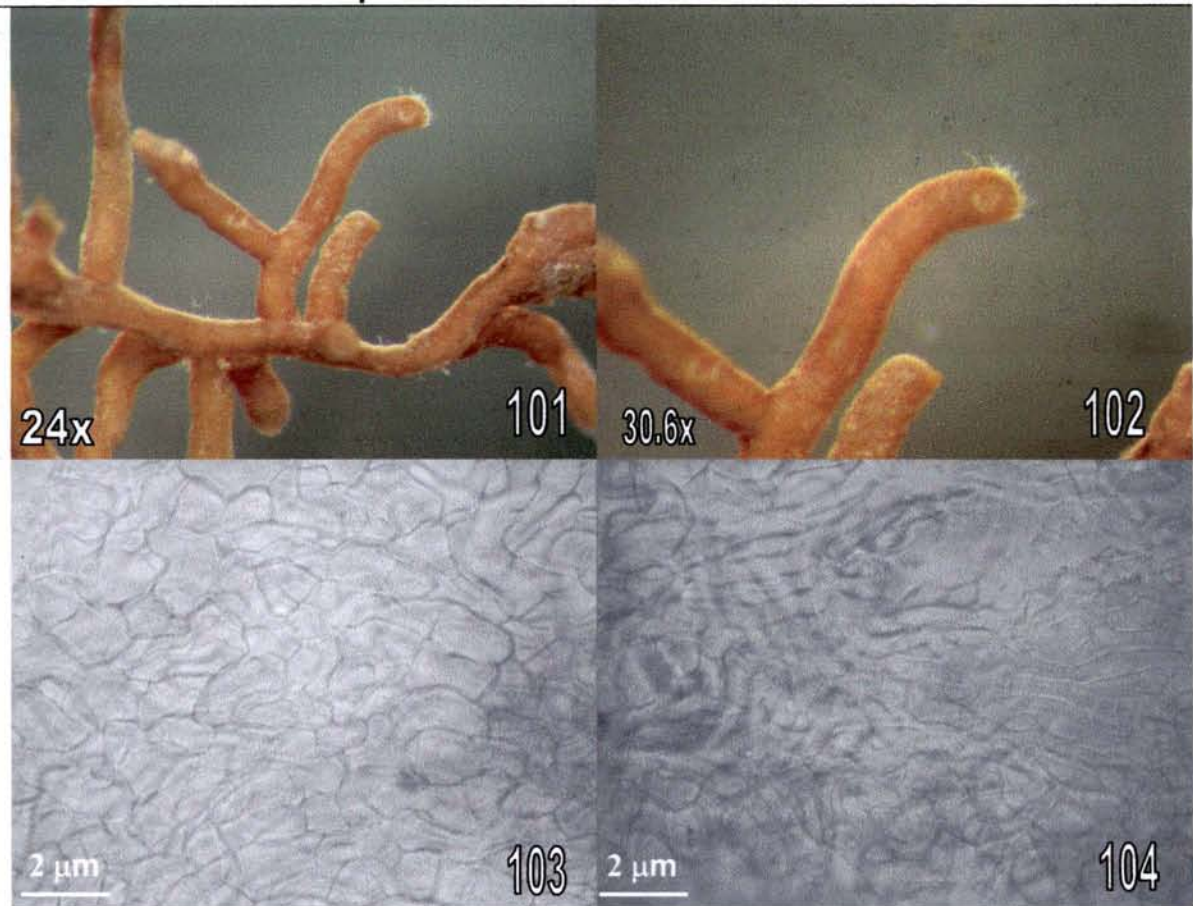




*Laccaria* sp.

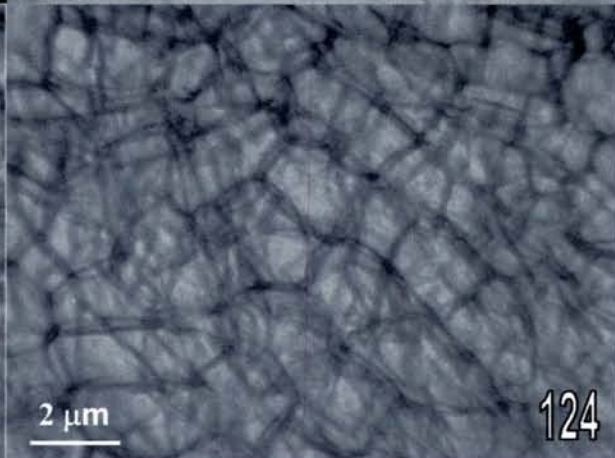
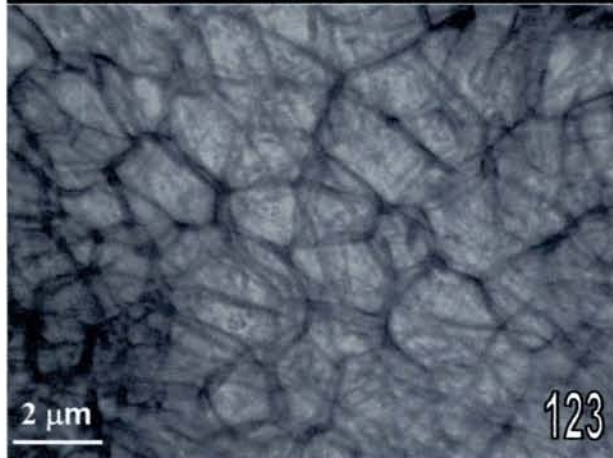
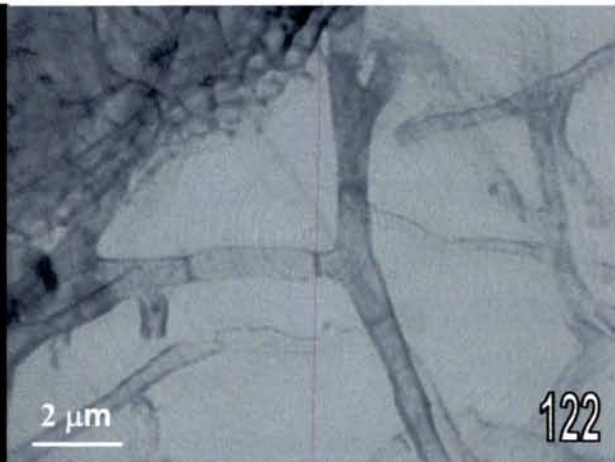
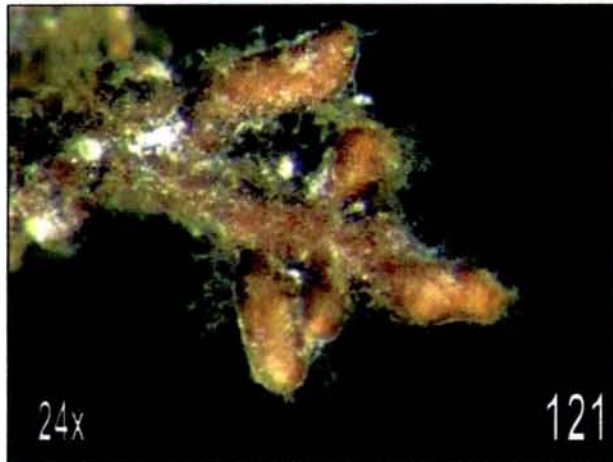


*Lactarius* sp. I

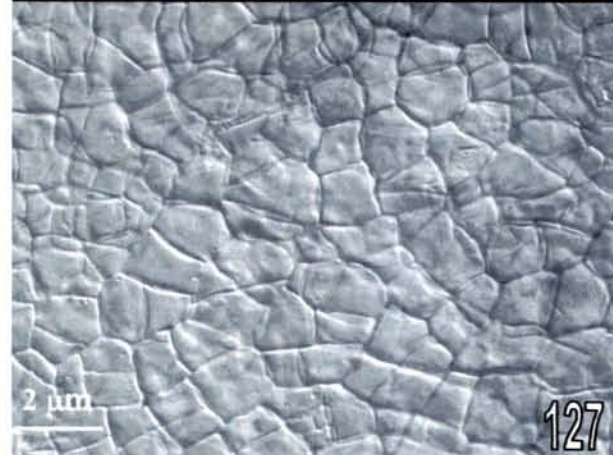
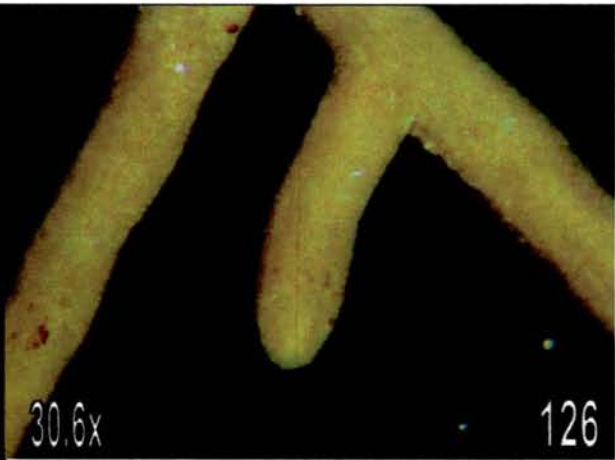
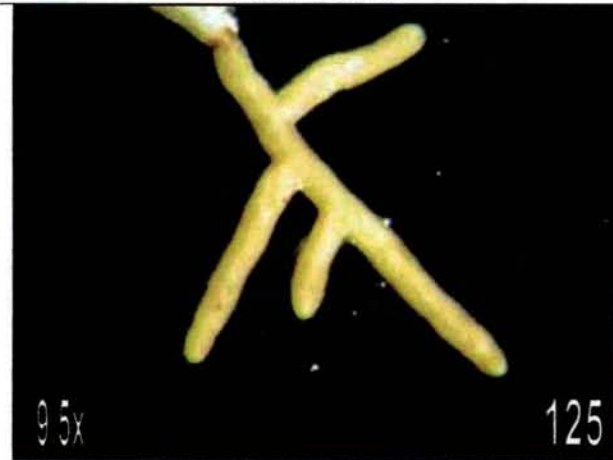




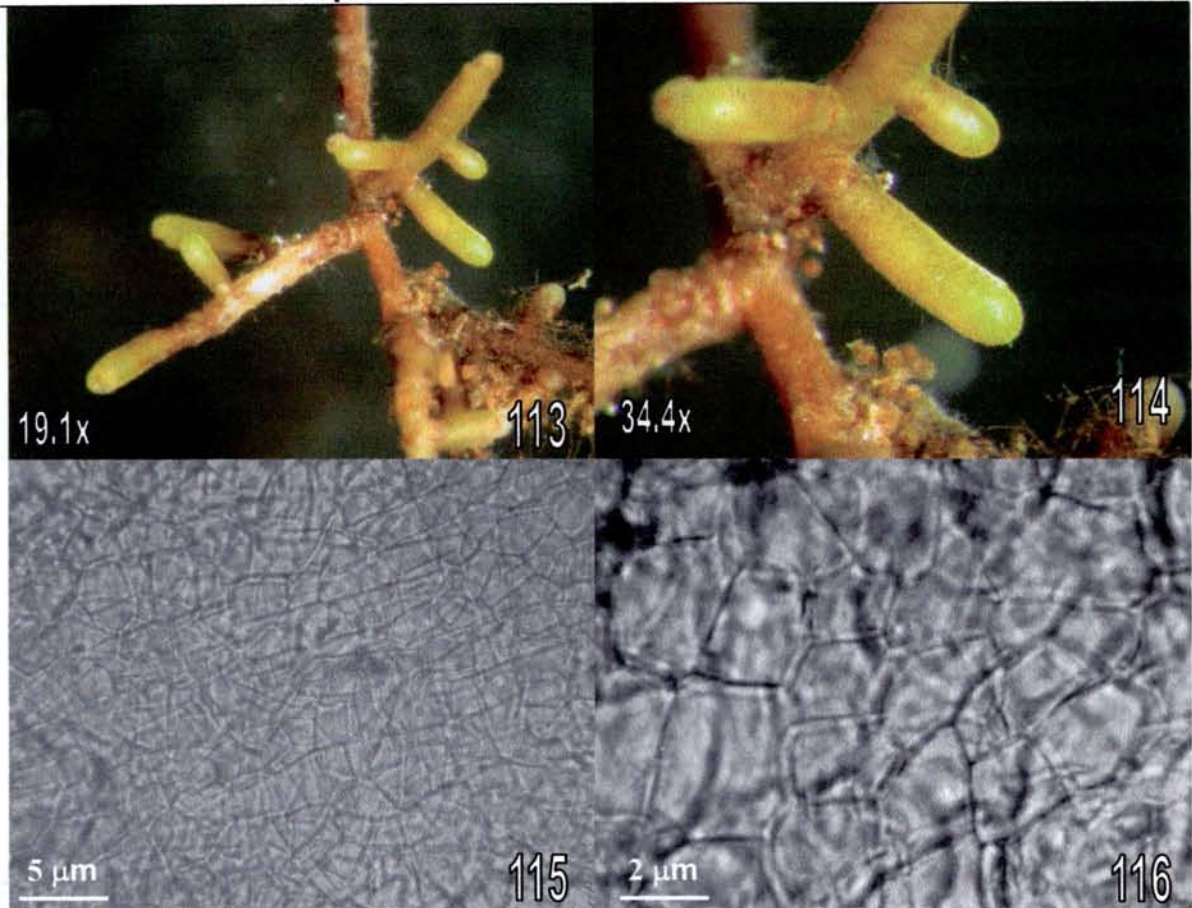
***Pezizaceae I***



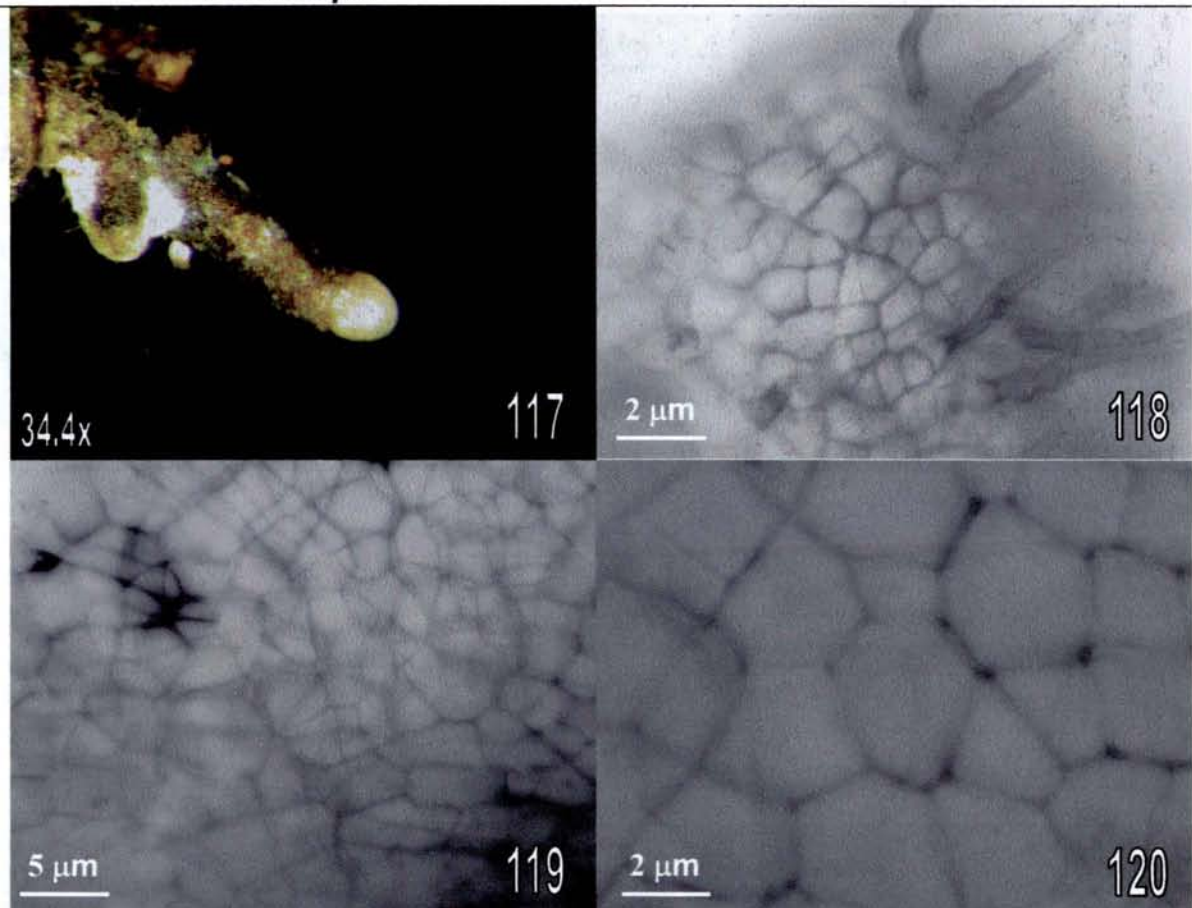
***Pezizales I***



*Peziza* sp. I

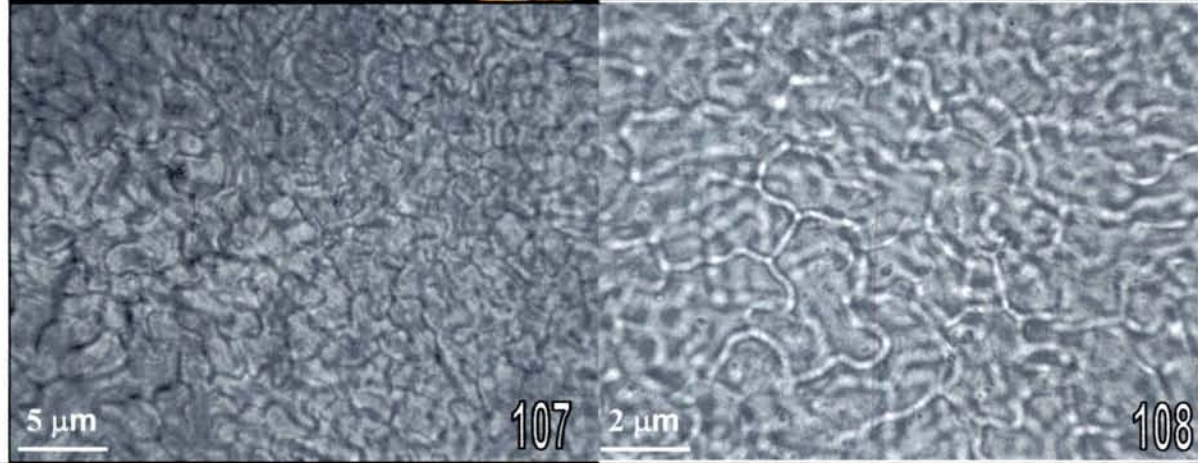


*Peziza* sp. II

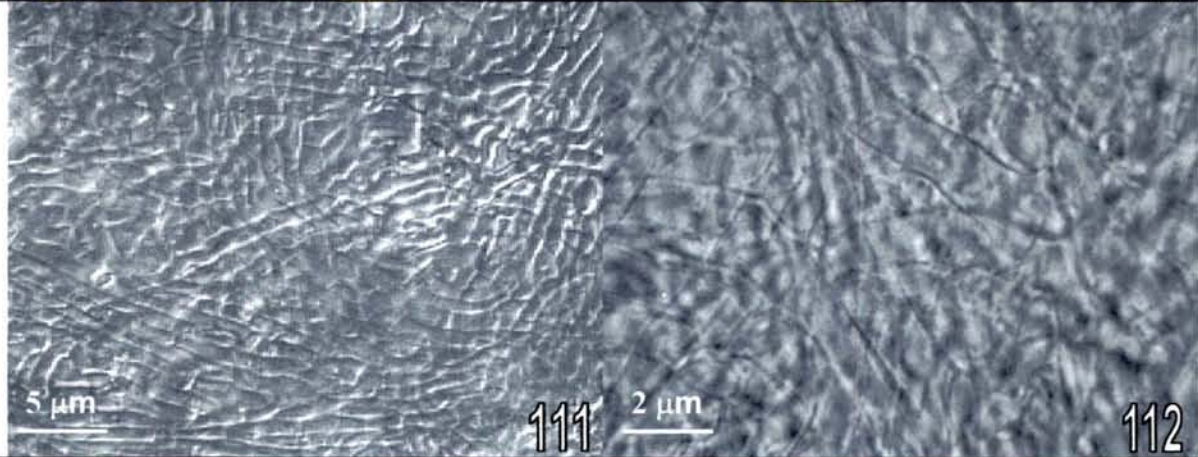
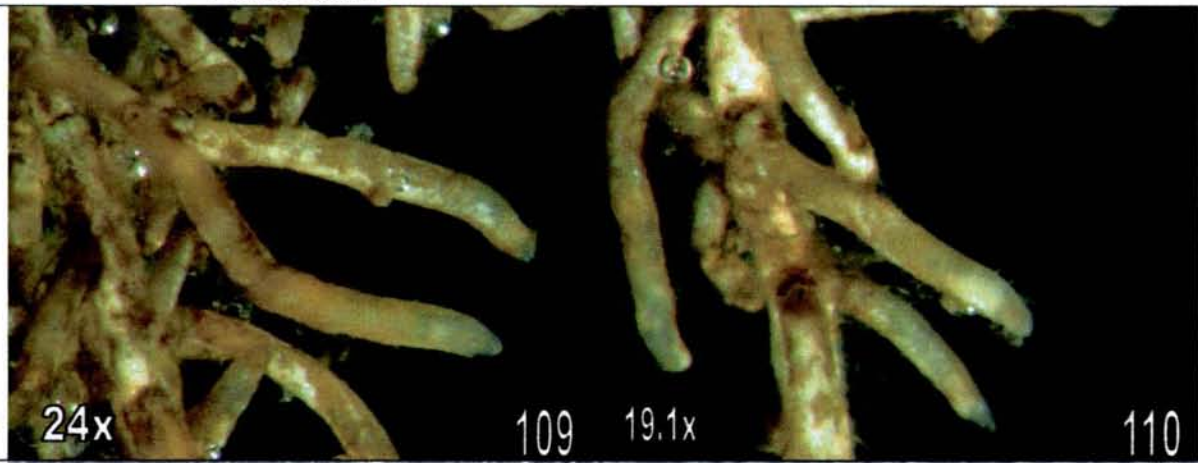




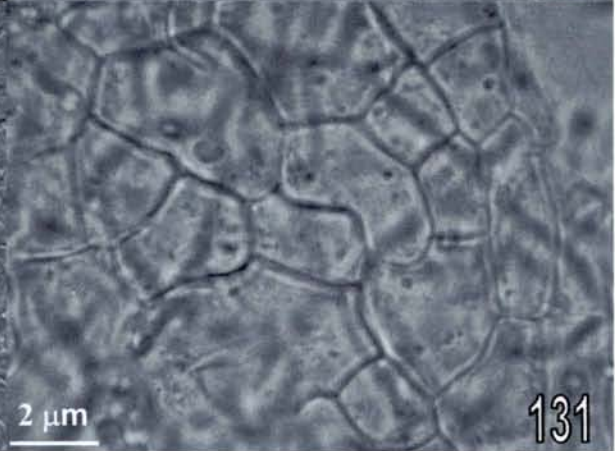
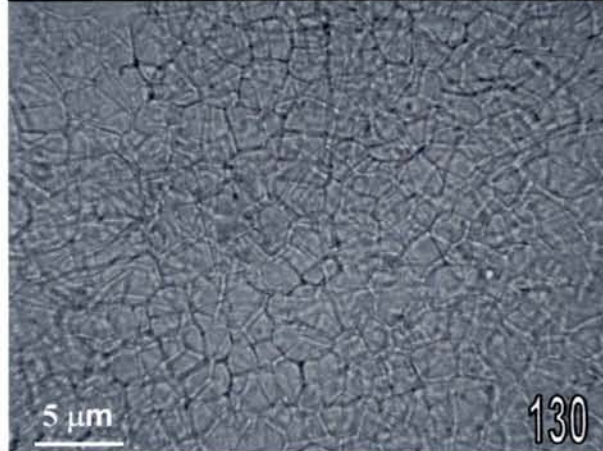
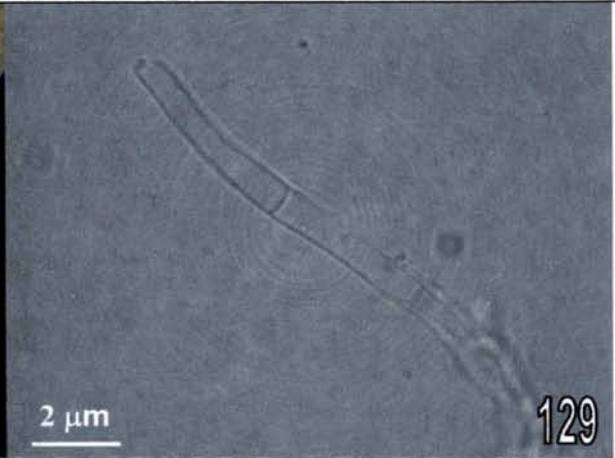
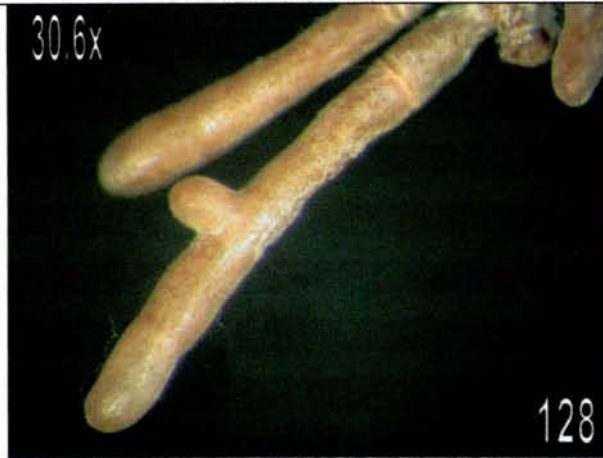
*Lactarius* sp. II



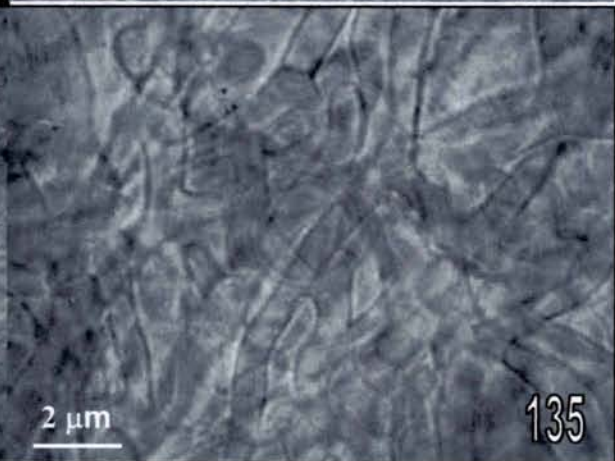
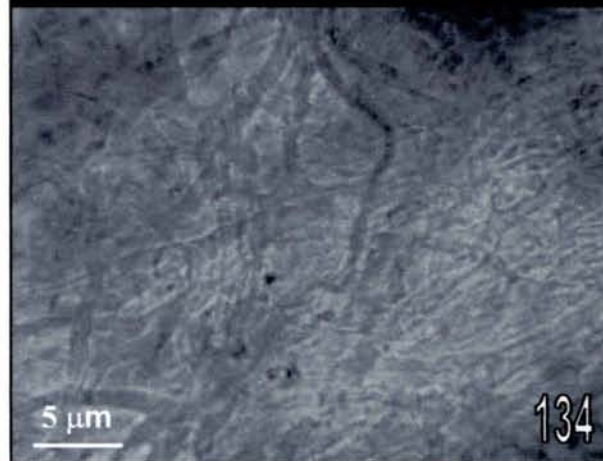
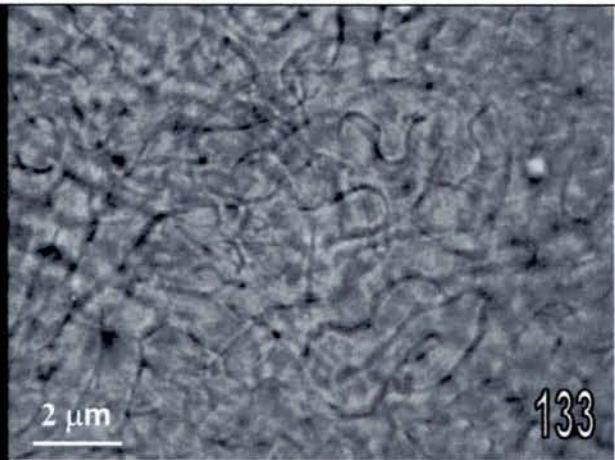
*Paxillaceae*



***Pezizales II***



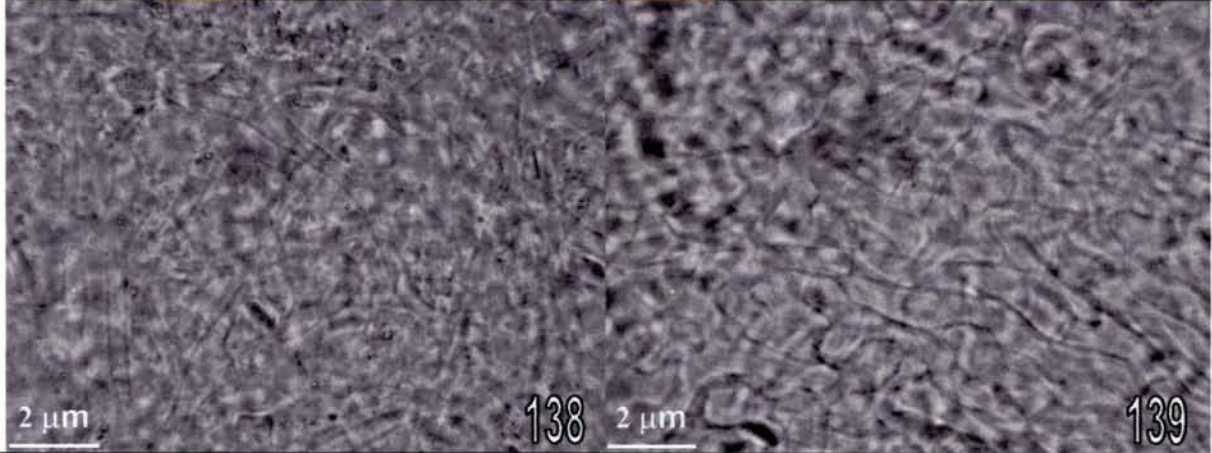
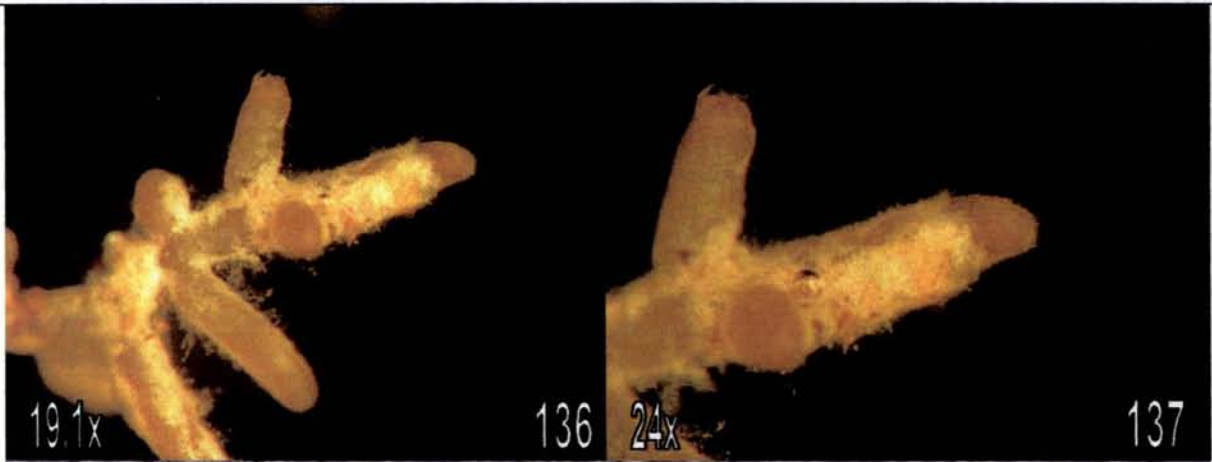
***Russula sp. I***



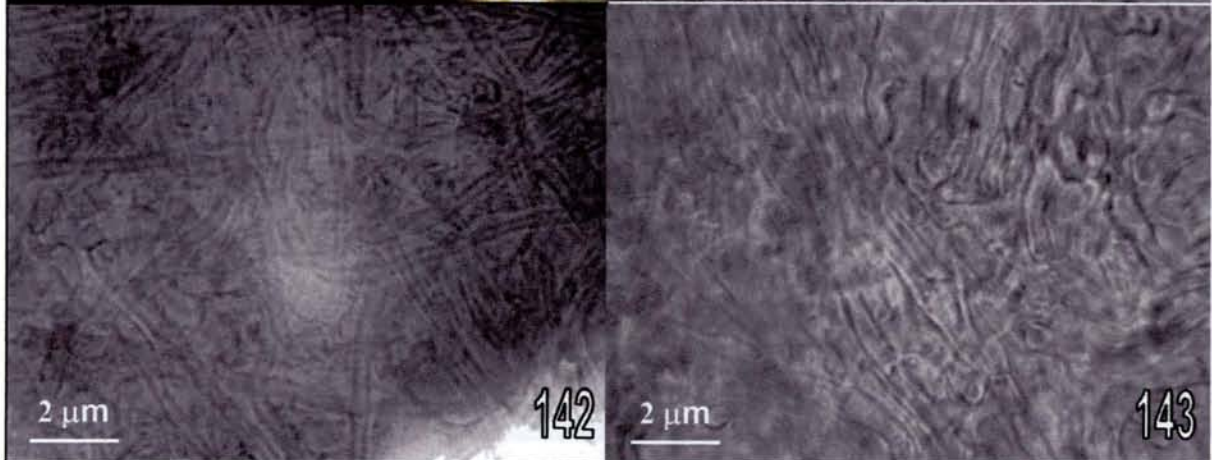
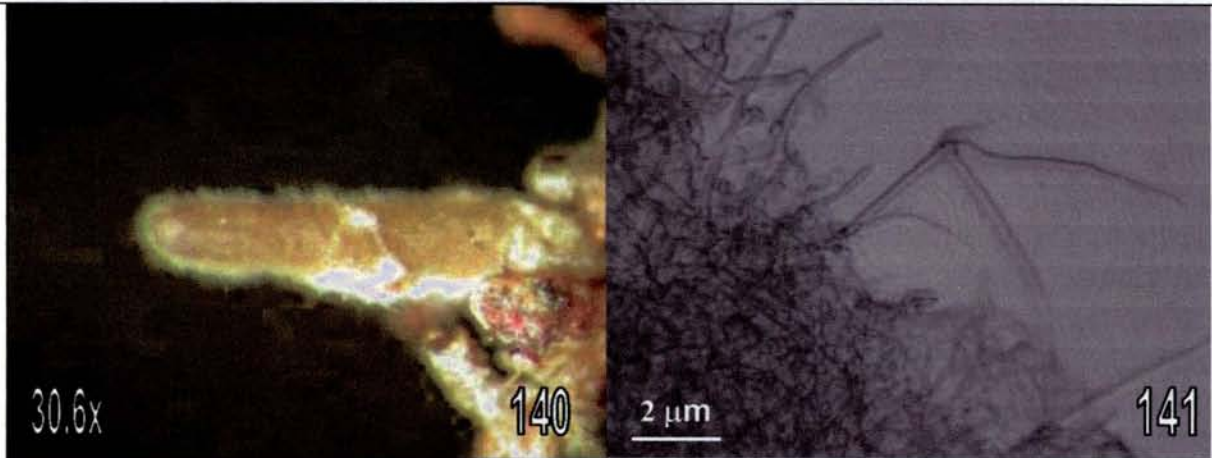




**Russulaceae I**

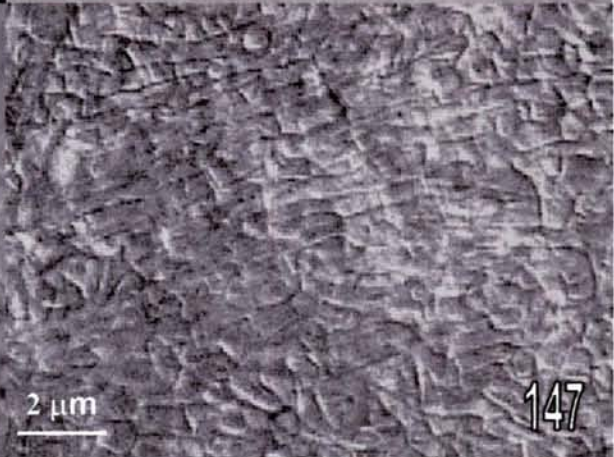
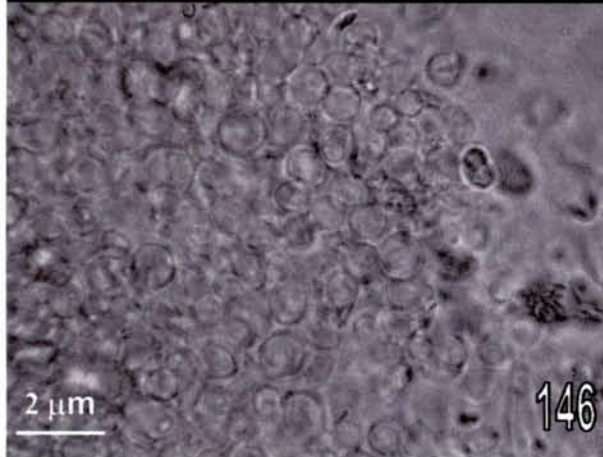
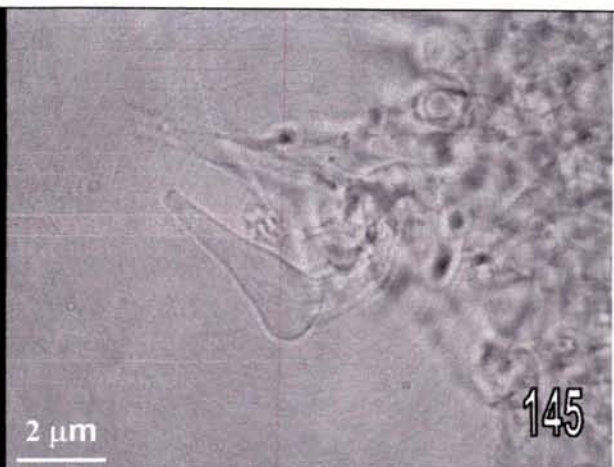
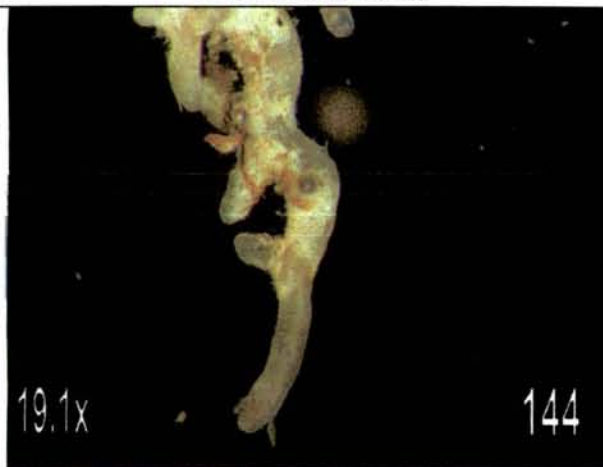


**Russulaceae II**

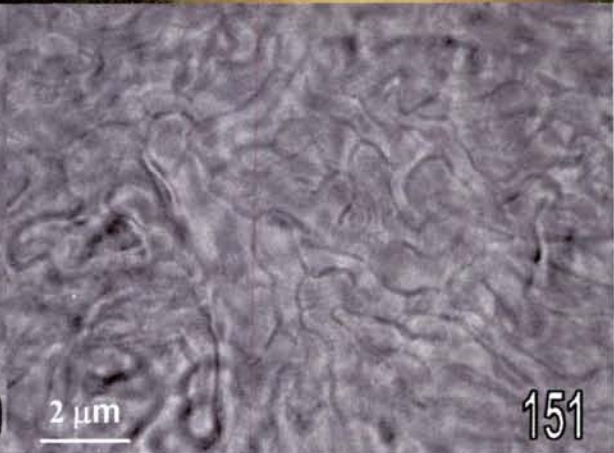
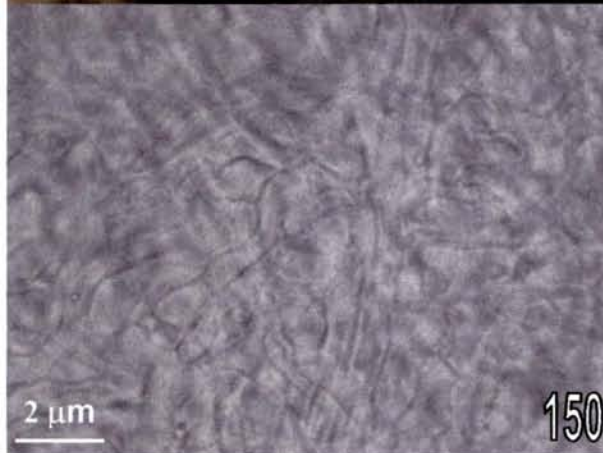
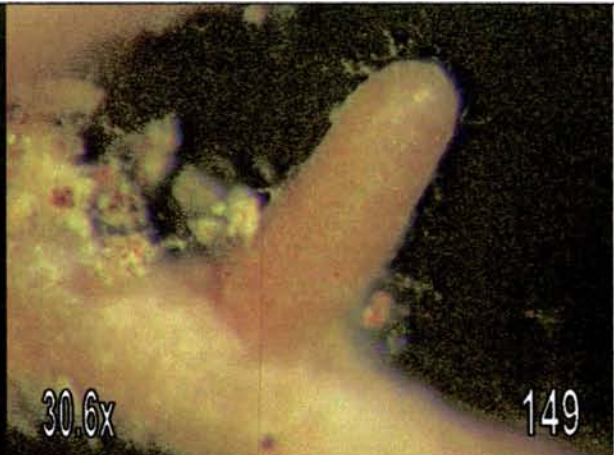




**Russulaceae III**

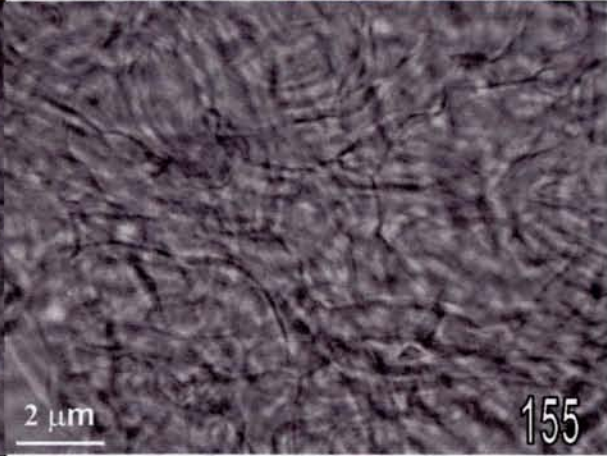
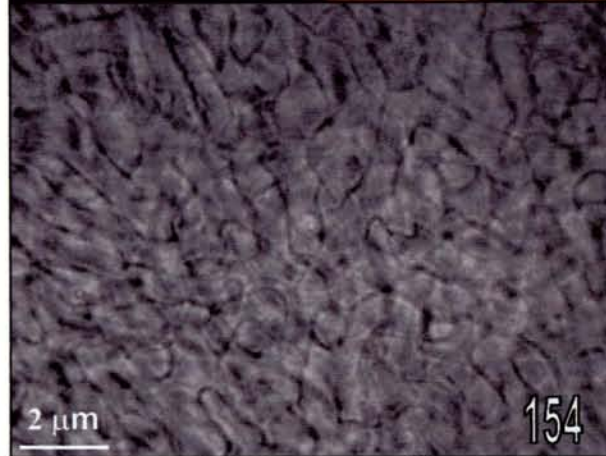


**Sebacinaceae I**

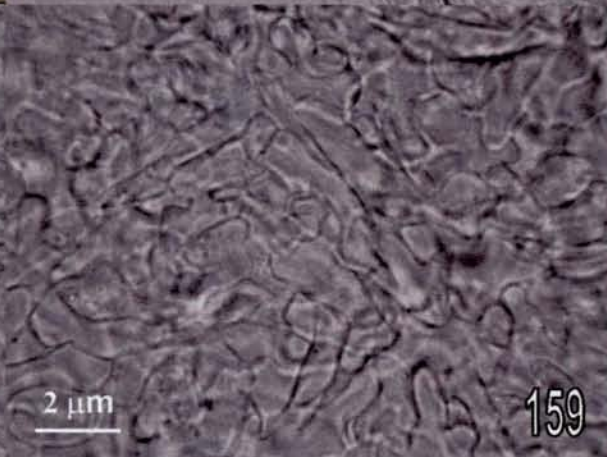
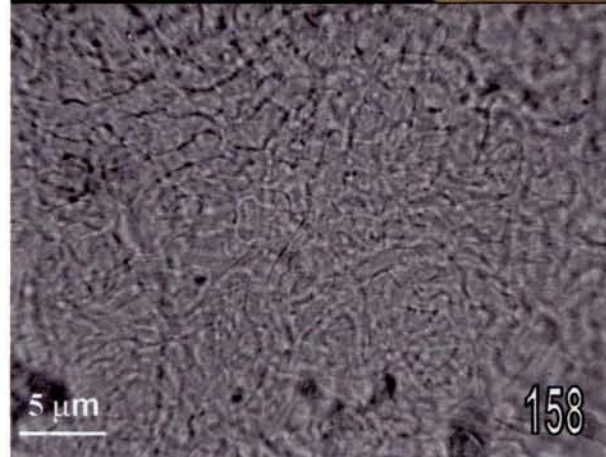
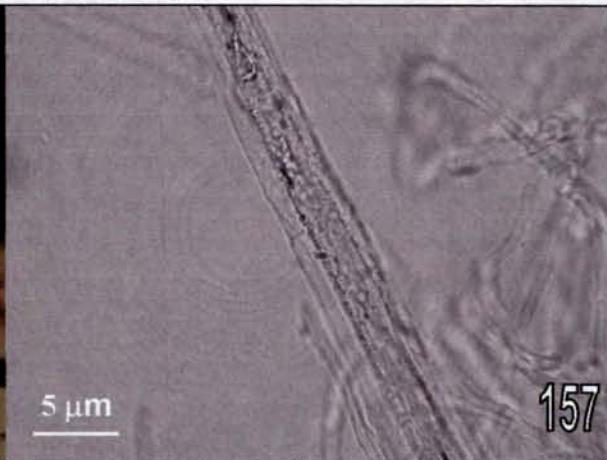




**Sebacinaceae II**

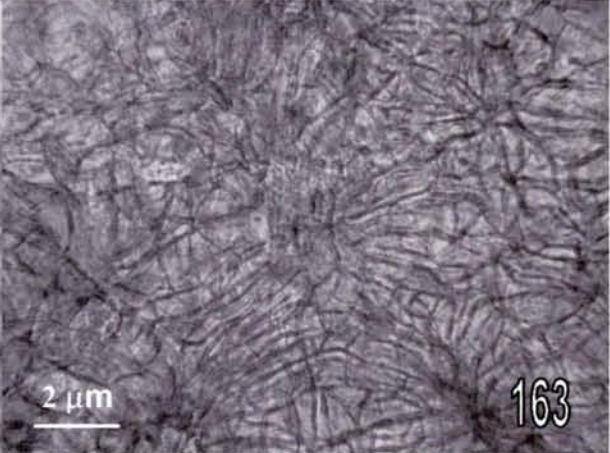
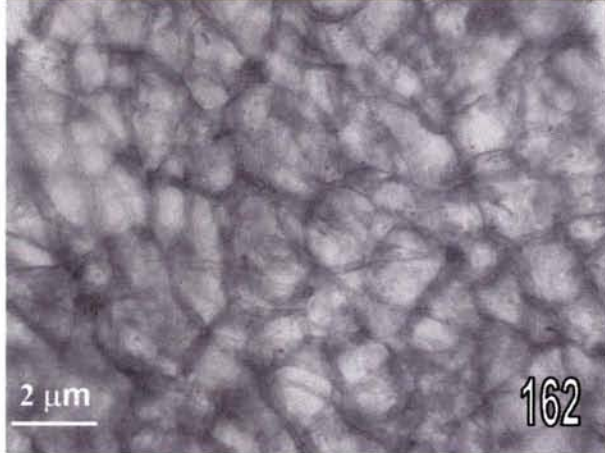
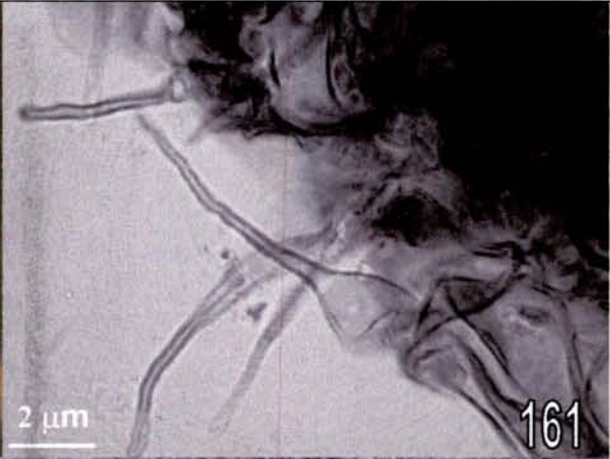


**Sebacinaceae III**

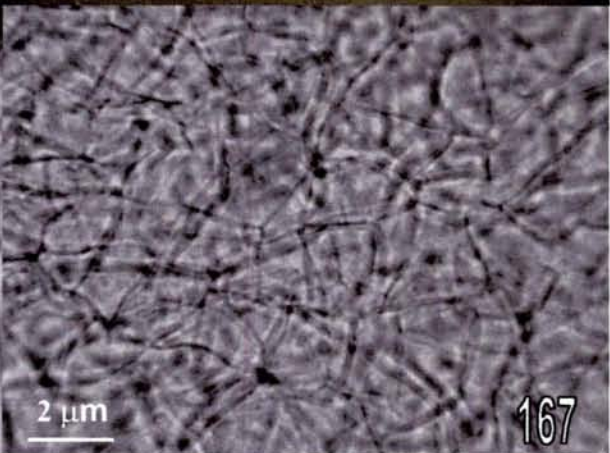
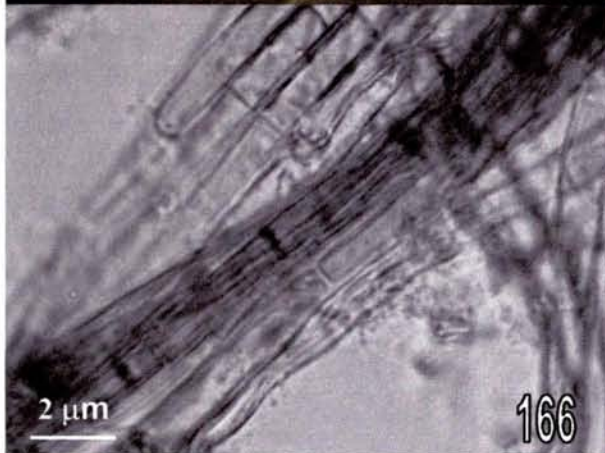
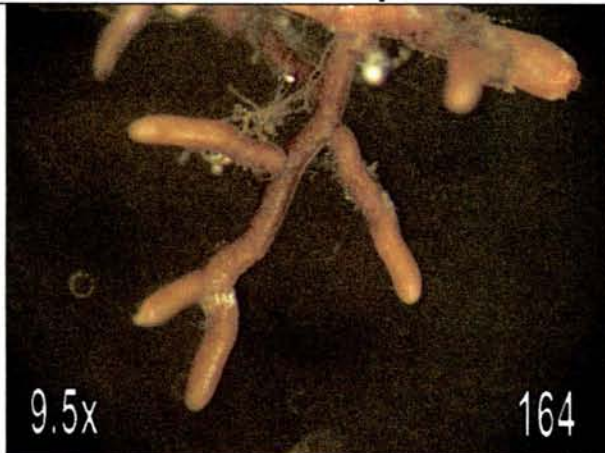




***Tomentella* sp. I**

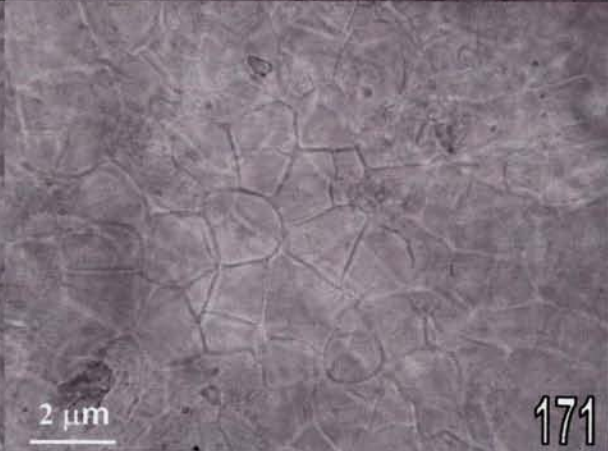
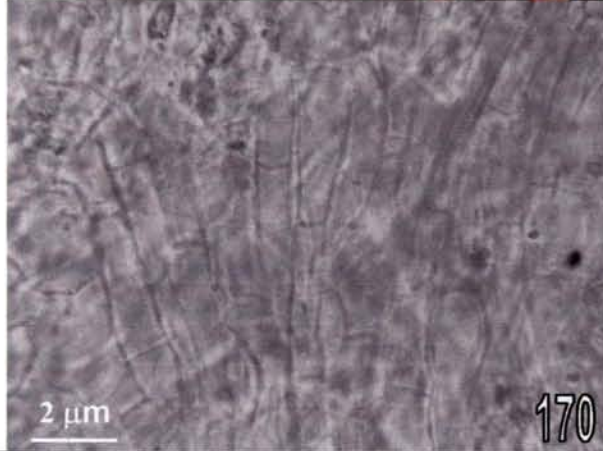
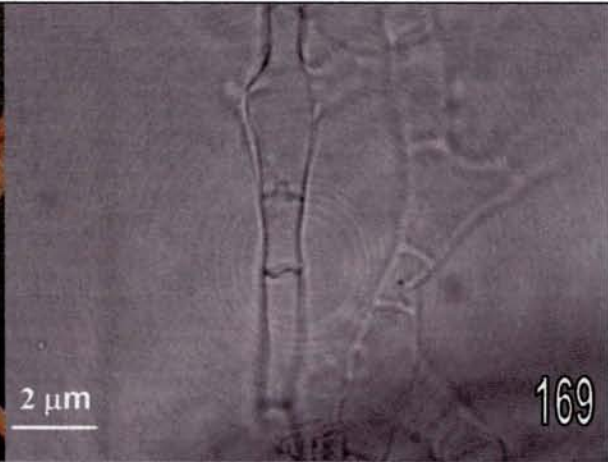


***Tomentella* sp. II**

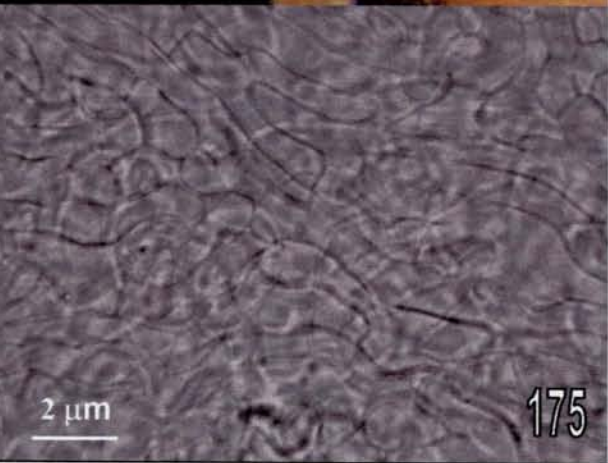
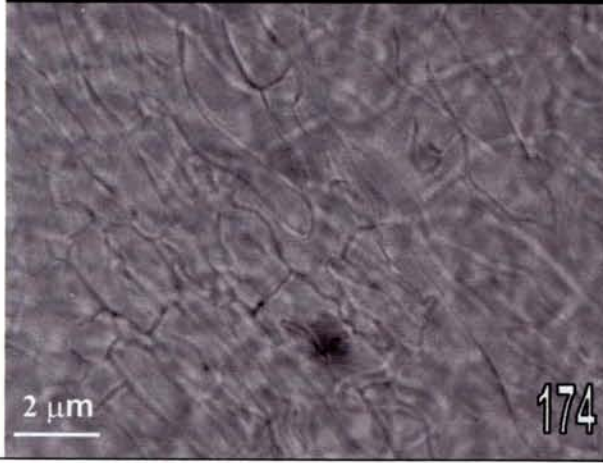
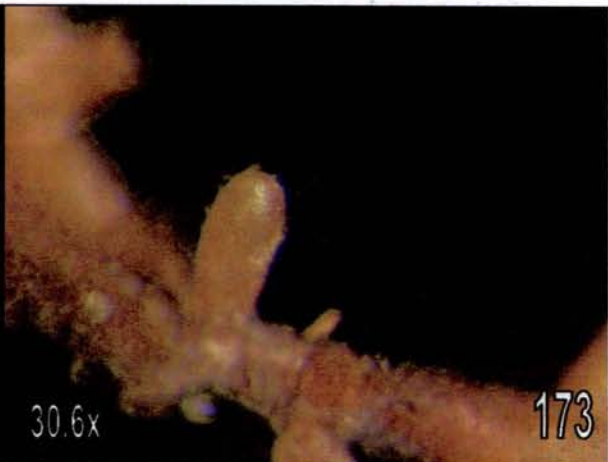




***Tomentella* sp. III**

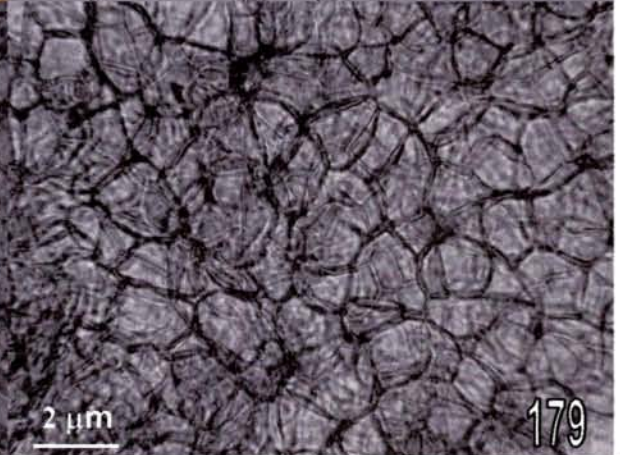
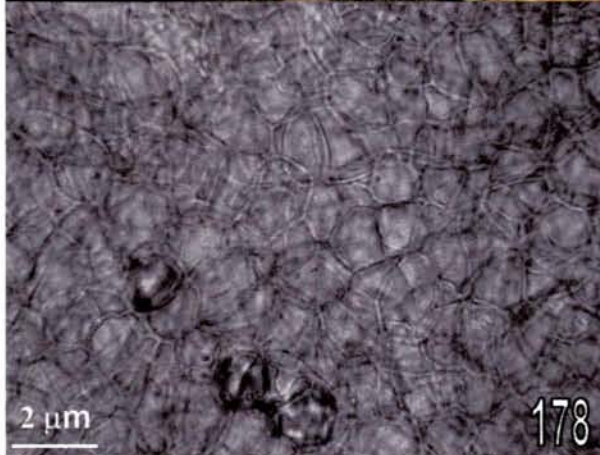
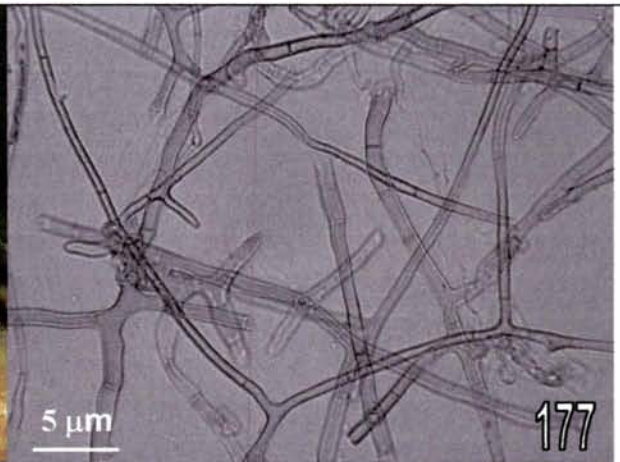


***Tomentella* sp. IV**

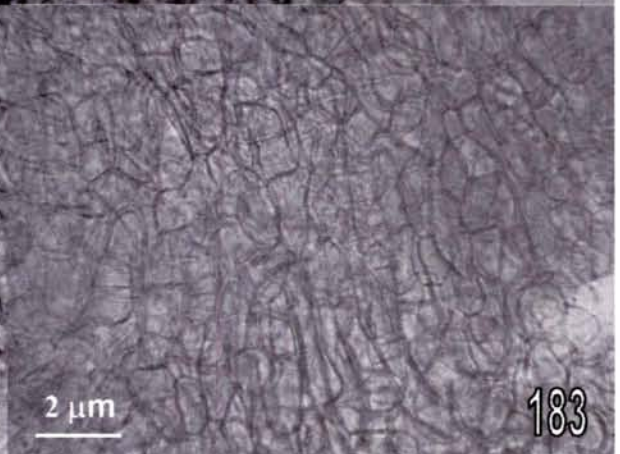
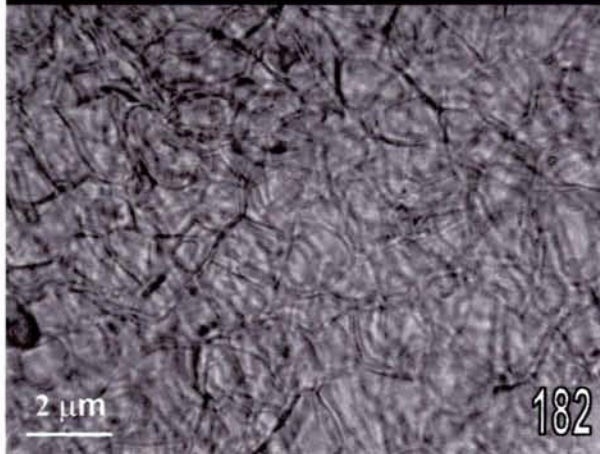
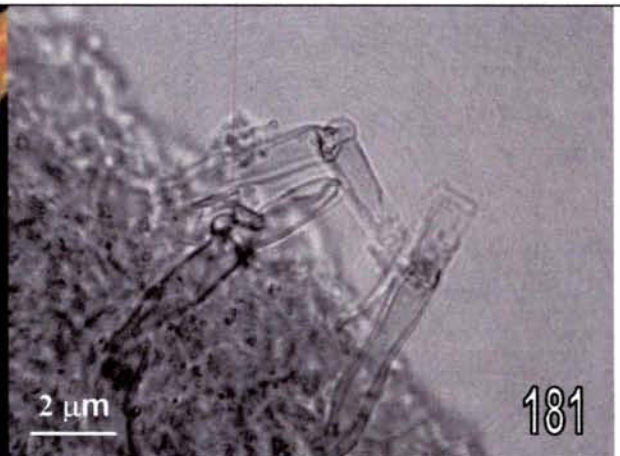




**Theleporaceae I**

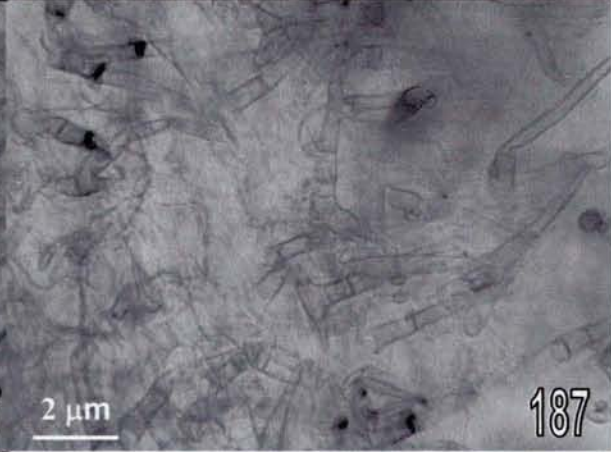
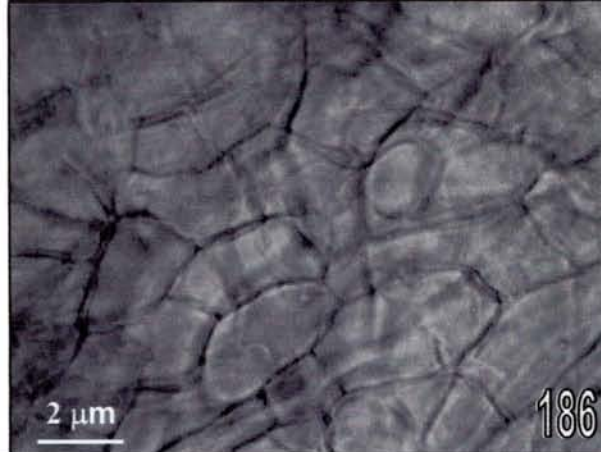
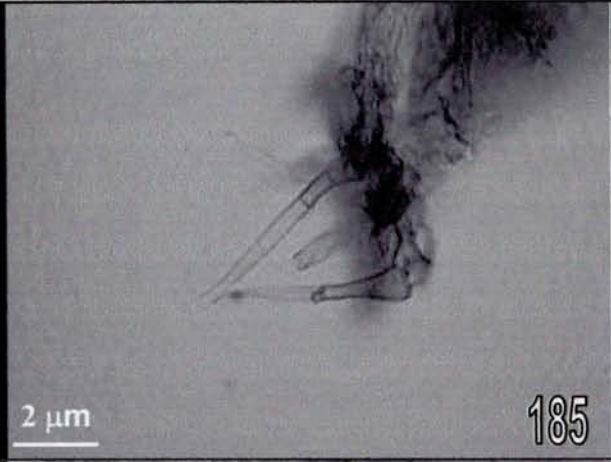


**Theleporaceae II**

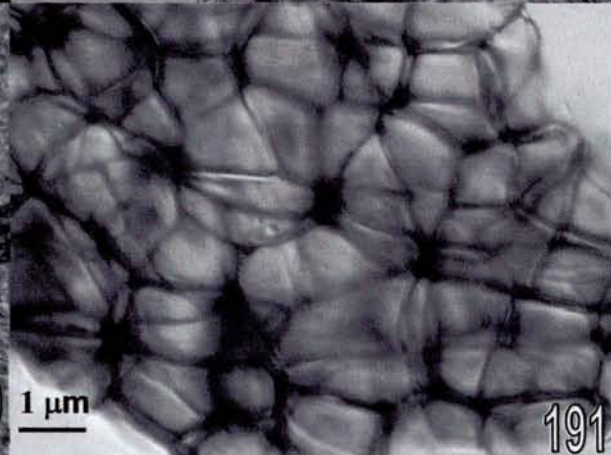
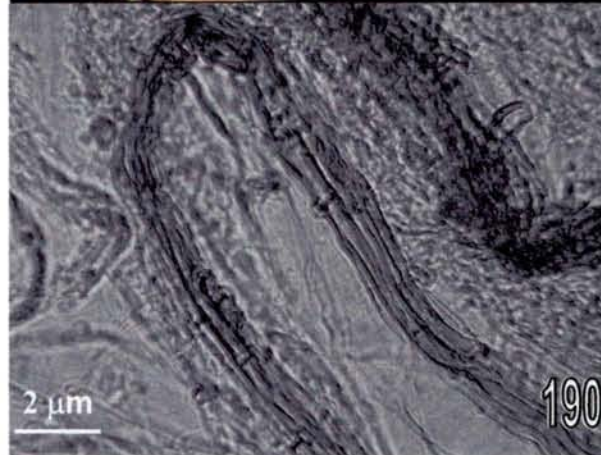
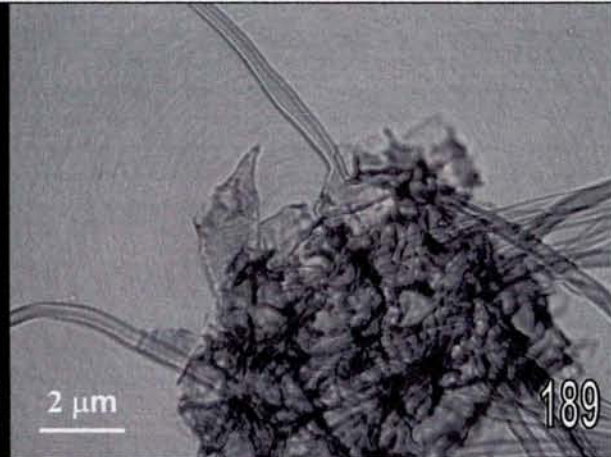




**Telephoraceae III**

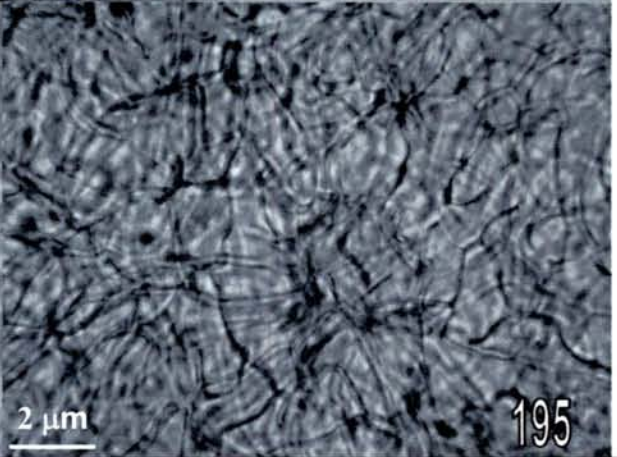
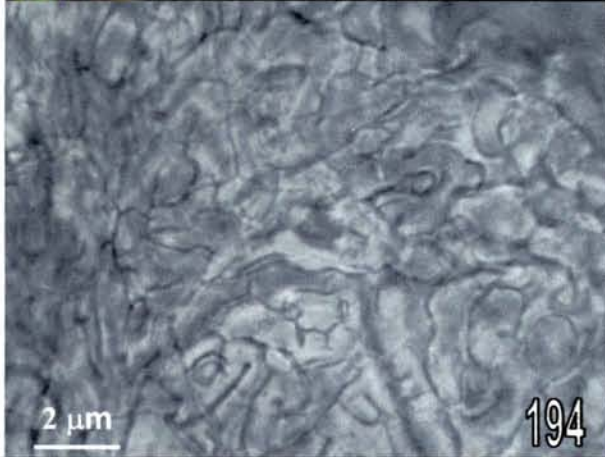
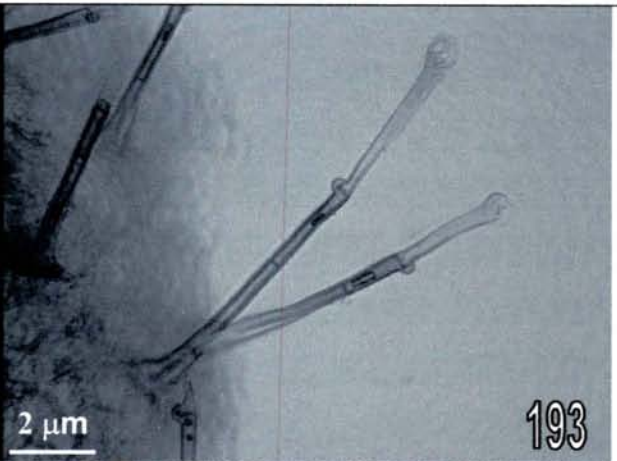
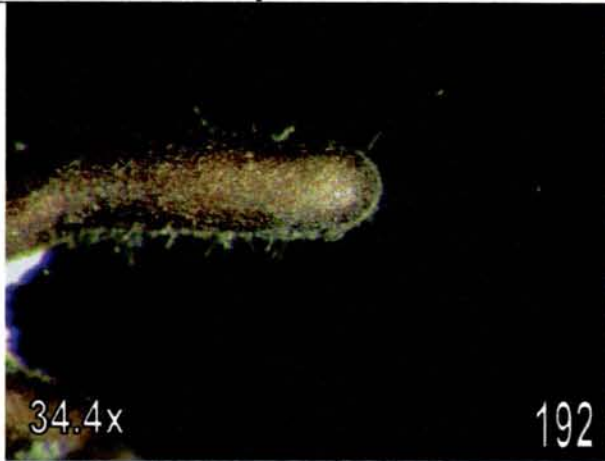


**Telephoraceae IV**

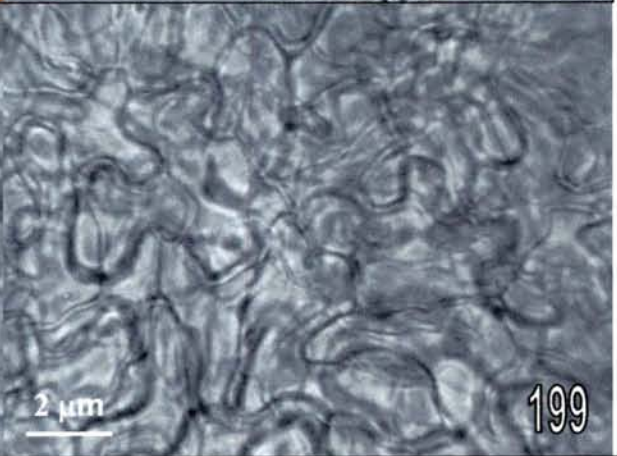
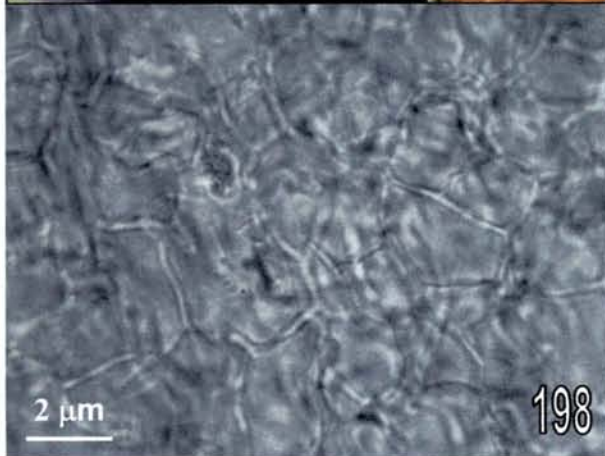
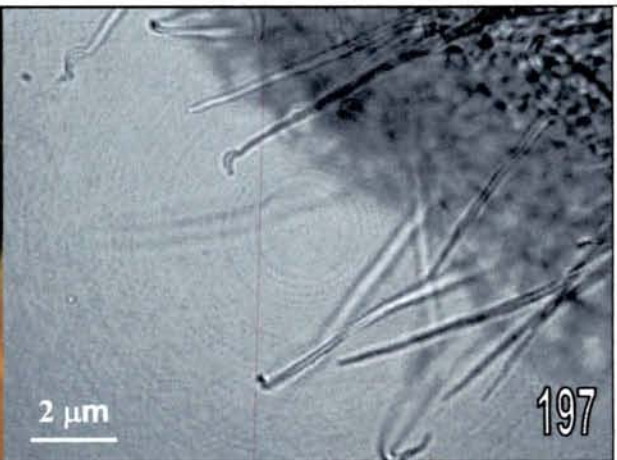
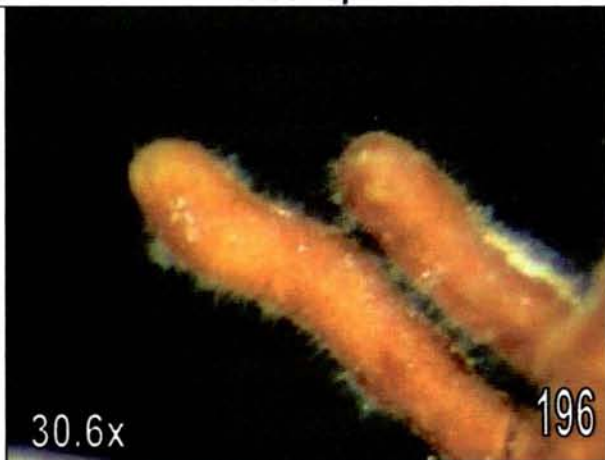




**Theleporaceae V**

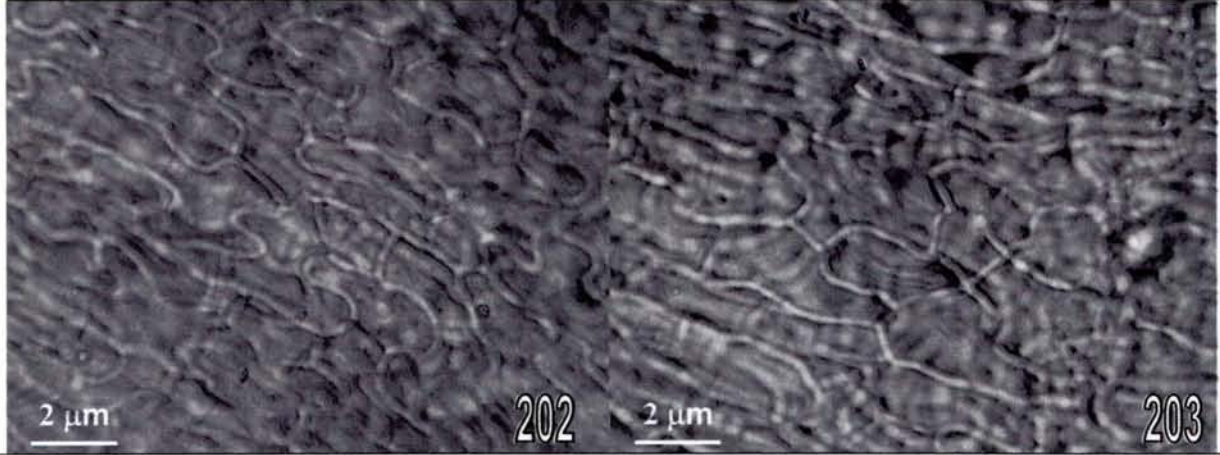
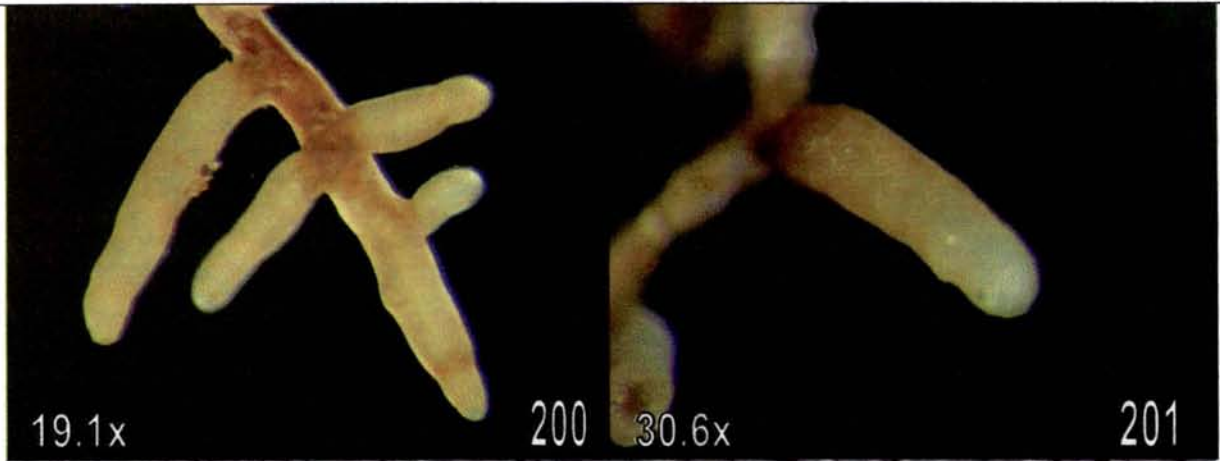


***Tuber* sp. I**

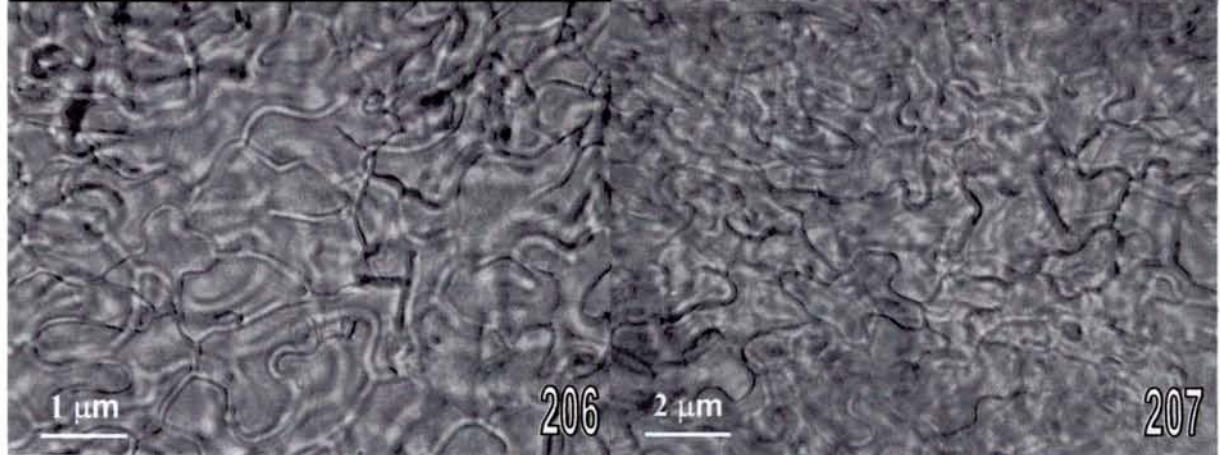
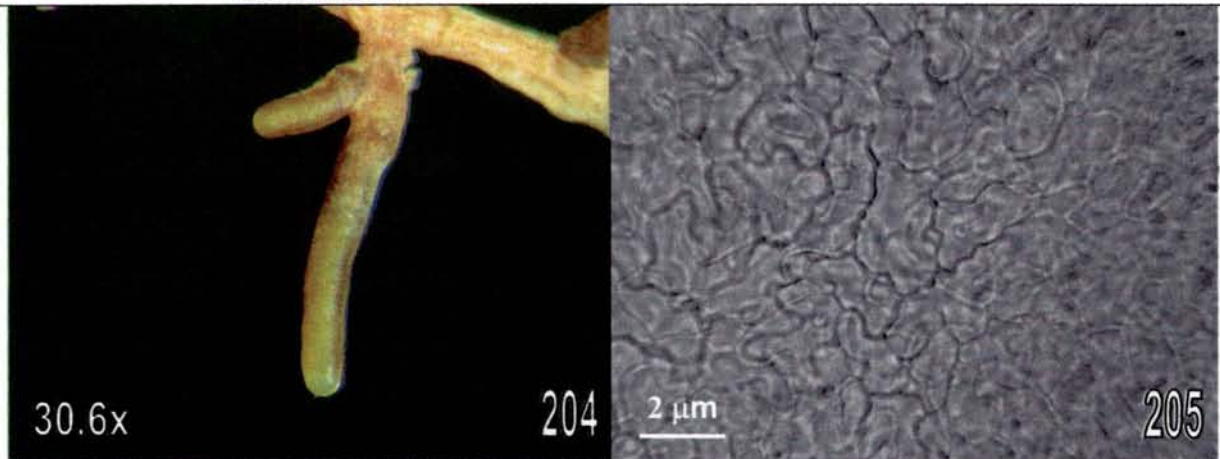




**Tuberales I**



**Tuberales II**







Mademoiselle MOSCA Elena

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ, NANCY 1  
en BIOLOGIE FORESTIERE

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER N°1364

Nancy, le 20 avril 2007

Le Président de l'Université



J.P. FINANCE



## Résumé

Le dépérissement des chênes est souvent associé à la réduction de la biomasse des racines fines et à une modification significative de la structure de la communauté ectomycorhizienne. Le présent travail a concerné l'effet d'un traitement d'éclaircie sur le statut ectomycorhizien de chênes dépérissants. Seize arbres dominants ont été choisis comme représentatifs de deux classes de dépérissement: modéré et sévère. L'effet de l'éclaircie a été évalué saisonnièrement grâce aux caractères suivants: vitalité et mycorhization des apex racinaires, structure spécifique et fonctionnelle de la communauté ectomycorhizienne, activités enzymatiques potentielles de trois anatomotypes dominants et dynamique de descripteurs de la morphologie racinaire. Que ce soit avant ou après l'éclaircie, les arbres plus dépérissants ont présenté la plus faible vitalité des racines fines et la plus faible colonisation ectomycorhizienne. Chez les arbres éclaircis, ces variables ont diminué avec le temps. 64 anatomotypes d'ectomycorhize ont été répertoriés, avec des abondances relatives dépendant de la classe de dépérissement et du traitement sylvicole. La structure de la communauté a été analysée en termes de capacité des ectomycorhizes à explorer le sol. Les anatomotypes appartenant au type d'exploration à grande distance ont surtout été trouvés sur les racines des arbres les plus dépérissants et éclaircis. *Clavulina cinerea*, *Tomentella sublilacina* et *Russula* sp étaient dominants dans tous les traitements. Les activités enzymatiques secrétées potentielles de ces anatomotypes ont été mesurées au cours de l'hiver et du printemps 2006. Les valeurs mesurées en hiver étaient plus élevées que celles mesurées au printemps. La dynamique de quatre descripteurs de la morphologie racinaire variait en fonction de la date de prélèvement. Ce travail confirme que la vitalité des racines et leur statut ectomycorhizien fournissent de précieuses indications permettant de préciser l'état de santé des arbres.

Mots clés: ectomycorrhizes, dépérissement des chênes, éclaircie, *Quercus robur*, communauté, structure, type d'exploration, profil enzymatique, dynamique des racines fines.

## Abstract

Oak decline is often associated with a reduced biomass of fine roots, and a significant change in the ectomycorrhizal community composition. The present study addressed the effect of a thinning treatment on the ectomycorrhizal status of declining oak trees. Sixteen dominant oak trees of similar dimensions were chosen to represent two contrasting decline classes (moderate and severe decline). The thinning effect was seasonally evaluated on the following characters: root tip vitality and mycorrhization, ectomycorrhizal community structure and functionality, potential enzymatic activity of three dominant anatomotypes, dynamics of root descriptors. Both before and after thinning, trees belonging to the severely declining class showed lower vitality and mycorrhization than the other class. These variables decreased along time in the thinned trees. 64 ectomycorrhizal anatomotypes were recorded, with relative abundances depending on tree decline status and silvicultural treatment. The community structure was also evaluated in terms of ability of the ectomycorrhizae to explore the soil. The anatomotypes belonging to the "long-distance" exploration type were recorded firstly in the severely declining thinned trees. *Clavulina cinerea*, *Tomentella sublilacina* and *Russula* sp were dominant in all treatments. The potential secreted enzymatic activities of the dominant anatomotypes were measured in winter and spring 2006. In general, the values measured in winter were higher than in spring. The dynamics of four fine root descriptors changed according to sampling date. This research confirms that root vitality and mycorrhization provides several indications able to evaluate the tree health status.

Key words: ectomycorrhizae, oak decline, thinning, *Quercus robur*, community structure, exploration type, enzymatic profile, fine root dynamics.