

**Università degli Studi di Napoli “Federico II”**



**Dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale**

**Tesi di Dottorato**

**in**

**Biologia Applicata**

**XXVI Ciclo**

**Applicazione al suolo di un potenziale erbicida  
naturale, la cumarina: effetti su piante  
graminacee e sulla comunità edafica**

**Tutor**

**Prof.ssa Flora Angela Rutigliano**

**Candidato**

**dott. Saverio De Crescenzo**

**Anno accademico 2013/2014**

## INDICE

<b>RIASSUNTO</b>	<b>3</b>
<b>CAPITOLO 1 – INTRODUZIONE</b>	<b>6</b>
<b>1.1 Premessa</b>	<b>6</b>
<b>1.2 Controllo delle infestanti in agricoltura</b>	<b>7</b>
<b>1.3 Effetti degli erbicidi di sintesi su organismi non bersaglio</b>	<b>9</b>
<b>1.4 Metaboliti secondari</b>	<b>12</b>
<b>1.4.1 Le cumarine</b>	<b>17</b>
<b>1.5 Comunità biotica del suolo</b>	<b>22</b>
<b>CAPITOLO 2 - OBIETTIVO DELLA RICERCA</b>	<b>27</b>
<b>CAPITOLO 3 – ESPERIMENTO N.1</b>	<b>28</b>
<b>3.1 Suolo utilizzato per l’esperienza</b>	<b>28</b>
<b>3.2 Disegno sperimentale</b>	<b>28</b>
<b>3.3 Analisi sulle piante</b>	<b>31</b>
<b>3.4 Analisi sul suolo</b>	<b>31</b>
<b>3.4.1 Tenore idrico</b>	<b>31</b>
<b>3.4.2 Capacità idrica di campo</b>	<b>32</b>
<b>3.4.3 Bulk density</b>	<b>33</b>
<b>3.4.4 Porosità</b>	<b>33</b>
<b>3.4.5 pH</b>	<b>33</b>
<b>3.4.6 Conducibilità elettrica</b>	<b>34</b>
<b>3.4.7 Carbonio organico</b>	<b>34</b>
<b>3.4.8 Azoto ammoniacale e nitrico</b>	<b>35</b>
<b>3.4.9 Biomassa microbica e carbonio organico estraibile</b>	<b>35</b>
<b>3.4.10 Micelio fungino</b>	<b>38</b>
<b>3.4.11 Respirazione potenziale</b>	<b>38</b>
<b>3.4.12 Mineralizzazione dell’azoto</b>	<b>39</b>
<b>3.4.13 Nitrificazione e nitrificazione potenziale</b>	<b>40</b>
<b>3.4.14 Attività <math>\beta</math>-glucosamminidasica</b>	<b>41</b>

<b>3.4.15</b>	<b>Indice di Qualità Biologica del suolo (QBS-ar)</b>	<b>43</b>
<b>3.5</b>	<b>Analisi statistica</b>	<b>45</b>
<b>3.6</b>	<b>Risultati e Discussione</b>	<b>46</b>
<b>3.6.1</b>	Caratteristiche del suolo usato per l'esperimento	<b>46</b>
<b>3.6.2</b>	Effetto della cumarina sulle piante	<b>47</b>
<b>3.6.3</b>	Effetto della cumarina sul suolo	<b>52</b>
<b>CAPITOLO 4 - ESPERIMENTO N. 2</b>		<b>61</b>
<b>4.1</b>	<b>Disegno sperimentale</b>	<b>61</b>
<b>4.2</b>	<b>Analisi sulle piante</b>	<b>63</b>
<b>4.3</b>	<b>Analisi sul suolo</b>	<b>63</b>
<b>4.3.1</b>	Diversità genetica delle comunità batterica e fungina	<b>63</b>
<b>4.4</b>	<b>Elaborazione dei dati</b>	<b>74</b>
<b>4.5</b>	<b>Risultati e Discussione</b>	<b>76</b>
<b>4.5.1</b>	Caratteristiche del suolo utilizzato per l'esperimento	<b>76</b>
<b>4.5.2</b>	Effetto della cumarina sulle piante	<b>77</b>
<b>4.5.3</b>	Effetto della cumarina sul suolo	<b>88</b>
<b>CAPITOLO 5 CONCLUSIONI</b>		<b>99</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>		<b>101</b>

## RIASSUNTO

Nei sistemi ad agricoltura intensiva si rende indispensabile l'uso di pesticidi di sintesi per eliminare erbe infestanti (che sottraggono spazio e risorse alle piante coltivate), erbivori (che si nutrono delle parti più nutrienti delle piante) e parassiti (che causano malattie alle piante coltivate). Tuttavia l'impiego di prodotti chimici sintetici in agricoltura può avere effetti negativi sull'uomo e sull'ambiente. La ricerca in campo agronomico sta cercando soluzioni alternative a tali prodotti, in linea con la Direttiva 2009\218\EC, che promuove un uso sostenibile dei pesticidi (inclusi gli erbicidi), riducendone i rischi e gli impatti derivanti dal loro utilizzo sulla salute umana e sull'ambiente. Un'interessante alternativa ai pesticidi di sintesi è rappresentata dai metaboliti secondari, prodotti sia dalle piante che da altri organismi. Si tratta di molecole non coinvolte nei processi metabolici principali, che spesso intervengono in numerose interazioni biotiche, quali meccanismi di competizione intra e/o interspecifica, erbivoria, etc. I metaboliti secondari possono quindi rappresentare per la pianta un valido meccanismo di difesa contro aggressioni esterne, quali erbivoria e parassitismo, provocando, per esempio, effetti tossici negli erbivori che li ingeriscono. L'azione difensiva può essere indirizzata anche verso altri organismi vegetali, consentendo alla pianta produttrice di divenire la specie dominante di una comunità vegetale, impedendo la proliferazione di altre specie. La cumarina (1,2-benzopirone) è un metabolita secondario isolato da diverse piante, tra cui la pianta stenomediterranea *Melilotus neapolitana*, di cui è stato dimostrato un effetto negativo contro piante coesistenti (Esposito et al., 2008) e piante infestanti (Pergo et al., 2008; Haig et al., 2009) e che pertanto può rappresentare un'interessante alternativa agli erbicidi tradizionali. Tuttavia la diffusione in campo di sostanze alternative agli erbicidi di sintesi, seppure naturali, richiede una sperimentazione preliminare per comprendere quali potrebbero essere i loro effetti non solo sull'infestante, ma anche su organismi non bersaglio, quali piante non infestanti e gli organismi del suolo, che svolgono un ruolo chiave nel riciclo dei nutrienti. In letteratura sono disponibili solo pochi studi (Luo et al., 2007) sugli effetti di tale sostanza sulla comunità edafica.

Obiettivo di questa ricerca è stato quello di valutare, attraverso uno studio su suolo, gli effetti della cumarina su piante graminacee e sulla comunità edafica. A tale scopo sono stati condotti due esperimenti.

Nel primo esperimento è stato studiato l'effetto di quantità crescenti di cumarina (0, 50, 100 e 150 mg kg<sup>-1</sup>) sulla emergenza e la crescita (in termini di lunghezza e peso della

radice e del germoglio) di una pianta infestante, l'avena (*Avena fatua*), una pianta coltivata, il grano (*Triticum durum* Desf. varietà Ofanto), una pianta coesistente di *Melilotus neapolitana*, la gramigna stellata (*Triticum ovatum*) e la comunità edafica. L'effetto della cumarina sulla comunità edafica è stato determinato valutando, a diversi tempi di esposizione (14 e 28 giorni), diversi parametri microbici (biomassa microbica, micelio fungino, respirazione potenziale, mineralizzazione dell'azoto, nitrificazione, attività N-acetil- $\beta$ -D-glucosamminidasi) e l'indice di qualità biologica del suolo (QBS-ar), che si basa sulle caratteristiche dei microartropodi del suolo. Sono stati anche determinati alcuni parametri chimici del suolo (pH, conducibilità elettrica, contenuto in carbonio organico estraibile, azoto ammoniacale e nitrico).

Sulla base dei risultati del primo esperimento, che hanno mostrato un lieve effetto negativo della cumarina sull'avena e un effetto positivo sul grano e nessun effetto negativo persistente sulla comunità edafica, è stato pianificato il secondo esperimento che ha avuto lo scopo di verificare l'effetto della cumarina in un intervallo più ampio di concentrazioni (0, 100, 200, 300 mg kg<sup>-1</sup>) e di capire quale fosse l'effetto della cumarina sia in monocoltura di grano o avena sia in condizioni di coesistenza delle due piante. L'ipotesi che abbiamo voluto verificare è se l'effetto positivo della cumarina sul grano potesse rendere quest'ultimo un migliore competitore nei confronti dell'avena, con conseguenze negative sulla crescita di questa infestante. A tale scopo semi di avena e semi di grano sono stati fatti germinare in piastre Petri e poi trasferiti in vasetti contenenti suolo indisturbato, sia in condizione di coltura pura che in condizioni di coltura mista, a due diverse densità di semi per vasetto (5 o 10). Il disegno sperimentale ha incluso 5 condizioni di crescita delle piante: 1) monocoltura di avena (5 semi per vasetto); 2) monocoltura di grano (10 semi per vasetto); 3) monocoltura di grano (5 semi per vasetto), 4) monocoltura di grano (10 semi per vasetto); 5) coltura mista di grano e avena (5 semi di avena + 5 semi di grano per vasetto). Inoltre è stata allestita un'ulteriore serie di vasetti contenenti suolo senza piante (utilizzata solo per le analisi sul suolo). Durante il periodo di incubazione (un mese) è stata valutata la lunghezza del germoglio delle piante di avena e grano, con cadenza settimanale. Al termine dell'incubazione è stata determinata la mortalità delle piante, la crescita in termini di lunghezza e peso del germoglio, della radice e dell'intera pianta, nonché, sui campioni di suolo (nei vasetti con coltura mista e nei vasetti senza piante) i parametri microbici e chimici già determinati nel primo esperimento, il QBS-ar e la diversità genetica delle comunità batterica e fungina del suolo.

Dai risultati è emerso un debole effetto allelopatico della cumarina su avena e un effetto positivo su grano nell'intervallo 100-150 mg kg<sup>-1</sup>, a dosi maggiori la cumarina ha un effetto negativo su avena più marcato, ma inibisce anche la crescita del grano. Nell'intervallo di concentrazioni di 100-150 mg kg<sup>-1</sup> la cumarina non ha prodotto generalmente effetti negativi sulla microflora edafica né ha alterato significativamente l'indice di qualità biologica del suolo. Pertanto tale dose di cumarina potrebbe essere considerata per un'eventuale applicazione in campo, sebbene altri studi siano necessari per aumentare l'efficacia della cumarina contro avena.

# CAPITOLO 1

## INTRODUZIONE

### 1.1 - Premessa

Nei sistemi agricoli accanto alle piante coltivate possono essere presenti anche numerose specie vegetali infestanti, dette “malerbe”, non seminate dall’uomo, che possono arrecare danni alle specie coltivate, riducendone la produttività. La pulitura del terreno, l’aratura e la fertilizzazione sono pratiche che favoriscono sia le piante coltivate che numerose altre piante. Alcune di queste, presenti nell’ambiente naturale a basse densità di popolazione, per effetto di condizioni ambientali non particolarmente favorevoli, possono diventare infestanti quando le condizioni create nel sistema agricolo ne stimolano la riproduzione e la crescita. Un esempio di infestante è *Avena fatua*, specie ubiquitaria nelle colture di cereali, diffusa in Europa, Nord America e Asia.

Le piante infestanti hanno in comune alcune caratteristiche: producono molti semi longevi, crescono rapidamente, vengono fecondate dal vento o da insetti non specializzati o sono in grado di autofecondarsi, sono capaci di efficiente propagazione vegetativa, sono difficili da sradicare, formano intrecci e talvolta soffocano le altre piante (Chrispeels e Sadava, 1994).

La facilità con cui le malerbe possono interagire, e in alcuni casi ibridarsi alle piante coltivate, è spesso da ascrivere ad affinità genetiche con le piante coltivate con cui coesistono. Gli effetti negativi che le specie infestanti possono esercitare sulle colture si distinguono in diretti e indiretti; quelli diretti si manifestano attraverso l’inibizione della germinazione delle piante coltivate, quelli indiretti si manifestano attraverso la competizione per luce, acqua e nutrienti. Nel delicato equilibrio della coltivazione di un terreno, le infestanti, da un lato, costituiscono un problema specialmente perché dotate di efficienti meccanismi di riproduzione e disseminazione (Chrispeels e Sadava, 1994), dall’altro svolgono un ruolo utile al ciclo vitale delle piante coltivate perché impediscono l’estinzione d’insetti impollinatori. Per bilanciare questi due opposti effetti è necessaria una buona gestione delle infestanti, indispensabile per evitare la riduzione della resa e un peggioramento qualitativo delle colture. Tale gestione può affiancare pratiche colturali adeguate all’uso di sostanze naturali ad azione erbicida, come alcuni metaboliti secondari di origine vegetale. Tra questi, la cumarina, prodotta da diverse specie vegetali, ha

dimostrato una buona attività erbicida in studi di laboratorio. Tuttavia affinché le molecole naturali, ad azione erbicida, possano sostituire gli erbicidi sintetici è necessario escluderne eventuali effetti negativi, sia diretti che indiretti, su organismi non bersaglio con ruoli importanti nel funzionamento degli ecosistemi, quali produttori e decompositori.

## **1.2- Controllo delle infestanti in agricoltura**

Il metodo più antico per l'eliminazione delle infestanti è quello manuale, successivamente sono stati impiegati strumenti meccanici. Inoltre nell'agricoltura "taglia e brucia", praticata nelle regioni tropicali, l'incendio degli alberi tagliati, oltre ad arricchire il terreno di nutrienti, lo libera dal detrito organico e dalle infestanti (Smith e Smith, 2007). Nell'agricoltura industrializzata, ampiamente praticata in Europa, Nord America, Russia, in alcune zone del Sud America e in Australia, le infestanti vengono eliminate principalmente mediante prodotti chimici, meglio noti come diserbanti. Attualmente gli erbicidi rappresentano uno dei principali mezzi di lotta contro le malerbe e un terzo dei prodotti chimici usati in agricoltura a livello mondiale (Fig. 1.1). L'idea di utilizzare prodotti chimici per il controllo delle erbe infestanti ed eradicare agenti patogeni è assai antica, già in Omero si trovano accenni all'uso dello zolfo per il controllo degli artropodi e già anticamente i cinesi conoscevano le proprietà insetticide dei prodotti arsenicati. Dalla metà del XX secolo in poi, la ricerca si è orientata verso erbicidi capaci di inibire l'emergenza delle piante infestanti (Dolara, 1997). L'uso diffuso di erbicidi di sintesi sta determinando l'insorgenza della resistenza nelle infestanti, oltre che una crescente preoccupazione sull'impatto di tali sostanze sulla salute dell'uomo e sull'ambiente (Vyvyan, 2002).

La preoccupazione dei possibili effetti negativi che gli erbicidi e in generale i pesticidi possono avere sulla salute dell'uomo e sull'ambiente ha portato all'emanazione della Direttiva 2009/218/EC con la quale viene sollecitato un uso sostenibile dei pesticidi (inclusi gli erbicidi) riducendone i rischi e gli impatti derivanti dal loro utilizzo sulla salute umana e sull'ambiente. Gli erbicidi sono composti chimici che uccidono le piante sia in modo selettivo che non selettivo. Gli erbicidi non selettivi uccidono tutte le piante, alcuni di questi sono definiti da pre-emergenza, vengono cioè usati per uccidere le malerbe prima di una nuova coltura. Gli erbicidi selettivi per essere utili devono uccidere le infestanti senza intaccare le colture, essi uccidono infestanti specifiche o proteggono



culture specifiche. Tuttavia non esiste una specificità estrema, gli erbicidi colpiscono anche le piante coltivate riducendone la resa.

L'impiego di agenti chimici, se da una parte risolve il problema delle infestanti più radicalmente, dall'altra crea un forte inquinamento delle acque superficiali e sotterranee dovuto al loro impiego in dosi elevate, mettendo così in serio pericolo la salute dell'uomo per il loro elevato livello di bioaccumulo.

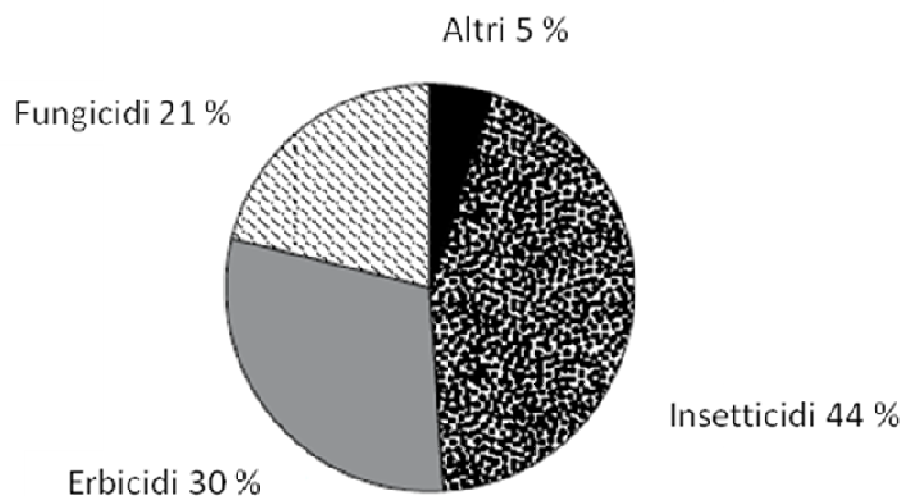


Fig. 1.1 – Uso di pesticidi nel mondo (da Aktar et al., 2009, modificato)

Le infestanti possono anche essere efficacemente controllate da idonee pratiche agricole e opportune coltivazioni come (Chrispeels e Sadava, 1996):

- Rotazione delle colture: numerosi tipi di agenti infestanti prosperano solo su piante specifiche o su gruppi di piante e quindi tenderanno ad aumentare se la stessa coltura viene piantata nello stesso campo anno dopo anno. Colture diverse richiedono pratiche agricole differenti e riducono la probabilità che la popolazione di piante infestanti possa aumentare.
- Sarchiatura: è il metodo più antico di controllo delle erbe infestanti ed è ancora ampiamente utilizzato non solo nei paesi in via di sviluppo, ma anche nei paesi a tecnologia avanzata. Si tratta di una lavorazione del terreno che consiste nel taglio o nel rimescolamento dello strato superficiale del terreno che può essere realizzato con la

zappa o con la sarchiatrice. Questa lavorazione oltre a favorire la respirazione delle radici, distrugge le malerbe.

- Aumento della densità delle piante coltivate: diminuendo la distanza tra le file della coltura, una volta che la copertura vegetale si è chiusa e che lo spazio tra le file risulta ombreggiato, le piante infestanti non possono più svilupparsi. Campi di piante coltivate diradati favoriscono in genere una grande popolazione di erbacce, l'intercoltura le può ridurre.

Un'altra interessante alternativa agli erbicidi ed ai pesticidi di sintesi, è rappresentata dai metaboliti secondari, prodotti sia dalle piante che da altri organismi. Si tratta di molecole non coinvolte nei processi metabolici principali, che spesso intervengono in numerose interazioni biotiche, quali meccanismi di competizione intra e interspecifica.

### **1.3 - Effetti degli erbicidi di sintesi su organismi non bersaglio**

Gli agricoltori definiscono le piante infestanti piante che competono con quelle coltivate e che ne diminuiscono la resa. Nonostante tutti i tentativi messi in atto per controllarle, le erbe infestanti riducono la produttività delle colture per un valore stimato intorno al 12 % (Chrispeels e Sadava, 1996). L'impiego di erbicidi, così come l'uso di altri prodotti chimici, quali pesticidi, insetticidi, fungicidi, rodenticidi, se da un lato ha l'effetto positivo di proteggere le culture agrarie dagli organismi nocivi, dall'altro si riflette negativamente sulla salute umana e sull'ambiente (aria, acqua, suolo, flora e fauna). I gruppi di popolazione umana più esposti ai pesticidi sono gli operai addetti alla produzione, gli agricoltori che li impiegano ed i consumatori di prodotti agricoli. I pesticidi insieme all'acqua sono distribuiti sui campi coltivati attraverso nebulizzatori e per questo si depositano non solo sulle piante e sui frutti destinati all'alimentazione umana, ma anche sul terreno, dal quale possono essere dilavati dall'acqua piovana e raggiungere le falde acquifere, i fiumi, i laghi o il mare (Fig. 1.2). Penetrando nel suolo, possono inoltre provocare danni sia alla vegetazione sia agli animali. Piccole quantità di pesticidi immesse nell'ambiente possono raggiungere, in organismi di livelli trofici superiori, tra cui l'uomo, concentrazioni così elevate da risultare tossiche. Molti sono composti chimici volatili che si spostano nell'aria, sia come gas sia legati a gocce d'acqua o a particelle di polvere.

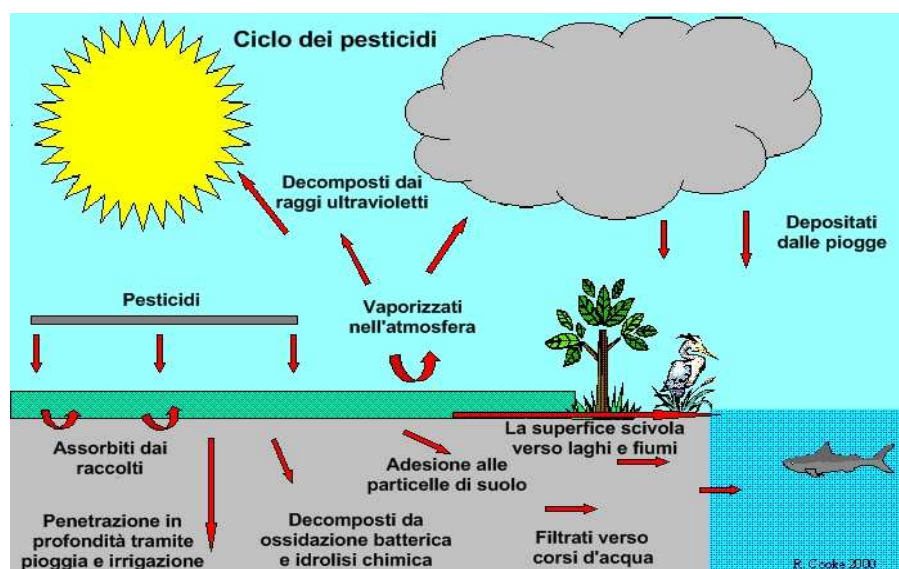


Fig.1.2 - Ciclo dei pesticidi (<http://scienzaalute.blogosfere.it>)

La maggior parte degli erbicidi non ha un'azione selettiva contro le piante bersaglio, pertanto possibili effetti nocivi possono manifestarsi anche su specie non bersaglio e questi possono determinare anche una perdita di biodiversità. In diversi studi è stato riscontrato che l'applicazione di erbicidi può avere effetti negativi su organismi che svolgono un ruolo fondamentale per il corretto funzionamento degli ecosistemi, quali decompositori, N-fissatori e impollinatori. In seguito all'applicazione degli erbicidi glifosato e acido 2,4-diclorofenossiacetico (2,4-D) è stata osservata un'alterazione della struttura della comunità batterica (Lupwayi et al., 2009). L'applicazione di diversi erbicidi (monolinuron, simazina, tridifano, nitrapirina) ha causato una riduzione della nitrificazione (Tu, 1996). Negli N-fissatori è stata evidenziata una riduzione dell'azoto da parte di *Rhizobium* in diverse leguminose per effetto dell'uso di diversi erbicidi, quali il flumetsulam e il diflufenican (De Filipe et al., 1987; Drew et al., 2007).

Gli effetti esercitati sugli organismi superiori e quindi anche sull'uomo da queste sostanze sono molto complessi. I pesticidi possono essere assorbiti per inalazione, per contatto cutaneo, o attraverso l'apparato digerente. Da alcuni studi risulta che l'impiego eccessivo di erbicidi, come l'acido 2,4-diclorofenossiacetico, utilizzato in tutto il mondo, può provocare, tra gli agricoltori esposti, il linfoma non-Hodgkin e altri tumori (Holland et al., 2002). Gli erbicidi possono avere effetti negativi anche sugli animali, per esempio alcuni studi hanno evidenziato notevoli riduzioni delle popolazioni di starna, uccello diffuso nel Regno Unito, e del fagiano comune negli Stati Uniti (Pimentel et al., 1992).

Il consumo di erbicidi nel periodo compreso tra il 1971 e il 1987 è all'incirca triplicato (Ministero dell'Agricoltura e delle Foreste, 1987). L'Organizzazione Mondiale della Sanità raccomanda di evitare l'uso di erbicidi in aree in cui c'è il rischio di contaminare i corpi idrici utilizzati per uso potabile e raccomanda che coloro che applicano tali sostanze prendano misure appropriate per minimizzare l'esposizione. Dal momento che molti erbicidi possono essere veicolati da un luogo all'altro attraverso i movimenti d'aria, questi sono distribuiti su tutta la Terra e sono presenti in tutti i sistemi idrici naturali. Tra i diversi erbicidi uno in particolare, l'atrazina, è stata bandita in Italia e in altri Paesi Europei dal 1992 (con il decreto del Ministero della Sanità del 18 marzo 1992, n.705\910) per la sua spiccata tendenza ad essere trasportata dalle acque, andando a costituire un inquinante delle falde acquifere in grado di persistere per anni. Attualmente il ricorso all'uso di erbicidi ha registrato un aumento del 9,5%, così come è stato rilevato un aumento degli insetticidi del 2,3%, mentre i pesticidi nocivi sono aumentati dell'81,3% (Dati ISTAT, 2011).

La W.H.O. (World Health Organization) stima che 3,5-5 milioni di persone soffrano di intossicazione acuta da pesticidi, ivi inclusi gli erbicidi, e ogni anno ne muoiano almeno 20.000. L'Unione Europea con lo scopo di migliorare la tutela e la salute dell'ambiente ha adottato dei regolamenti sull'autorizzazione e la vendita dei pesticidi nonché sul loro uso sostenibile e la promozione della difesa integrata per arginare i danni che possono causare. Le normative vigenti sono:

- IL REGOLAMENTO DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO n. 1107\2009 riguardante l'autorizzazione, l'immissione sul mercato, l'impiego e il controllo all'interno della Comunità dei prodotti fitosanitari, così come sono presentati nella loro forma commerciale;
- IL REGOLAMENTO DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO n. 1185\2009, che stabilisce una metodologia armonizzata per rilevare i dati statistici di immissione in commercio e impiego dei prodotti fitosanitari, allo scopo di fornire elementi utili alla definizione di indicatori adeguati per valutare l'andamento delle vendite e dell'utilizzo nei diversi Stati Membri. Le rilevazioni statistiche annuali riguarderanno le quantità delle singole sostanze attive immesse sul mercato, mentre le rilevazioni quinquennali riguarderanno gli usi delle sostanze attive per ciascuna delle culture rilevanti secondo gli obiettivi dei Piani d'azione nazionali. La Commissione Europea predisporrà periodicamente relazioni concernenti la qualità dei dati trasmessi, la metodica di raccolta,

l'onere per le imprese, ma anche l'utilità delle rilevazioni statistiche rispetto agli obiettivi della direttiva sull'uso sostenibile dei pesticidi.

• LA DIRETTIVA n. 2009\128\CE prevede l'adozione di una serie di misure relative a:

- formazione di utilizzatori, venditori e consulenti;
- divieto d'uso del mezzo aereo, tranne che in casi specifici adeguatamente motivati;
- tutela dei corpi idrici applicando misure di mitigazione del rischio;
- riduzione dell'uso di prodotti fitosanitari in aree sensibili e aree naturali;
- corretta effettuazione di manipolazione, stoccaggio, smaltimento e pulizia delle attrezzature;
- sensibilizzazione e informazione della popolazione e dei consumatori.

L'obiettivo della Comunità Europea è, infatti, quello di ottenere una regolamentazione dettagliata che doterà l'Unione Europea di una politica di "protezione integrata" entro il 2014. Nello stesso tempo, anche la ricerca scientifica, sensibile all'esigenza di utilizzare pesticidi più sostenibili, sta incoraggiando i ricercatori a individuare molecole naturali che abbiano un impatto basso o nullo per la salute dell'uomo, e che possano contribuire a controllare gli agenti nocivi in agricoltura.

## **1.4 - Metaboliti secondari**

Con l'espressione "metabolismo vegetale" s'indica l'insieme di reazioni, svolte principalmente ad opera di enzimi, che caratterizzano il ciclo vitale di una pianta. Esso si distingue in metabolismo primario e secondario. Il metabolismo primario riguarda la sintesi, la degradazione e la trasformazione di sostanze necessarie per le funzioni vitali della pianta stessa. È un processo comune a tutte le specie e i composti coinvolti sono detti "metaboliti primari". Il metabolismo secondario invece è caratteristico di alcune specie e porta alla liberazione di composti, noti come "metaboliti secondari", che svolgono funzioni non essenziali per la crescita, lo sviluppo e la riproduzione della pianta, ma svolgono piuttosto un ruolo importante nella difesa contro predatori, o nella competizione nei confronti di altre piante (Alpi et al., 2000). I metaboliti secondari sono caratterizzati da un'enorme variabilità strutturale, alcuni sono dotati di molti centri chirali e di diversi gruppi funzionali che potrebbero essere responsabili della specifica azione

farmacologica, ove presente. Sulla base della struttura chimica, possono essere classificati in quattro classi principali: terpenoidi, steroidi, flavonoidi, alcaloidi (Bourgaud et al., 2001). Questi possono essere rilasciati nell'ambiente esterno mediante: volatilizzazione, lisciviazione, decomposizione ed essudazione (Figura 1.3). La volatilizzazione consiste nella liberazione di composti volatili che possono essere assorbiti dalle piante vicine direttamente dall'atmosfera o dal suolo cui arrivano grazie alla pioggia. La lisciviazione è il processo che porta alla perdita di sostanze dalla parte aerea della pianta per mezzo di nebbia o pioggia. Tra i prodotti liberati in questo modo si trovano amminoacidi, acidi fenolici, alcaloidi e zuccheri. La decomposizione, insieme con la lisciviazione, risulta essere la principale fonte di metaboliti secondari. Tali sostanze rimangono confinate in compartimenti cellulari, come vacuoli o inclusioni e, solo quando questi vengono demoliti, esse si liberano e si convertono in possibili tossine (Macias et al., 2005). L'essudazione avviene attraverso le radici e consiste nella liberazione di sostanze come amminoacidi, carboidrati, enzimi e flavonoidi da piante integre e sane.

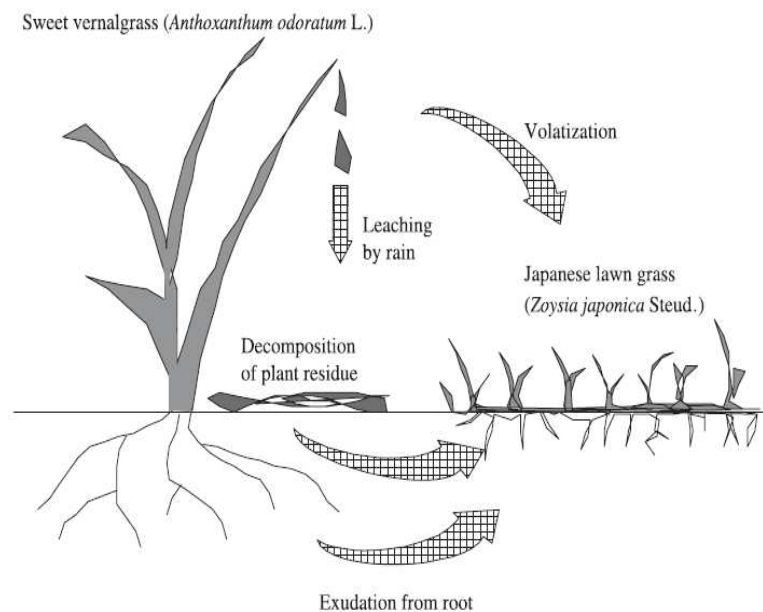


Fig. 1.3 - Liberazione dei metaboliti secondari nell'ambiente esterno (da Yamamoto 2009)

I metaboliti secondari liberati attraverso questi quattro processi sono potenzialmente in grado di svolgere la propria azione sugli altri organismi presenti nell'ambiente circostante e non sull'organismo produttore.

Le piante superiori sono fonte di numerosissimi metaboliti secondari, coinvolti sia in meccanismi di difesa da funghi patogeni, insetti e nematodi sia nella competizione con altri individui della stessa specie o di specie diverse. I metaboliti secondari entrano dunque in gioco in numerose interazioni biotiche (Harborne, 1993): pianta-pianta, pianta-microrganismo, pianta-animale, animale-animale.

Nell'interazione tra piante i metaboliti secondari possono inibire la crescita di piante competitive, ad esempio i terpeni volatili cineola e canfora, prodotti dagli arbusti californiani *Salvia leucophylla* e *Artemisia californica* inibiscono la germinazione di piante erbacee (Odum, 1988). Alcune piante emettono sostanze inefficaci verso le specie normalmente presenti nel loro ambiente di provenienza, ma attive nei confronti delle specie presenti in ambienti in cui esse vengono introdotte, deliberatamente o accidentalmente.

L'interazione pianta-microrganismo si realizza attraverso la produzione di composti detti "fitoalexine", come risposta a microrganismi patogeni. In piante appartenenti alle *Solanacee*, come la patata, in seguito ad un'infezione fungina vengono prodotte fitoalexine come la riscitina (Fig. 1.4; Tomiyana et al., 1968):

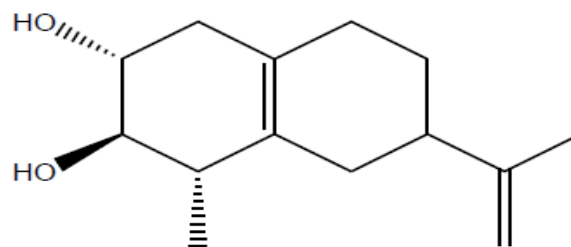


Fig. 1.4 – Riscitina

L'interazione tra piante e animali può avere l'effetto di ridurre l'erbivoria o di attrarre impollinatori e dispersori di semi (Lewinsohn e Gijzen, 2009). I metaboliti secondari possono, per esempio, provocare effetti blandamente irritanti fino ad effetti letali negli organismi erbivori che se ne nutrono.

I metaboliti secondari che entrano in gioco nell'interazione animale-animale possono essere coinvolti nell'interazione tra specie diverse (interazione interspecifica) o nelle interazioni nell'ambito della stessa specie (interazione intraspecifica). Esempi di metaboliti secondari coinvolti nell'interazione interspecifica sono frequenti in organismi marini, i quali sono in grado di secernere composti alogenati o sesquiterpenoidi utilizzati

come meccanismi di difesa contro eventuali predatori. Invece i metaboliti secondari coinvolti nell'interazione intraspecifica, definiti feromoni, sono emessi per attrarre gli insetti nella fase di accoppiamento (feromoni sessuali) oppure vengono emessi in situazioni di pericolo (feromoni di allarme).

Grazie allo sviluppo delle tecniche biochimiche e alla nascita della biologia molecolare è stato chiaramente dimostrato che i metaboliti secondari giocano un ruolo importante anche nell'adattamento delle piante al loro ambiente. Essi possono agire contro condizioni ambientali avverse, per esempio possono assorbire le radiazioni UV, prevenendo danni fogliari.

In questo lavoro di tesi una particolare attenzione è stata rivolta alla produzione di metaboliti secondari da parte delle piante. Questi sono stati descritti come antibiotici, antivirali e antifungini, quindi in grado di proteggere le piante da agenti patogeni ("fitoalexine"), o anche inibire la germinazione o essere tossici per altre piante ("sostanze allelopatiche"). Il termine *allelopatia* fu coniato dal fisiologo vegetale Hans Molish (1937) per indicare le interazioni biochimiche che si verificano tra le specie vegetali, sia direttamente sia mediate da microrganismi del terreno. Successivamente la definizione è stata modificata da Rice (1984) che ha definito l'allelopatia come l'effetto negativo che una pianta, e i microrganismi ad essa associati, esercitano sulla germinazione, sulla crescita e sullo sviluppo di un'altra specie, mediante la produzione e l'immissione nell'ambiente di composti. In genere gli effetti allelopatici provocano una ridotta germinazione, uno sviluppo stentato e una riduzione dell'accrescimento delle plantule e dell'apparato radicale, un minore assorbimento di elementi nutritivi e un rallentamento dell'attività enzimatica e fotosintetica (Kobayashi, 2004). Le sostanze con potenziali effetti allelopatici sono molto numerose (Vyvyan, 2002). Nella maggior parte dei casi i fenomeni allelopatici sono da attribuire ad una miscela di composti, piuttosto che a una singola molecola, che vengono rilasciati nell'atmosfera o nel terreno sia durante la crescita di una pianta sia durante i processi di decomposizione dei suoi residui vegetali (Chou, 1990; Seigler, 1996).

Grazie alle sostanze allelopatiche la pianta produttrice può diventare la specie dominante di una comunità di piante, impedendo la proliferazione di altre specie. L'individuazione di allelochimici che sopprimono o eliminano specie di piante concorrenti sta ricevendo molta attenzione da parte degli studiosi e molti metaboliti secondari sono stati identificati, come ad esempio lo juglone, identificato come 5-idrossi-1,4-naftochinone (Bode, 1958), che deriva dall'ossidazione nel terreno dell'idrojuglone. Il noce produce l'idrojuglone



sottoforma di glicoside non tossico che, quando viene dilavato dalla pioggia, raggiunge il suolo dove si ossida trasformandosi nella forma tossica attiva in grado di inibire, già a basse concentrazioni, la germinazione dei semi e lo sviluppo delle piante (Bode, 1958). Molti altri allelochimici sono stati individuati e si è osservato che, talvolta, l'effetto allelopatico rappresenta il risultato di un'azione sinergica di più composti. È il caso della cumarina, il lattone dell'acido o-idrossicinnamico, che, in presenza di p-idrossibenzaldeide, mostra più spiccata attività fitotossica (Del Morl e Muller, 1970). Di recente particolare attenzione è stata rivolta allo studio fitochimico di specie appartenenti alla vegetazione mediterranea, una fitocenosi caratterizzata da elevata biodiversità specifica e da notevole potenzialità fitochimica, poiché è noto che in ambienti soggetti a frequenti fonti di stress (aridità, salinità, variazione di temperatura) la risposta adattiva delle piante può essere amplificata da un aumento della produzione di allelochimici (Rice 1984). In tale contesto è stato dimostrato che i metaboliti isolati da *Melilotus neapolitana* (Fig. 1.5), specie stenomediterranea, sono in grado di influenzare la germinazione e la crescita di specie coesistenti.



Fig. 1.5 – *Melilotus neapolitana*  
(da [http://digilander.libero.it/felrig/photos/melilotus\\_sulcata.htm](http://digilander.libero.it/felrig/photos/melilotus_sulcata.htm))

Ulteriori studi hanno dimostrato che gli esteri cinnamici, costituenti di molte piante della macchia mediterranea, sono responsabili, anche a basse concentrazioni, di un forte effetto inibente su specie erbacee coesistenti (Fiorentino et al., 2008). Analogamente, i diterpeni neoclerodanici, isolati da *Teucrium chamaeris* e frequenti nel genere *Teucrium*,

esercitano un' apprezzabile attività fitotossica su due specie infestanti, l'*Amaranthus retroflexus* e l'*Avena fatua*, significativamente superiore a quella mostrata su piante erbacee coesistenti (Fiorentino et al., 2009).

Le sostanze allelopatiche possono costituire dei promettenti erbicidi naturali. L'uso delle sostanze di origine vegetale per contrastare le piante infestanti non è una novità. Esempi sono costituiti dalla "pacciamatura", pratica consolidata in cui sono utilizzati residui culturali (Weston e Duke, 2003), o miscele di prodotti organici naturali, come miscela di aceto, estratti di limone, olio e chiodi di garofano (eugenolo), o ancora la farina di glutine di mais, usata come diserbante e anche come fertilizzante.

Negli ultimi anni si sta registrando, soprattutto a livello internazionale, un interesse crescente verso l'applicazione delle sostanze allelopatiche per il controllo delle piante infestanti. La coltivazione di piante che rilasciano, direttamente o dopo l'intervento dei microrganismi del terreno, prodotti allelopatici tossici per le malerbe potrebbe infatti permettere di ridurre la quantità di diserbanti chimici utilizzati in agricoltura, con un probabile aumento della sicurezza sia alimentare che ambientale (Bhowmik e Inderjit, 2003). Inoltre lo studio dell'attività fitotossica delle sostanze di origine naturale può occupare un ruolo importante sia nella ricerca di nuove sostanze attive che per la messa a punto di strategie eco-compatibili per il controllo della flora infestante. In particolare, i principali vantaggi legati a queste sostanze sono la possibilità di individuare nuove strutture chimiche, impossibili o difficili da ottenere per via sintetica, di trovare sostanze con siti e meccanismi d'azione diversi da quelli degli erbicidi di sintesi, l'opportunità di ottenere schemi per la sintesi di nuove molecole ad attività erbicida, la maggiore sicurezza ambientale. Nella maggior parte dei casi, le sostanze di origine naturale non sono, come gli erbicidi di sintesi, degli idrocarburi alogenati, sostanze delle quali è ben nota la pericolosità nei confronti dell'ambiente e dell'uomo (Abbas e Duke, 1997).

Un promettente metabolita secondario ad azione biocida è la cumarina (1,2-benzopirone), prodotta da varie piante, tra cui *Melilotus neapolitana*, che, in saggi di laboratorio condotti su piastra, ha determinato una significativa riduzione della germinazione e della crescita di diverse piante coesistenti (Esposito et al. 2008).

#### **1.4.1 - Le cumarine**

Le cumarine costituiscono un gruppo eterogeneo di sostanze fenoliche con numerose attività, tra le quali attività terapeutiche. Comprendono 1300 metaboliti secondari isolati

principalmente dalle piante, ma anche da funghi e batteri (Hoult, 1996). Tutte le cumarine presenti in natura derivano dalla cumarina (1,2-benzopirone, Fig. 1.6), una sostanza estratta per la prima volta nel 1820 dai semi della *Dipteryx odorata*, una leguminosa tropicale originaria dell’America meridionale, nota come *Coumarouna odorata*, che fornisce la fava tonka ed un tipo di legno (cumarù). Quest’albero era chiamato dagli indigeni “coumarou”, da cui il termine cumarina.

Attualmente le cumarine sono state isolate da più di 700 specie diverse. Le famiglie più ricche di questi composti sono le *Apiaceae* e le *Poaceae*. In particolare, i derivati cumarinici abbondano nell’imperatoria (*Peucedanum ostruthium*), nel panace (*Heracleum spodylium*), nella pastinaca (*Pastinaca sativa*), nella visanga (*Ammi Visanga*), nell’ammi (*Ammi majus*), nell’asperula (*Asperula odorata*) e nell’angelica (*Angelica archangelica*). Essi possono trovarsi in diverse parti della pianta, soprattutto nelle foglie, nei frutti, nei semi e nelle radici. Le cumarine, presenti sia in forma libera sia glicosidica (eterosidi), da un punto di vista biosintetico, derivano dai fenilpropanoidi, prodotti naturali che contengono un gruppo  $C_6H_5-(CH_2)_3$ . Questi derivano a loro volta, da intermedi del metabolismo dell’acido scikimico o dall’introduzione, in opportuni precursori, di residui di acido cinnamico o di amminoacidi fenilalanina e tirosina.

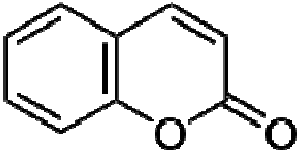
	
<b>Nome IUPAC</b>	
<b>1,2-benzopirone</b>	
<b>Formula bruta o molecolare</b>	<b>C<sub>9</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub></b>
<b>Massa molecolare (u)</b>	<b>146.143</b>
<b>Aspetto</b>	<b>solido cristallino incolore</b>
<b>Numero CAS</b>	<b>[91-64-5]</b>
<b>Densità (g/cm<sup>3</sup>, in c.s.)</b>	<b>0,935</b>
<b>Temperatura di fusione (K)</b>	<b>343 (70 °C)</b>
<b>Temperatura di ebollizione (K)</b>	<b>571 (298 °C)</b>

Fig. 1.6 - La cumarina

Le cumarine possono essere classificate in quattro gruppi in base alla natura chimica di alcuni costituenti o al tipo di molecola con la quale il nucleo fondamentale si lega. Si possono distinguere in base alla loro composizione chimica in: cumarine semplici, idrossicumarine, pirano e furano-cumarine.

➤ **Cumarine semplici**, come la cumarina (Fig. 1.6), presente nelle sommità fiorite del meliloto (*Melilotus officinalis*), che ha mostrato spiccate proprietà flebotoniche ed antiedematose.

➤ **Idrossi-cumarine**, che possono essere o meno metossilate (metossicumarine). I principali rappresentanti di questo gruppo sono l'umbelliferone, l'esculetina, la scopoletina e il dicumarolo (Fig. 1.7). L'umbelliferone si trova nelle parti aeree della pilosella (*Hieracium pilosella*) e nelle resine prodotte da molte *Umbelliferae* come l'assa fetida (*Ferula asa fetida*). Svolge un'attività antibiotica marcata nei confronti di alcuni microrganismi patogeni, soprattutto nei confronti dei germi del genere *Brucella*. Assorbe le radiazioni UV al di sotto di 315 nm (ma non quelle comprese tra 315 e 400 nm che causano l'abbronzatura) e viene utilizzato nella composizione dei filtri solari. L'esculetina è l'aglicone dell'esculina, un glucoside che può essere estratto dalla corteccia e dalle foglie di castagna equina (*Aesculus hippocatanum*). Essa ha proprietà batteriostatiche e antifungine ed è anche potenzialmente utile nel trattamento dell'asma e di alcune malattie infiammatorie grazie alla sua capacità d'inibizione della biosintesi dei prostanoïdi. Come l'umbelliferone, l'esculetina è utilizzata per la produzione di filtri solari. Oltre all'esculetina, si estrae dalla corteccia dell'ippocastano anche l'esculina, considerata un protettivo vascolare. La scopoletina è presente nella corteccia del *Viburnum prunifolium* e del *Viburnum opulus*. Alla scopoletina vengono attribuite proprietà antispastiche e, a concentrazioni elevate, può avere effetti tossici. Il dicumarolo o dicumarina è il dimero della 4-idrossicumarina. Pur essendo estraibile da alcune leguminose come il meliloto (*Melilotus officinalis*) e il trifoglio (*Trifolium pratense*), oggi si ottiene soprattutto per sintesi industriale. Il dicumarolo è un potente agente anticoagulante utilizzato in medicina per la prevenzione della trombosi. È il precursore dei medicinali anticoagulanti della famiglia della warfarina.

➤ **Pirano-cumarine**, se il nucleo della cumarina si unisce con quello del pirano. Le piranocumarine, come la visnadina presente nei frutti dell'*Ammi visanga*, sono dotate di un'accentuata azione antispasmodica sulla muscolatura liscia dell'utero, delle vie biliari, delle vie respiratorie; antispasmodica e vasodilatatrice dei vasi coronarici. Inducono fotosensibilizzazione come le furano-cumarine.

➤ **Furano-cumarine**, se il nucleo della cumarina risulta condensato con quello del furano. Due cumarine tipiche del Bergamotto, bergaptene e psoralene, e più in generale le altre 6,7-furano-cumarine come la xantossina, possiedono una marcata azione fotosensibilizzante, esaltano l'azione cutanea dei raggi ultravioletti, in particolare di quelli responsabili dell'abbronzatura, a causa di una minore estensione del sistema coniugato di elettroni nel gruppo cromoforo. Pertanto le droghe contenenti elevate percentuali di questi composti sono controindicate in caso di esposizione alla luce solare per il rischio di ustioni e di melanomi. Vengono per questo impiegate nella cosiddetta terapia fotodinamica, utilizzata per stimolare la pigmentazione cutanea nella vitiligine ed in misura minore nella psoriasi e nell'alopecia areata. Questa pratica consiste nell'applicazione topica di preparati cumarinici fotosensibilizzanti, seguita dall'esposizione alle radiazioni UVA (320-400 nm).

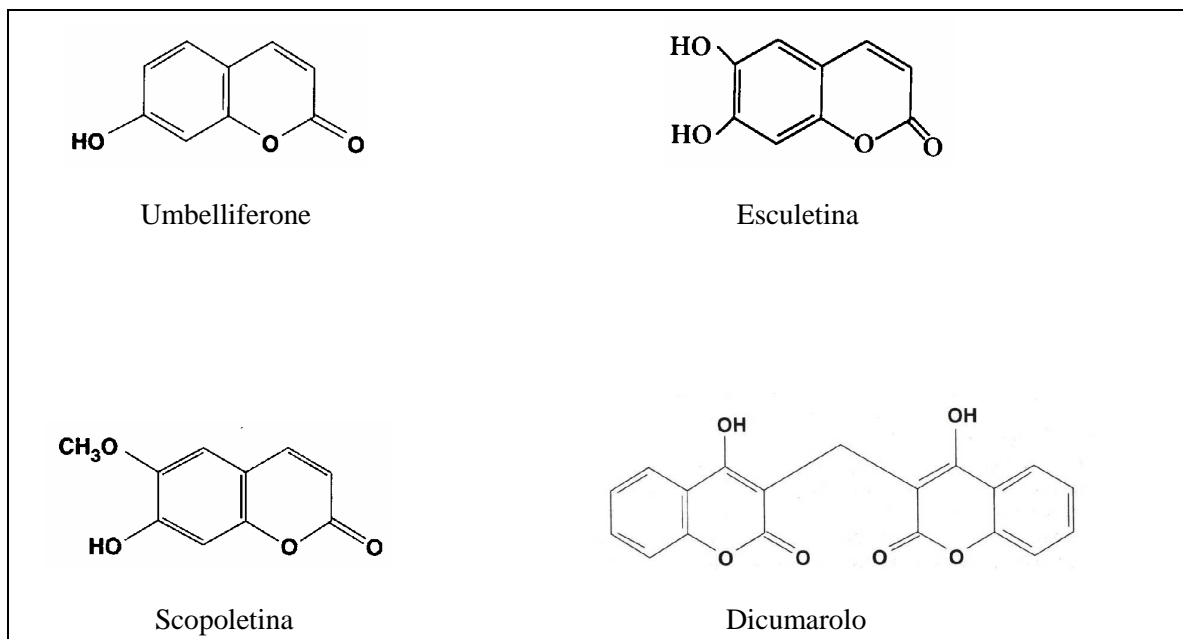


Fig. 1.7 - Alcune cumarine

Le cumarine hanno dimostrato di possedere numerose attività terapeutiche, come si è già accennato e come di seguito riportato:

➤ **Azione flebotonica.** È propria delle sostanze in grado di aumentare il tono venoso, come l'esculina e la cumarina. L'esculina diminuisce la permeabilità dei capillari e aumenta la resistenza, migliorando la funzionalità delle vie vascolari anche grazie a proprietà antiflogistiche. L'azione antiedematosa della cumarina è stata dimostrata in

diversi modelli di animali (Rombi, 1993); non a caso viene suggerita in associazione ai flavonoidi, nel trattamento e nella profilassi dell'insufficienza venosa e delle sue manifestazioni.

➤ **Azione antibatterica.** Per esempio l'umbelliferone svolge una potente azione antibiotica, soprattutto nei confronti della brucella (Rombi, 1993; Spignoli et al., 1999) e l'esculetina, aglicone dell'esculina, ha un'azione batteriostatica e antifungina (Ricciuti, 2004). Uno studio del 1998 ha dimostrato che esculetina, umbelliferone e scopoletina inibiscono la crescita di *Escherichia coli* in condizioni sia aerobie che anerobie (Duncan et al., 1998).

➤ **Azione spasmolitica.** È associata a diverse cumarine, tra cui la scopoletina, con azione antispastica e ipotensiva, e le cumarine contenute nell'olio essenziale estratto dalla radice dell'angelica (*Angelica archangelica*), che esplicano una significativa azione spasmolitica (Ricciuti, 2004). In particolare l'angelicina ha un'azione rilassante muscolare, anticonvulsione e sedativa in diverse specie di animali, sia introdotta per via orale che per via intraperitoneale (Chandhoke e Ghatak, 1975). L'arcanglicina e i suoi derivati hanno potenti effetti vasodilatatori coronarici per inibizione della fosfodiesterasi (Lemmich et al., 1983).

➤ **Azione antiossidante.** È stato dimostrato che la scopoletina è l'agente responsabile dell'azione antiossidante di un estratto di *Sinomonium acutum* nei confronti del radicale ed anione superossido (Shaw et al., 2003).

➤ **Azione antivirale.** Alcune cumarine inibiscono il ciclo di replicazione dell'HIV a diversi livelli (Yu et al., 2003). In particolare, le 3-fenilcumarine sarebbero in grado di inibire in misura significativa l'attività di promozione della trascrizione dell'HIV (Uschiumi et al, 2003).

➤ **Azione anticoagulante** associata al dicumarolo. Alla fine del XIX secolo gli allevatori dell'America settentrionale introdussero il *Trifolium pratense* nei loro pascoli; si manifestò ben presto un'epidemia emorragica tra il bestiame, che solo qualche anno più tardi si scoprì essere legata all'utilizzo di questo nuovo foraggio. Durante l'essiccazione del trifoglio, infatti, la cumarina subisce una serie di trasformazioni chimiche, in parte spontanee e in parte mediate da funghi del genere *Aspergillus*, che portano alla formazione di dicumarolo. Questa sostanza interferisce con il processo di coagulazione del sangue, bloccando la sintesi di alcuni fattori della coagulazione che sono vitamina k-dipendenti. Un suo derivato, il warfarin, viene attualmente utilizzato come anticoagulante orale nella terapia della trombosi venosa profonda e come profilassi dell'embolia

polmonare e dell'infarto cardiaco in pazienti con fibrillazione atriale o portatori di valvole cardiache artificiali.

I derivati della cumarina sono stati utilizzati anche in ambito industriale, come aromatizzanti nella produzione di profumi e del tabacco. In passato venivano adoperati per edulcorare bevande alcoliche come il rum, ma attualmente l'uso nell'industria alimentare è stato eliminato soprattutto a causa della loro epatotossicità, del potenziale cancerogeno e dell'interazione con molti farmaci.

La cumarina (1,2-benzopirone) può trovare impiego anche in agricoltura come potenziale erbicida. Infatti, essa è risultata attiva contro piante infestanti, quali *Bidens pilosa* (Pergo et al. 2008), molto diffusa in Brasile, e *Lolium rigidum* (Haig et al., 2009), la maggiore infestante delle colture di grano in Australia. L'applicazione in campo di tale sostanza richiede ancora un'approfondita sperimentazione che possa escluderne effetti tossici verso organismi non bersaglio, tra i quali i microrganismi del suolo e la pedofauna che garantiscono il funzionamento degli ecosistemi terrestri, grazie al loro ruolo fondamentale nel riciclo dei nutrienti.

## 1.5 – Comunità biotica del suolo

Il suolo, che costituisce lo strato più superficiale della crosta terrestre, ospita una ricca e diversificata comunità biotica, rappresentata da pedofauna e microflora (Fig. 1.8), oltre che dalle radici delle piante.

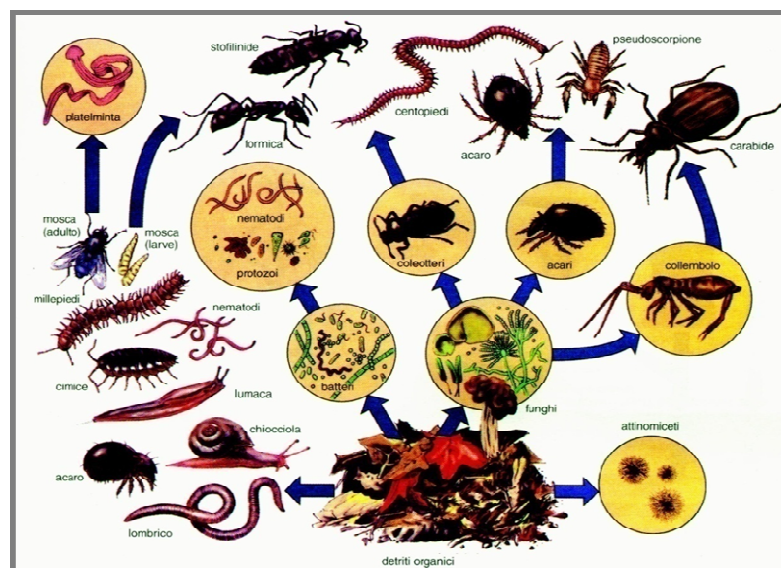


Fig. 1.8 – Comunità biotica del suolo (Miller e Levine, 2010)

La pedofauna o fauna del suolo include l'insieme di organismi animali che compiono per intero o per un periodo più o meno cospicuo il loro ciclo vitale nel terreno. Essa svolge un ruolo fondamentale per le funzioni del suolo, in quanto coadiuva la microflora edifica nella decomposizione della sostanza organica morta e nel ciclo dei nutrienti; inoltre influenza la porosità, e quindi l'aerazione del suolo, ma anche l'infiltrazione e la distribuzione della materia organica lungo il profilo del suolo (Bird et al., 2004; Menta et al., 2011).

La pedofauna è costituita da una molteplicità di organismi che dal punto di vista funzionale vengono classificati non solo in base ai classici criteri tassonomici, ma anche in base al ruolo ecologico svolto nel suolo.

Secondo la classificazione ecologica (Jacot, 1940) nel suolo possiamo distinguere i geofili inattivi, cioè gli organismi che non contribuiscono alla formazione del suolo in quanto soggiornano nel suolo unicamente per svernare o subire diapausa, dai geofili attivi, cioè quegli organismi, come i Ditteri e i Coleotteri, le cui larve vivono nel suolo. Esiste poi una terza categoria di organismi, i geofiti, che comprendono specie, come Acari, Collemboli e Pseudoscorpioni, che trascorrono la loro intera esistenza nel suolo.

Ma la pedofauna del suolo può essere classificata anche in base alle dimensioni del corpo (Swift et al., 1979) in microfauna, mesofauna e macrofauna e megafauna.

La microfauna (dimensioni  $< 0,1$  mm) comprende un vasto gruppo di Protozoi e Nematodi, e in misura minore anche Rotiferi e Tardigradi. I Nematodi hanno un impatto significativo sulle popolazioni microbiche e sulle radici, molti Nematodi sono infatti parassiti degli apparati radicali delle piante, ma una parte assai più cospicua conduce vita libera e si nutre di minuscoli detriti, di succhi cellulari oppure predando altri organismi. I Protozoi sono organismi eucarioti unicellulari eterotrofi privi di parete cellulare. Sono rappresentati da flagellati, amebe, ciliati e testacei (Louiser e Bamforth, 1990). Essi presentano tutte le forme conosciute di eterotrofismo. Parecchie specie conducono vita libera e si nutrono di microflora; alcune sono saprofiti ed altre possono essere parassite, commensali o predatrici di animali, piante, o di altri Protozoi, compresi talvolta i membri della stessa specie (forme cannibali).

La mesofauna (dimensioni comprese tra 0,1 e 2 mm) include gli Anellidi Enchitreidi, i Proturi e molte tipologie di microartropodi. Gli Anellidi Enchitreidi si nutrono di spore e ife fungine, oltre che di detrito vegetale. I Proturi sono fungivori ed assumono i fluidi delle ife, comprese quelle delle micorrize. Tra i microartropodi, Acari e Collemboli sono i maggiori rappresentanti della mesofauna del suolo; tra questi due gruppi si instaurano



rapporti molto complessi. Alcuni Acari sono carnivori e quindi predatori anche dei Collemboli; altri, tra i quali gli Oribatei, sono in competizione con i Collemboli. In questi ultimi anni sono stati compiuti studi approfonditi che hanno preso in considerazione le preferenze alimentari di singole specie di Acari e Collemboli; i risultati hanno evidenziato un'alta frequenza dell'onnivorismo (Lupetti et al., 1989). Altri studi (Van Amelsvoort et al., 1988) hanno messo in evidenza, inoltre, che le specie più grandi di Collemboli vivono in suoli con pori più larghi, in cui c'è un'abbondanza di ife fungine e in cui la sostanza organica è relativamente "giovane". Si tratta di specie abituate a vivere in suoli caratterizzati da un'elevata velocità di decomposizione; al contrario le specie più piccole occupano suoli a tessitura più fine, dove la crescita fungina è ridotta e la sostanza organica è relativamente "vecchia", quindi dove la velocità di decomposizione è bassa. Ne consegue che le specie che raggiungono taglie maggiori possono cibarsi delle più nutrienti ife fungine, mentre le più piccole ingeriscono humus e particelle minerali per cibarsi dei batteri in essi presenti. Il contributo alla mineralizzazione appare pertanto diverso; per le specie piccole è molto modesto, al contrario, le specie di maggiori dimensioni stimolano anche la crescita dei funghi e provocano quindi un alto tasso di mineralizzazione della sostanza organica.

La macrofauna (dimensioni comprese tra 2 e 20 mm) e la megafauna (>20 mm) includono un vasto gruppo di Anellidi Lombricidi, di Molluschi e altri macroartropodi tra i quali gli Isopodi, i Millepiedi, gli Scorpioni e i Ragni. Gli animali più noti e più significativi della fauna del suolo sono i Lombrichi. Numerosi studi hanno confermato l'importanza dei Lombrichi come agenti biologici nella formazione del suolo, nella decomposizione della lettiera e nella ridistribuzione di materiale organico nel suolo (Edwards & Lofty, 1977; Lee, 1985; Hendrix, 1995). L'abbondanza e la biomassa dei Lombrichi fa di essi una componente importante della comunità biotica del suolo; alcuni studi hanno stabilito che la biomassa di un lombrico si avvicina alla biomassa dei funghi risultando pari a 16 g di carbonio per metro cubo (Hendrix et al., 1987).

La microflora edafica, che rappresenta la parte più cospicua della biomassa del terreno (escludendo le radici delle piante), è costituita da un numero elevatissimo di specie ed include batteri, funghi, alghe e virus (Lavelle e Spain, 2001).

I batteri sono organismi procarioti. Essi costituiscono il gruppo più abbondante dei microrganismi del suolo in termini di numero di individui e di specie. Un grammo di suolo può contenere fino a 10.000 specie batteriche (Turco e Sadowsky, 1995). I batteri possono essere classificati in diversi modi. In funzione delle risorse energetiche utilizzate,

essi si dividono in fotoautotrofi (in grado di utilizzare l'energia solare), chemioautotrofi (capaci di sfruttare l'energia chimica di alcune reazioni esotermiche) e eterotrofi (che traggono energia dalla decomposizione della sostanza organica). Alcuni batteri possono vivere solo in presenza di ossigeno, e quindi sono chiamati aerobi, altri solo in assenza di ossigeno (anaerobi), altri ancora possono vivere sia in presenza di ossigeno che in sua assenza (anaerobi facoltativi). I batteri possono essere classificati anche in base alla composizione e alla struttura della loro parete cellulare in Gram positivi e Gram negativi. La distribuzione dei batteri è funzione della disponibilità di nutrienti, della tessitura e della struttura del suolo.

Dopo i batteri, i funghi sono gli organismi del suolo numericamente più abbondanti. I funghi sono organismi eucarioti provvisti di pareti cellulari rigide, sono microscopici e crescono formando lunghi filamenti all'interno del suolo. Questi filamenti dello spessore di pochi micrometri sono chiamati "ife". Tutti i funghi sono eterotrofi e si nutrono mediante l'assorbimento di molecole organiche disciolte. Alcuni funghi sono decompositori, cioè in grado di degradare macromolecole complesse, trasformandole in molecole più semplici. Tra i generi maggiormente rappresentati e attivi nel terreno vi sono: *Mucor*, *Pythium*, *Fusarium*, *Tricoderma*, *Penicillium* (produttori di antibiotici), *Aspergillus* (demolitori dei tannini).

Sia i cianobatteri che le alghe eucariotiche sono fototrofi, ma a maggiori profondità esistono anche alghe capaci di crescere sia autotroficamente che eterotroficamente (alghe verdi e diatomee). Essi hanno un ruolo ecologico chiave come colonizzatori primari delle superficie nude, come suoli vulcanici e versanti rocciosi, esposte alle radiazioni solari, in modo particolare quando vivono in associazioni simbiotiche con funghi a formare licheni. I virus sono entità infettive che si comportano da parassiti strettamente obbligati in quanto sono capaci di vivere e replicarsi solo all'interno della cellula ospite. Essi vengono classificati in base all'ospite che infettano, e si distinguono virus animali, vegetali e virus batterici chiamati anche batteriofagi (Madigan e Martinko, 2003).

Tra i microrganismi del suolo sono rappresentate dunque tutte le modalità per ottenere energia (Madigan e Martinko, 2003): dai composti chimici di natura organica (eterotrofi), da quelli di natura inorganica (chemioautotrofi) o dal sole (fotoautotrofi). Le diverse esigenze nutrizionali e le diverse modalità di utilizzo dei substrati organici e dei nutrienti come donatori e accettori finali di elettroni spiegano la grande biodiversità caratteristica del suolo.

La microflora edafica svolge funzioni fondamentali per il funzionamento dell'ecosistema. In particolare essa ha un ruolo importante nel processo di decomposizione della sostanza organica morta, che libera i nutrienti indispensabili per la crescita delle piante, ma è anche in grado di degradare inquinanti di origine antropica, riducendo il pericolo di contaminazione delle falde acquifere e dei corpi idrici che ricevono le acque liscivate dai suoli.

I microrganismi rilasciano nel suolo enzimi in grado di catalizzare le reazioni di ossidoriduzione di una varietà di molecole differenti, alcuni dei quali sono caratterizzati da un'ampia specificità di substrato (Gibson e Yeh, 1973). L'attività degli enzimi nel suolo è la somma dell'attività degli enzimi prodotti dalle cellule proliferanti, degli enzimi presenti in cellule morte, ma ancora attivi e degli enzimi accumulati nel suolo e stabilizzati dall'interazione con le particelle di argilla e humus. Attraverso la produzione di enzimi i microrganismi sono in grado di demolire la sostanza organica morta liberando i nutrienti in forma minerale. Solo batteri e funghi posseggono complessivamente il corredo enzimatico necessario a degradare tutte le molecole organiche naturali. Tuttavia un ruolo importante nella decomposizione della sostanza organica, sebbene indiretto, è svolto dalla pedofauna. Questa coadiuva l'attività microbica in diversi modi: tritutando corpi di animali e piante morti o parti di questi in modo da aumentare la superficie esposta all'attacco microbico, disgregando e lisando i tessuti animali e vegetali che così diventano più suscettibili all'attacco microbico, rimescolando la sostanza organica negli strati superficiali del suolo.

La comunità edafica può essere minacciata dall'immissione di inquinanti nel suolo, tra i quali vanno annoverati anche i composti chimici utilizzati in agricoltura (fertilizzanti e pesticidi), e più in generale dalla degradazione del suolo, che include i processi erosivi, l'inquinamento e le alterazioni fisiche (compattamento, saturazione idrica, etc.). L'esigenza di prevenire e contenere i processi di degradazione del suolo stimola l'attività di ricerca finalizzata a ridurre l'utilizzo di prodotti chimici in agricoltura sostituendoli con prodotti di origine naturale.

## CAPITOLO 2

### OBIETTIVO DELLA RICERCA

Nell'agricoltura meccanizzata per aumentare le rese agricole, e quindi i profitti, si usano sostanze chimiche (come erbicidi, insetticidi, nematocidi, fungicidi etc.), che possono arrecare danni all'ambiente e alla salute dell'uomo. Pertanto recentemente è stata emanata una direttiva comunitaria (Direttiva 2009\218\EC) che promuove un uso sostenibile dei pesticidi (inclusi gli erbicidi), riducendone i rischi e gli impatti derivanti dal loro utilizzo sulla salute umana e sull'ambiente. In tale contesto un ruolo importante potrebbe essere assunto da molecole naturali che possano contribuire a controllare agenti nocivi in agricoltura, incluse le piante infestanti, purché abbiano un impatto basso o nullo sulla salute dell'uomo e sull'ambiente. Interessanti alternative agli erbicidi di sintesi sono rappresentate dai metaboliti secondari prodotti dalle piante che inibiscono la crescita di altre piante (effetto allelopatico). Un promettente metabolita ad azione biocida è la cumarina, prodotta da varie piante, tra cui la pianta stenomediterranea *Melilotus neapolitana*, che, in saggi di laboratorio condotti su piastra, ha determinato una significativa riduzione della germinazione e della crescita di diverse piante (Esposito et al., 2008). La cumarina è risultata essere attiva anche contro piante infestanti (Pergo et al., 2008; Haig et al., 2009). Tuttavia non si può escludere un effetto tossico di tale sostanza su organismi non bersaglio, come le piante coltivate e gli organismi del suolo che svolgono un ruolo chiave nel ciclo dei nutrienti e quindi nel funzionamento degli ecosistemi. Solo pochi studi sono disponibili in letteratura su potenziali effetti di tale sostanza sulla comunità edafica (Luo et al., 2007).

L'obiettivo di questo lavoro di tesi è stato quello di valutare l'effetto della cumarina su una pianta infestante, l'avena (*Avena fatua*), e su organismi non bersaglio (piante non infestanti e organismi del suolo), attraverso saggi di laboratorio condotti su suolo. A tale scopo sono stati realizzati 2 esperimenti.

## **CAPITOLO 3**

### **ESPERIMENTO N.1**

Obiettivo del primo esperimento è stato quello di saggiare l'effetto di quantità crescenti di cumarina (0-150 mg kg<sup>-1</sup>) su tre specie di graminacee (di cui una infestante e due non infestanti) e sulla comunità biotica del suolo. Si è trattato di un esperimento preliminare, dal momento che in letteratura non esistevano studi simili che potessero fornire suggerimenti sulle concentrazioni di cumarina da applicare al suolo, ma solo studi condotti su piastra (Esposito et al., 2008; Ojala et al., 2000).

#### **3.1 – Suolo utilizzato per l'esperimento**

Il suolo da utilizzare per l'esperimento è stato prelevato il 21 Marzo 2011 nel territorio comunale di Maddaloni (CE). Tale territorio (Foglio n°172 “Caserta” della Carta Topografica d'Italia), che occupa la parte orientale del margine Nord-Est della Piana Campana, è delimitato a Nord e ad Est dalle propaggini orientali dei Monti Tifatini, mentre da NW a SE si apre sulla Piana Campana fino ai limiti comunali di Caserta, S. Marco Evangelista, Marcianise, Acerra e S. Maria a Vico. Tutta l'area comunale è compresa tra le quote altimetriche di 40 e 420 m sul livello del mare. Il suolo è stato prelevato in un oliveto, localizzato sul Monte Decoro (150 m s.l.m.) abbandonato da circa cinquant'anni per evitare che il suolo campionato fosse contaminato da trattamenti fitochimici effettuati in precedenza.

Il suolo utilizzato è un Molli-Vitric Andosols (di Gennaro, 2002).

#### **3.2 - Disegno sperimentale**

Per valutare l'effetto della cumarina sulle piante, sono state usate 3 specie vegetali: una pianta infestante, l'avena (*Avena fatua* L.), una pianta coltivata, il grano (*Triticum durum* Desf. varietà Ofanto) e una pianta coesistente di *Melilotus neapolitana*, la gramigna stellata (*Triticum ovatum* L.) (Fig. 3.1). Campioni indisturbati di suolo (prelevati ad una profondità di 0-10 cm) sono stati sistemati in 3 serie di vasetti, in ciascuna delle quali è

stata seminata una specie vegetale considerata, ad una densità di 10 semi per vasetto (Fig. 3.2).



Fig. 3.1 - *Avena fatua* (a sinistra), *Triticum durum* (al centro), *Triticum ovatum* (a destra) (Da [co.wikipedia.org](http://co.wikipedia.org), [biologie.uni-hamburg.de](http://biologie.uni-hamburg.de) e [luirig.altervista.org](http://luirig.altervista.org))



Fig. 3.2 – Vasetti utilizzati per la semina

Immediatamente dopo la semina i vasetti di ciascuna serie sono stati trattati con quantità crescenti di cumarina (0, 50, 100, 150 mg kg<sup>-1</sup>), in 5 repliche per ogni trattamento, per un totale di 60 vasetti. L'aggiunta di cumarina è stata preceduta da una stima del tenore idrico (par. 3.4.1), del peso netto secco di suolo e della capacità idrica di campo (par. 3.4.2) in ogni vasetto al fine di stabilire la quantità di cumarina da aggiungere in ogni vasetto e il volume di acqua da utilizzare per portare il suolo al 60% della capacità idrica di campo. I vasetti sono stati poi incubati per 20 giorni a circa 25 °C e al 60% della

capacità idrica di campo. Ogni tre giorni i vasetti sono stati pesati in modo da aggiungere eventualmente l'acqua perduta per evaporazione. Al termine dell'incubazione è stata valutata la percentuale di germinazione e la crescita di ciascuna specie vegetale.

Parallelamente campioni di suolo indisturbati, prelevati all'interno di microcosmi di 20 x 20 cm (0-10 cm di profondità) (Fig. 3.3) sono stati ugualmente trattati con dosi crescenti di cumarina (0, 50, 100, 150 mg kg<sup>-1</sup>), previa determinazione del tenore idrico, del peso netto secco di suolo e della capacità idrica di campo di ogni microcosmo.



Fig. 3.3 – Prelievo suolo e sistemazione nei contenitori

Dopo l'aggiunta di cumarina i microcosmi sono stati incubati al buio e in condizioni ottimali per la comunità microbica (25°C, 60 % della capacità idrica di campo) per 2 tempi di esposizione (14 e 28 giorni). Ogni tre giorni i microcosmi sono stati pesati in modo da aggiungere eventualmente l'acqua perduta per evaporazione. Preliminarmente 2 microcosmi sono stati utilizzati per la determinazione delle caratteristiche iniziali del suolo. Per ogni trattamento ed ogni tempo di incubazione sono stati utilizzati 2 microcosmi, ciascuno dei quali, dopo l'incubazione, è stato suddiviso in due subcampioni in modo da avere complessivamente 4 repliche per ogni trattamento e ogni tempo di incubazione, per un totale di 32 campioni di suolo (4 trattamenti x 2 tempi x 4 repliche). Trascorso il tempo di incubazione, un'aliquota di suolo è stata utilizzata per la determinazione del QBS-ar (valutato solo dopo 28 giorni), la restante parte è stata setacciata con setacci di plastica (diametro della maglia del setaccio: 2 mm), in modo da eliminare lo scheletro ed eventuali parti vegetali o animali di dimensione superiore a 2 mm. Una parte di suolo setacciato è stata seccata all'aria per la maggior parte delle analisi chimiche, l'altra è stata conservata a 4 °C per le analisi biologiche del suolo e per la determinazione del contenuto in azoto minerale.

### **3.3 – Analisi sulle piante**

Al termine dell'incubazione di ciascuna specie vegetale con dosi crescenti di cumarina, è stato valutato il numero di semi che aveva prodotto plantule (= emergenza) per ciascun vasetto, esprimendo il risultato in percentuale del numero totale di semi aggiunti al suolo. Non è stato possibile, invece, identificare nel terreno i semi che non avevano prodotto plantule per verificare se fossero comunque germinati, attraverso un'analisi microscopica che consentisse di verificare la rottura del tegumento e l'emissione della radichetta. La crescita delle plantule è stata determinata, in termini di lunghezza (cm) e di peso (g), sia sulla radice che sul germoglio.

### **3.4- Analisi sul suolo**

Il suolo utilizzato per l'esperimento è stato preliminarmente analizzato per determinarne il tenore idrico, la capacità idrica di campo, la bulk density, la porosità e il contenuto in carbonio organico. Inoltre sia prima che dopo l'incubazione con cumarina, sul suolo sono stati determinati i seguenti parametri: pH, conducibilità elettrica, contenuto in carbonio organico estraibile, azoto ammoniacale e nitrico, biomassa microbica, micelio fungino, respirazione potenziale, mineralizzazione dell'azoto, nitrificazione, attività N-acetil- $\beta$ -D-glucosamminidasi e indice di qualità biologica del suolo (QBS-ar).

#### **3.4.1. Tenore idrico**

Il tenore idrico, che indica la quantità di acqua contenuta nel suolo al momento del campionamento, è stato ricavato mediante metodo gravimetrico (Allen, 1989). Esso è stato determinato sia sul suolo tal quale (per determinare la quantità di acqua presente nel suolo incubato nei vasetti e poter quindi calcolare la quantità di acqua da utilizzare per preparare le soluzioni di cumarina in modo da portare il suolo al 60 % della capacità idrica di campo) sia su suolo setacciato per riferire ogni misura effettuata al peso secco unitario. In ogni caso quantità note di suolo fresco (setacciato o no) sono state seccate in stufa a 105 °C fino al raggiungimento del peso costante (almeno 48 ore). Dopo questo periodo, i campioni sono stati pesati, previo raffreddamento in un essiccatore con gel di silice, in modo da determinare il peso secco. Per differenza tra il peso netto fresco e il



peso netto secco è stato ricavato il tenore idrico (T.I.), espresso in percentuale di peso secco.

### **3.4.2. Capacità idrica di campo**

La capacità idrica di campo viene definita come la quantità massima di acqua che il suolo riesce a trattenere a saturazione contro la forza di gravità (Florenzano, 1983). L'acqua presente nel suolo è indispensabile per la vita degli organismi (microrganismi e pedofauna) che in esso vivono e per la crescita delle piante; inoltre la sua presenza nei pori del suolo influenza alcune proprietà fisiche del suolo come il grado di compattazione e la resistenza alla penetrazione delle radici. La capacità di campo è stata determinata mediante il metodo gravimetrico. Campioni di suolo fresco tal quale sono stati prelevati dai vasetti mediante carotatori cilindrici in plastica a peso noto. L'estremità inferiore del carotatore è stata chiusa mediante una garza per evitare perdite di campione. I carotatori quindi sono stati posti in un recipiente contenente acqua per tutta la notte per favorire la risalita di acqua per capillarità fino alla superficie. Quindi, dopo aver lasciato percolare l'acqua gravitazionale, è stato determinato il peso a saturazione; successivamente i campioni saturi di acqua sono stati messi in stufa a 105 °C fino al raggiungimento di un peso costante.

La capacità idrica di campo è stata calcolata mediante la formula:

$$\text{CIC (\% p.s.)} = \frac{(\text{peso netto a saturazione} - \text{peso netto secco})}{\text{peso netto secco}} \times 100$$

La capacità idrica di campo è stata anche determinata su terreno setacciato, utilizzando la stessa procedura già descritta, per valutare la quantità di acqua da aggiungere al suolo setacciato per raggiungere il 55 % della saturazione per la determinazione della respirazione del suolo (par. 3.4.11), la mineralizzazione dell'azoto (par. 3.4.12) e la nitrificazione (par. 3.4.13).

### 3.4.3. Bulk density

La bulk density è stata determinata mediante il metodo del carotaggio (Metodo Ufficiale n° II 1.3.1 - Supplemento Ordinario della G.U. n° 248 del 21.10.1999). Campioni indisturbati di suolo sono stati prelevati ad una profondità di circa 10 cm mediante carotatori a volume noto (altezza =10 cm, diametro= 6 cm). I campioni sono stati quindi trasferiti in vaschette di alluminio ed essiccati in stufa a 105°C fino al raggiungimento di un peso costante. La bulk density (BD) è stata determinata mediante l'equazione:

$$BD \text{ (kg p.s. m}^{-3}\text{)} = \frac{\text{Peso netto secco}}{\text{Volume del carotatore}}$$

### 3.4.4. Porosità

La porosità del suolo è stata determinata sulla base della bulk density secondo quanto previsto dal Metodo Ufficiale n° IV.1 - Supplemento Ordinario della G.U. n° 248 del 21.10.1999. Tale metodo prevede il calcolo della porosità (P) attraverso l'equazione:

$$P \text{ (\% p.s.)} = 1 - (BD/2,65) \times 100$$

dove BD è il valore di bulk density, mentre 2,65 è il valore di densità di una particella media di sabbia.

### 3.4.5 - pH

Il pH è stato determinato con il metodo potenziometrico su sospensione di suolo con acqua in un rapporto di 1:2.5, in accordo con il Metodo Ufficiale n. III. 1 del supplemento Ordinario G.U. n° 248 del 21.10.1999. A 10 g di suolo secco sono stati aggiunti 25 ml di acqua distillata; i campioni così preparati sono stati posti in agitazione su uno shaker orbitale per 2 ore. Dopo lasciato sedimentare le soluzioni per 30 minuti, la misura di pH è stata effettuata immergendo l'elettrodo del pH-metro nel surnatante, previa calibrazione con soluzioni a pH noto.

### **3.4.6 – Conducibilità elettrica**

La conducibilità elettrica è stata determinata con metodo piezometrico su estratti acquosi dei campioni di suolo (in rapporto acqua\suolo 1:2), in accordo con il Metodo Ufficiale n. IV.1 del supplemento Ordinario G.U. n°248 del 21.10.1999. La determinazione è stata effettuata trasferendo, in contenitori da 100 ml, 20 g di campione e 100 ml di acqua bidistillata. I campioni sono stati posti in agitazione per due ore e successivamente lasciati a decantare per una notte. Il surnatante è stato, poi, filtrato con filtro di carta Whatman n°42 e sull'estratto è stata effettuata la misura potenziometrica utilizzando un elettrodo specifico in grado di fornire direttamente il valore di conducibilità, espresso in  $\text{dS m}^{-1}$  a 25°C.

### **3.4.7 – Carbonio organico**

La determinazione del contenuto in carbonio organico è stata eseguita con il metodo di Springer-Klee (1954; Metodo Ufficiale n° VII.2 - Supplemento Ordinario della G.U. n° 248 del 21.10.1999), che prevede l'ossidazione per via umida del carbonio organico ad anidride carbonica mediante aggiunta di una soluzione di bicromato di potassio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ), in presenza di acido solforico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). La quantità di bicromato di potassio consumata nella reazione può essere determinata titolando direttamente il bicromato residuo con una soluzione di ferro(II) solfato. La determinazione è stata condotta su 0,5 g di suolo secco polverizzato (mediante mortaio di agata). Ogni campione di suolo è stato inserito all'interno di un provettone da digestore insieme con 20 ml di  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  2 N, 26 ml di  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (96-98%) e solfato di argento. I provettoni, coperti con un tubo refrigerante a ricadere, sono stati posti sulle apposite piastre riscaldanti ad una temperatura di 160 °C per 10 minuti. Per ciascun ciclo di digestione, è stato inserito un bianco, nel quale sono stati posti i reattivi, ma non il campione di suolo. Conclusa la digestione, e dopo avere atteso che i provettoni si fossero raffreddati, il contenuto di ogni provettone è stato trasferito quantitativamente in un matraccio tarato da 200 ml e portato a volume con l'aggiunta di acqua distillata. Dal matraccio sono stati prelevati, mediante una pipetta di precisione, 20 ml di soluzione e versati in una beuta da 250 ml con circa 100 ml di acqua distillata, 8 ml di acido ortofosforico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) 85 %. I campioni sono stati titolati con una soluzione 0,2 N di Ferro(II) solfato eptaidrato, utilizzando come indicatore sodio-4-difenilamminosolfonato ( $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{NaNO}_3\text{S}$ ), fino al viraggio dell'indicatore. Prima di ogni

serie di titolazione è stato verificato il titolo della soluzione titolante, a causa dell'instabilità delle soluzioni contenenti Fe(II) che spontaneamente si ossida a Fe(III) in presenza di ossigeno atmosferico. Il contenuto di carbonio organico, espresso in  $\text{g kg}^{-1}$ , è stato calcolato usando la seguente formula:

$$C = \frac{3 \times (B-A) \times N_{\text{Fe(II)}}}{m}$$

dove:

C = contenuto di carbonio organico ( $\text{g kg}^{-1}$ );

3 = peso equivalente del carbonio;

B = volume della soluzione di ferro(II) solfato utilizzato per la titolazione del bianco (ml);

A = volume della soluzione di ferro(II) solfato utilizzato per la titolazione del campione (ml);

$N_{\text{Fe(II)}}$  = normalità effettiva della soluzione di ferro(II) solfato;

m = massa del campione di suolo (g) presente nel volume di estratto usato per la titolazione.

### **3.4.8 – Azoto ammoniacale e nitrico**

La determinazione dell'azoto ammoniacale e nitrico nel suolo è stata effettuata con metodo potenziometrico (Kandeler, 1995a). Campioni di suolo fresco (20 g) sono stati estratti mediante una soluzione di  $\text{K}_2\text{SO}_4$  0,5 M (rapporto suolo: soluzione di 1:5) e poi filtrati mediante filtri Whatman n° 42. Il contenuto in azoto ammoniacale e nitrico è stato determinato mediante elettrodi specifici, rispettivamente per l'ammoniaca (ORION, Modello 9707) e per il nitrato (ORION, Modello 290A).

Per la calibrazione degli elettrodi sono stati utilizzate soluzioni standard contenenti quantità note e crescenti di ammonio o nitrato (0,1, 1, 10, 100 ppm di  $\text{N-NH}_4^+$  come solfato di ammonio e di  $\text{N-NO}_3^-$  come nitrato di potassio).

### **3.4.9 – Biomassa microbica e Carbonio organico estraibile**

La determinazione della biomassa microbica del suolo, valutata come carbonio microbico ( $C_{\text{mic}}$ ), è stata effettuata con il metodo della fumigazione estrazione (Vance et al., 1987). Il metodo assume che i composti cellulari, liberati in seguito alla lisi cellulare determinata

dalla fumigazione con cloroformio, possono essere estratti mediante una soluzione di  $K_2SO_4$ . La quantità di carbonio presente in questi estratti viene determinata per ossidazione per via umida della sostanza organica (digestione a caldo mediante bicromato di potassio). Per determinare il contenuto di carbonio microbico sono stati preparati due set equivalenti di campioni. Nel primo set di campioni (campioni non fumigati) 5 g di suolo fresco sono stati trattati con 20 ml di una soluzione di  $K_2SO_4$  0,5 M (in rapporto 1:4 suolo/estraente), poi sono stati messi in agitazione per 30 minuti e successivamente filtrati con filtri Watmann n° 42. Nel secondo set di campioni (campioni fumigati) 5 g di suolo fresco sono stati pesati in capsule di vetro sottoposte poi a fumigazione, per 24 ore al buio e a 25 °C, con cloroformio (precedentemente purificato con acido solforico concentrato), utilizzando una campana di vetro (in cui è stato prodotto il vuoto mediante una pompa a membrana). La fumigazione con cloroformio, determina la lisi delle cellule microbiche con il conseguente rilascio del materiale citoplasmatico. Al termine dell'incubazione, il cloroformio è stato completamente allontanato dai pori del terreno attraverso una serie di lavaggi con aria. I campioni fumigati, quindi, sono stati trasferiti quantitativamente in tubi da 50 ml ed estratti mediante la soluzione di  $K_2SO_4$  0,5 M (come descritto per i campioni non fumigati). Per poter determinare il contenuto di carbonio microbico è stato necessario determinare il contenuto di carbonio organico sugli estratti di campioni di suolo fumigati e non fumigati. Tale determinazione è stata effettuata per ossidazione del carbonio organico ad anidride carbonica con soluzione di bicromato di potassio in ambiente acido. In provettoni da digestore, sono stati messi 8 ml di estratto a cui sono stati aggiunti 2 ml di una soluzione 0,4 N di bicromato di potassio ( $K_2Cr_2O_7$ ), una punta di spatola di HgO (in modo da evitare l'interferenza dei cloruri durante la misura) e una punta di spatola di  $Ag_2SO_4$  (che funge da catalizzatore e sequestra i cloruri). Successivamente è stato inserito su ogni provettone il refrigerante a ricaduta sormontato da campanella e sono stati introdotti cautamente 10 ml di soluzione di  $H_2SO_4$  al 98 % e 5 ml di acido fosforico ( $H_3PO_4$ ) all'85%. I provettoni sono stati quindi inseriti nel digestore, precedentemente riscaldato a 160 °C, ed è stato impostato un tempo di digestione pari a 30 minuti. Conclusa la digestione, dopo il raffreddamento, gli estratti sono stati trasferiti quantitativamente in beute da 250 ml sciacquando accuratamente i provettoni con acqua distillata. L'eccesso di bicromato che non ha reagito con il carbonio organico è stato determinato mediante titolazione con ferro(II)solfato eptaidrato 0,04 N, utilizzando un indicatore redox (preparato sciogliendo 0,2 g di sodio-4-difenilammoniosolfonato in 100 ml di  $H_2SO_4$  concentrato) fino al viraggio del colore da

violetto a verde. Contemporaneamente è stata preparata una prova di bianco utilizzando 8 ml di soluzione estraente ( $K_2SO_4$  0,5 M). Per ogni serie di analisi è stato necessario controllare il titolo esatto della soluzione di titolante al momento della misura.

Il contenuto di carbonio organico negli estratti di suolo è stato ricavato dalla formula:

$$C = \frac{3 \times (B-A) \times N_{Fe(II)}}{m}$$

dove:

C = contenuto di carbonio organico ( $g\ kg^{-1}$ ).

3 = peso equivalente del carbonio

B = volume delle soluzione di ferro(II)solfato eptaidrato utilizzato per la titolazione del bianco, espresso in ml

A = volume delle soluzione di ferro(II)solfato eptaidrato utilizzato per la titolazione del campione, espresso in ml

$N_{Fe(II)}$  = normalità effettiva della soluzione di ferro(II)solfato eptaidrato

m = massa del campione di suolo presente nell'estratto utilizzato per la titolazione, espressa in grammi

Il carbonio microbico ( $C_{mic}$ ), espresso in  $mg\ g^{-1}$ , è stato determinato mediante la seguente formula:

$$C_{mic} = (C_{orgF} - C_{orgNF}) \times 2.64$$

dove:

$C_{orgF}$  = contenuto in carbonio organico nel campione fumigato;

$C_{orgNF}$  = contenuto in carbonio organico nel campione non fumigato;

2,64 = fattore di conversione, usato per tenere conto del fatto che il metodo non comporta l'estrazione di tutta la sostanza organica dalle cellule microbiche morte. Esso è stato calcolato sulla base del confronto con il metodo di fumigazione-incubazione (Vance et al., 1987).

Il contenuto in carbonio organico nell'estratto ottenuto dal campione non fumigato corrisponde al carbonio organico estraibile.

### **3.4.10 – Micelio fungino**

Per determinare il micelio fungino totale è stato utilizzato il metodo della conta delle intersezioni delle ife fungine al microscopio ottico (Olson, 1950), previa filtrazione di una sospensione di suolo su filtri a membrana (Sundman e Sivelä, 1978). Il micelio fungino totale comprende sia le ife vive che quelle morte, ma non ancora decomposte. Un'aliquota nota di suolo fresco (1 g di peso fresco) e 100 ml di acqua distillata sono stati omogeneizzati (2 minuti a 6000 rpm) in un mixer. Dalla miscela ottenuta, sono stati prelevati 0,5 ml di sospensione che sono stati filtrati mediante filtri in nitrocellulosa da 0,45  $\mu\text{m}$  di porosità e 25 mm di diametro. I filtri sono stati colorati con una soluzione di blu di anilina in acido lattico e lasciati asciugare. I filtri asciutti sono stati posti su vetrini porta-oggetto, chiarificati con olio da immersione, ricoperti con vetrini copri-oggetto e letti al microscopio ottico ad un ingrandimento di 400X. Nell'oculare del microscopio è stato previamente montato un retino quadrato suddiviso in 20 campi. Sono state contate le intersezioni delle ife fungine con il retino e poi convertite in lunghezza delle ife secondo Olson (1950). Il micelio fungino totale, espresso in mg di peso secco di ife per grammo di peso secco di suolo, è stato calcolato considerando che la sezione media delle ife è pari a  $9.3 \times 10^{-6} \text{ mm}^2$ , che la loro densità è di  $1.1 \text{ g ml}^{-1}$  e che il peso secco di un'ifa è pari al 15% di quello fresco (Berg e Söderström, 1979).

### **3.4.11 - Respirazione potenziale**

La respirazione del suolo costituisce un indice dell'attività metabolica della comunità biotica del suolo; essa è determinata come quantità di  $\text{CO}_2$  prodotta nell'ossidazione della sostanza organica. Il contributo principale alla respirazione del suolo è dato dalla comunità microbica. Infatti è stato stimato (Parker e Dopxtader, 1983) che la microflora edafica è responsabile del 71 % dell'evoluzione di  $\text{CO}_2$  totale dal suolo. Inoltre in questo studio la respirazione del suolo è stata determinata su suolo setacciato, in modo da escludere le radici delle piante e la pedofauna di maggiori dimensioni, pertanto questa misura può essere considerata essenzialmente una stima dell'attività della comunità microbica.

La respirazione è stata determinata mediante la misura della quantità di  $\text{CO}_2$  rilasciata dai campioni di suolo durante un periodo di incubazione di un'ora a 25 °C al buio (Kieft, 1998). Aliquote di suolo fresco corrispondenti a 6 grammi di suolo secco sono stati posti

all'interno di vial da 35,72 ml e pre-incubati per circa 72 ore a 25 °C al buio. Al termine della pre-incubazione, i campioni sono stati portati al 55 % della capacità idrica di campo. Dopo la pre-incubazione e l'aggiunta di acqua i vial sono stati tutti chiusi ermeticamente con tappi di butile sostenuti da ghiere in alluminio e sottoposti a lavaggio con aria standard priva di CO<sub>2</sub> (20 % O<sub>2</sub>, 80 % N<sub>2</sub>) per 2 minuti, facendo fluire il gas proveniente da una bombola mediante un ago in entrata ed uno in uscita inseriti nel tappo di butile. Infine i campioni sono stati incubati per un'ora, al buio a 25 °C. La CO<sub>2</sub> prodotta dopo un'ora d'incubazione è stata misurata prelevando, mediante una siringa, circa 5 ml di gas da ogni vial e iniettandoli nel gas-cromatografo Trace GC Ultra Thermo Scientific, munito di loop da 3 ml. I valori di CO<sub>2</sub> registrati dallo strumento come aree che sottendono i picchi registrati ad un tempo di ritenzione specifica, sono stati convertiti in ppmV, utilizzando la retta di taratura ottenuta iniettando 3 standard a concentrazione nota di CO<sub>2</sub> (350, 5000, 10000 ppmV). I ppmV di CO<sub>2</sub> sono stati convertiti in mg CO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> di suolo h<sup>-1</sup>, mediante la legge dei gas ideali (essendo noto il volume dei vials).

#### **3.4.12 - Mineralizzazione dell'azoto**

La trasformazione dell'azoto organico nella forma inorganica, assimilabile dalle piante, è nota come mineralizzazione dell'azoto. In una prima fase della decomposizione dei composti organici contenenti azoto viene prodotto ammonio (ammonificazione), in una fase successiva (nitrificazione), l' $\text{NH}_4^+$  che è stato prodotto viene ossidato a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e poi il nitrito a il nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ).

La determinazione del tasso di mineralizzazione dell'azoto nel suolo è stata effettuata in condizione aerobiche, come riportato da Kandeler (1995a). Aliquote pari a 20 g di suolo fresco sono state pesate in contenitori di plastica e per ogni campione il tenore idrico è stato portato al 55% della capacità idrica di campo. I contenitori sono stati chiusi con dei tappi forati e i campioni sono stati poi incubati a 25 °C per 28 giorni. Al tempo zero e dopo 28 giorni di incubazione, l'azoto inorganico è stato estratto con una soluzione di K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M (rapporto suolo: soluzione di 1:5), quindi i campioni sono stati filtrati mediante filtri Whatman n° 42. Il contenuto in azoto ammoniacale e nitrico è stato determinato come riportato nel paragrafo 3.4.8.



La mineralizzazione dell'azoto (espressa come  $\mu\text{g N g}^{-1} \text{giorno}^{-1}$ ) è stata calcolata come differenza tra contenuto di N minerale nel suolo (somma di  $\text{N-NH}_4^+$  e  $\text{N-NO}_3^-$ ) dopo 28 giorni di incubazione e contenuto di N minerale al tempo zero.

$$\text{Tasso di mineralizzazione} = \frac{(\text{N-NH}_4^+ + \text{N-NO}_3^-)_A - (\text{N-NH}_4^+ + \text{N-NO}_3^-)_B}{n}$$

dove:

$(\text{N-NH}_4^+ + \text{N-NO}_3^-)_A$  = contenuto di  $\text{N}_{\text{min}}$  nei campioni a fine incubazione, espresso in  $\mu\text{g N g}^{-1}$ ;

$(\text{N-NH}_4^+ + \text{N-NO}_3^-)_B$  = contenuto di  $\text{N}_{\text{min}}$  iniziale ( $t_0$ ) nei campioni, espresso in  $\mu\text{g N g}^{-1}$ ;

$n$  = tempo di incubazione, espresso in giorni.

### 3.4.13 - Nitrificazione e nitrificazione potenziale

La nitrificazione stima la conversione dell'azoto inorganico da una forma ridotta ad una ossidata. Questo processo è in genere operato da batteri aerobi chemioautotrofi: gli ammonio-ossidanti, che ossidano l'ammonio a nitrito (*Nitrosomonas*), e i nitrito-ossidanti, che ossidano il nitrito a nitrato (*Nitrobacter*).

Per la stima della velocità della nitrificazione sono stati utilizzati i valori di  $\text{N-NO}_3^-$  finale ed iniziale ottenuti dai suoli incubati per la stima delle mineralizzazioni. La velocità di nitrificazione (espressa come  $\mu\text{g N-NO}_3^- \text{g}^{-1} \text{giorno}^{-1}$ ) è stata quindi calcolata come differenza tra il contenuto di  $\text{N-NO}_3^-$  nei campioni di suolo dopo 28 giorni di incubazione e il contenuto di  $\text{N-NO}_3^-$  al tempo zero.

$$\text{Velocità di nitrificazione} = \frac{(\text{N-NO}_3^-)_A - (\text{N-NO}_3^-)_B}{n}$$

dove:

$(\text{N-NO}_3^-)_A$  = contenuto di  $\text{NO}_3^-$  nei campioni dopo l'incubazione, in  $\mu\text{g N-NO}_3^- \text{g}^{-1}$ ;

$(\text{N-NO}_3^-)_B$  = contenuto di  $\text{NO}_3^-$  iniziale ( $t_0$ ) nei campioni, espresso in  $\mu\text{g N-NO}_3^- \text{g}^{-1}$ ;

$n$  = tempo di incubazione espresso in giorni.

La determinazione della nitrificazione potenziale è stata effettuata in condizioni non limitanti per il substrato aggiungendo solfato di ammonio come substrato e incubando i campioni a  $25^\circ\text{C}$  (Kandeler, 1995b). A campioni di suolo fresco (10 g), posti in contenitori di plastica, sono stati aggiunti 1 ml di una soluzione di solfato di ammonio

(100  $\mu\text{g N g}^{-1}$  suolo secco) e il tenore idrico è stato aggiustato per raggiungere il 55% della capacità idrica di campo. Dopo aver chiuso i contenitori con tappi forati, i campioni sono stati incubati a 25 °C per 28 giorni. Al termine dell'incubazione il nitrato è stato estratto dal suolo con una soluzione di solfato di potassio ( $\text{K}_2\text{SO}_4$  0,5 M), l'estratto è stato filtrato con filtri Whatman 42 e il contenuto di nitrato nell'estratto è stato determinato con elettrodo specifici, dopo calibrazione con standard a concentrazione nota (0.1, 1, 10 e 100 ppm di  $\text{NO}_3^-$  come nitrato di potassio).

#### **3.4.14 - Attività N-acetil- $\beta$ -D-glucosamminidasi**

La N-acetil- $\beta$ -D-glucosamminidasi è un enzima che catalizza l'idrolisi dei residui N-acetil- $\beta$ -D-glucosammina (NAG) dall'estremità non riducente dei chito-oligosaccaridi (Bielka et al., 1984). Data la sua funzione, questo enzima (noto anche come NAGasi; Parham e Deng, 2000) è responsabile della degradazione della chitina insieme agli altri due enzimi che appartengono alla famiglia delle chitinasi, quali la chitobiosidasi e la endochitinasi (Tronsmo e Harman, 1993). La chitina è il secondo biopolimero più abbondante sulla Terra (Stryer, 1988), esso è costituito da residui di NAG (N-acetil- $\beta$ -D-glucosammina) legati tra di loro mediante legami di tipo  $\beta$ -1,4. La chitina è il costituente dell'esoscheletro degli insetti e di altri invertebrati, quali i crostacei, e della parete cellulare dei funghi (Rodriguez-Kabana et al., 1983). Nel suolo, la chitina rappresenta una riserva di carbonio e azoto, ma, essendo un composto recalcitrante (Stryer, 1988), solo l'attività delle chitinasi permette la conversione della chitina in amminozuccheri semplici che possono essere impiegati come substrati mineralizzabili nel ciclo del carbonio e dell'azoto. Pertanto l'importanza di questi enzimi nel suolo è ampiamente riconosciuta, in particolare studi condotti sull'attività delle chitinasi nel suolo (Rodriguez-Kabana et al., 1983; Miller et al., 1998; Ekenler e Tabatabai, 2002) hanno correlato l'attività della N-acetil- $\beta$ -D-glucosamminidasi con la biomassa fungina del suolo, rendendo la determinazione di questo enzima un indicatore semiquantitativo della biomassa fungina del suolo (Miller et al., 1998).

La determinazione della attività dell'enzima N-acetil- $\beta$ -D-glucosamminidasi (NAGasi) o attività  $\beta$ -glucosamminidasica è stata effettuata utilizzando il metodo proposto da Parham e Deng (2000). Il metodo consiste nell'aggiunta al suolo di *p*-nitrophenyl N-acetyl- $\beta$ -D-glucosamminide (N9376, Sigma-Aldrich), un substrato che viene degradato dalla N-

acetyl- $\beta$ -D-glucosamminidasi (Fig. 3.4). In seguito a questa reazione viene rilasciata una sostanza di colore giallo, il *p*-nitrofenolo, che mostra un picco di assorbanza a 405 nm.

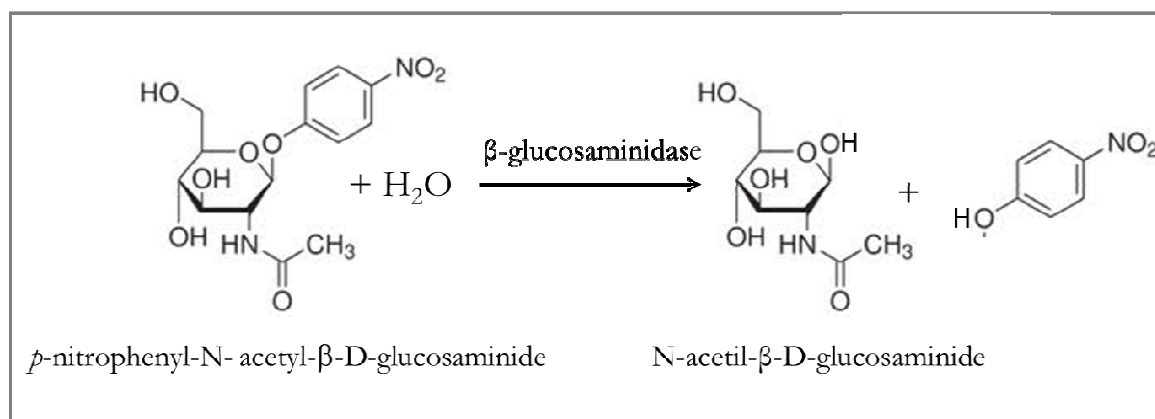


Fig. 3.4 - Reazione catalizzata dall'enzima  $\beta$ -glucosamminidasi (Da: Ekenler e Tabatabai, 2002; modificata)

A 5 g di suolo fresco setacciato sono stati aggiunti 4 ml di tampone acetato (soluzione di sodio acetato triidrato 0,1 M a pH 5,5) e 1 ml di soluzione di *p*-nitrophenil-N-acetyl- $\beta$ -D-glucosamminide 10 mM. La miscela è stata quindi incubata per un'ora al buio a 37 °C, e al termine dell'incubazione sono stati aggiunti 4 ml di NaOH 0,5 M e 1 ml di CaCl<sub>2</sub> 0,5 M per bloccare la reazione. I campioni sono stati agitati, centrifugati, filtrati (usando filtri Whatman n °2) ed analizzati per determinare la quantità di *p*-nitrofenolo (prodotto dalla reazione) presente nei campioni di suolo mediante lettura ad uno spettrofotometro a doppio raggio ad una lunghezza d'onda di 405 nm. Per valutare la quantità di *p*-nitrofenolo prodotto dalla reazione sono stati preparati 2 controlli, il primo è stato preparato usando il suolo e il tampone, ma non il substrato, aggiungendo quest'ultimo solo al termine del periodo di incubazione, dopo aver bloccato la reazione con NaOH e CaCl<sub>2</sub>, allo scopo di tener conto del colore di base del suolo addizionato di substrato. Il secondo controllo è stato preparato utilizzando tutti i reagenti tranne il suolo ed incubando nelle stesse condizioni del campione, allo scopo di tenere conto dell'eventuale assorbimento a 405 nm del *p*-nitrofenolo prodotto per degradazione spontanea del substrato. Quindi su tutti gli estratti è stata eseguita una misura dell'assorbanza del *p*-nitrofenolo. I valori di assorbanza del *p*-nitrofenolo sono stati convertiti in concentrazioni

di *p*-nitrofenolo mediante una retta di taratura ottenuta utilizzando soluzioni a concentrazione nota di *p*-nitrofenolo (0, 5, 10, 15, 20, 25  $\mu\text{M}$ ) (Tabatabai e Bremner, 1969). L'attività dell'enzima N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasi è stata ricavata sottraendo alla concentrazione di *p*-nitrofenolo di ciascun campione quella dei due controlli ed è stata espressa in  $\mu\text{g } p\text{-nitrofenolo g}^{-1} \text{ suolo h}^{-1}$ .

### **3.4.15 - L'Indice di Qualità Biologica del suolo (QBS-ar)**

L'indice di qualità biologica del suolo (QBS-ar) si basa sul principio che il numero di gruppi di microartropodi morfologicamente ben adattati al suolo è tanto maggiore quanto migliore è la qualità del suolo (Parisi et al., 2005). I microartropodi possono essere distinti in diverse forme biologiche in relazione al loro adattamento morfologico all'ambiente edafico. Le forme ben adattate alla vita di questo ambiente (di piccole dimensioni, depigmentate, prive di occhi e ali, con appendici ridotte, etc.) sono dette euedafiche (forme che vivono in profondità), quelle meno adattate epiedafiche (forme che vivono in superficie) e quelle con caratteristiche intermedie emiedafiche (Parisi et al., 2005). Il QBS-ar è di facile applicazione in quanto non richiede l'identificazione dei microartropodi a livello di specie e pertanto è uno strumento appropriato per monitoraggi su larga scala, dove deve essere esaminato un gran numero di campioni.

L'indice QBS-ar può consentire di valutare il livello di degradazione di un suolo. Valori relativamente bassi di QBS-ar sono stati riscontrati in suoli di colture di mais, grano e pomodori, al contrario valori più alti sono stati osservati in prati permanenti o foreste (Parisi et al., 2005; Menta et al., 2011). Bassi valori di QBS-ar sono stati anche rilevati in suoli soggetti ad aratura rispetto a suoli non arati (Menta et al., 2010).

La determinazione del QBS-ar è stata effettuata su un'aliquota di suolo prelevata dopo 28 giorni di incubazione con dosi crescenti di cumarina. L'estrazione della fauna del suolo è stata eseguita utilizzando un estrattore di Berlese-Tulgren modificato (Fig. 3.5) secondo la procedura suggerita Parisi e collaboratori (2005). Il metodo sfrutta la reazione di fuga della fauna del suolo determinata sia dalla presenza della luce sia dall'essiccamento causato da quest'ultima. Il disturbo causato dalla fonte luminosa costringe la fauna che si trova nel suolo a rifugiarsi in profondità alla ricerca di ambienti umidi. La fuga verso il basso fa sì che gli animali possano essere raccolti in un contenitore contenente una soluzione fissante.

L'estrattore di Berlese-Tullgren include un imbuto con una griglia (rete di plastica con maglie di 2 mm) al di sopra del quale è montata una lampadina (40 Watt a luce bianca), posta ad una distanza di circa 30 cm dall'imbuto, e al di sotto del quale si trova un contenitore (volume di 50 – 100 ml) contenente la soluzione fissante (2 parti di alcool etilico al 75% e 1 parte di glicerolo). Ciascun campione di suolo è stato collocato al centro della griglia di ogni imbuto facendo attenzione a non modificare in maniera eccessiva la forma delle carote. A questo punto le lampadine posizionate sui vari imbuti sono state accese e lasciate in questa condizione giorno e notte per un periodo di 15 giorni. Al termine dell'estrazione i contenitori posizionati sotto gli imbuti sono stati chiusi e conservati fino alla fase del riconoscimento dei microartropodi.



Fig. 3.5 - Estrattore di Berlese-Tullgren modificato utilizzato in questo studio

Gli organismi estratti sono stati identificati allo stereoscopio da dissezione (Zeiss Stemi 2000). L'identificazione è avvenuta a livello di phylum, classe o, al massimo, ordine, tramite l'ausilio di chiavi dicotomiche. Ad ogni gruppo identificato è stato attribuito un punteggio. Questo valore, chiamato indice eco-morfologico (EMI), varia all'interno delle diverse unità sistematiche da un minimo di 1, attribuito alle forme poco o nulla adattate alla vita edafica, ad un massimo di 20 per le forme che presentano il massimo adattamento alla vita edafica (Parisi et al., 2005). Per i Collemboli e i Coleotteri, gruppi sistematici che comprendono specie con un elevato numero di forme biologiche a diverso grado di adattamento, è stato necessario utilizzare tabelle specifiche. Dalla somma di tutti i punteggi EMI identificati è stato ricavato il valore del QBS-ar.

### **3.5 - Analisi statistica**

I dati riportati nei grafici e nelle tabelle rappresentano la media ( $\pm$  deviazione standard) delle 4 repliche per ogni trattamento con cumarina (0, 50, 100, 150 mg kg<sup>-1</sup>). Per valutare la significatività delle differenze, per ciascun parametro considerato, è stata eseguita un'analisi della varianza (ANOVA) ad una via, seguita, in caso di significatività di tale test, dallo Student-Newman-Keuls test ( $P < 0.05$ ), mediante il software Sigma Stat 1.0. La correlazione tra i diversi parametri è stata saggiata mediante il coefficiente di Pearson (Sigma Stat 1.0).

## 3.6 - Risultati e discussione

### 3.6.1 – Caratteristiche del suolo usato per l'esperimento

Il suolo usato per l'esperimento è stato preliminarmente analizzato per le caratteristiche fisiche, chimiche e biologiche (Tabella 3.1).

Tab. 3.1 - Valori (media  $\pm$  deviazioni standard) dei parametri fisici, chimici e biologici del suolo utilizzato per l'esperimento. La tessitura del suolo è anche riportata.

Parametro	Misura
Capacità idrica di campo (%)	62,5 ( $\pm$ 10,8)
Bulk density ( $\text{g m}^{-3}$ )	0,7 ( $\pm$ 0,1)
Porosità (%)	77,4 ( $\pm$ 7,8)
Tessitura <sup>1</sup>	Franco-sabbiosa
pH	7,8 ( $\pm$ 0,1)
Conducibilità elettrica ( $\text{dS m}^{-1}$ )	0,30 ( $\pm$ 0,05)
Carbonio organico ( $\text{g kg}^{-1}$ )	55,3 ( $\pm$ 2,9)
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ( $\mu\text{g g}^{-1}$ p.s.)	4,4 ( $\pm$ 1,5)
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ( $\mu\text{g g}^{-1}$ p.s.)	86,5 ( $\pm$ 12,1)
Biomassa microbica ( $\text{mg C}_{\text{mic}} \text{g}^{-1}$ p.s.)	1,0 ( $\pm$ 0,2)
Micelio fungino ( $\text{mg g}^{-1}$ p.s.)	0,60 ( $\pm$ 0,03)
Respirazione ( $\mu\text{g CO}_2 \text{g}^{-1}$ p.s. $\text{h}^{-1}$ )	75,4 ( $\pm$ 5,1)
Mineralizzazione ( $\mu\text{g N g}^{-1}$ p.s. $\text{d}^{-1}$ )	0,7 ( $\pm$ 0,3)
Nitrificazione ( $\mu\text{g N-NO}_3^- \text{g}^{-1}$ p.s. $\text{d}^{-1}$ )	1,2 ( $\pm$ 0,1)
Nitrificazione potenziale ( $\mu\text{g N-NO}_3^- \text{g}^{-1}$ p.s. $\text{d}^{-1}$ )	6,6 ( $\pm$ 0,2)

<sup>1</sup> Dati da Marzaioli et al. (2010)

### 3.6.2 - Effetto della cumarina sulle piante

L'effetto di dosi crescenti di cumarina (0, 50, 100, 150 mg kg<sup>-1</sup>), valutato su avena (pianta infestante), grano (pianta coltivata) e gramigna stellata (specie coesistente con *Melilotus neapolitana*, produttrice di cumarina), è riportato nella Figure 3.6-3.8. La percentuale di emergenza di avena è risultata debolmente (anche se non significativamente) ridotta dal trattamento con cumarina, mentre nessun effetto sulla emergenza è stato osservato nel grano e nella gramigna stellata (Fig. 3.6). Tuttavia la percentuale di emergenza del grano è risultata positivamente correlata alla concentrazione di cumarina nel suolo ( $r=0.53$ ,  $n=20$ ,  $P<0.05$ ).

La crescita delle plantule dopo 20 giorni dalla semina è risultata debolmente ridotta in avena alla dose più elevata di cumarina (150 mg kg<sup>-1</sup>), sia in termini di lunghezza che di peso del germoglio, anche se le differenze non sono risultate significative (Figg. 3.7, 3.8). Sia la lunghezza che il peso di avena fatua dopo 20 giorni dalla semina sono risultate negativamente correlate alla concentrazione di cumarina nel suolo (rispettivamente,  $r=-0.60$ ,  $n=20$ ,  $P<0.01$ ;  $r=-0.43$ ,  $n=20$ ,  $P=0.059$ ).

Alle dosi maggiori di cumarina (100 e 150 mg kg<sup>-1</sup>) la crescita del grano è risultata stimolata sia in termini di lunghezza del germoglio e della radice (Fig. 3.7) che di peso del germoglio (Fig. 3.8). Alla concentrazione di cumarina nel suolo sono risultati infatti positivamente correlati la lunghezza del germoglio ( $r=0.75$ ,  $n=20$ ,  $P<0.001$ ) e della radice ( $r=0.60$ ,  $n=20$ ,  $P<0.01$ ) del grano, così come il peso del germoglio ( $r=0.59$ ,  $n=20$ ,  $P<0.01$ ). La crescita della gramigna stellata non è risultata alterata dal trattamento con cumarina (Figg. 3.7, 3.8).

L'effetto allelopatico della cumarina, isolata da diverse specie, tra cui *Melilotus neapolitana* (Esposito et al., 2008) e *Lavandula* sp.pl. (Haig et al., 2009), è stato dimostrato, in studi condotti su piastra, su piante di ambiente mediterraneo coesistenti con *Melilotus neapolitana* (Esposito et al., 2008), su piante da foraggio, quali *Phleum pratense* (Avers e Goodwin, 1956), *Medicago sativa* e *Lolium multiflorum* (Dornbos e Spencer, 1990) e su diverse piante infestanti, quali *Avena fatua* (Goodwin e Taves, 1950), *Bidens pilosa* (Pergo et al., 2008), *Echinochloa crus-galli* (Chon e Kim, 2004), *Abutilon theophrasti* (Dornbos e Spencer, 1990) e *Lolium rigidum* (Haig et al., 2009). Questo studio dimostra un effetto allelopatico, sebbene debole, della cumarina su avena anche in un esperimento effettuato su suolo. Questo effetto non era deducibile dai saggi realizzati su piastra in quanto l'efficacia del potenziale erbicida potrebbe non essere osservata sul



suolo, dove entrano in gioco le numerose caratteristiche del suolo e le interazioni biotiche (Haig et al., 2009). Infatti Dias et al. (1995), in un saggio di laboratorio, scoprirono che l'estratto acquoso di *Lavandula stoechas* (contenente cumarina) inibiva la germinazione di *Phalaris minor*, un'infestante delle colture grano. Tuttavia quando Dias et al. (2004) eseguirono un saggio in vaso con questo estratto tale effetto non fu osservato e gli autori suggerirono che altri fattori, come la luce e le interazioni biotiche, fossero responsabili della perdita di bioattività nel suolo.

Altro risultato interessante è la specificità di questo potenziale erbicida, in quanto agisce, sebbene debolmente, sulla pianta infestante considerata ma non sulla pianta coltivata né su una pianta coesistente del meliloto napoletano, al contrario sulla pianta coltivata è stato osservato addirittura un effetto stimolante sulla crescita.

## Emergenza

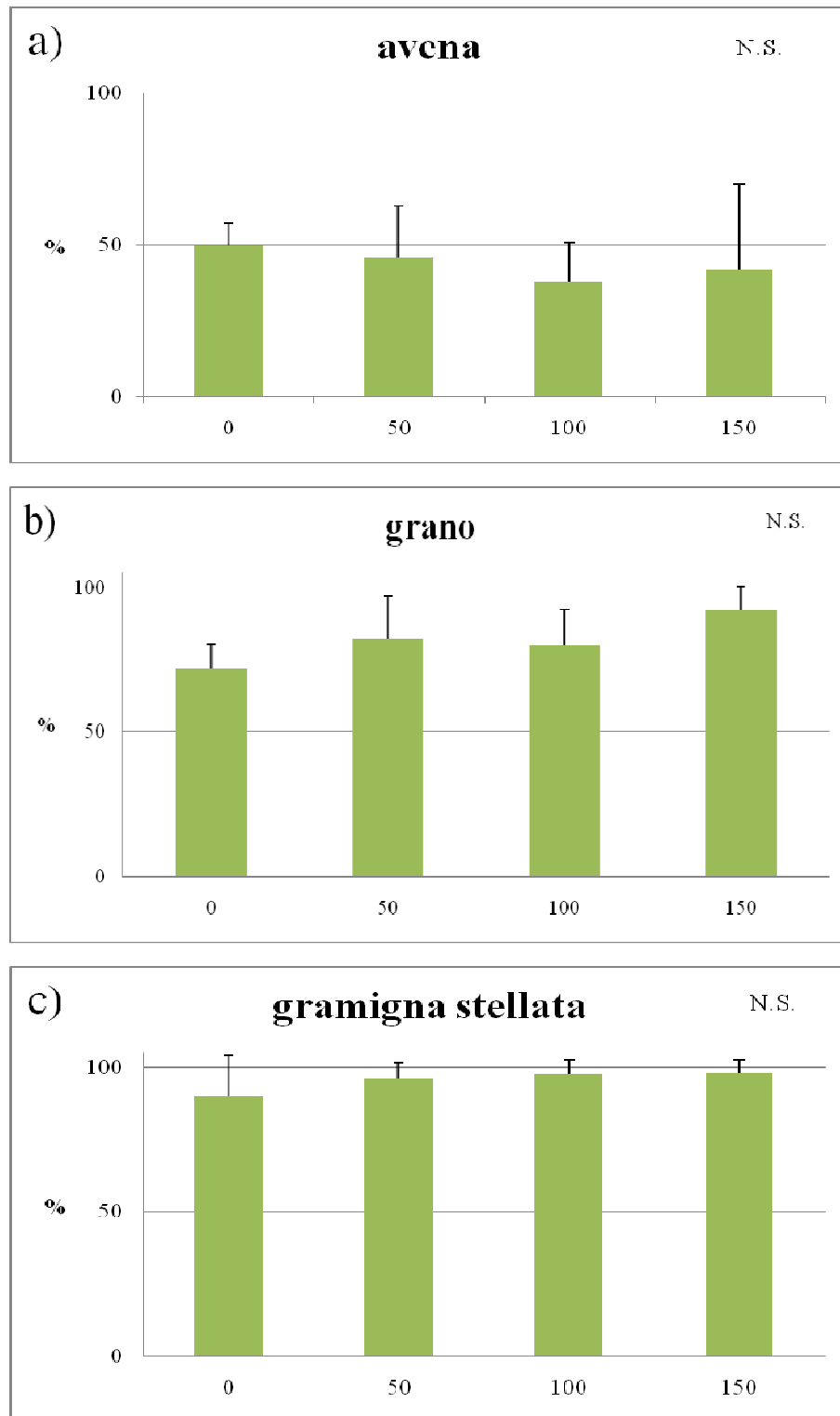


Fig. 3.6 – Effetto del trattamento con dosi crescenti di coumatralb (0, 50, 100, 150 mg kg<sup>-1</sup>) sulla percentuale di emergenza osservata in avena (a), grano (b) e gramigna stellata (c) dopo 20 giorni dal trattamento. N.S.: differenze non significative tra i trattamenti.

## Lunghezza

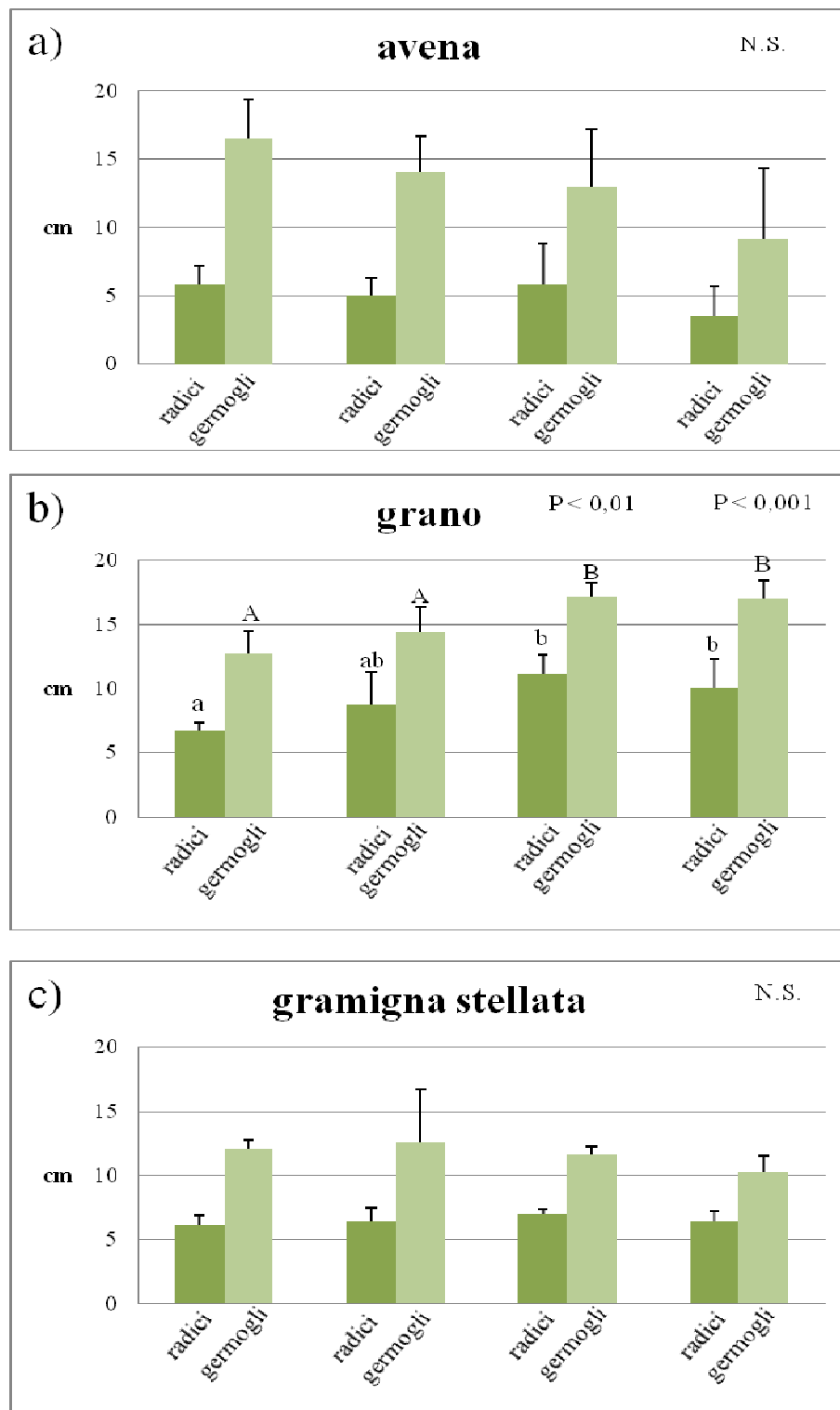


Fig. 3.7 – Effetto del trattamento con dosi crescenti di cumarina (0, 50, 100, 150 mg kg<sup>-1</sup>) sulla crescita in lunghezza del germoglio e della radice delle plantule di avena (a), grano (b) e gramigna stellata (c), misurata 20 giorni dopo il trattamento. Lettere diverse sulle barre indicano differenze significative tra i trattamenti in termini di lunghezza del germoglio (lettere maiuscole) o della radice (lettere minuscole). N.S.: differenze tra i trattamenti non significative.

## Peso

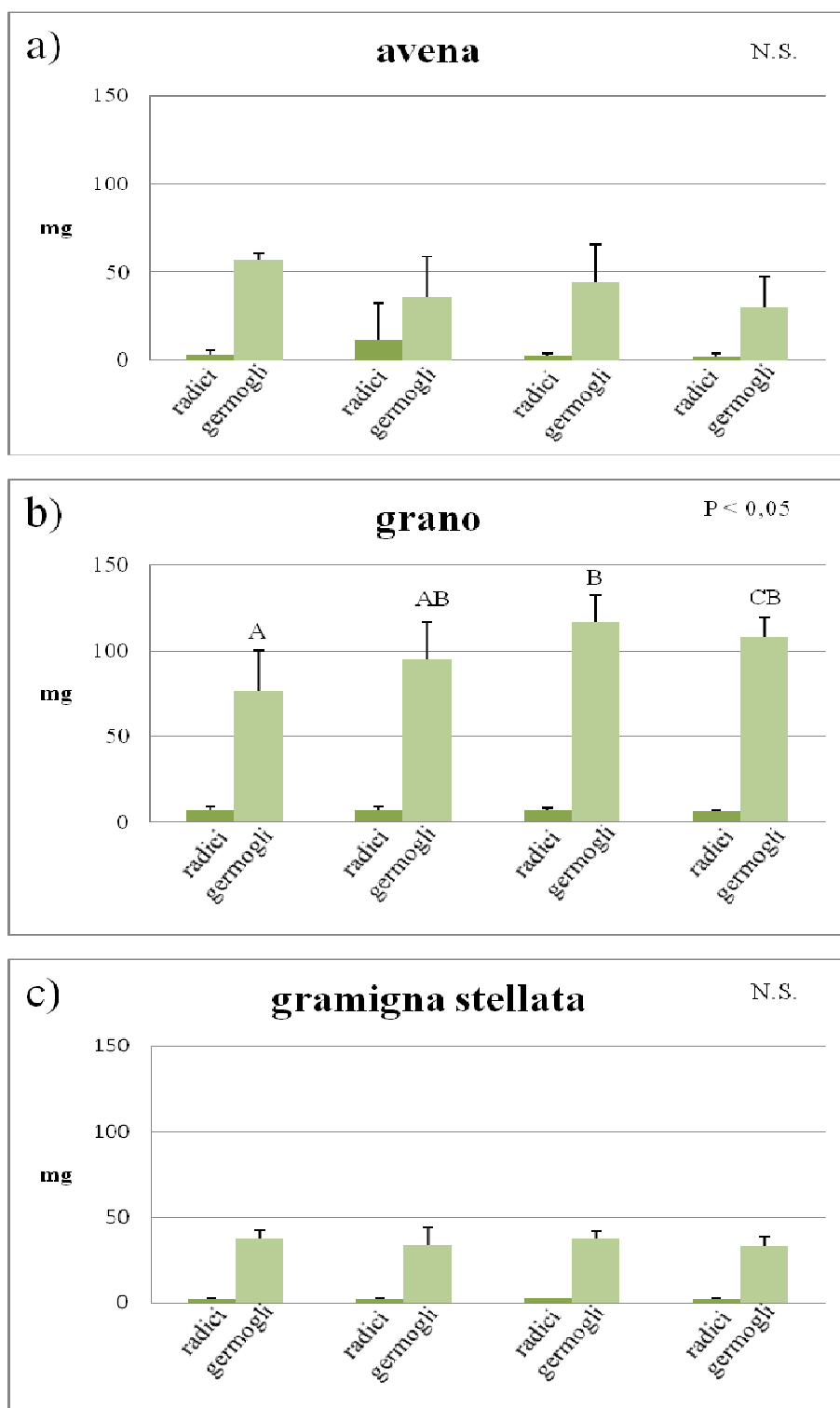


Fig. 3.8 – Effetto del trattamento con dosi crescenti di cumarina (0, 50, 100, 150 mg kg<sup>-1</sup>) sulla crescita in peso del germoglio e della radice delle plantule di avena (a), grano (b) e gramigna stellata (c), misurata 20 giorni dopo il trattamento. Lettere diverse sulle barre indicano differenze significative tra i trattamenti in termini di peso del germoglio. N.S.: differenze non significative tra i trattamenti.

### 3.6.3 - Effetto della cumarina sul suolo

La cumarina non ha prodotto generalmente effetti negativi sui parametri chimici (Tab. 3.2), ad eccezione che per un aumento di pH a 150 mg kg<sup>-1</sup> di cumarina, dopo 14 giorni di esposizione, e un aumento di carbonio organico estraibile e azoto ammoniacale a 100 mg kg<sup>-1</sup> di cumarina, rispettivamente a 14 e a 28 giorni di esposizione (Tab. 3.2). La biomassa microbica totale non ha risentito del trattamento con cumarina né dopo 14 giorni né dopo 28 giorni (Fig. 3.9). Al contrario il micelio fungino (Fig. 3.10) è risultato significativamente ridotto dopo 14 giorni di trattamento indipendentemente dalla dose utilizzata. Un'attività antifungina della cumarina è stata riportata anche da Razawi (2011). Tuttavia tale effetto è temporaneo perché dopo 28 giorni il micelio fungino non risulta più influenzato dal trattamento con cumarina (Fig. 3.10).

Il trattamento con cumarina non ha influenzato le attività microbiche considerate legate al ciclo del C e dell'azoto. In particolare nessun effetto significativo del trattamento con cumarina è stato riscontrato su respirazione del suolo (Fig. 3.11), mineralizzazione dell'azoto (Fig. 3.12), nitrificazione (dati non mostrati) e nitrificazione potenziale (Fig. 3.13). Al contrario l'attività  $\beta$ -glucosamminidasi (Fig. 3.14) è risultata significativamente ridotta dopo 14 giorni di trattamento indipendentemente dalla dose utilizzata. Tuttavia tale effetto è temporaneo perché dopo 28 giorni l'attività  $\beta$ -glucosamminidasi non risulta più influenzata dal trattamento con cumarina (Fig. 3.14).

Per quanto riguarda i microartropodi del suolo, i dati hanno mostrato una leggera diminuzione dell'indice QBS-ar e del numero di forme euedafiche non accidentali (almeno 3 per trattamento) solo nei campioni trattati con le dosi più alte di cumarina (100 e 150 mg kg<sup>-1</sup>) (Fig. 3.15). Deve essere sottolineato che in questo primo esperimento il QBS-ar è stato determinato solo su una replica pertanto non è stato possibile effettuare un'analisi statistica. In ogni caso i valori osservati in questo studio sono risultati confrontabili con quelli osservati in suoli di boschi, arbusteti e praterie della Provincia di Parma (Parisi et al., 2005), ma molto più elevati di quelli osservati in colture tradizionali (41-101) della stessa Provincia.

Tab. 3.2 – Valori medi ( $\pm$  deviazione standard) dei parametri chimici considerati del suolo trattato con cumarina. Lettere diverse in apice indicano differenze significative ( $P < 0.05$ ) tra i trattamenti, per ciascun tempo di esposizione.

Parametri	Tempo incubazione	Concentrazione cumarina ( $\text{mg kg}^{-1}$ p.s.)			
		0	50	100	150
pH	T <sub>14</sub>	7.93 ( $\pm$ 0.05) <sup>a</sup>	7.95 ( $\pm$ 0.05) <sup>a</sup>	8.00 ( $\pm$ 0.10) <sup>ab</sup>	8.07 ( $\pm$ 0.03) <sup>b</sup>
	T <sub>28</sub>	7.90 ( $\pm$ 0.10)	7.97 ( $\pm$ 0.07)	8.02 ( $\pm$ 0.02)	7.97 ( $\pm$ 0.04)
Conducibilità elettrica ( $\text{dS m}^{-1}$ )	T <sub>14</sub>	0.55 ( $\pm$ 0.06)	0.54 ( $\pm$ 0.04)	0.52 ( $\pm$ 0.05)	0.52 ( $\pm$ 0.07)
	T <sub>28</sub>	0.59 ( $\pm$ 0.03)	0.58 ( $\pm$ 0.11)	0.51 ( $\pm$ 0.01)	0.64 ( $\pm$ 0.07)
Carbonio organico estraibile ( $\text{g kg}^{-1}$ )	T <sub>14</sub>	0.30 ( $\pm$ 0.16) <sup>ab</sup>	0.18 ( $\pm$ 0.22) <sup>a</sup>	0.51 ( $\pm$ 0.05) <sup>b</sup>	0.36 ( $\pm$ 0.05) <sup>ab</sup>
	T <sub>28</sub>	0.44 ( $\pm$ 0.06)	0.34 ( $\pm$ 0.07)	0.34 ( $\pm$ 0.13)	0.36 ( $\pm$ 0.06)
N- NH <sub>4</sub> ( $\mu\text{g g}^{-1}$ d.s.)	T <sub>14</sub>	2.34 ( $\pm$ 0.48)	2.44 ( $\pm$ 0.74)	3.08 ( $\pm$ 0.88)	2.31 ( $\pm$ 0.45)
	T <sub>28</sub>	2.41 ( $\pm$ 0.41) <sup>a</sup>	2.21 ( $\pm$ 0.49) <sup>a</sup>	4.92 ( $\pm$ 0.77) <sup>b</sup>	2.16 ( $\pm$ 0.22) <sup>a</sup>
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ( $\mu\text{g g}^{-1}$ d.s)	T <sub>14</sub>	86.20 ( $\pm$ 13.56)	94.10 ( $\pm$ 8.76)	79.34 ( $\pm$ 27.28)	89.30 ( $\pm$ 10.42)
	T <sub>28</sub>	132.70 ( $\pm$ 24.86)	124.63 ( $\pm$ 40.74)	114.04 ( $\pm$ 9.31)	157.26 ( $\pm$ 18.95)

## Biomassa microbica

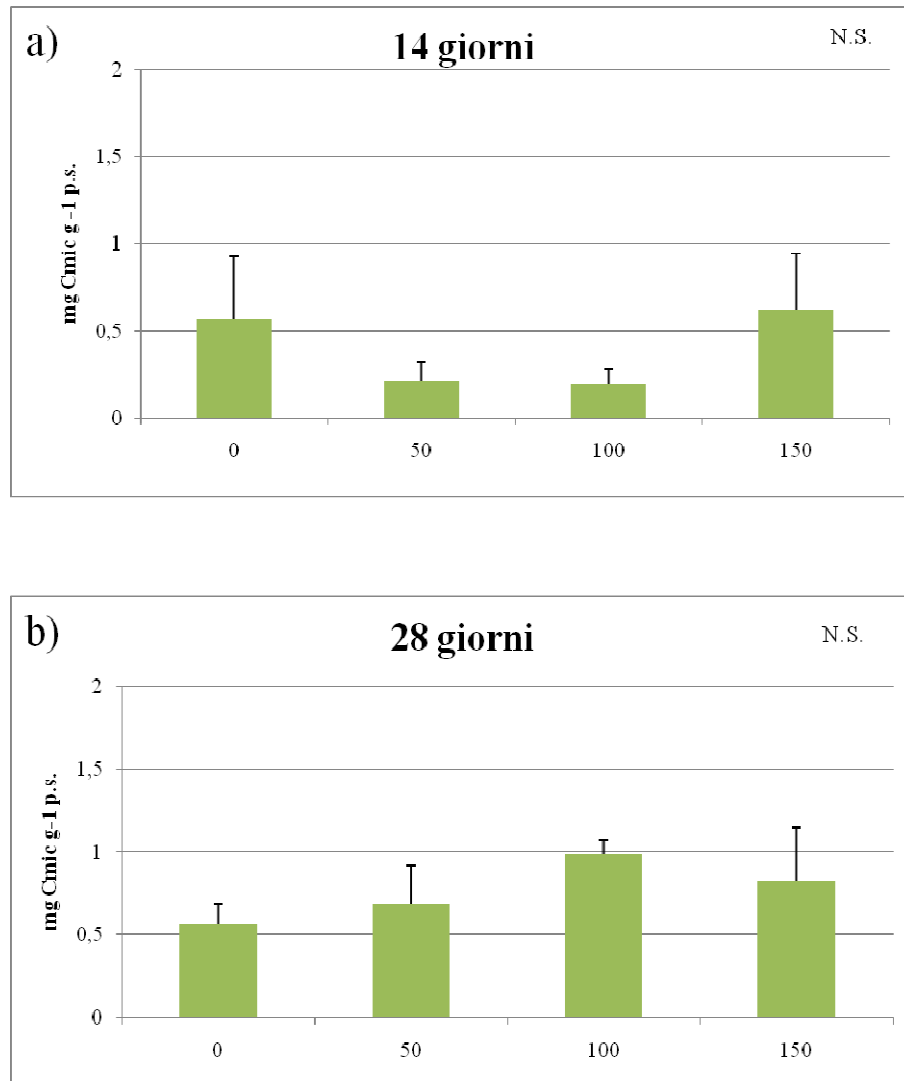


Fig. 3.9 – Effetto del trattamento con dosi crescenti di cumarina (0, 50, 100, 150 mg kg<sup>-1</sup>) sulla biomassa microbica (C<sub>mic</sub>) dopo 14 e dopo 28 giorni di incubazione. N.S.: differenze non significative tra i trattamenti.

## Micelio fungino

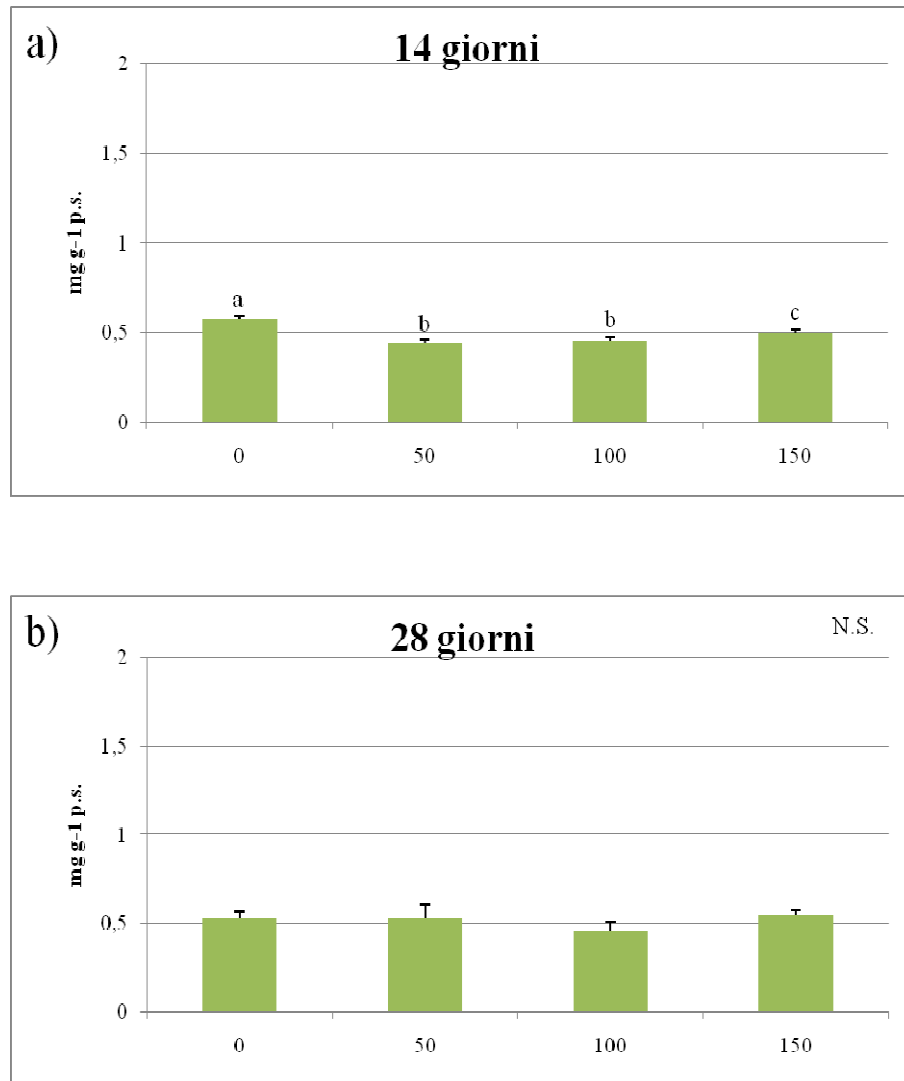
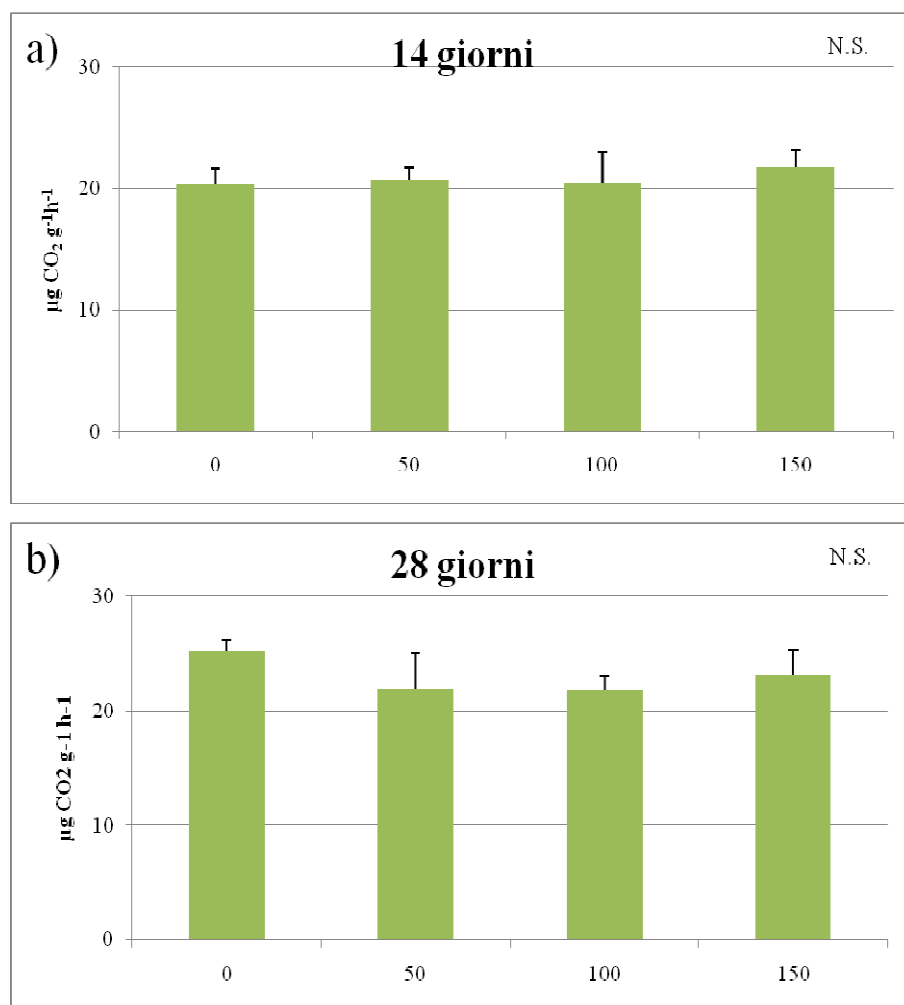


Fig. 3.10 - Effetto del trattamento con dosi crescenti di cumarina (0, 50, 100, 150 mg kg<sup>-1</sup>) sul micelio fungino dopo 14 e 28 giorni di incubazione. Lettere diverse indicano differenze significative ( $P < 0.05$ ) tra i trattamenti. N.S.: differenze non significative tra i trattamenti.



## Respirazione del suolo



3.11 - Effetto del trattamento con dosi crescenti di cumarina (0, 50, 100, 150 mg kg<sup>-1</sup>) sulla respirazione del suolo dopo 14 (a) e dopo 28 (b) giorni di incubazione. N.S.: differenze non significative tra i trattamenti.

## Mineralizzazione dell'azoto

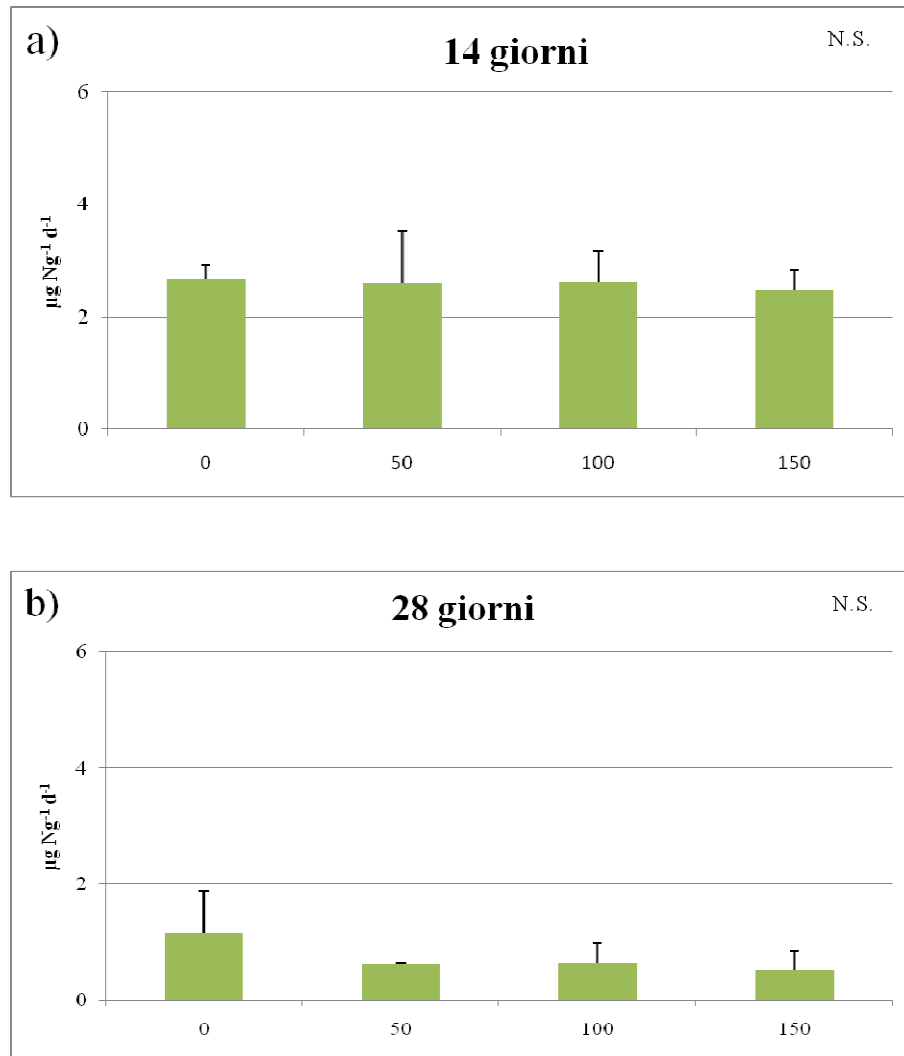


Fig. 3.12 - Effetto del trattamento con dosi crescenti di cumarina (0, 50, 100, 150 mg kg<sup>-1</sup>) sul tasso di mineralizzazione dell'azoto dopo 14 (a) e dopo 28 (b) giorni di incubazione. N.S.: differenze non significative tra i trattamenti.

## Nitrificazione potenziale

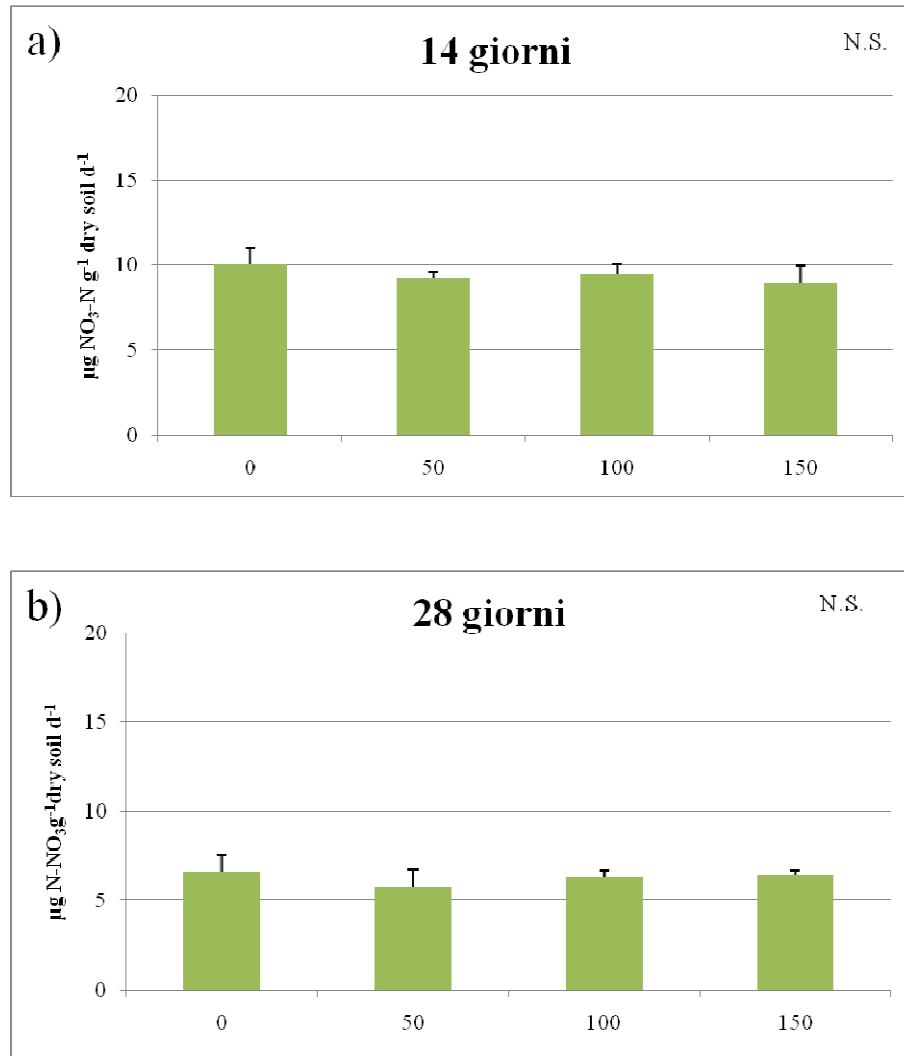


Fig. 3.13 - Effetto del trattamento con dosi crescenti di cumarina (0, 50, 100, 150 mg kg<sup>-1</sup>) sul tasso di nitrificazione potenziale dopo 14 (a) e dopo 28 (b) giorni di incubazione. N.S.: differenze non significative tra i trattamenti.

## Attività della $\beta$ - glucosamminidasi

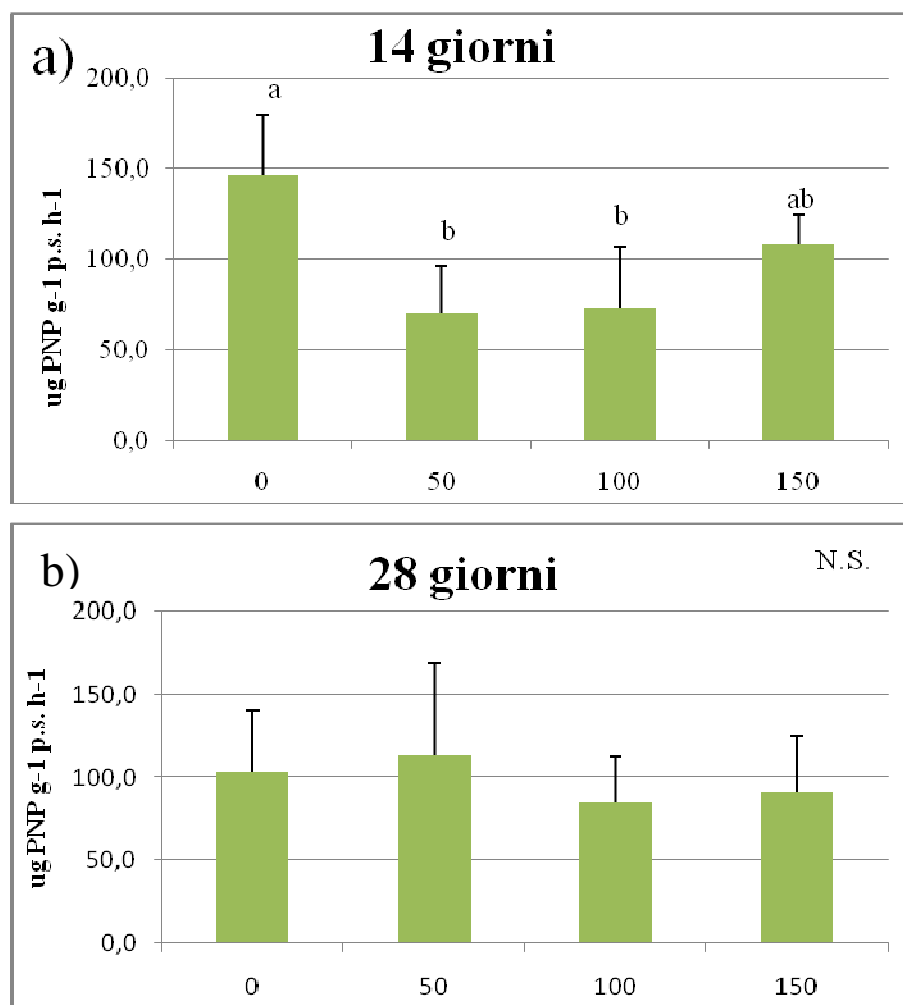


Fig. 3.14 - Effetto del trattamento con dosi crescenti di cumarina (0, 50, 100, 150 mg kg<sup>-1</sup>) sull'attività  $\beta$ -glucosamminidasica dopo 14 (a) e 28 (b) giorni di incubazione. Lettere diverse indicano differenze significative ( $P < 0.05$ ) tra i trattamenti. N.S.: differenze non significative tra i trattamenti.

## QBS-ar

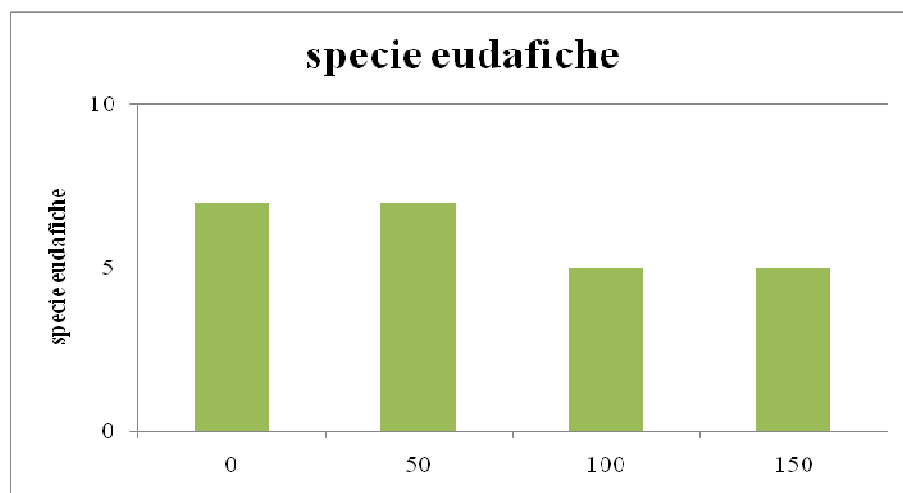
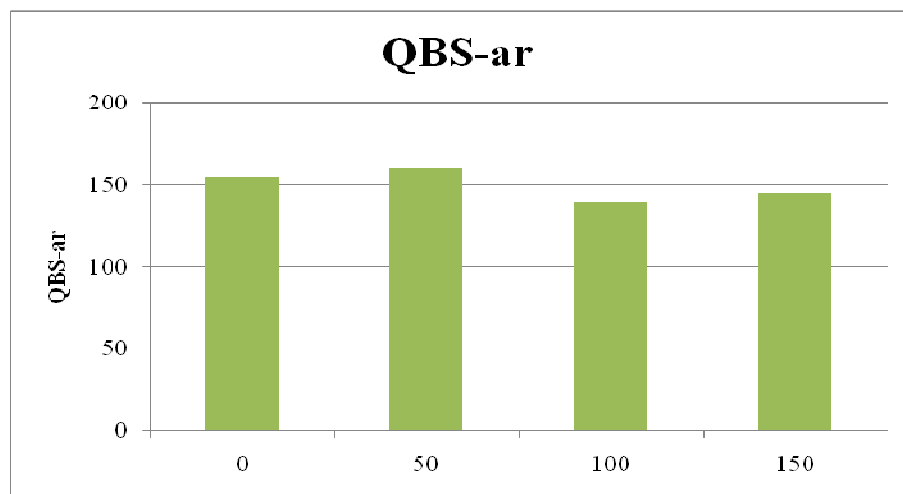


Fig. 3.15 - Effetto del trattamento con dosi crescenti di cumarina (0, 50, 100, 150 mg kg<sup>-1</sup>) sull'indice QBS-ar e sul numero di forme eudafiche non accidentali.

## CAPITOLO 4

### Esperimento n. 2

Sulla base dei risultati del primo esperimento, che hanno mostrato un lieve effetto negativo della cumarina su avena, un effetto positivo sul grano e nessun effetto persistente sulla comunità edafica, è stato pianificato un secondo esperimento che ha previsto l'applicazione al suolo di cumarina in un più ampio intervallo di concentrazioni (0-300 mg kg<sup>-1</sup>). Non essendo stato osservato, nel primo esperimento, alcun effetto sulla gramigna stellata, in questo nuovo saggio non è stata inclusa questa pianta. È stato usato solo un tempo di esposizione alla cumarina (4 settimane) in quanto nel primo esperimento a 2 settimane sono stati osservati solo effetti temporanei. Infine nel secondo esperimento è stata anche considerata l'interazione suolo-pianta e pianta coltivata-pianta infestante allo scopo di verificare le seguenti ipotesi: 1) l'effetto della cumarina sulla comunità biotica del suolo può essere influenzata dalla presenza delle piante; 2) l'effetto positivo della cumarina sul grano (evidenziato nel primo esperimento) può rendere quest'ultimo un migliore competitore nei confronti dell'avena, con conseguenze negative sulla crescita di questa infestante, più pronunciate rispetto a quelle osservate nel primo esperimento.

#### 4.1 – Disegno sperimentale

In questo esperimento è stato saggiato l'effetto del trattamento del suolo con quantità crescenti di cumarina (0, 100, 200, 300 mg kg<sup>-1</sup>) su avena, grano e la comunità biotica del suolo dopo 4 settimane di esposizione.

Considerando che nel primo esperimento sono state osservate basse percentuali di emergenza delle plantule (<50%; Fig. 3.6), è stata ipotizzata (ma non determinata) una bassa percentuale di germinazione dei semi, probabilmente dovuta ad una scarsa vitalità di questi. Per questo motivo, in questo secondo esperimento è stato scelto di far germinare i semi in piastre Petri e di trasferire nei vasetti le plantule, in modo da avere un numero definito di plantule per vasetto. La prima fase del lavoro ha previsto una selezione dei semi per escludere quelli non vitali. I semi di avena sono stati dapprima decorticati, per favorirne la germinazione, e poi analizzati al microscopio, in modo da eliminare i semi danneggiati e scegliere semi uniformi per dimensione. I semi selezionati sono stati

sistemati in piastre Petri. I semi di avena sono stati sistemati in 35 piastre (50 semi per piastra), ciascuna contenente un filtro Whatman e 8 ml di acqua distillata, mentre i semi di grano sono stati posti in 25 piastre (50 semi per piastra), ciascuna contenente un filtro Whatman e 9 ml di hoagland (terreno nutritivo). Immediatamente dopo la germinazione (che è avvenuta dopo quattro giorni dalla semina per l'avena e dopo 2 giorni per il grano), i semi germinati sono stati trasferiti nei vasetti contenenti il terreno prelevato nello stesso sito descritto nel paragrafo 3.1. Sono state allestite 5 serie di vasetti in modo da saggiare l'effetto della cumarina sulle piante cresciute a diversa densità (5 o 10 per vasetto) in condizioni di coltura pura (avena o grano) o in condizioni di coltura mista (avena + grano). Sono state così realizzate 5 condizioni di crescita delle piante:

- 1) avena (5 semi per vasetto)
- 2) avena (10 semi per vasetto)
- 3) grano (5 semi per vasetto)
- 4) grano (10 semi per vasetto)
- 5) grano + avena (5 semi per vasetto di ciascuna specie)

Inoltre è stata allestita una sesta serie di vasetti contenente suolo ma senza piante, da utilizzare solo per le misure sul suolo. Per ciascuna serie di vasetti è stato effettuato, immediatamente dopo la semina, il trattamento del suolo con quantità crescenti di cumarina (0, 100, 200, 300 mg kg<sup>-1</sup>) in 5 repliche per trattamento, per un totale di 120 vasetti (6 serie di vasetti x 4 trattamenti con cumarina x 5 repliche).

L'aggiunta di cumarina (in soluzione acquosa) è stata preceduta da una stima del tenore idrico del suolo (come già fatto per l'esperimento n. 1), effettuata su un'aliquota di suolo prelevata da ciascun vasetto, prima della semina. In base al peso fresco del suolo e al tenore idrico di ogni vasetto, è stato calcolato il peso secco del suolo e la quantità di acqua presente in ciascun vasetto. Inoltre dalla capacità idrica di campo, determinata precedentemente, e dal peso secco di suolo per ogni vasetto è stato possibile calcolare la quantità di acqua da aggiungere a ciascun vasetto per portare il suolo al 60% della capacità idrica di campo. In tale quantità di acqua è stata aggiunta la dose di cumarina da aggiungere ad ogni vasetto sulla base del peso secco. Dopo l'aggiunta di cumarina nella quantità appropriata di acqua, i vasetti sono stati incubati in laboratorio per 4 settimane (Fig. 4.1), ad una temperatura di 17-22 °C. Ogni tre giorni i vasetti sono stati pesati in modo da aggiungere eventualmente l'acqua perduta per evaporazione.



Fig. 4.1 – Vasetti incubati in laboratorio

## **4.2 Analisi sulle piante**

Durante l'esperimento è stata misurata la lunghezza del germoglio con cadenza settimanale. Al termine del periodo di incubazione sulle piante sono stati determinati i seguenti parametri: crescita in peso e in lunghezza dell'intera pianta, del germoglio e della radice e percentuale di mortalità.

## **4.3 Analisi sul suolo**

Al termine dell'incubazione su campioni contenenti solo suolo e su campioni in coltura mista (avena + grano) sono stati determinati, oltre ai parametri chimici e biologici determinati nel primo esperimento (par. 3.4) anche la diversità genetica delle comunità batterica e fungina.

### **4.3.1 - Diversità genetica delle comunità batterica e fungina**

La diversità genetica del suolo è stata valutata mediante la tecnica 16S rDNA e 18S rDNA PCR-DGGE. In questa metodica si possono distinguere tre fasi principali:

1. estrazione del DNA
2. amplificazione mediante PCR (*Polymerase Chain Reaction*) del DNA estratto mediante primer specifici



### 3. corsa elettroforetica su gel a gradiente denaturante (DGGE) del DNA amplificato

L'estrazione del DNA è stata effettuata mediante l'uso di *Fast DNA<sup>®</sup> Kit for soil* (BIO 101, Inc.); questo kit è stato progettato per isolare il DNA genomico delle cellule batteriche e fungine; i prodotti ottenuti possono essere impiegati direttamente per la fase successiva di amplificazione mediante PCR. Sono stati pesati 0,5 g di suolo fresco (da un pool contenente suolo delle 5 repliche per ciascun trattamento e ciascuna condizione sperimentale) all'interno di piccoli tubi (*Lysing Matrix E tube*), contenenti sfere di ceramica e di silice di diverse dimensioni, che favoriscono la lisi cellulare. Successivamente sono stati aggiunti 978 µl di *Sodium phosphate Buffer* e 122 µl di *MT Buffer*. I tubi sono stati sottoposti ad agitazione all'interno di *Fast Prep Instrument* (FP120 Fast Prep Cell Distructor) per 40 secondi ad una velocità di 6 m/s per determinare la lisi cellulare. I tubi sono stati, poi, centrifugati a 14.000 RCF per 5 minuti in modo da separare il surnatante dal precipitato; quindi il surnatante è stato prelevato e trasferito in tubi da 2 ml a cui sono stati aggiunti 250 µl di PPS (*Protein Precipitate Solution*), per eliminare le proteine dall'estratto. I campioni sono stati prima agitati manualmente 10 volte e poi centrifugati a 14.000 RCF per 5 minuti; il surnatante ottenuto è stato trasferito in tubi da 15 ml e ad esso è stato aggiunto 1 ml di *Binding Matrix Suspension*, una resina con siti di scambio anionico a cui si lega il DNA. Per favorire l'attacco del DNA alla resina, è stata effettuata un'agitazione a bassa velocità per 2 minuti; il risultato di questa fase è la presenza all'interno del tubo di due fasi: un surnatante che contiene le proteine da eliminare e una fase più densa che contiene il DNA legato alla resina. Quindi dopo l'eliminazione della maggior parte del surnatante, 600 µl della fase più densa sono stati trasferiti in *Spin Filter* (tubi contenenti filtri che catturano la resina contenente il DNA) e sottoposti a centrifugazione a 14.000 RCF per 1 minuto per legare la resina contenente il DNA al filtro. Successivamente allo *Spin Filter* sono stati aggiunti 500 µl di SEWS (*Salt/Etanol Wash Solution*) per staccare la resina dal filtro, e i tubi sono stati centrifugati nuovamente per due volte eliminando il surnatante tra una centrifuga e l'altra. A questo punto lo *Spin Filter* è stato posto in un nuovo tubo, ventilato a temperatura ambiente per 5 minuti; successivamente sono stati aggiunti 100 µl di DES (*DNase/Pyrogen-Free Water*), un reattivo che consente di estrarre il DNA dal filtro, e dopo un'ultima fase di centrifuga a 14.000 RCF per 1 minuto, è stato recuperato il surnatante che è stato trasferito in tubi da 2 ml puliti dopo aver misurato il volume ottenuto (Tab. 4.1).

Tab. 4.1 - Volumi di estratto contenente DNA ottenuto dall'estrazione.

Trattamento	Volume di estratto ( $\mu\text{l}$ )	
	Suolo	Suolo+Piante
0	80	80
100	80	60
200	72	81
300	70	68

La valutazione qualitativa del DNA estratto è stata effettuata mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio allo 0,8 %. Il gel di agarosio è stato preparato sciogliendo 0,4 g di agarosio in 50 ml di tampone Tris Boric Acid-EDTA (TBE 1X); a completo scioglimento è stato anche aggiunto 1  $\mu\text{l}$  di bromuro di etidio, un intercalante del DNA, che rende visibili gli acidi nucleici con luce UV. L'agarosio è stato fatto polimerizzare in un apposito supporto e mediante dei pettinini sono stati ricavati i pozzetti necessari per caricare i campioni. Il gel così ottenuto, è stato posto nella camera per elettroforesi completamente ricoperto dal tampone TBE 1X. A 5  $\mu\text{l}$  di campione è stato aggiunto 1  $\mu\text{l}$  di blu di bromofenolo Dye 10 X, un colorante contenente glicerolo che appesantisce il campione e rende possibile la sua migrazione all'interno del gel. Il marker impiegato è stato Fermentas Gene Ruler 1kb Plus DNA Ladder. La corsa è stata condotta a 150 V per 15 minuti. La foto del gel di agarosio di controllo dell'estrazione di DNA è riportata in Figura 4.2.

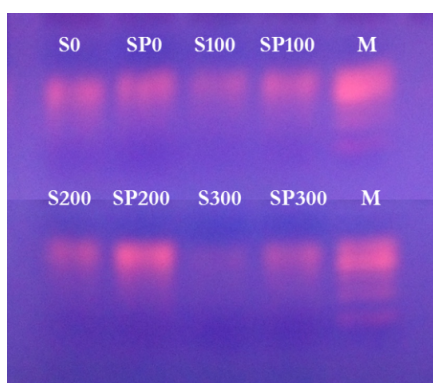


Fig. 4.2 - Gel di agarosio di controllo dell'estrazione del DNA, relativi a campioni soggetti a diversi trattamenti con cumarina (0, 100, 200, 300  $\text{mg kg}^{-1}$ ) nelle diverse condizioni sperimentali: suolo (S0, S100, S200, S300) e suolo+piante (SP0, SP100, SP200, SP300). M: Marker.

Accanto alla valutazione qualitativa dell'estratto, è stata eseguita una valutazione quantitativa mediante metodo spettrofotometrico, utilizzando il sistema Nano Drop (Thermo Scientific Nano Drop™ 1000 Spectrophotometer). Si tratta di uno spettrofotometro UV-visibile che utilizza uno spettro di lunghezze d'onda compreso tra 220 nm e 750 nm; il sistema consente di sfruttare la tensione superficiale dei liquidi in modo da mantenere il campione sotto forma di goccia al momento della lettura. Per effettuare la lettura si deposita 1 µl di campione al termine di una fibra ottica (fibra ricevente), quindi una seconda fibra ottica (fibra sorgente) viene messa in contatto con il campione; in questo modo il liquido riempie lo spazio tra le due fibre ottiche che sono poste ad una distanza di un millimetro che rappresenta il cammino ottico. La sorgente luminosa è costituita da una lampada allo xenon ed da uno spettrofotometro che rivela e analizza la luce dopo il passaggio attraverso il campione. Il vantaggio di utilizzare questo strumento rispetto ad uno spettrofotometro tradizionale è quello di analizzare campioni molto concentrati senza bisogno di diluizioni. L'analisi quantitativa del DNA è stata effettuata valutando l'assorbanza del campione a 260 nm; la purezza dell'estratto è stata ricavata dal rapporto tra le assorbanze a 260 nm e a 280 nm considerando che a quest'ultima lunghezza d'onda si ha il picco massimo di assorbanza per le proteine (Sambrook et al., 1989). Le rese di DNA ottenute mediante la quantizzazione descritta sono riportate in Tabella 4.2.

Tab. 4.2 - Rese di estrazione del DNA.

Trattamento	Resa DNA (ng/µl)		Resa DNA (ng DNA/g p.s.)	
	Suolo	Suolo + Piante	Suolo	Suolo+ Piante
0	70	70	0,014	0,017
100	35	40	0,008	0,007
200	46	91	0,010	0,022
300	54	24	0,012	0,005

Dopo aver effettuato la valutazione quantitativa e qualitativa dell'estratto di DNA, si è proceduto con l'amplificazione di sequenze specifiche del DNA mediante PCR utilizzando dei primers specifici. Per gli eubatteri i primers universali utilizzati sono stati: GC 968f/UNI 1401r (Nübel et al., 1996), che amplificano il frammento 968-1401 del gene 16S rDNA di *Escherichia coli*, collocato nelle regioni variabili V6 e V8. I numeri che descrivono i primers indicano la posizione 5' del nucleotide nel gene 16S rDNA di *Escherichia coli* (Brosius et al., 1978). La sequenza del primer GC 968f è: 5'-AACGCGAAGAACCTTAC-3'; a tale sequenza viene legata all'estremità 5' una sequenza di 40 nucleotidi (GC-clamp) che evita la completa denaturazione dei prodotti della PCR nell'elettroforesi a gradiente denaturante (Muyzer et al., 1997). Il primer 1401r è composto invece da una sequenza di 24 nucleotidi: 5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGAACG-3'. La composizione della miscela di reazione per la PCR è riportata in Tabella 4.3.

La 16S PCR è stata eseguita con termociclatore (2720 Thermal Cycler) secondo le fasi previste da Agnelli et al. (2004), riportate in Tabella 4.4.

Tab. 4.3 - Miscela di reazione per la 16S rDNA-PCR.

Mix (per 1 campione)	Concentrazione iniziale	Volume ( $\mu$ l)
H <sub>2</sub> O UHQ		20,25
Primer GC 968f	[10 $\mu$ M]	1,25
Primer uni 1401r	[10 $\mu$ M]	1,25
Buffer	[10 x]	5
MgCl <sub>2</sub>	[10mM]	7,5
BSA	[500 $\mu$ g/ml]	10
dNTP mix	[10mM] ciascuno	1,25
TAQ Polymed	[5 U/ $\mu$ l]	0,5
<b>Volume mix finale</b>		47
DNA stampo	[10ng/ $\mu$ l]	3
<b>Volume finale</b>		50

Tab. 4.4 - Fasi e cicli della 16S rDNA-PCR (Agnelli et al., 2004).

Temperatura (°C)	Fase	Durata	N° cicli
94	Denaturazione	90 sec.	1
56	Ibridazione	30 sec.	
72	Estensione	45 sec.	
95	Denaturazione	20 sec.	33
56	Ibridazione	30 sec.	
72	Estensione	45 sec.	
72	Estensione finale	7 min.	1

Dopo la PCR è stata condotta una corsa elettroforetica su gel di agarosio 1% in tampone TBE 1x, impiegando 10 µl di DNA stampo e 1 µl di L Dye 10x; le bande sono state confrontate con un DNA marker a peso molecolare noto (Low DNA Mass Ladder), operazione che ha consentito la quantizzazione del DNA amplificato.

Il risultato della corsa elettroforetica e le quantità di DNA amplificato sono riportate in Figura 4.3 e Tabella 4.5.

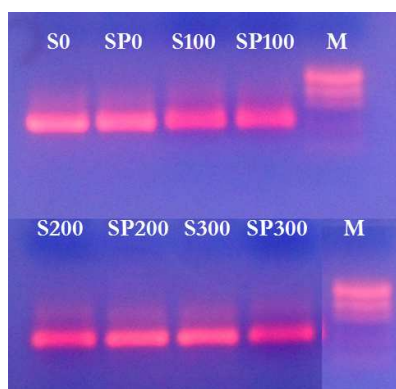


Fig. 4.3 - Gel di agarosio 1 % contenente 16S rDNA amplificato mediante PCR, relativo a campioni soggetti a diversi trattamenti con cumarina (0, 100, 200, 300 mg kg<sup>-1</sup>) nelle diverse condizioni sperimentali: suolo (S0, S100, S200, S300) e suolo+piante (SP0, SP100, SP200, SP300). M: Marker.

Tab. 4.5 - Quantità di DNA ottenute dall'amplificazione mediante PCR 16S rDNA.

Trattamento	Prodotto della PCR (ng/ $\mu$ l)	
	Suolo	Suolo + Piante
0	80	80
100	160	160
200	120	80
300	80	160

La 16S rDNA PCR-DGGE è stata eseguita su una quantità di ampliconi pari a 150 ng, utilizzando un DCode System (Universal Mutation Detection System; Bio Rad). La corsa elettroforetica è stata eseguita su due repliche per ogni amplicone, utilizzando delle aliquote di campioni a cui è stata aggiunta una soluzione di colorante (Loading dye, 2x), costituito da blu di bromo fenolo (BBF) e da xilene cianolo, caricando anche tre repliche del marker molecolare Mass Ruler DNA Ladder Mix; la miscela di campione così ottenuta è stata caricata su gel al 6 % di poliacrilammide (acrilammide/bisacrilammide 37,5:1), costituito da un gradiente denaturante di formamide e urea di 35-50 %, parallelo alla direzione dell'elettroforesi, considerando che la soluzione 100 % denaturante contiene urea 7 M e formamide 40 %; inoltre alla soluzione 100 % denaturante sono stati anche aggiunti 2 ml di glicerolo che aumenta la flessibilità del gel facilitando la sua manipolazione durante la fase acquisizione di fine corsa. Ciascun gradiente denaturante è stato ottenuto tramite diluizione di due soluzioni stock di denaturante 0 % e 100 % seguendo le istruzioni della casa produttrice (Tab. 4.6 e Fig. 4.4) fino al volume finale di 25 ml. Poco prima di versare il gel di poliacrilammide, le due soluzioni denaturanti ottenute sono state trattate con 125  $\mu$ l di ammonio persolfato (APS), e 25  $\mu$ l di TEMED (N,N,N,N'-Tetra-Metil-Etilendiammina), catalizzatori che accelerano la reazione di polimerizzazione del gel; il successivo versamento del gel è avvenuto con modalità "Top Filling" (LOW davanti e HIGH dietro), con un tempo di polimerizzazione pari a circa 1 ora.



Fig. 4.4 - Immagine A) gel di poliacrilammide con gradiente denaturante messo in evidenza dalla sfumatura di colore blu; immagine B) fase di caricamento dei campioni sul gel di poliacrilammide; C) il sistema DCode System impiegato per la corsa elettroforetica.

La corsa elettroforetica è durata 4 ore con voltaggio pari a 200 V ed una temperatura costante di 60 °C, utilizzando come tampone di corsa il TAE (Tris Acetate –EDTA buffer) 0,5 X. A fine corsa il gel è stato colorato con Sybr Green I (diluito 1:10.000 con TAE 0,5x) per 30 minuti al buio. Infine il gel è stato osservato con uno scanner chemiofluorescente (Typhoon Scanner) e quindi fotografato.

Tab. 4.6 - Composizione delle soluzioni a gradiente denaturante 0 % e 100 % per un gel di poliacrilammide al 6 %

<b>Gradiente denaturante</b>	<b>0%</b>	<b>100%</b>
Bis Acrilammide 40%	15 ml	15 ml
TAE Buffer 50 X	2 ml	2 ml
Formamide	-	40 ml
Urea	-	42 g
V finale (a.d. sterile)	100 ml	100 ml

La diversità della comunità fungina nel suolo è stata determinata mediante l’approccio 18S PCR rDNA-DGGE, utilizzando primers specifici per gli eucarioti. È stata effettuata una Nested PCR sul gene 18S rDNA. La prima PCR è stata eseguita su 2 µl di DNA stampo, utilizzando i primers NS1f/NS8r (Kowalchuk, 1999), che amplificano quasi l’intero 18S rDNA generando ampliconi di dimensioni pari a 1700 bp (coppie di basi). Di seguito 2 µl degli ampliconi della prima PCR sono stati sottoposti ad una seconda PCR, in modo da produrre ampliconi di 500 bp, utilizzando primers EF4f/NS3r (Brodie et al., 2003). Anche in questo caso al primer revers (r) è stata aggiunto un “GC-clamp”, così da avere un campione idoneo per la DGGE. Le sequenze dei primer utilizzati per le PCR sono riportate in Tabella 4.7.

Tab. 4.7 - Sequenze dei primer impiegati per la nested PCR sul frammento 18S rDNA  
(Da Anderson e Cairney, 2004).

PCR Primer	Sequenza primer
NS1 f	5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3'
NS8 r	5'-TCCGCAGGTTACCTACGGA-3'
EF4 f	5'-GGAAGGGRTGTATTTATTAG-3'
NS3 r	5'-GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC-3'

Le due successive 18S rDNA PCR sono state eseguite utilizzando il termociclature (2720 Thermal Cycler). La composizione delle miscele di reazione e le fasi della PCR sono mostrate nelle Tabelle 4.8-4.11.

Tab. 4.8 - Miscela di reazione per la 1<sup>a</sup> 18S rDNA-PCR  
(da: Kowalchuk, 1999; White et al., 1990).

Mix (per 1 campione)	Concentrazione iniziale	Volume (μl)
H <sub>2</sub> O UHQ		16,98
Primer NS1f	[10μM]	2
Primer NS8r	[10μM]	2
Buffer	[10 x]	5
MgCl <sub>2</sub>	[10mM]	7,5
BSA	[500μg/ml]	10
dNTP mix	[10mM] ciascuno	2
TAQ Polymed	[5 U/μl]	0,52
<b>Volume mix finale</b>		46
DNA stampo	[10ng/μl]	4
<b>Volume finale</b>		50



Tab. 4.9 - Fasi e cicli della 1a 18S rDNA-PCR.

Temperatura (°C)	Fase	Durata	N° cicli
94	Denaturazione iniziale	3 min.	1
94	Denaturazione	1 min.	
60	Ibridazione	1 min.	10
72	Estensione	1 min.	
94	Denaturazione	1 min.	
50	Ibridazione	1 min.	15
72	Estensione	2 min.	
72	Estensione finale	5 min.	1

Tab. 4.10 - Miscela di reazione per la 2<sup>a</sup> 18S rDNA-PCR (nested PCR)(da: Brodie et al., 2003).

Mix (per 1 campione)	Concentrazione iniziale	Volume (μl)
H <sub>2</sub> O UHQ		29,74
Primer EF4 f	[10μM]	2
Primer NS3 GC r	[10μM]	2
Buffer	[10 x]	5
MgCl <sub>2</sub>	[10mM]	7,5
dNTP mix	[10mM] ciascuno	1
TAQ Polymed	[5 U/μl]	0,76
<b>Volume mix finale</b>		48
DNA stampo	[10ng/μl]	2
<b>Volume finale</b>		50

Tab. 4.11 - Fasi e cicli della 2<sup>a</sup> 18S rDNA-PCR.

Temperatura (°C)	Fase	Durata	N° cicli
94	Denaturazione iniziale	2 min.	1
94	Denaturazione	1 min.	30
50	Ibridazione	1 min.	
72	Estensione	1,5 min.	
72	Estensione finale	5 min.	1

Gli ampliconi prodotti della seconda PCR sono stati poi controllati su gel d'agarosio e fotografati come descritto per i batteri. In Figura 4.5 è riportata la foto del gel di agarosio 1 % dei prodotti di PCR, in Tabella 4.12 è invece riportata la quantità di DNA amplificata.

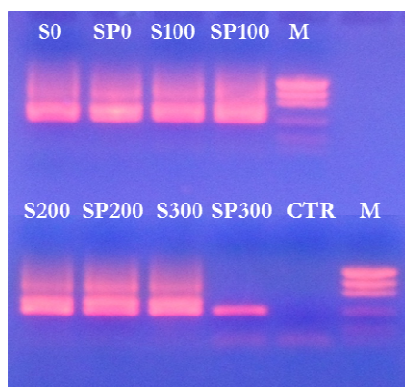


Fig. 4.5 - Gel di agarosio 1 % contenente 18S rDNA prodotto della 2<sup>a</sup> PCR, relativo a campioni soggetti a diversi trattamenti con cumarina (0, 100, 200, 300 mg kg<sup>-1</sup>) nelle diverse condizioni sperimentali: suolo (S0, S100, S200, S300) e suolo+piante (SP0, SP100, SP200, SP300). M: Marker CTR: controllo negativo (senza DNA stampo).

Tab. 4.12 - Quantità di DNA ottenute dall'amplificazione mediante la 2<sup>a</sup> PCR 18S rDNA.

Trattamento	Prodotto della PCR (ng/μl)	
	Suolo	Suolo + Pianta
0	100	100
100	100	100
200	100	100
300	100	12

La 18S rDNA-DGGE è stata effettuata con DCode System, caricando 130 ng di ampliconi. I campioni di DNA sono stati caricati con il colorante Loading Dye (2X) su gel di poliacrilammide al 10 %, avente un gradiente denaturante, 30-45 %, parallelo alla direzione dell'elettroforesi, formato da urea e formamide (100 % denaturante contiene 7 M urea e 40 % formamide). Le soluzioni denaturanti sono state ottenute come descritto nella metodica della diversità della comunità batterica. La corsa è durata 4 ore ad un voltaggio costante di 200 V e ad una temperatura costante di 60°C, ed è stata effettuata in tampone TAE 0,5X. Quindi il gel è stato colorato e fotografato come descritto per i batteri.

#### **4.4 – Elaborazione dei dati**

Per ciascun parametro analizzato (ad eccezione che per la diversità genetica), è stata calcolata la media e la deviazione standard delle repliche per ciascun trattamento (0, 100, 200, 300 mg kg<sup>-1</sup>), per ogni condizione di crescita delle piante (coltura pura o mista di avena e grano) o per ciascuna condizione sperimentale del suolo (suolo, suolo+piante). Il numero di repliche è pari a 25, per le piante cresciute in coltura pura a bassa densità (5 per vasetto) e in coltura mista, è invece pari a 50, per le piante cresciute in coltura pura ad alta densità (10 per vasetto), e a 5 per i campioni di suolo. Per ciascun parametro è stata valutata la significatività delle differenze tra i trattamenti con cumarina, per ciascuna condizione di crescita delle piante o per ciascuna condizione sperimentale del suolo, mediante l'analisi della varianza (ANOVA) ad una via, seguita, in caso di significatività di tale test, dallo Student-Newman-Keuls test ( $P < 0.05$ ), mediante il software Sigma Stat 1.0. La correlazione tra i parametri è stata saggiata mediante il coefficiente di Pearson (Sigma Stat 1.0).

Per quanto riguarda la diversità genetica, le immagini del gel di poliacrilammide sono state elaborate utilizzando il software ImageJ 1.45. Questo software è in grado di eseguire un'analisi delle bande del gel convertendo il colore grigio in valori non calibrati di densità ottica mediante la formula:

$$OD = \log_{10}(255/\text{valore del pixel})$$

Il risultato che si ottiene da quest'analisi è un plot lineare in cui si possono osservare dei picchi che corrispondono alle bande visibili all'interno del gel (Fig. 4.6). L'elaborazione è stata eseguita su ogni colonna del gel di poliacrilammide separatamente, in modo da avere una migliore risoluzione del plot stesso ed è stata utile per poter identificare tutte le bande che si sono separate durante la corsa elettroforetica. I risultati ottenuti con questa tecnica di elaborazione delle immagini sono stati integrati con l'identificazione manuale delle bande. Il passo successivo è stato quello di identificare tutte le posizioni occupate dalle bande (mediante l'ausilio di una griglia), operazione necessaria per la realizzazione di una matrice in cui per ogni banda del campione è stata indicata l'intensità. La matrice ottenuta è stata analizzata individuando la Richness (numero di bande), l'intensità totale delle bande (pixel) e l'indice di diversità Simpson (c):

$$c = 1 - \sum (n_i/N)^2$$

dove:

$n_i$  = area di ogni banda di un profilo

$N$  = somma di tutte le intensità di ogni profilo

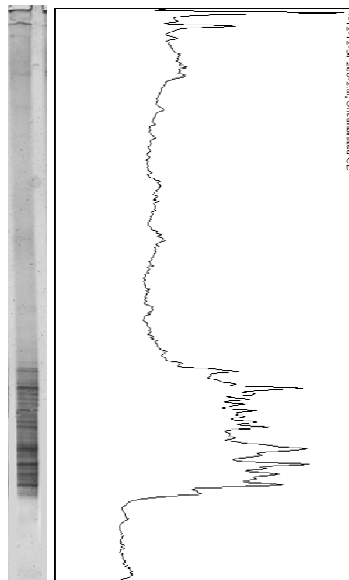


Fig. 4.6 - Esempio di elaborazione dell'immagine del gel di poliacrilammide mediante software ImageJ.

## 4.5 Risultati e discussione

### 4.5.1. Caratteristiche del suolo utilizzato per l'esperimento

Il suolo utilizzato per l'esperimento è stato preliminarmente analizzato e le sue caratteristiche sono riportate in Tabella 4.13.

Tab. 4.13 - Caratteristiche del suolo utilizzato per l'esperimento (valori medi  $\pm$  deviazione standard), prelevato alla profondità di 0-10 cm.

Parametro	Misura
Capacità di Campo (%)	78,37 $\pm$ 6,2
Bulk density (g m <sup>-3</sup> )	0,6 $\pm$ 0,1
Porosità (%)	77,3 $\pm$ 3,4
Tessitura <sup>1</sup>	Franco-sabbiosa
pH	7,5 $\pm$ 0,1
Conducibilità elettrica (dS m <sup>-1</sup> )	0,5 $\pm$ 0,1
Carbonio organico (g kg <sup>-1</sup> )	102,7 $\pm$ 14,3
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ( $\mu$ g g <sup>-1</sup> p.s.)	17,10 $\pm$ 1,91
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ( $\mu$ g g <sup>-1</sup> p.s.)	23,07 $\pm$ 4,48
Biomassa microbica (mg g <sup>-1</sup> p.s.)	0,33 $\pm$ 0,15
Micelio fungino (mg g <sup>-1</sup> p.s.)	0,15 $\pm$ 0,03
Mineralizzazione dell'N ( $\mu$ g N g <sup>-1</sup> p.s. d <sup>-1</sup> )	4,54 $\pm$ 1,14
Nitrificazione ( $\mu$ g N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> g <sup>-1</sup> p.s. d <sup>-1</sup> )	3,42 $\pm$ 1,26
Nitrificazione potenziale ( $\mu$ g N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> g <sup>-1</sup> p.s. d <sup>-1</sup> )	10,67 $\pm$ 3,94

da Marzaioli et al., 2010.

#### 4.5.2 – Effetto del trattamento della cumarina sulle piante

L'effetto del trattamento con quantità crescenti di cumarina (0, 100, 200, 300 mg kg<sup>-1</sup>) sulla dinamica di crescita della pianta infestante (*Avena fatua*) e della pianta coltivata (*Triticum durum*) è riportato nelle figure 4.7 e 4.8. I grafici mostrano l'andamento della crescita in lunghezza del germoglio, rilevata con cadenza settimanale, sia in coltura pura, a due diverse densità di semi (5 e 10 semi per vasetto) che in coltura mista (5 semi di avena in presenza di 5 semi di grano). In coltura pura a bassa densità, l'avena ha presentato una progressiva riduzione della crescita all'aumentare della dose di cumarina aggiunta al suolo (Fig. 4.7 a), anche se l'effetto della cumarina è risultato significativo solo alla dose maggiore (300 mg kg<sup>-1</sup>), come si è verificato anche in condizione di coltura mista (Fig. 4.7 c), mentre l'effetto della cumarina è risultato meno chiaro a maggiore densità di semi in coltura pura (Fig. 4.7 b). La crescita del germoglio di avena è risultata correlata negativamente alla quantità di cumarina applicata al suolo a tutte le date di misura, nella coltura pura a bassa densità e nella coltura mista, e solo a 14 e 29 giorni in condizione di coltura pura ad alta densità (Tab. 4.14).

Per quanto riguarda il grano, è stato osservato un effetto stimolante della cumarina alle dosi più basse (100 e 200 mg kg<sup>-1</sup>) sulla dinamica di crescita del germoglio in condizioni di coltura pura a bassa densità (5 semi per vasetto), ma un effetto inibente alla dose maggiore di cumarina (300 mg kg<sup>-1</sup>; Fig. 4.14 a). A maggiore densità di semi, sia in coltura pura (Fig. 4.14 b) che in coltura mista (Fig. 4.14 c), l'effetto stimolante della cumarina non è stato più osservato, mentre l'effetto inibente è stato rilevato solo a 300 mg kg<sup>-1</sup>, in coltura pura (Fig. 4.14 b) e anche a 200 mg kg<sup>-1</sup>, in condizioni di coltura mista (Fig. 4.14 c). Una correlazione negativa tra crescita del germoglio di grano e dose di cumarina è stata riscontrata a tutte le date di misura e in tutte le condizioni di crescita delle piante (Tab. 4.15).

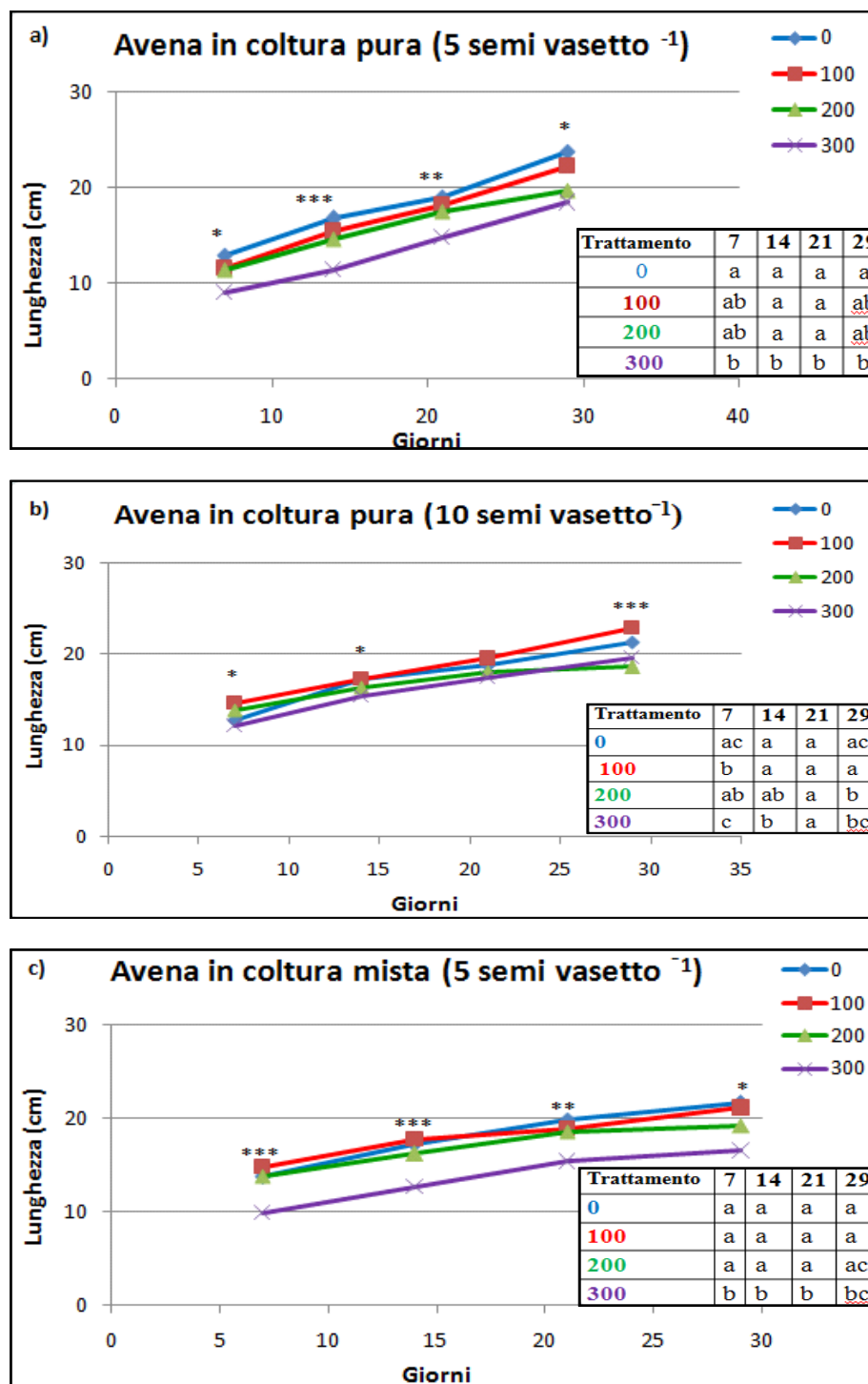


Fig. 4.7- Effetto del trattamento con dosi crescenti di cumarina (0, 100, 200, 300 mg kg<sup>-1</sup>) sulla lunghezza del germoglio di avena misurato a 7, 14, 21 e 29 giorni dopo il trattamento. Gli asterischi indicano differenze significative (\* P<0.05; \*\* P<0.01; \*\*\* P<0.001) tra i trattamenti, per ogni data, saggate mediante l'ANOVA ad una via; lettere diverse in tabella indicano differenze significative (P<0.05) tra i trattamenti saggate mediante Student-Newman-Keuls test.

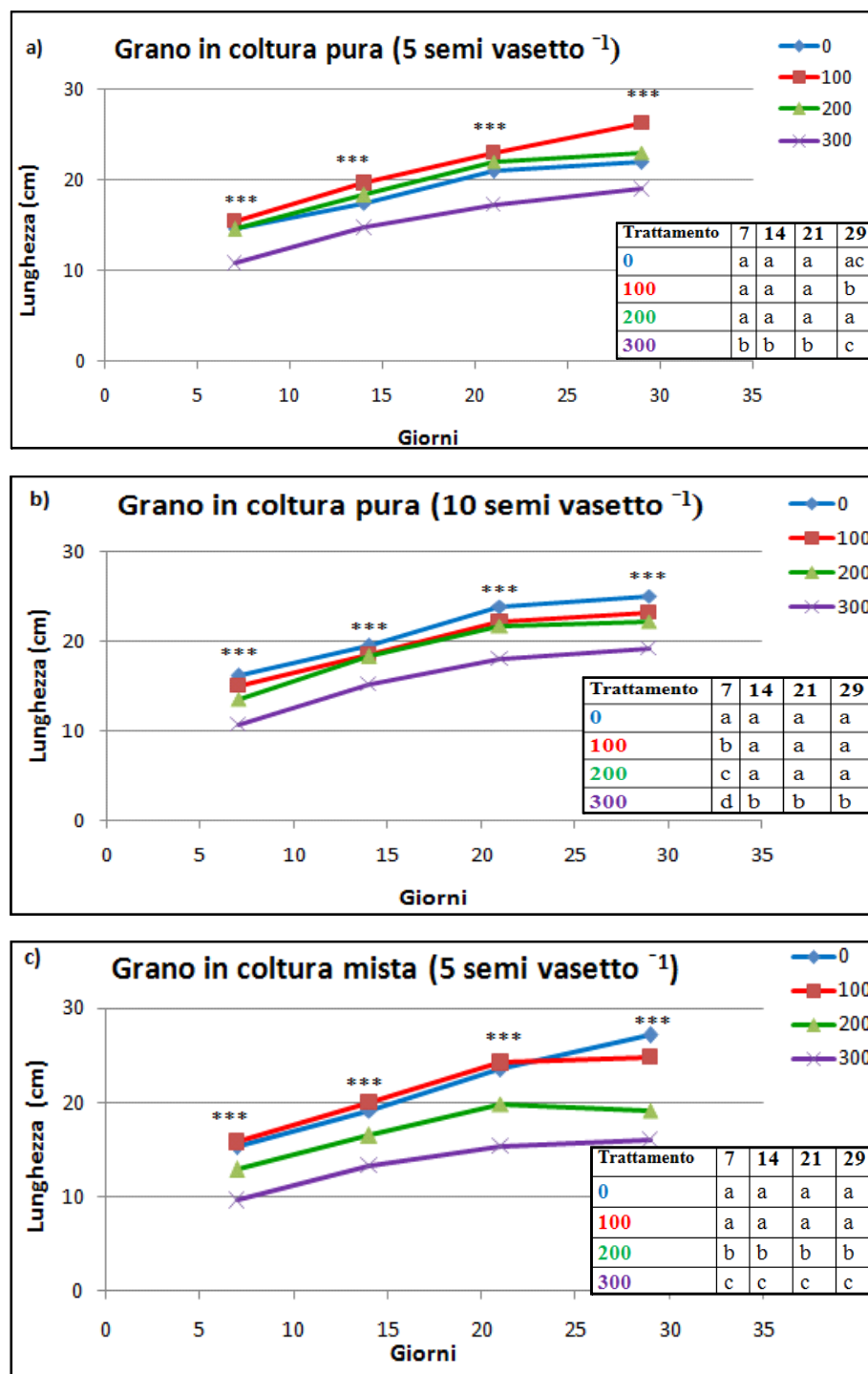


Fig. 4.14 - Effetto del trattamento con dosi crescenti di coumatralb (0, 100, 200, 300 mg kg<sup>-1</sup>) sulla lunghezza del germoglio di grano misurato a 7, 14, 21, 29 giorni dopo il trattamento. Gli asterischi indicano differenze significative (\*\*\*) P<0.001) tra i trattamenti, per ogni data, saggiate mediante l'ANOVA ad una via, lettere diverse in tabella indicano differenze significative (P<0.05) tra i trattamenti saggiate mediante Student-Newman-Keuls test.



Tab. 4.14 – Risultati della correlazione tra trattamento con cumarina e indicatori di crescita e mortalità dell'avena nelle diverse condizioni di crescita. È riportato il coefficiente di Pearson (r), il numero di osservazioni (in parentesi) e la significatività (\* P<0.05; \*\* P<0.01; \*\*\* P<0.001).

	Coltura pura (5 semi per vasetto)	Coltura pura (10 semi per vasetto)	Coltura mista
Mortalità	n.s.	n.s.	n.s.
Lunghezza pianta	-0.26 (89)*	-0.22 (176)**	n.s.
Lunghezza germoglio			
7 giorni	-0.35 (98)***	n.s.	-0.37 (95)***
14 giorni	-0.52 (98)***	-0.19 (199)**	-0.47 (95)***
21 giorni	-0.36 (96)***	n.s.	-0.26 (94)*
29 giorni	-0.39 (89)***	-0.19 (177)*	-0.31 (86)**
Lunghezza radice	0.24 (89)*	n.s.	0.25 (86)*
Peso pianta	n.s.	0.34 (176)***	n.s.
Peso germoglio	n.s.	0.26 (176)***	-0.25 (74)*
Peso radice	n.s.	0.32 (176)***	n.s.

Tab. 4.15 – Risultati della correlazione tra trattamento con cumarina e indicatori di crescita e mortalità del grano nelle diverse condizioni di crescita. È riportato il coefficiente di Pearson (r), il numero di osservazioni (in parentesi) e la significatività (\* P<0.05; \*\* P<0.01; \*\*\* P<0.001).

	Coltura pura (5 semi per vasetto)	Coltura pura (10 semi per vasetto)	Coltura mista
Mortalità	n.s.	n.s.	n.s.
Lunghezza pianta	-0.34 (97)***	-0.37 (191)***	-0.72 (97)***
Lunghezza germoglio			
7 giorni	-0.51 (100)***	-0.65 (199)***	-0.68 (101)***
14 giorni	-0.28 (100)**	-0.38 (198)***	-0.56 (101)***
21 giorni	-0.27 (100)**	-0.34 (197)***	-0.56 (101)***
29 giorni	-0.22 (97)*	-0.33 (191)***	-0.68 (97)***
Lunghezza radice	-0.36 (97)***	-0.25 (191)***	-0.46 (97)***
Peso pianta	0.21 (97)*	-0.15 (190)*	-0.44 (96)***
Peso germoglio	n.s.	n.s.	n.s.
Peso radice	0.21 (97)*	-0.18 (190)*	n.s.

Al termine del periodo di incubazione sono state rilevate la mortalità (Fig. 4.15) e la crescita, in termini di lunghezza e peso dell'intera pianta, della radice e del germoglio delle due specie considerate (Figg. 4.16-4.19). La mortalità di avena e grano non è risultata incrementata dal trattamento con cumarina (Fig. 4.15). In condizioni di coltura pura di grano a maggiore densità (10 semi per vasetto) la mortalità è risultata addirittura ridotta rispetto al controllo a tutte le dosi di cumarina (Fig. 4.15 b).

Al termine del periodo di incubazione la lunghezza dei germogli di avena è risultata negativamente influenzata dal trattamento con la dose maggiore di cumarina ( $300 \text{ mg kg}^{-1}$ ), in tutte le condizioni di crescita (Fig. 4.16 b), e anche alla dose di  $200 \text{ mg kg}^{-1}$  in condizione di coltura pura a maggiore densità (10 semi per vasetto). Al contrario non è stato registrato nessun effetto negativo della cumarina sulla lunghezza dell'intera pianta (Fig. 4.16 a) né della radice (Fig. 4.16 c). Il trattamento con cumarina ha influito negativamente sul peso dei germogli di avena solo in condizioni di coltura mista (Fig. 4.17 b); in condizioni di coltura pura a maggiore densità (10 semi per vasetto) è stato osservato addirittura un effetto stimolante sul peso della pianta intera (Fig. 4.17 a), dei germogli (Fig. 4.17 b) e delle radici (Fig. 4.17 c). L'analisi delle correlazioni ha generalmente evidenziato un effetto negativo della cumarina sulla lunghezza del germoglio e dell'intera pianta, indipendentemente dalla condizione di crescita delle piante (Tabella 4.13), mentre al variare delle condizioni di crescita cambia l'effetto sul peso. Solo in coltura mista è stata osservata una correlazione negativa tra dose di cumarina e peso del germoglio (Tab. 4.14).

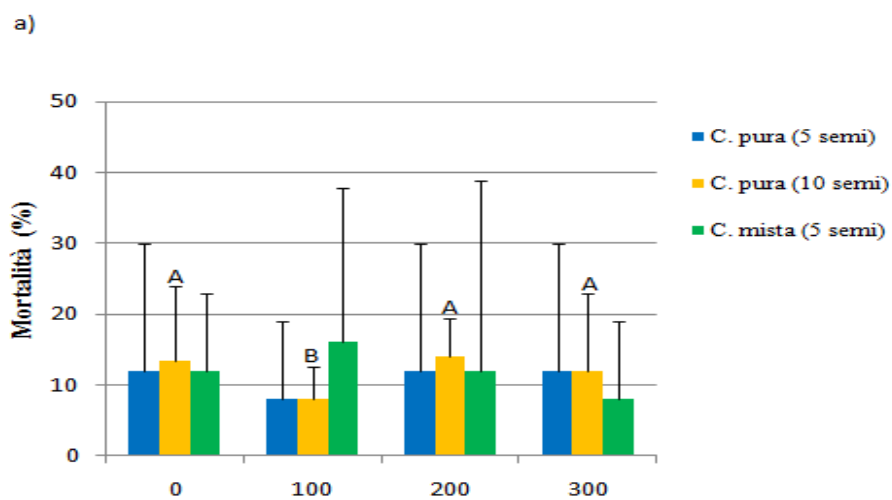
Per quanto riguarda il grano, al termine del periodo di incubazione è stato osservato un effetto stimolante del trattamento con la dose minore di cumarina ( $100 \text{ mg kg}^{-1}$ ) sulla crescita in lunghezza della pianta intera e del germoglio, in coltura pura a bassa densità (5 semi per vasetto), ma non nelle altre condizioni di crescita (Fig. 4.18 a, b). In ogni caso alla dose maggiore di cumarina ( $300 \text{ mg kg}^{-1}$ ), e talvolta anche a  $200 \text{ mg kg}^{-1}$ , è stata rilevata generalmente una riduzione significativa della lunghezza dell'intera pianta (Fig. 4.18 a), del germoglio (Fig. 4.18 b) e della radice di grano (Fig. 4.18 c). Nel grano è stato anche osservato un effetto stimolante sul peso della pianta intera in condizioni di coltura pura a bassa densità (5 semi per vasetto) a tutte le dosi di cumarina (Fig. 4.19 a). Nelle stesse condizioni di crescita un effetto stimolante è stato generalmente rilevato anche sul peso delle radici (Fig. 4.19 c), ma non su quello del germoglio (Fig. 4.19 b). Infatti il peso della pianta di grano e delle radici è risultato positivamente correlato alla quantità di cumarina aggiunta al suolo nella condizione di crescita a bassa densità (Tab. 4.15).

Tuttavia in condizioni di coltura mista è stato osservato un effetto negativo sul peso dell'intera pianta alle dosi maggiori di cumarina (200 e 300 mg kg<sup>-1</sup>; Fig. 4.19 a). Considerando l'intero intervallo di concentrazioni utilizzato (0-300 mg kg<sup>-1</sup>) è risultato un effetto negativo della cumarina sul grano per la maggior parte dei parametri considerati, ad eccezione del peso dell'intera pianta e della radice in condizione di bassa densità di semi per vasetto (Tab. 4.15).

I risultati di questo studio hanno generalmente confermato l'effetto positivo della cumarina sul grano solo alla concentrazione di 100 mg kg<sup>-1</sup> in accordo con quanto evidenziato nel precedente esperimento, nell'intervallo di concentrazioni di cumarina di 0-150 mg kg<sup>-1</sup>. L'effetto negativo su avena alle dosi minore di cumarina è risultato significativo solo in termini di peso del germoglio in condizione di coltura mista. A dosi maggiori di cumarina (200 e 300 mg kg<sup>-1</sup>) l'effetto negativo su avena è risultato più marcato, ma in tali condizioni anche il grano ha risentito negativamente del trattamento. Pertanto l'intervallo 100-150 mg kg<sup>-1</sup> di cumarina non può essere superato per il trattamento contro l'avena per evitare di compromettere anche la crescita del grano. Tuttavia a dosi minori l'efficacia della cumarina applicata tal quale non è tale da giustificare l'uso in campo. L'effetto della competizione con il grano sulla risposta dell'avena alla cumarina è stato rilevato solo in termini di peso del germoglio.

Come si è detto l'effetto allelopatico della cumarina su *Avena fatua* è stato dimostrato in studi condotti su piastra (Goodwin e Taves, 1950). L'elevata fitotossicità della cumarina (applicata a concentrazione di 10<sup>-3</sup> M) sulla germinazione e sulla crescita radicale di *Avena fatua* sembra dovuta al fatto che la cumarina rallenta il metabolismo e blocca la mitosi, a livello radicale, e inibisce l'allungamento cellulare nei coleottili (Goodwin e Taves, 1950). I dati ottenuti in questo studio, utilizzando quantità di cumarina (2-5 10<sup>-3</sup> M) corrispondenti a quelle utilizzate da Goodwin e Taves (1950), dimostrano però che i dati ottenuti in piastra non sempre trovano riscontro anche su suolo, dove entrano in gioco una serie di altri fattori ecologici, quali le numerose caratteristiche del suolo e le interazioni biotiche (Haig et al., 2009; Dias et al. (1995).

## Avena



## Grano

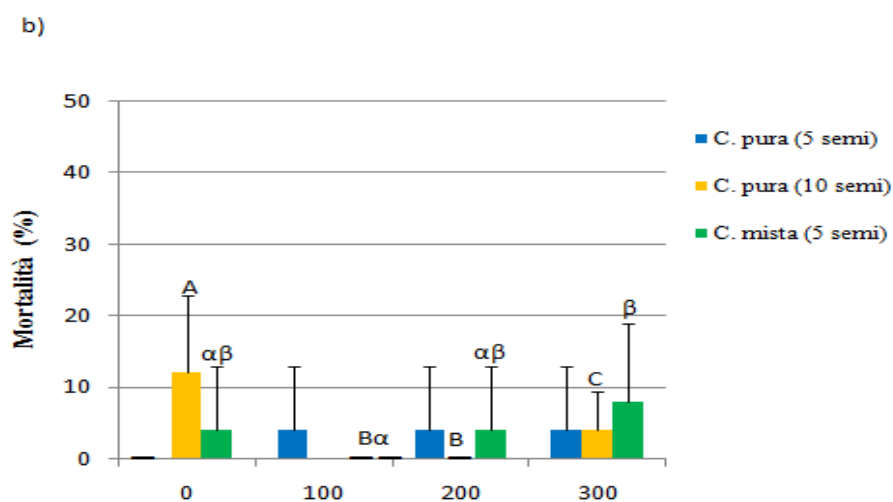


Fig. 4.15 – Effetto del trattamento con dosi crescenti di coumatetallyl (0, 100, 200, 300 mg kg<sup>-1</sup>) sulla percentuale di mortalità osservata in avena (a) e grano (b) dopo 29 giorni dal trattamento. Lettere diverse sulle barre indicano differenze significative ( $P < 0.05$ ) tra i trattamenti, per ogni condizione di crescita, saggiate mediante Student-Newman-Keuls test.

# Avena

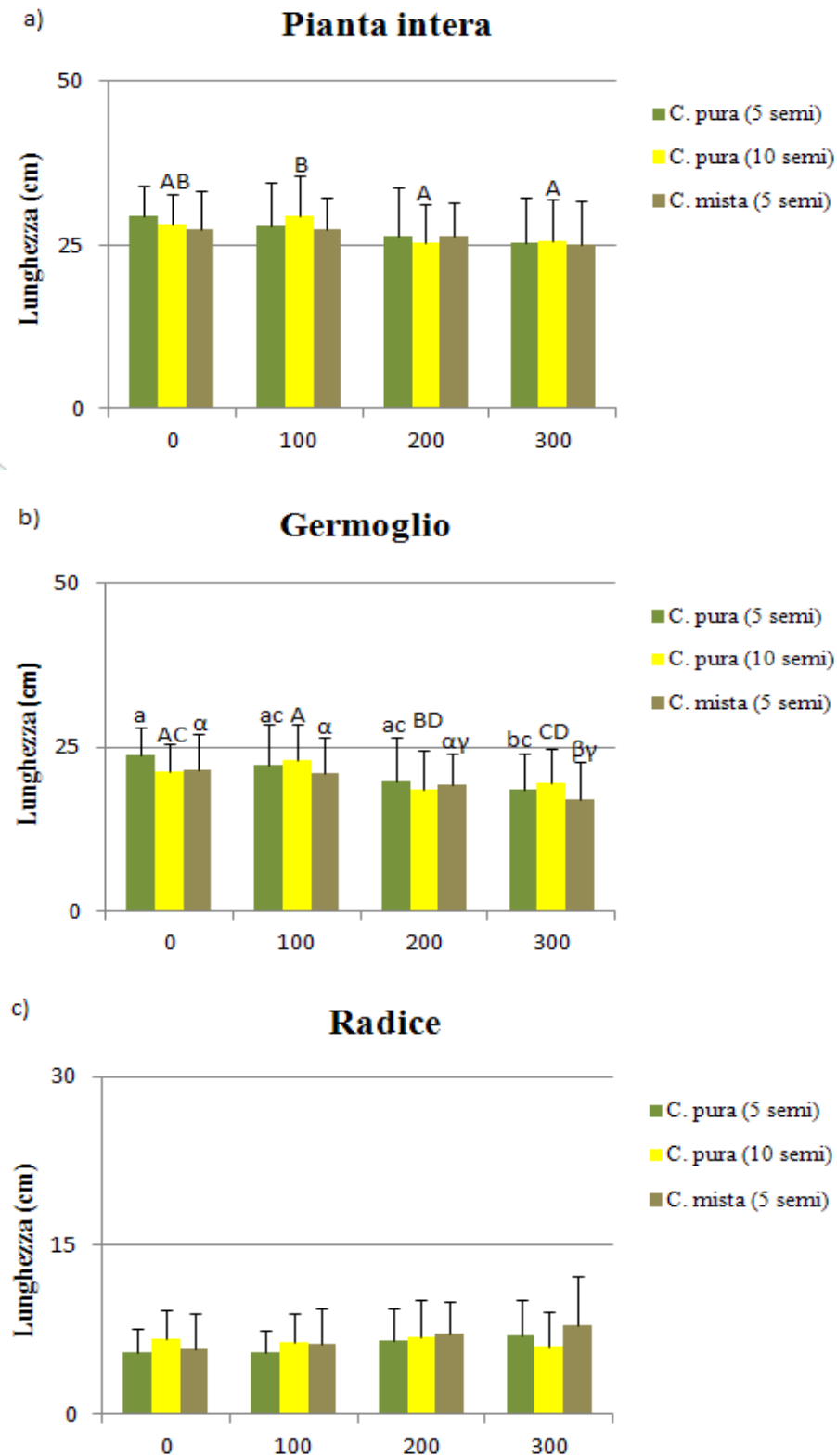


Fig. 4.16 – Effetto del trattamento con dosi crescenti di cumarina (0, 100, 200, 300  $\text{mg kg}^{-1}$ ) sulla lunghezza finale della pianta intera (a), del germoglio (b) e della radice (c) di avena misurata 29 giorni dopo il trattamento. Lettere diverse sulle barre indicano differenze significative ( $P < 0.05$ ) tra i trattamenti, per ogni condizione di crescita, saggiate mediante Student-Newman-Keuls test.

# Avena

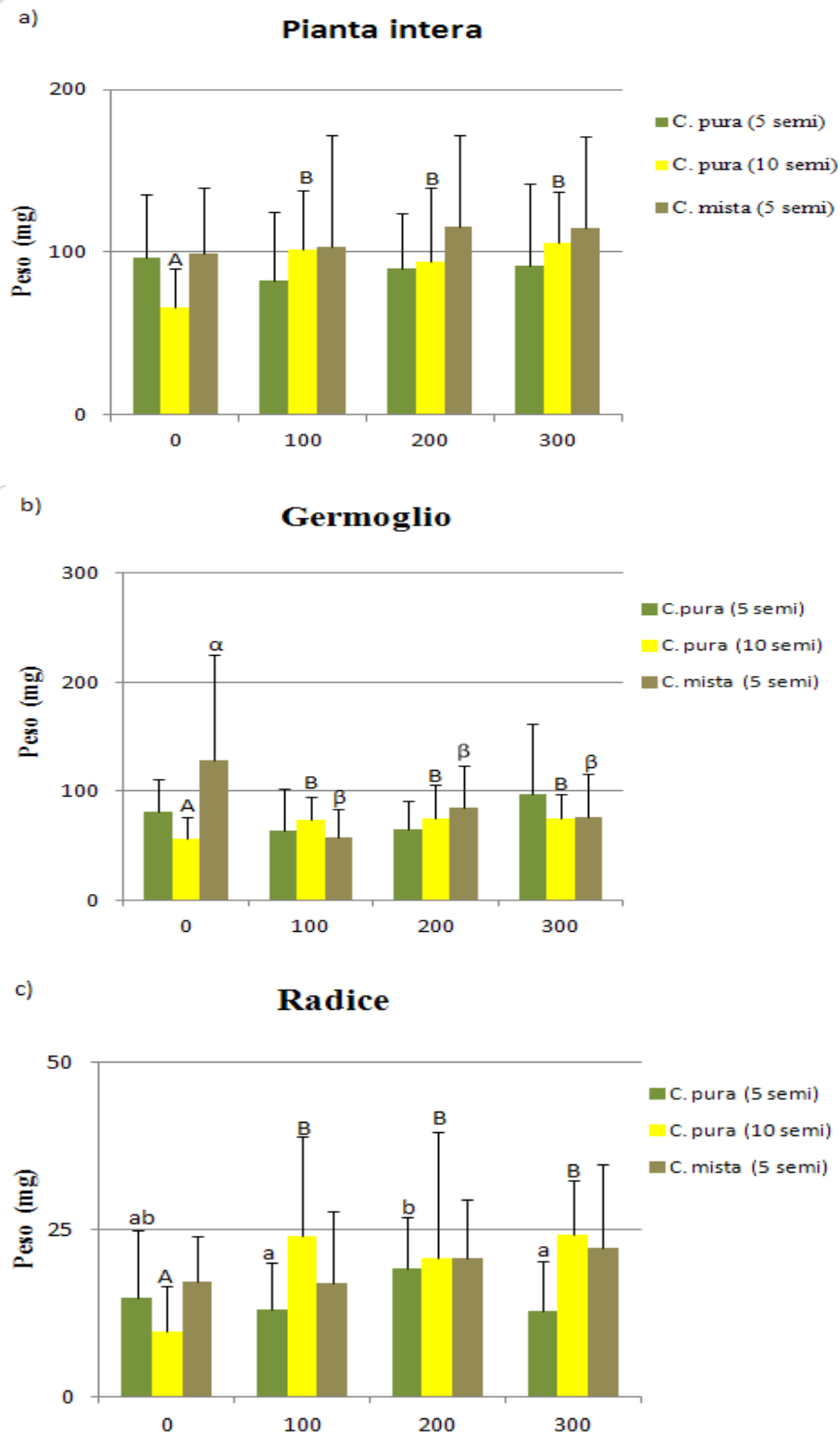


Fig.4.17 - Effetto del trattamento con dosi crescenti di cumarina (0, 100, 200, 300 mg kg<sup>-1</sup>) sul peso finale della pianta intera (a), del germoglio (b) e della radice (c) di avena misurato 29 giorni dopo il trattamento. Lettere diverse sulle barre indicano differenze significative ( $P < 0.05$ ) tra i trattamenti, per ogni condizione di crescita, saggate mediante Student-Newman-Keuls test.

# Grano

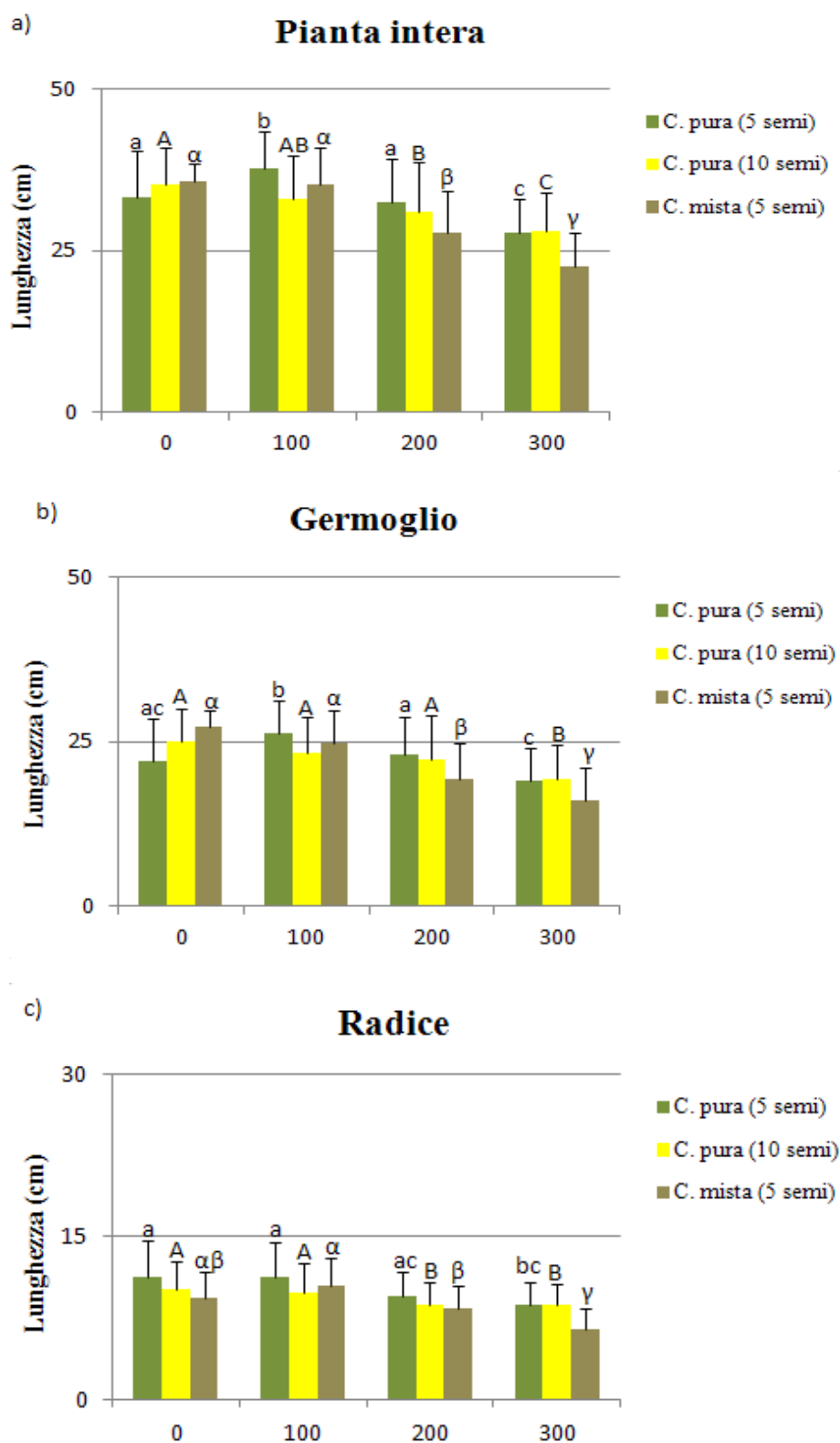


Fig.4.18 – Effetto del trattamento con dosi crescenti di cumarina (0, 100, 200, 300 mg kg<sup>-1</sup>) sulla lunghezza finale della pianta intera (a), del germoglio (b) e della radice (c) di grano misurata 29 giorni dopo il trattamento. Lettere diverse sulle barre indicano differenze significative (P<0.05) tra i trattamenti, per ogni condizione di crescita, saggate mediante Student-Newman-Keuls test.

# Grano

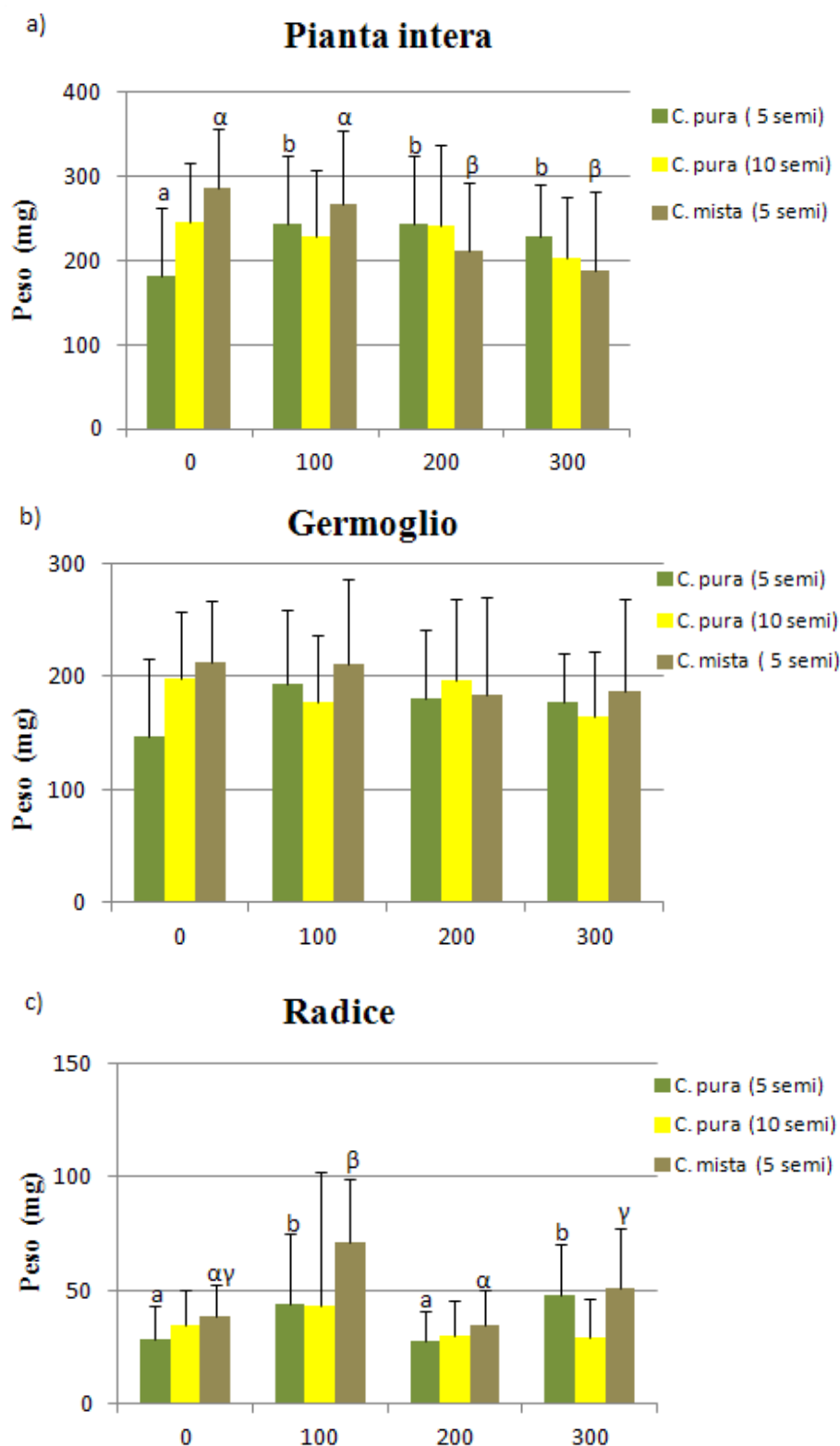


Fig. 4.19 - Effetto del trattamento con dosi crescenti di cumarina (0, 100, 200, 300 mg kg<sup>-1</sup>) sul peso finale della pianta intera (a), del germoglio (b) e della radice (c) di grano misurato 29 giorni dopo il trattamento. Lettere diverse sulle barre indicano differenze significative (P<0.05) tra i trattamenti, per ogni condizione di crescita, saggate mediante Student-Newman-Keuls test.



### 4.5.3 - Effetto della cumarina sul suolo

Il trattamento con cumarina non ha generalmente modificato significativamente i parametri chimici del suolo (Tab. 4.16) sia in assenza che in presenza di piante (avena + grano), eccetto che per un aumento di azoto ammoniacale nei suoli trattati con cumarina, rispetto al controllo, indipendentemente dalla dose di cumarina e dalla condizione sperimentale (suolo e suolo+piante) e per un aumento della concentrazione di azoto nitrico a 300 mg kg<sup>-1</sup> di cumarina, rispetto al controllo, in presenza di piante. Analogamente la biomassa microbica totale (Fig. 4.20), la mineralizzazione dell'azoto (Fig. 4.22), la nitrificazione (dati non mostrati), la nitrificazione potenziale (Fig. 4.23) e l'attività  $\beta$  - glucosamminidasi (Fig. 4.25) non sono risultate influenzate dalla cumarina a nessuna dose considerata, e addirittura la respirazione potenziale (Fig. 4.24) è risultata significativamente maggiore nei suoli trattati con cumarina rispetto al controllo, nei vasetti contenenti solo suolo. Al contrario la componente fungina ha risentito negativamente della presenza di cumarina alle dosi maggiori (200 e 300 mg kg<sup>-1</sup>), anche se le differenze sono risultate significative solo alla dose di cumarina di 200 mg kg<sup>-1</sup> nella condizione suolo+pianta (Fig. 4.21). Infatti la quantità di micelio fungino è risultata negativamente correlata alla quantità di cumarina nel suolo sia in assenza di piante ( $r=-0,58$ ;  $n= 20$ ;  $P<0.01$ ) che in presenza di piante ( $r=-0.52$ ;  $n=20$ ;  $P<0.05$ ).

Ojala e collaboratori (2000) hanno riportato una bassa attività antibatterica e antifungina di estratti di piante della famiglia delle Apiaceae e delle Rutaceae contenenti composti cumarinici, tra cui la cumarina stessa, ad eccezione dell'effetto inibitorio osservato nei confronti del fungo fitopatogeno *Fusarium culmorum*. L'effetto antifungino della cumarina e di suoi derivati è confermato anche da Brooker e collaboratori (2007) che hanno notato che composti alogenati della cumarina inibiscono, per oltre tre settimane dall'inizio del trattamento, la crescita in vitro dei funghi fitopatogeni *Macrophomina phaseolina* e *Pythium* spp. In un altro studio Brooker e collaboratori (2008) hanno dimostrato che i composti alogenati della cumarina manifestavano un effetto tossico su alcune specie di funghi (*Macrophomina phaseolina*, *Phytophthora* spp., *Rhizoctonia* spp. e *Pythium* spp.) maggiore della cumarina semplice, osservando una LD100 (Dose letale per il 100 % della popolazione) già a piccole dosi di questi composti. Anche Razavi e collaboratori (2010) hanno osservato che un altro derivato della cumarina (7-prenyloxycoumarin) manifestava effetti tossici contro il fungo fitopatogeno *Sclerotinia sclerotiorum*.

In un esperimento effettuato da Roca et al. (dati non pubblicati) è stato osservato un effetto temporaneo della cumarina sul fungo *Trametes versicolor*, responsabile della carie bianca, che ha presentato una riduzione della crescita 10 giorni dopo il trattamento con cumarina, con effetto tanto più marcato quanto più concentrata era la soluzione di cumarina; tuttavia dopo quattro mesi la colonia aveva completamente occupato le piastre, indipendentemente dalla dose di cumarina. Luo et al. (2007) non hanno osservato effetti negativi della cumarina, aggiunta in quantità di circa 300 mg kg<sup>-1</sup>, sulla struttura della comunità microbica, valutata in termini di profilo degli acidi grassi dei fosfolipidi (PLFA, phospholipid fatty acids profile) né su suoli ricchi di sostanza organica né su suoli poveri. Per quanto riguarda la mesofauna del suolo, i dati hanno mostrato una diminuzione delle forme euedafiche non accidentali (almeno 3 per trattamento) (Fig. 4.26). Va sottolineato che le forme euedafiche sono comunque poco rappresentate in questo suolo (3-4 taxa). Va anche sottolineato che in tutti i suoli i valori di QBS-ar sono risultati più bassi che nel precedente esperimento, condotto, come si è detto, sullo stesso suolo.

Tab. 4.16 – Valori medi ( $\pm$  deviazioni standard) delle caratteristiche chimiche del suolo sottoposto a diversi trattamenti con cumarina.

Parametri	Condizione sperimentale	Concentrazione cumarina (mg kg <sup>-1</sup> p.s.)			
		0	100	200	300
pH	suolo	7.08 ( $\pm$ 0.13)	7.14 ( $\pm$ 0.07)	7.09 ( $\pm$ 0.13)	7.10 ( $\pm$ 0.11)
	suolo + piante	7.08 ( $\pm$ 0.17)	7.17 ( $\pm$ 0.10)	6.99 ( $\pm$ 0.10)	7.10 ( $\pm$ 0.10)
Conducibilità elettrica (dS m <sup>-1</sup> )	suolo	0.51 ( $\pm$ 0.08)	0.61 ( $\pm$ 0.06)	0.58 ( $\pm$ 0.06)	0.49 ( $\pm$ 0.08)
	suolo + piante	0.55 ( $\pm$ 0.06)	0.52 ( $\pm$ 0.12)	0.50 ( $\pm$ 0.02)	0.51 ( $\pm$ 0.09)
Carbonio organico estraibile (g kg <sup>-1</sup> )	suolo	0.17 ( $\pm$ 0.08)	0.21 ( $\pm$ 0.07)	0.21 ( $\pm$ 0.07)	0.21 ( $\pm$ 0.11)
	suolo + piante	0.14 ( $\pm$ 0.08)	0.21 ( $\pm$ 0.07)	0.22 ( $\pm$ 0.06)	0.19 ( $\pm$ 0.11)
N- NH <sub>4</sub> (μg g <sup>-1</sup> d.s.)	suolo	2.01 ( $\pm$ 0.09) <sup>a</sup>	2.55 ( $\pm$ 0.34) <sup>b</sup>	2.95 ( $\pm$ 0.45) <sup>ab</sup>	3.24 ( $\pm$ 0.34) <sup>ab</sup>
	suolo + piante	2.67 ( $\pm$ 0.50) <sup>a</sup>	3.84 ( $\pm$ 0.77) <sup>b</sup>	3.19 ( $\pm$ 0.45) <sup>b</sup>	3.25 ( $\pm$ 0.35) <sup>b</sup>
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (μg g <sup>-1</sup> d.s.)	suolo	38.28 ( $\pm$ 10.30)	54.22 ( $\pm$ 14.66)	51.09 ( $\pm$ 16.15)	37.11 ( $\pm$ 13.03)
	suolo + piante	54.20 ( $\pm$ 12.63) <sup>a</sup>	62.93 ( $\pm$ 27.13) <sup>a</sup>	55.69 ( $\pm$ 15.94) <sup>a</sup>	171.29 ( $\pm$ 6.55) <sup>b</sup>

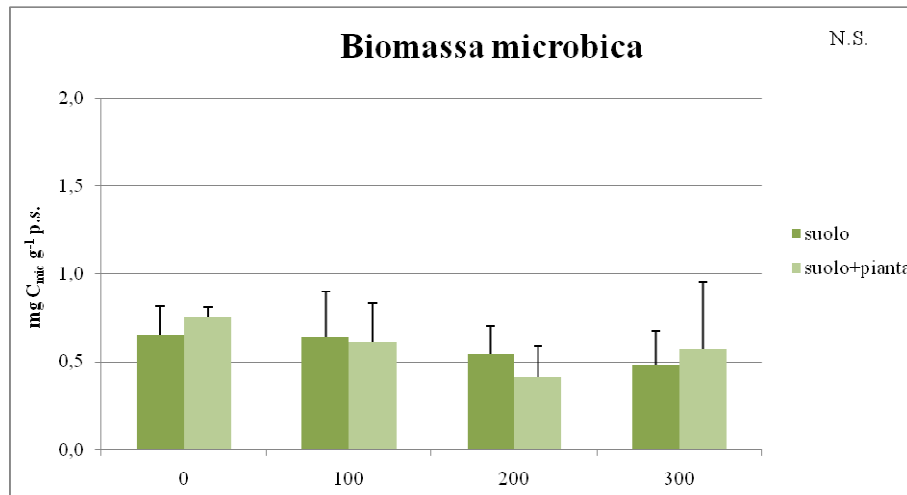


Fig. 4.20 - Effetto del trattamento con dosi crescenti di cumarina (0, 100,200, 300 mg kg<sup>-1</sup>) sulla biomassa microbica del suolo (C<sub>mic</sub>) misurata 29 giorni dopo il trattamento sia in presenza che in assenza di piante. N.S.: differenze non significative tra i trattamenti.

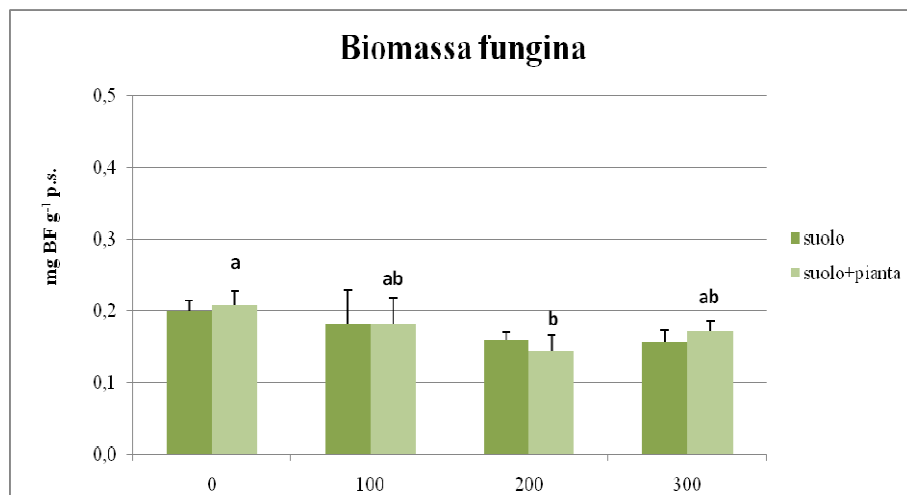


Fig. 4.21 - Effetto del trattamento con dosi crescenti di cumarina (0, 100,200, 300 mg kg<sup>-1</sup>) sulla biomassa fungina del suolo misurata 29 giorni dopo il trattamento sia in presenza che in assenza di piante. Lettere diverse sulle barre indicano differenze significative (P<0.05) tra i trattamenti, saggiate mediante Student-Newman-Keul test.

a

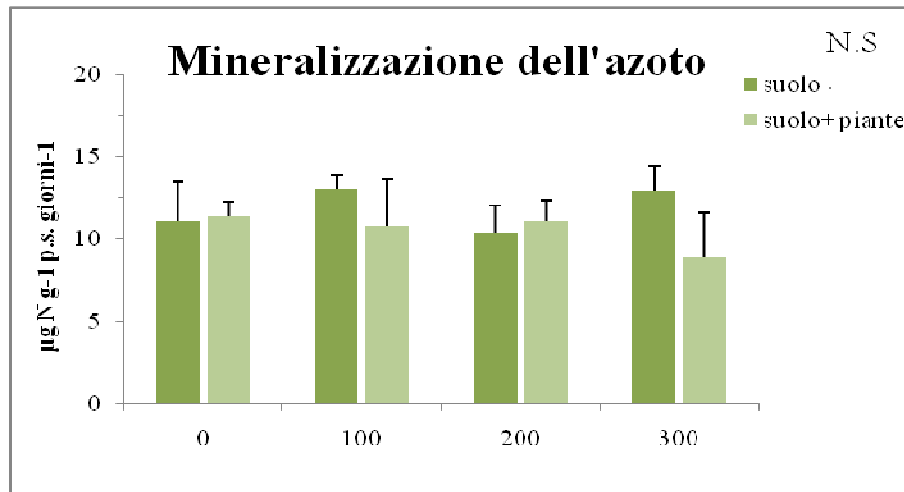


Fig. 4.22 - Effetto del trattamento con dosi crescenti di cumarina (0, 100,200, 300 mg kg<sup>-1</sup>) sulla mineralizzazione dell'azoto misurata 29 giorni dopo il trattamento sia in presenza che in assenza di piante. N.S.: differenze non significative tra i trattamenti.

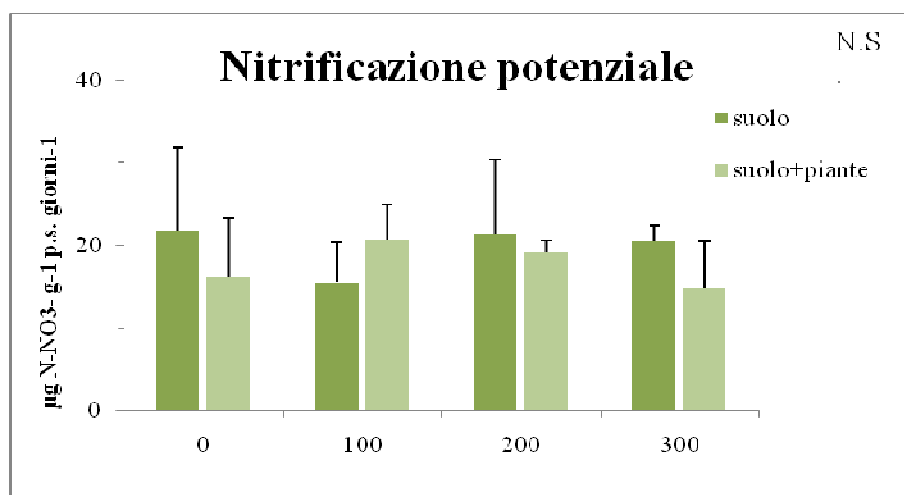


Fig. 4.23 - Effetto del trattamento con dosi crescenti di cumarina (0, 100,200, 300 mg kg<sup>-1</sup>) sulla nitrificazione potenziale del suolo misurata 29 giorni dopo il trattamento sia in presenza che in assenza di piante. N.S.: differenze non significative tra i trattamenti.

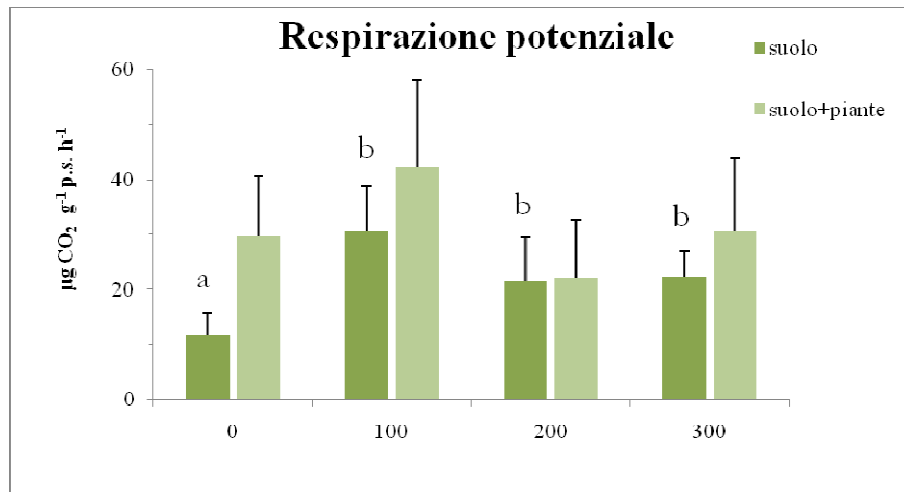


Fig. 4.24 - Effetto del trattamento con dosi crescenti di cumarina (0, 100,200, 300 mg kg<sup>-1</sup>) sulla respirazione potenziale del suolo misurata 29 giorni dopo il trattamento sia in presenza che in assenza di piante. Lettere diverse sulle barre indicano differenze significative (P<0.05) tra i trattamenti, saggiate mediante Student-Newman-Keul test.

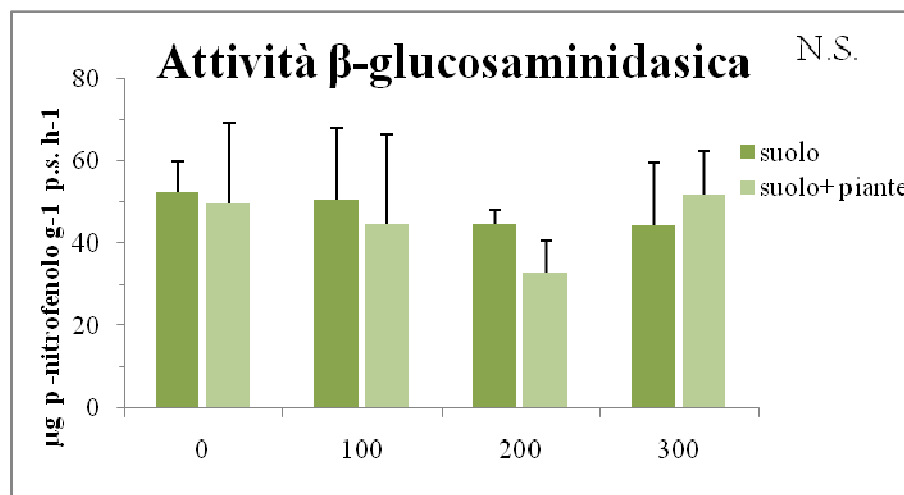


Fig. 4.25 - Effetto del trattamento con dosi crescenti di cumarina (0, 100,200, 300 mg kg<sup>-1</sup>) sull'attività β - glucosamminidasi del suolo misurata 29 giorni dopo il trattamento sia in presenza che in assenza di piante. N.S.: differenze non significative tra i trattamenti.

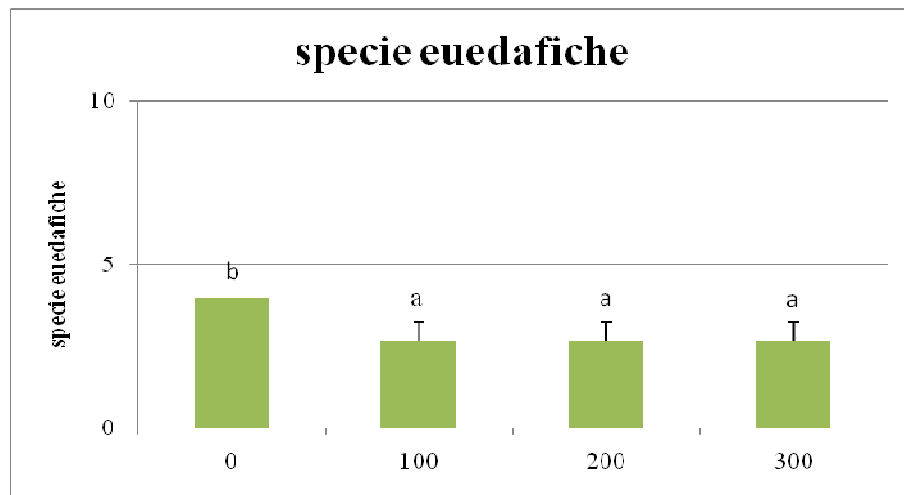
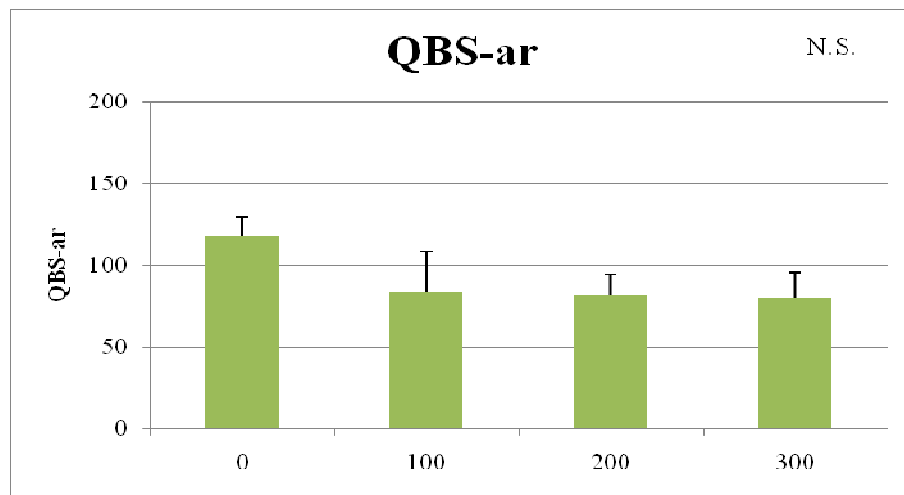


Fig. 4.26 - Effetto del trattamento con dosi crescenti di cumarina (0, 100, 200, 300 mg kg<sup>-1</sup>) sull'indice QBS-ar e sul numero di forme euedafiche non accidentali. Ogni valore rappresenta la media di tre repliche ( $\pm$  deviazione standard).

I profili DGGE o impronte genetiche (genetic fingerprinting) delle comunità batterica (16S rDNA PCR-DGGE) e fungina (18S rDNA PCR-DGGE) sono mostrati, rispettivamente, nelle Figure 4.27 e 4.28.

L'assunzione su cui si basa l'analisi DGGE è che ogni banda dell'impronta genetica corrisponde ad un unico gruppo di batteri o funghi (Schäfer e Muyzer, 2001), infatti questo sistema è in grado di separare in bande diverse frammenti che differiscono anche solo per una coppia di basi. Dall'analisi delle immagini acquisite sono stati ricavati il numero (richness) e l'area (intensità) delle bande, l'intensità totale delle bande per ogni impronta; tali informazioni possono quindi essere sottoposte ad un'analisi numerica per valutare le differenze tra le impronte genetiche ottenute per ogni campione (Schäfer e Muyzer, 2001). La prima fase dell'analisi è stata quella di riconoscere tutte le bande che si sono separate durante la corsa elettroforetica. Questa non è una fase banale in quanto la valutazione visiva delle bande è molto soggettiva, poiché, non tutte le bande appaiono nitide allo stesso modo. Quindi anche se alcuni autori (Ferrari e Hollibaugh, 1999) ritengono che l'individuazione visiva delle bande del gel sia il miglior tipo di analisi, per eliminare la soggettività della valutazione, è preferibile che questa sia supportata da un'analisi delle immagini mediante software specifici. Per tale motivo si è deciso di procedere mediante l'uso del software ImageJ 1.45m, che converte le diverse tonalità di grigio in valori di densità ottica non calibrati, facilitando, in tal modo, l'individuazione di tutte le bande che si sono separate durante la corsa elettroforetica per ogni campione.

Come si può osservare dalle figure 4.29 e 4.32, i trattamenti con cumarina hanno causato, nella condizione sperimentale "suolo", una riduzione della ricchezza di gruppi batterici e fungini, rispetto al controllo. Al contrario nella condizione "suolo+piante" i gruppi fungini sono apparsi più numerosi nei suoli trattati con le dosi maggiori di cumarina (200 e 300 mg kg<sup>-1</sup>) (Fig. 4.32) e nelle stesse condizioni è risultata significativamente aumentata anche l'intensità totale delle bande (Fig. 4.33) e la diversità fungina, come dimostrato dall'indice di Simpson (Fig. 4.34).

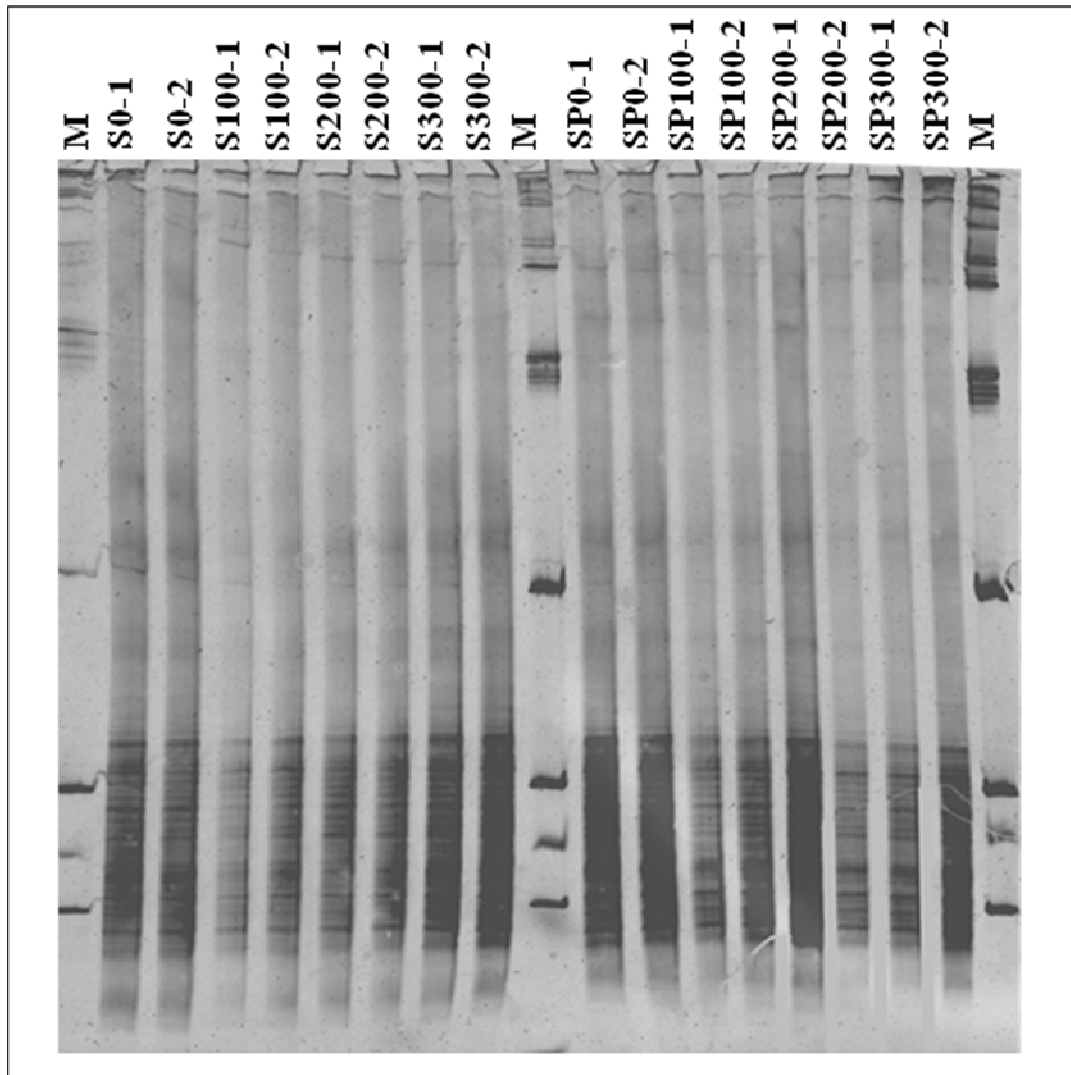


Fig. 4.27 - Impronte genetiche delle comunità batteriche relative a campioni di suolo soggetti a diversi trattamenti con cumarina (0, 100, 200, 300 mg kg<sup>-1</sup>) nelle due diverse condizioni sperimentali: suolo (S0, S100, S200, S300) e suolo+piante (SP0, SP100, SP200, SP300). Per ogni trattamento e per ogni condizione sperimentale sono state effettuate 2 corse su gel di poliacrilammide (indicate con 1 e 2). M: marker Mass Ruler DNA Ladder Mix.



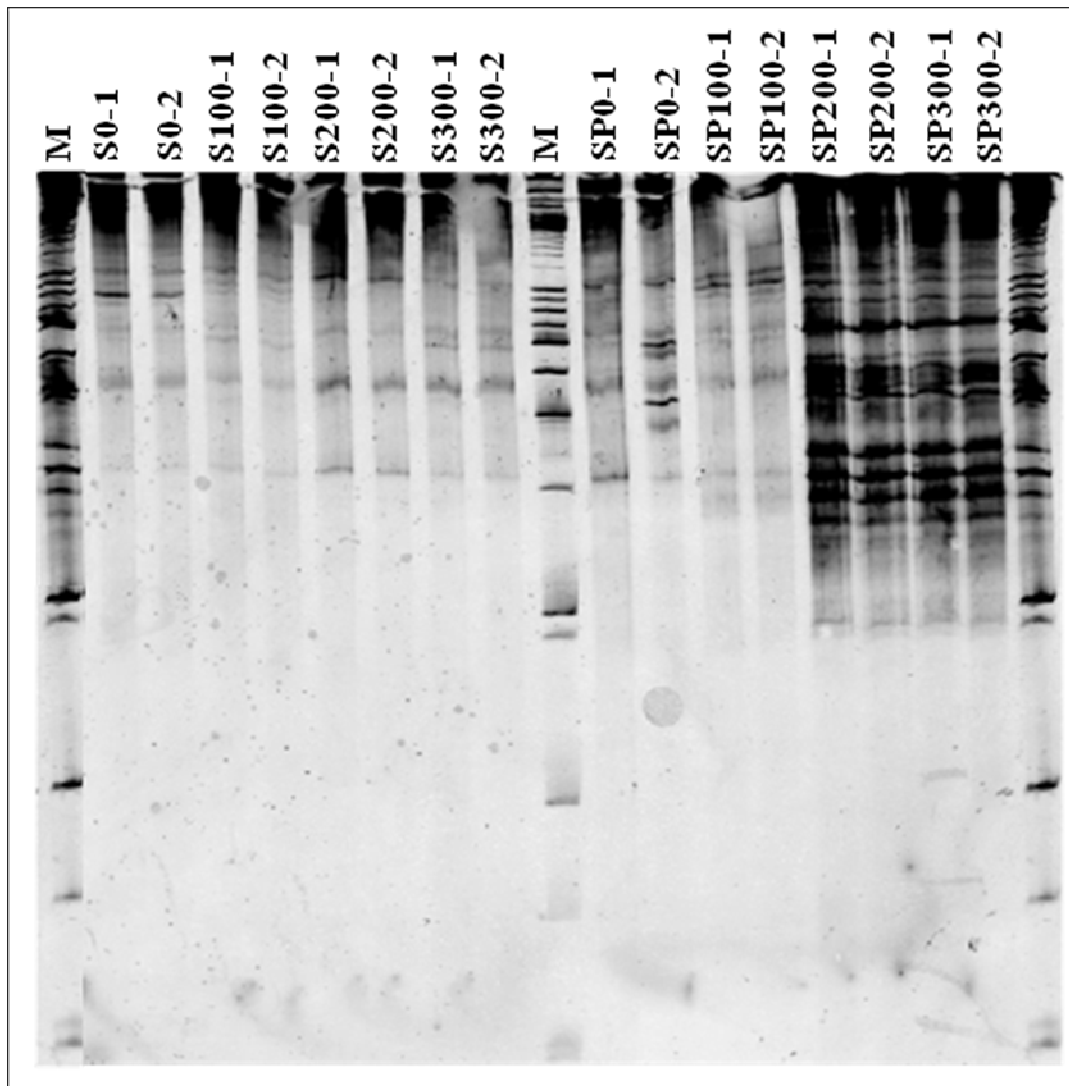


Fig. 4.28 - Impronte genetiche delle comunità fungine relative a campioni di suolo soggetti a diversi trattamenti con cumarina (0, 100, 200, 300 mg kg<sup>-1</sup>) nelle due diverse condizioni sperimentali: suolo (S0, S100, S200, S300) e suolo+piante (SP0, SP100, SP200, SP300). Per ogni trattamento e per ogni condizione sperimentale sono state effettuate 2 corse su gel di poliaccrilammide (indicate con 1 e 2). M: marker Mass Ruler DNA Ladder Mix.

## Gruppi batterici

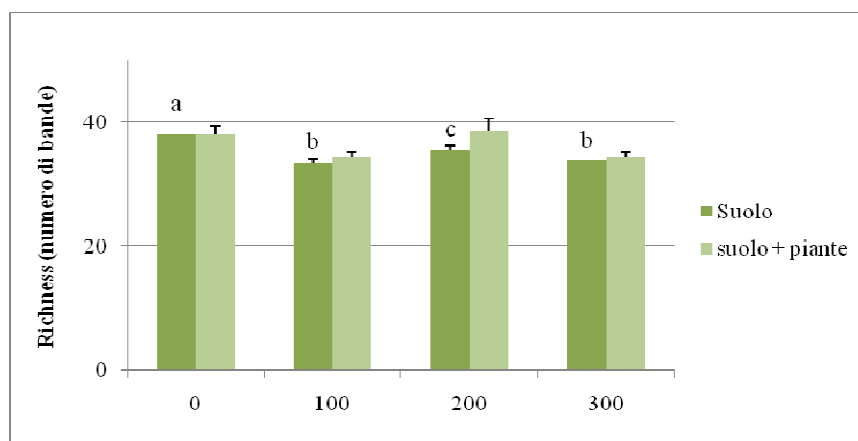


Fig. 4.29 – Richness (numero di bande) rilevata nella comunità batterica del suolo nelle due condizioni sperimentali (suolo e suolo + piante) e nei diversi trattamenti con cumarina.

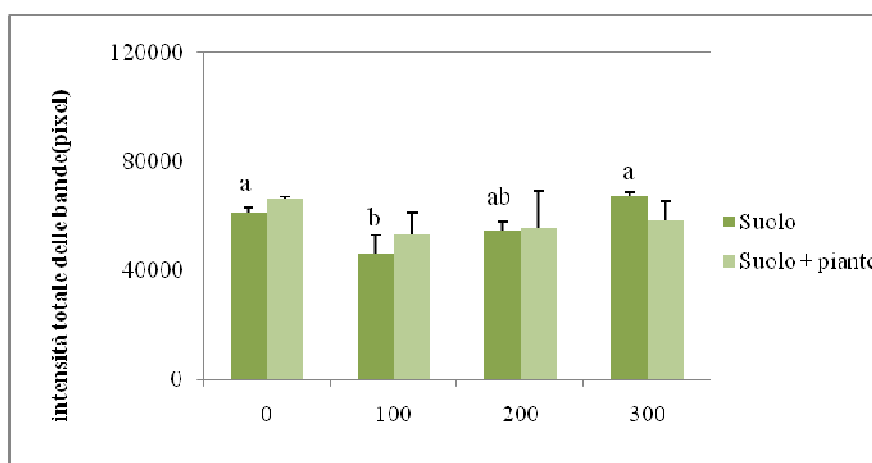


Fig. 4.30 – Intensità totale delle bande ricavata dall'impronta genetica della comunità batterica del suolo nelle due condizioni sperimentali (suolo e suolo + piante) e nei diversi trattamenti con cumarina.

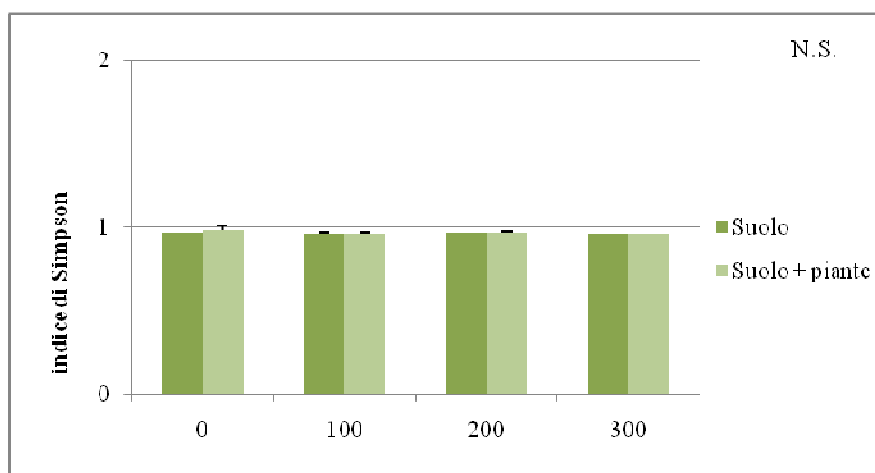


Fig. 4.31 – Indice di Simpson calcolato per la comunità batterica del suolo nelle due condizioni sperimentali (suolo e suolo + piante) e nei diversi trattamenti con cumarina.

## Gruppi fungini

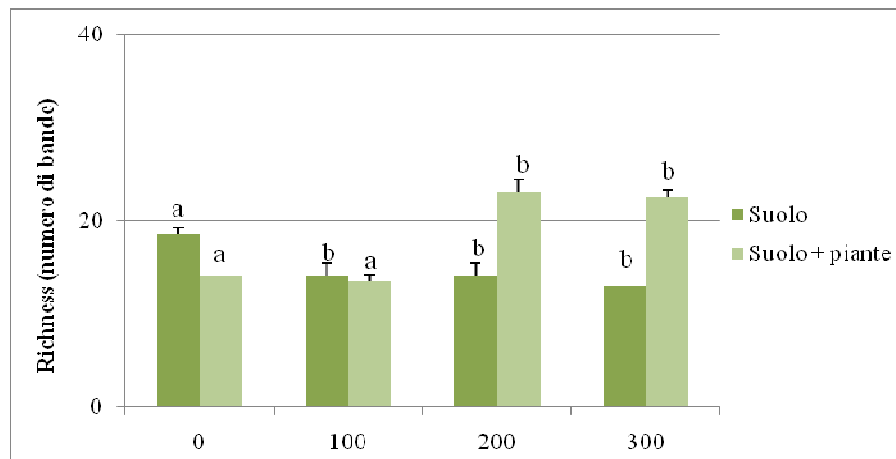


Fig. 4.32 – Richness (numero di bande) rilevata nella comunità fungina del suolo nelle due condizioni sperimentali (suolo e suolo + piante) e nei diversi trattamenti con cumarina.

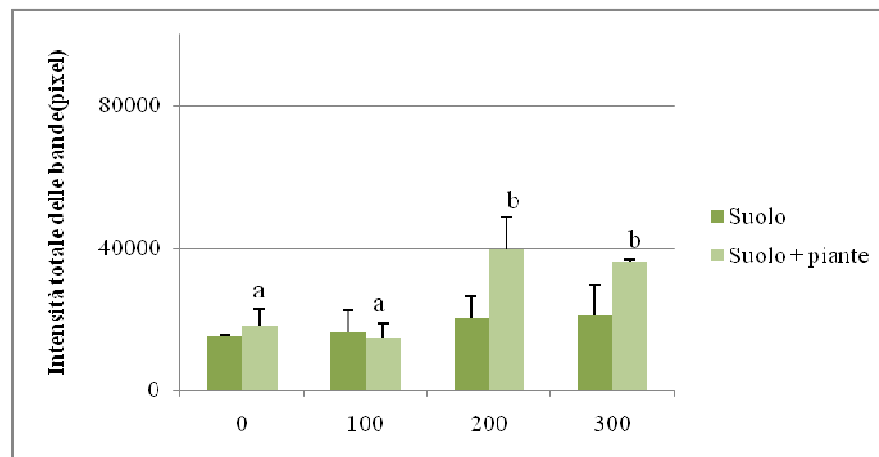


Fig. 4.33 – Intensità totale delle bande ricavata dall'impronta genetica della comunità fungina del suolo nelle due condizioni sperimentali (suolo e suolo + piante) e nei diversi trattamenti con cumarina.

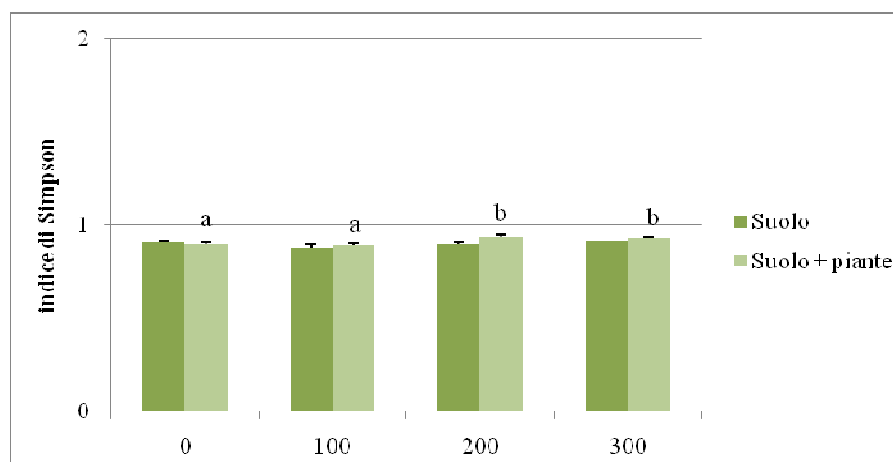


Fig. 4.34 – Indice di Simpson calcolato per la comunità fungina del suolo nelle due condizioni sperimentali (suolo e suolo + piante) e nei diversi trattamenti con cumarina.

## CAPITOLO 5

### CONCLUSIONI

Questo è il primo studio che ha valutato, simultaneamente, l'effetto di un potenziale erbicida naturale non solo su una pianta infestante, ma anche su piante non bersaglio e sulla comunità biotica del suolo.

Dai risultati di questo studio è emerso un effetto allelopatico, sebbene debole, della cumarina su avena, e un effetto positivo sul grano, almeno fino alle dosi di 100 e 150 mg kg<sup>-1</sup> (rispettivamente, secondo e primo esperimento). A dosi maggiori di cumarina (200 e 300 mg kg<sup>-1</sup>) l'effetto negativo su avena è risultato più marcato, ma in tali condizioni anche il grano ha risentito negativamente del trattamento. Pertanto l'intervallo 100-150 mg kg<sup>-1</sup> di cumarina non può essere superato per il trattamento contro l'avena per evitare di compromettere anche la crescita del grano.

L'ipotesi che l'effetto positivo della cumarina sul grano possa rendere quest'ultimo un migliore competitore nei confronti dell'avena, in coltura mista, con conseguenze negative sulla crescita di questa infestante è stata confermata solo nel caso della crescita in peso del germoglio di avena.

Per quanto riguarda il suolo è emerso un effetto poco rilevante della cumarina sulla comunità microbica complessiva del suolo utilizzato, infatti la maggior parte dei parametri biologici analizzati (biomassa microbica, respirazione, attività legate al ciclo dell'azoto) non è risultata negativamente influenzata dal trattamento, e addirittura la respirazione è risultata incrementata nel sistema solo suolo del secondo esperimento. Anche la diversità fungina e l'intensità delle bande individuate nell'impronta genetica della comunità fungina sono risultate favorite dal trattamento con cumarina nella condizione "suolo+piante".

Un effetto negativo è stato invece osservato per il micelio fungino, alle dosi maggiori di cumarina (200 e 300 mg kg<sup>-1</sup>), e per la ricchezza di gruppi batterici e fungini e per le forme euedafiche dei microartropodi del suolo, a tutte le dosi di cumarina nella condizione "suolo". Va sottolineato che le forme euedafiche erano, in ogni caso, poco rappresentate (3-4 specie).

Non sono stati generalmente riscontrati effetti negativi per tutti i parametri analizzati alla concentrazione di 100 mg kg<sup>-1</sup> per entrambe le condizioni sperimentali, ad eccezione che per la ricchezza in gruppi batterici e fungini, in assenza di piante, e per le forme

euedafiche. Considerando che la condizione sperimentale “suolo” è meno realistica della condizione “suolo+piante”, nella quale non sono stati osservati tali effetti negativi, si può concludere che la dose di 100 mg kg<sup>-1</sup> risulta accettabile e potrebbe essere applicata al suolo senza rischi per la comunità edafica. Inoltre il primo esperimento consente di escludere un effetto negativo persistente sulla comunità biotica del suolo anche alla dose di 150 mg kg<sup>-1</sup>. Tuttavia, sono necessari studi più approfonditi per saggiare l’effetto della cumarina sulla fauna del suolo, dal momento che il QBS-ar fornisce solo dati indicativi. Ulteriori studi, inoltre, sono indispensabili per comprendere in che modo si possa migliorare l’efficacia della cumarina sull’infestante, non superando l’intervallo di concentrazione di 100-150 mg kg<sup>-1</sup>. Per esempio si può saggiare l’efficacia dell’intero estratto di *M. neapolitana*, piuttosto che della sola cumarina, o della lettiera della pianta stessa.

## BIBLIOGRAFIA

- Abbas H. K., Duke O. S., 1997. Plant pathogens and their phytotoxins as herbicides. In Upadhyay R.K., Mukerji K.G. (Eds.), *Toxins in plant disease development and evolving biotechnology*. Oxford and IBH Publishing Private limited company New Daly, Calcutta, pp. 1-20.
- Agnelli A., Ascher J., Corti G., Ceccherini M.T., Nannipieri P., Pietramellara G., 2004. Distribution of microbial communities in a forest soil profile investigated by microbial biomass, soil respiration and DGGE of total and extracellular DNA. *Soil Biology & Biochemistry* **36**: 859-868.
- Aktar Md. W., Sengupta D., Chowdhury A., 2009. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology* **2**(1): 1–12.
- Allen S.E., 1989. *Chemical analysis of ecological materials*. Blackwell Scientific Publications.
- Alpi A., Pupillo P., Rigano C., 2000. *Fisiologia delle piante*. Edises.
- Anderson I. C., Cairney J.W. G., 2004. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Environmental Microbiology* **6**: 769–779.
- Anderson J.P.E., Domsch K.H., 1978. A physiological method for the quantification measurements of microbial biomass in soil. *Soil & biochemistry* **10**: 215-221.
- Avers C.J., Goodwin R.H., 1956. Studies on root IV. Effects of coumarin and scopoletin on the standard root growth pattern of *Phleum pratense*. *American Journal of Botany* **43**: 61-620.
- Berg B., Wessèn B., 1984. Changes in organic-chemical components and in growth of fungal mycelium in decomposing birch leaf as compared to pine needles. *Pedobiologia* **26**: 258-296.
- Bertin C., Yang X., Weston L. A., 2003. The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant and Soil* **256**: 67-83.
- Bielka H., Dixon H.B.F., Karlson P., Lieâbecq C., Sharon N., Van Lenten S.F., Velick S.G., Vliegthart J.F.G., Webb E.C., 1984. *Enzyme Nomenclature*. Academic Press, New York.

- Bird S.B., Coulson R.N., Fischer R.F., 2004. Change in soil and litter arthropods abundance following tree harvesting and site preparation in a loblolly pine (*Pinus taeda* L.) plantation. *Forest Ecology and Management* **202**: 195–208.
- Bhowmik P.C., Inderjit, 2003. Challenges and opportunities in implementing allelopathy for natural weed management. *Crop Protection* **22**: 661-671.
- Bode H. R., 1958. Allelopathy in some Juglandaceae. *Planta* **51**: 440-80.
- Bossio D.A., Scow K.M., Gunapal K.J., 1998. Determinants of soil microbial communities: effects of agriculture management, season and soil type on phospholipids fatty acid profile. *Microbial Ecology* **36**: 1-12.
- Bourgau F., Gravot A., Milesi S., Gontier E., 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science* **161**: 839-851.
- Brim H., Heyndrickx M., De Vos P., Wilmotte A., Sparingael D., Schlegel H.G., Mergeay M., 1999. Amplified r DNA restriction analysis and further genomic characterization of metal-resistant soil bacteria and related facultative hydrogenotrophs. *Systematic and Applied Microbiology* **22**: 258-268.
- Brinkhoff T., Muyzer G., 1997. Increased species diversity and extended habitat range of sulfur-oxidizing *Thiomicrospira* spp. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 3789-3796.
- Brodie E., Edwards S., Clipson N., 2003. Soil fungal community structure in a temperate upland grassland soil. *Microbiology Ecology* **45**: 105-114.
- Brooker N., Windorski J., Bluml E., 2008. Halogenated coumarin derivatives as novel seed protectants. *Communication in Agricultural and Applied Biological Sciences* **73**: 81-9.
- Brooker N.L., Kuzimichev Y., Laas J., Pavlis L., 2007. Evaluation of coumarin derivatives as anti-fungal agents soil-borne fungal pathogens. *Communication in Agricultural and Applied Biological Sciences* **72**: 785-793.
- Brosius J., Palmer M.L., Kennedy P.J., Noler H.F., 1978. Complete and nitrate leaching in an oxisols of the Brazilian Amazon. *Agronomy Journal* **85**: 334-340.
- Castaldi S., Carfora A., Fiorentino A., Natale A., Messere A., Miglietta F., Cotrufo M.F., 2009. Inhibition of net nitrification activity in a Mediterranean woodland: possible role of chemicals produced by *Arbutus unedo*. *Plant Soil* **315**: 273-283.
- Chandhoke N., Ghatak B. J., 1975. Pharmacological investigations of angelecina tranquillo sedative and anticonvulsant agent. *Indian Journal of Medical Research* **63** (6): 833-41.

- Chon S. U., Kim Y. M., 2004. Herbicidal potential and quantification of suspected allelochemicals from four grass crop extracts. *Journal of Agronomy and Crop Science* **190**: 145–150.
- Chou C.H., 1990. In: Gliessman S.R. ed. 1990. *Agroecology: researching the ecological basis for sustainable agriculture*. Ecological Studies n. 78. Springer –Vergal. Berlin. 105-121.
- Chrispeels M.J., Sadava D.E., 1994. *Plants, genes, and agriculture*. Jones and Bartlett Publishers.
- Chrispeels M.J., Sadava D., 1996. *Biologia vegetale applicata (piante, geni e agricoltura)*. Piccin-Nuova Libreria.
- De Filipe M.R., Fernandez – Pascual M., Pozuelo J. M., 1987. Effects of the erbicides Lindex and Simazine on chloroplast and nodule development, nodule activity, and grain yield in *Lupinus albus* L. *Plant and Soil* **101**: 99-105.
- Degens B.P., 1998. Microbial function diversity can be influenced by the composition of simple organic substrates added to soil. *Soil Biology & Biochemistry* **30**: 1981-1988.
- Degens B.P., Schipper L.A., Sparling G.P., Vukovic M.V., 2000. Decreases in organic C reserves in soil can reduce the catabolic diversity of soil microbial communities. *Soil Biology & Biochemistry* **32**: 189-196.
- Del Morl R., Muller C. H., 1970. Allelopathic effect of *Eucalyptus camaldulensis*. *The American Midland Naturalist* **83**(1): 254-282.
- Dias L.S., Pereira I.P., Dias A.S., 1995. Evaluation of Mediterranean-type vegetation for weedicide activity. *Allelopathy Journal* **2**: 197–204.
- Dick R.P., 1994. Soil enzyme activities as indicators of soil quality. In: Doran J.W., Leman D.C., Bezdicek D.F., Stewart B.A., SSSA (eds) *Defining soil quality for sustainability environment*. Proceeding of a symposium, Minneapolis, MN, 4-5 November 1992, pp. 107-124.
- di Gennaro, A., 2002. *I Sistemi di Terre della Campania*. S.EL.CA., Firenze.
- Dolara P., 1997. *Tossicologia generale e ambientale*. PICCIN.
- Doran J.W., Zeiss M.R., 2000. Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. *Applied Soil Ecology* **15**: 3-11.
- Dornbos D. L., Spencer G. F. 1990. Natural products phytotoxicity—A bioassay suitable for small quantities of slightly water-soluble compounds. *Journal of Chemical Ecology* **16**: 339–352.



- Drew E.A., Gupta V.V.S.R., Roget D.K., 2007. Herbicide use, productivity, and nitrogen fixation in field pea ( *Pisum Stivum* ) Australian Journal of agricultural Research, **58**: 1204-1214.
- Duncan S.H., Flint H.J., Stewart C.S., 1998. Inhibitory activity of gut bacteria against *Escherichia coli* O157 mediated by dietary plant metabolites. FEMS Microbiol Letters; 164 (2): 283-8.
- Edwards C.A. & Lofty J.R., 1977. Biology of Earthworms, 2nd Ed. h& Hall, London.
- Ekenler M., Tabatabai M. A., 2002.  $\beta$ -Glucosaminidase activity of soils: effect of cropping systems and its relationship to nitrogen mineralization. Biology and Fertility of Soils **36**: 367–376.
- Esposito A, Strumia S, Castaldo-Cobianchi R, Mazzoleni S., 1998. Analysis of Bryophyte dynamics after fires of pine woodlands and Mediterranean macchia, Southern Italy. In: Trabaud L, editor. Fire management and landscape ecology. Fairfield (WA): International Association Wildland Fire: 77-85.
- Esposito A., Fiorentino A., D'Abrosca B., Izzo A., Cefarelli G, Golino A., Monaco P., 2008. Potential allelopathic interference of *Melilotus neapolitana* metabolites on three coexisting species of Mediterranean herbaceous plant community. Journal of Plant Interactions **3**: 199-210.
- Ferrari V.C., Hollibaugh J.T., 1999. Distribution of microbial assemblages in the central Arctic ocean basin studied by PCR/DGGE: analysis of a large data set. Hydrobiologia **401**: 55-68.
- Ferris M.J., Muyzer G., Ward D.M., 1996. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S r RNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. Applied and Environmental Microbiology, **62**: 340-346.
- Fiorentino A., D'Abrosca B., Della Greca, M., Izzo A., Pascarella M.T., Pacifico S., Barelli A., Monaco P., 2008. Chemical characterization of new oxylipids from *Cestrum parqui* and their effects on seed germination and early seedling growth. Chemistry & Biodiversity **5**: 1780-1791.
- Fiorentino A., D'Ambrosca B., Esposito A., Izzo A., D'Angelo G., Pascarella M. T, Monaco P., 2009. Potential allelopathic effect of neo-clerodane diterpenes from *Teurium chamaedrys* (L.) on stenomediterranean and weed cosmopolitan species. Biochemical Systematics and Ecology **37**: 349-353.
- Florenzano G., 1983. Fondamenti di microbiologia del terreno. Reda.

- Garland J.L., Mills A.L., 1991. Classification of heterotrophic communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization *Applied and Environmental Microbiology* **57**: 2351-2359.
- Gibson D.T., Yeh, E. K., 1973. Microbial degradation of aromatic hydrocarbons. *The Microbial Degradation of Oil Pollutants*. Ed. By Aheam, D.G., Meyers, S.P. Louisiana State University. Baton Rouge, LA. Publication No. LSU Student Government, 7341. 33-38.
- Giller K.E., Beare M.H., Lavelle P., Izac A.M.N., Swift M.J., 1997. Agricultural intensification, soil biodiversity and agroeco system function. *Applied Soil Ecology* **6**: 3-16.
- Goodwin R.H., Taves C., 1950. The effect of coumarin derivativs on tha growth of Avena roots. *American Journal of Botany* **37**: 224-231.
- Govaerts R., 2003. How many species of seed plants are there? A response. *Taxon* **3**: 583-589.
- Haig T.J., Haig T.J., Seal A.N., Pratley J.E., An M., Wu H., 2009. Lavender as a Source of Novel Plant Compounds for the Development of a Natural Herbicide. *Journal of Chemical Ecology* **35**: 1129–1136.
- Hara M., Umetsu N., Miyamoto C., Tamari K., 1973. Inhibition of the biosynthesis of plant cell wall materials, especially cellulose biosynthesis by coumarin. *Plant Cell Physiol.* **14**:11–28.
- Harborne J.B., 1993. *Introduction to ecological Biochemistry*, Academic Press, 1989; *Adv. Chemical Ecology in Natural Product Rep.* 10, 327-335.
- Head I.M., Saunders J.R., Pickup R.W., 1998. Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal analysis of uncultivated microorganisms. *Microbial Ecology* **35**: 1-21.
- Hendrix P.F., Crossley D.A. Jr., Coleman D.C., Parmelee R.W., Beare M.H., 1987. Carbon dynamics in soil microbes and fauna in conventional and no-tillage agroecosystems. *INTECOL Bulletin.* 15: 59-63.
- Heuer H., Krsek M., Baker P., Smalla K., Wellington E.M.H., 1997. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of gene encoding 16S rDNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradient. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 3233-3241.
- Hierro J.L., Callaway R.M., 2003. Allelopathy and exotic plant invasion. *Plant and Soil* **256**: 29-39.

- Hill G.T., Mitkowski N.A., Aldrich-Wolfe I., Emele L.R., Jurkonie D.D., Ficke A., Maldonado-Ramirez S., Lynch S.T., Nelson E.B., 2000. Methods for asseing the composition and diversity of soil microbial communities. *Applied Soil Ecology* **15**: 25-36.
- Holland N. T., Duramad P., Rothman N., Figgs L. W., Blair A., Hubbard A., Smith M. T., 2002. Micronucleus frequency and proliferation in human lymphocytes after exposure to herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in vitro and in vivo. *Mutation Research* 521: 165-78.
- Hooper D.C., Wolfson J.S., McHugh G.L., Winters M.B., Swartz M.N., 1982. Effects of Novobiocin, Coumermycin A1, Clorobiocin, and Their Analogs on Escherichia coli DNA Gyrase and Bacterial Growth. *Antimicrobial Agents And Chemothempy* pp. 662-671.
- Hoult J.R.S., Payà M., 1996. Pharmacological and Biochemical Actions of Simple Coumarins: Natural Products with Therapeutic Potential. *General Pharmacology* **27**: 713-722.
- Jacot A.P., 1940. The fauna of the soil. *The Quarterly Review of Biology*, 15, 1
- Kandeler E., 1995(a). N-mineralization under aerobic conditions. In: Schinner F, Kandeler E, Ohlinger R, Margesin R (eds) *Methods in soil biology*. Springer, Heidelberg: 139-141.
- Kandeler E., 1995(b). Nitrification during long term incubation. In: Schinner F, Kandeler E, Ohlinger R, Margesin R (eds) *Methods in soil biology*. Springer, Heidelberg: 149-151.
- Kandeler E, Böhm K.E., 1996. Temporal dynamic of microbial biomass, xylanase activity, N-mineralization and potential nitrification in different tillage system. *Applied Soil Ecology* **5**: 221-230.
- Kelly J.J., Hoggblom M., Tate R.L., 1999. Changes in soil microbial communities over time resulting from one time application of zinc: a laboratory microcosm study. *Soil Biology and Biochemistry* **31**: 1455-1465.
- Khanh T.D., Chung I.M., Tawata S., Xuan T.D., 2006. Weed suppression by *Passiflora edulis* and its potential allelochemicals. *Weed Research Journal*. **46**: 296-303.
- Kieft T. L., White C. S., Loftin S. R., Aguilar R., Craig J. A., Skaar D. A., 1998. Temporal dynamics in soil carbon and nitrogen resources at a grassland-shrubland ecotone. *Ecology* **79**: 671-683.
- Killam K., 1994. *Soil Ecology*. Cambridge University Press.

- Kirk J.L., Beaudette L.A., Hart M., Moutoglis P., Klironomos J.N., Lee H., Trevors J.T., 2004. Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods* **58**: 169-188.
- Knypl J.S., 1964. Coumarin-induced respiration of sunflower. *Physiol. Plantarum* **17**: 771-778.
- Kobayashi K., 2004. *Weed Biology and Management* **4**: 1-7.
- Kohli R.K., Batish D.R., Singh H.P., 2006. Allelopathic interactions in agroecosystems in: Reigosa M. V., Pedrol N., González L. (eds.). *Allelopathy: A Physiological Process with Ecological Implications* Springer, Netherlands, pp. 465-493.
- Konopka A., Oliver L., Turco Jr R.F., 1998. The use of carbon substrate utilization patterns in environmental and ecological microbiology. *Microbial Ecology* **35**: 103-115.
- Kopidlowasa E., Dobrzynska K., Parys E., Zobel A.M., 1994. Effect of coumarin and xanthotoxin on mitochondrial structure, oxygen uptake and succinate dehydrogenase activity in onion root cells. *Journal of Chemical Ecology* **20**: 2471-2480.
- Kössel A., 1891. Über die Chemische Zusammensetzung der Zelle, *Archiv für Physiologie* 181-186.
- Kowalchuk G., 1999. Fungal community analysis using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). In: Akkermans A.D.L., van Elsas J.D., De Bruijn F.J. (Eds.), *Molecular Microbial Ecology Manual*, vol. 3.4.6. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, pp. 1-16.
- Lavelle P., Spain A.V., 2001. *Soil Ecology*. Kluwer Academic Publishers.
- Lemmich J., Havelund S., Thastrup O., 1983. Dihydrofuranocoumarin glycosides from *Angelica archangelica* and *Angelica sylvestris*. *Phytochemistry* **22**: 553-555.
- Lewinshon J., Gijzen M., 2009. Phytochemical diversity: The sounds of silent metabolism. *Plant Science* **176**(2): 161-169.
- Lousier J.E., Bamforth S.S., 1990. Soil protozoa. In *Soil Biology Guide*, 97-136.
- Ludwig W., Schleifer K.H. 1994. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiology Reviews* **15**: 155-173.
- Luo W., D'Angelo E.M., Coyne M.S., 2007. Plant secondary metabolites, biphenyl, and hydroxypropyl-β-cyclodextrin effects on aerobic polychlorinated biphenyl removal and microbial community structure in soils. *Soil Biology & Biochemistry* **39**: 735-743.

- Lupetti P., Malatesta E., Dallai R., 1989. Observations on soil fauna activity and on midgut content of Collembola. In Dallai R., Third International Seminar on Apterygota, University of Siena, Siena, pp. 307-315.
- Lupwayi N.Z, Harker K. N., Clayton G.W., O' Donovan J. T., Blackshaw R.E., 2009. Soil microbial response to herbicides applied to glyphosate-resistant canola. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **129**:171-176.
- Macías F.A., Galindo J.L.G., Galindo J.C.G., 2007. Evolution and current status of ecological phytochemistry. *Phytochemistry* **68**: 2917-2936.
- Macías F.A., Oliveros-Bastidas A., Marin D., Castellano D., Simonet A.M., Molinillo J.M.G., 2005. Degradation Studies on Benzoxazinoids. Soil Degradation Dynamics of (2R)-2-O- $\beta$ -D-Glucopyranosyl-4-hydroxy-(2H)-1,4benzoxazin-3(4H)-one (DIBOA-Glc) and its degradation products, Phytotoxic Allelochemicals from Gramineae". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**(3): 554-561.
- Madigan M.T., Martinko P.J., 2003. Brock. *Biologia dei microrganismi*. Vol.1.
- Magurran A.E., 1988. *Ecological diversity and its measurement*. Croom Helm, London.
- Mallik A., 2008. Allelopathy: Advances, Challenges and Opportunities. *Allelopathy in Sustainable Agriculture and Forestry*, pp. 25-38.
- Mallik A.U., 1995. Conversion of temperate forests into heaths: Role of ecosystem disturbance and ericaceous plants. *Environmental Management* **19**: 675-684.
- Marzaioli R., D'Ascoli R., De Pascale R.A., Rutigliano F.A., 2010. Soil quality in a Mediterranean area of Southern Italy as related to different land use types. *Applied Soil Ecology* **44**: 205–212.
- Menta C., Leoni A., Tarasconi K., Affanni P., 2010. Does compost use affect microarthropod soil communities? *Fresenius Environmental Bulletin* **19**: 2303–2311.
- Menta C., Leoni A., Gardi C., Conti F.D., 2011. Are grasslands important habitats for soil microarthropod conservation? *Biodiversity and Conservation* **20**:1073–1087.
- Miller K., Levine J., 2010. *Biologia. L'evoluzione, la biodiversità e l'ecologia*.
- Miller M., Palojarvi A., Rangger A., Reeslev M., Kjoller A., 1998. The use of florogenic substrate to measure fungal presence and activity in soil. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 613-617.
- Molisch H., 1937. *Der einfluss einer Pflanze auf die andere-Allelopathic*. (Gustav Fischer, Jena).

- Moran M.A., Torsvik V.L., Torsvik T., Hodson R.E., 1993. Direct extraction and purification of rRNA for ecological studies. *Applied and Environmental Microbiology* **59**: 915-918.
- Moreland E.D., Novitzky W.P., 1987. Effects of coumarins and flavonoids on isolated chloroplast and mitochondria, in G. R. Waller (ed.) pp: 247-261. *Allelochemicals: Role in Agriculture and Forestry American Society Series*. American Chemical Society, Washington, DC.
- Muyzer G., Brinkhoff T., Nübel U., Santegoeds C., Schäfer H., Wawer C., 1997. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. In: Akkermans A.D.L., van Elsas J.D. e de Bruijn F.J. (Eds) *Molecular Microbial Ecology Manual* 3.4.4, pp. 1–27. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Muyzer G., de Waal E.C., Uitterlinden A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* **59**: 695-700.
- Muyzer G., Smalla K., 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek* **73**: 127-141.
- Muyzer G., Teske A., Wirsén C.O., Jannasch H.W., 1995. Phylogenetic relationship of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Archives of Microbiology* **164**: 165-172.
- Nakatsu C.H., Torsvik V., Ovreas L., 2000. Soil community analysis using DGGE of 16S rDNA polymerase chain products. *Soil Science Society of America Journal* **64**: 1382-1388.
- Nannipieri P., Ascher J., Ceccherini M.T., Landi L., Pietramellara G., Renella G., 2003. Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science* **54**: 655-670.
- Nübel U., Engelen B., Felske A., Snaird J., Wieshuber A., Amann R.I., Ludwig W., Backhaus, H., 1996. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology* **178**: 5636–5643.
- Odum E.P., 1988. *Basi di ecologia*. Piccin. 345.

- Ojala T., Remes S. , Haansuu P. , Vuorela H., Hiltunen R., Haahtela K., Vuorela P., 2000. Antimicrobial activity of some coumarin containing herbal plants growing in Finland. *Journal of Ethnopharmacology* **73**: 299–305.
- Olson F. C. W., 1950. Quantitative estimates of filamentous algae. *Transaction of the American Microscopy Society* **69**: 272-279.
- Othonen R., Aikio S., Väre H., 1997. Ecological theories in soil biology. *Soil Biology & Biochemistry* **29**: 1613-1619.
- Pace N.R., Stahl D.A., Lane D.J., Olsen G.J., 1986. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. *Advances in Microbial Ecology* **9**: 1–55.
- Parham J.A., Deng S.P., 2000. Detection, quantification and characterization of  $\beta$ -glucosaminidase activity in soil. *Soil Biology and Biochemistry* **32**: 1183-1190.
- Parisi V., 2001. La qualità biologica del suolo. un metodo basato sui microartropodi. *Acta Naturalia de l'Ateneo Parmense* **37**: 97-106.
- Parker L.W., Doxtader K.G., 1983. Kinetics of microbial degradation of 2,4-D in soil: effects of temperature and moisture. *Journal of Environmental Quality* **12**: 553-558.
- Pergo E.M., Abraham D., Da Silva C. P. S., Kern K. A., Da Silva L. J., Voll E., E.L. I. Iwamoto, 2008. *Bidens pilosa* L. Exhibits High Sensitivity to Coumarinin Comparison with Three Other Weed Species. *Journal of Chemical Ecology* **34**: 499-507.
- Pimentel D., Acquay H., Biltonen M., Rice P., Silva M., Nelson J., Lipner V., Giordano S., Horowitz A., D'Amore M., 1992. Environmental and economic costs of pesticide use. *Bioscience* **42**: 750-760
- Podbickowska, M., Kupidłowska E., Waleza M., Dobrzynska K., Louis S. A., Keightley A., Zobel A. M., 1994. Coumarin as antimicrobials. *International Journal of Pharmaceutics* **32**: 262-273.
- Primack R.B., Carotenuto L., 2003. *Conservazione della natura*. Zanichelli.
- Raham A.U., 2000. *Studies in Natural Product Chemistry* **24**: 860-861.
- Razawi S.M., 2011. Plant coumarins as allelopathic agents. *International Journal of Biological Chemistry* **5**: 86-90.
- Razavi S.M., Zarrini G., Zahri S., Mohammedi S., 2010. Biological activity of *Prangos ulaptera*, a medicinal plant from Iran. *Natural Product Research* **24**:797-803.
- Renella G., Mench M., Van der Lelie D., Pietramellara G., Ascher J., Ceccherini M.T., Landi L. and Nanniperi P., 2004. Hydrolase activity, microbial biomass and

- community structure in long-term Cd-contaminated soils. *Soil Biology and Biochemistry* **36**: 443-451.
- Ricciuti S, Cardini C.; Le cumarine. Profilo farmacologico e terapeutico. *Il Policlinico: Sezione pratica* 2004; vol. **111**; numero 4; pag. 181-194.
- Rice E.L., 1964. Inhibition of nitrogen fixing and nitrifying bacteria by seed plants. I. *Ecology* **45**: 824-837.
- Rice E.L., 1965. Inhibition of nitrogen fixing and nitrifying bacteria by seed plants. II. Characterization and identification of inhibitors. *Physiologia Plantarum* **18**: 255-268.
- Rice EL, 1984. Allelopathy, Second Edition. Academic Press, Orlando, FL.
- Rodriguez-Kabana R., Godoy G., Morgan-Jones G., Shelby R.A., 1983. The determination of soil chitinase activity: conditions for assay and ecological studies. *Plant and Soil* **75**: 95-106.
- Rombi M. 1993. 100 piante medicinali. Composizione, meccanismo d'azione ed interesse terapeutico. Ed. Romart.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., 1969. *Molecular Cloning, Second Edition* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. B16.
- Schäfer H., Muyzer G., 2001. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis in Marine Microbial Ecology. In: John Paul ed., *Methods in Microbiology* **30**: 425-468 Academic Press, London.
- Seigler, D. S. 1996. Chemistry and mechanisms of allelopathic interactions. *Agronomy Journal* **88**: 876-885.
- Sharma S.K., Ramesh A., Sharma M.P., Joshi O.P., Govaerts B., Steenwerth K.L., Karlen D.L., 2010. Microbial community structure and diversity as indicator for evaluating soil quality. *Biodiversity, Biofuels, Agroforestry and Conservation Agriculture*, 317 Sustainable Agriculture Reviews 5, E. Lichtfouse (ed.).
- Shaw C.Y., Chen C.H., Hsu C.C., Chen C.C., Tsai Y. C., 2003. Antioxidant properties of scopletin isolated from *Sinomonium acutum*. *Phytotherapy Research* **17**(7): 823-5.
- Smith T.M., Smith R.L., 2007. *Elementi di Ecologia*. Pearson.
- Spignoli G. Mercati V, Boncomagni E. Guida bibliografica ai più noti fitoterapici. Aboca, 1999.
- Springer U., Klee J., 1954. Prüfung der leistungsfähigkeit von einigen wichtigeren Verfahren zur Bestimmung des Kohlenstoffs mittels Chromoschwefelsäure sowie Vorschlag einer Schnellmethode. *Z. Pflanzenernähr. Dung. Bodenk* **64**:1-26.



- Stryer L., 1988. *Biochemistry*, 3<sup>rd</sup> ed. Freeman, New York.
- Svensson S.B., 1972. The effect of coumarin on growth, production of dry matter, protein and nucleic acids in roots of maize and wheat and the interactions of coumarin with metabolic inhibitors. *Physiologia Plantarum* **27**:13-24.
- Swift M.J., Heal O.W., Anderson J.M., 1979. *Decomposition in Terrestrial Ecosystems*. Blackwell University of California Press, Berkeley.
- Tabatabai M.A., Bremner J.M., 1969. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biology and Biochemistry* **1**: 301-307.
- Teske A., Sigalevich P., Cohen Y., Muyzer G., 1996. Molecular identification of bacteria from coculture by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S ribosomal DNA fragments as a tool for isolation in pure cultures. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 4210-4215.
- Tomiyana K., Sakuma T., Ishizaka N., Sato N., Katsui N., Takasugi M., Masamune T., 1968. "New antifungal substance isolated from resistant potato tuber tissue infected by pathogens. *Phytopathology* **58**: 115-122.
- Torsvik V., Daae F.L., Sandaa R., Ovreas L., 1998. Novel techniques for analyzing microbial diversity in natural and perturbed environments. *Journal of Biotechnology* **64**: 53-62.
- Tronzo A., Harman, G.E., 1993. Detection and quantification of N-acetyl-b-D-glucosaminidase, chitinase and endochitinase in solutions and on gels. *Analytical Biochemistry* **208**: 74-79.
- Tu C. M., 1996. Effect of selected on activities of microorganism in soils. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, **31**: 1201-1214.
- Turco R.F., Saowsky M., 1995. The microflora of bioremediation. In: Skipper H.D., Turco R.F. (Eds), *Bioremediation : Science and Application*. Special Publ. No. 43, Soil Science Society of America, Madison, WI, 87-102.
- Uchiyama F., Hatano T., Ito H., Yoshida T., Tanuma S., 2003. Transcriptional suppression of the HIV promoter by natural compounds. *Antiviral Research* **58**(1): 89-98.
- Van Amelsvoort P. A. M.; Van Dongen M.; Van Der Werff P. A, 1988. The impact of Collembola on humification and mineralization of soil organic matter. *Pedobiologia*, **31**(1-2):103-111

- Van Sumere C.F., Cottenie J., De Greef J., Kint J., 1972. Biochemical studies in relation to the possible germination regulatory role of naturally occurring coumarin and phenolic. *Recent Adv. Phytochemistry* **4**: 165-221.
- Vance E. D., Brokes P. C., Jenkinson D. S., 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry* **9**: 703-707.
- Vyvyyan J.R., 2002. Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. *Tetrahedron* **58**: 1631-1646.
- Wardle D.A., Bonner K.I., Nicholson K.S., 1997. Biodiversity and plant litter: experimental evidence which does not support the view that enhanced species richness improves ecosystem function. *Oikos* **79**: 247-258.
- Weston L.A., Duke S. O., 2003. Weeds and crop allelopathy. *Critical Reviews in Plant Sciences* **22**: 367-389.
- White T. J., Burns T., Lee S., Taylor J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innes M A, Gelfand D H, Sninsky J J, White T J, editors; Innes M A, Gelfand D H, Sninsky J J, White T J, editors. *PCR protocols*. San Diego, Calif: Academic Press, pp. 315–322.
- Williams R.D., Peal L.K., Bartholomew P.W., Williams S.J., 2005. Seed hydration-dehydration in an allelochemical coumarin alters germination and seedling growth. *Allelopathy Journal* **15**: 183-196.
- Woese C.R., 1987. Bacterial evolution. *Microbiol Reviews* **51**: 221-271.
- Yakushkina N.I., Starikova V.T., 1978. Effects of coumarin and gibberellin on certain aspects of the energy metabolism of corn seedlings. *Fiziologiya Rastenii (Moscow)* **24**: 1211-1216.
- Yamamoto Y., 2009. Movement of allelopathic compound coumarin from plant residue of sweet vernalgrass (*Anthoxanthum odoratum* L.) to soil. *Grassland Science* **55**: 36–40.
- Yu D., Sunzuki M., Xie L., Morris-Natschke S.L., Lee K.H., 2003. Recent progress in the development of coumarin derivatives as potent anti-HIV agents. *Medicinal Research Reviews* **23**(3): 322-45.
- Zackrisson O., 1977. Influence of forest fires on the northern Swedish boreal forest. *Oikos* **29**: 22-32.
- Zelles L., 1999. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterization of microbial communities in soil: a review. *Biology and Fertility of Soil* **29**: 111-129.

