

# **UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO**

**Facoltà di scienze Agrarie e Alimentari**

**Corso di Laurea Triennale in**

**Valorizzazione e Tutela dell'Ambiente e del Territorio Montano**



## **ANALISI CROMATOGRAFICA DEGLI ESTRATTI DI RADICI: UN NUOVO METODO PER L'IDENTIFICAZIONE DELLE PIANTE ?**

**Relatore: Prof.ssa Annamaria GIORGI**

**Correlatore: Dott. Luca GIUPPONI**

**Elaborato finale di:**

**Francesco DUSINA**

**Matr. 817758**

**Anno Accademico 2014 - 2015**

*Alla mia famiglia Loredana, Marino e Barbara ...*

“ Crediamo che non ci sia  
altra struttura nella pianta  
più meravigliosa, per  
quanto riguarda le sue  
funzioni, che l'apice  
radicale [...].”

(Darwin C. & Darwin F., 1880)

## RIASSUNTO

Lo scopo della sperimentazione condotta durante lo svolgimento del tirocinio presso il Centro Studi Applicati Ge.S.Di.Mont., è stato quello di caratterizzare le radici delle principali piante arboree diffuse sulle Alpi, mediante la tecnica cromatografica HPLC, al fine di dimostrare le differenze fra le varie specie ed elaborare un nuovo metodo che consenta l'identificazione delle piante partendo dall'analisi degli estratti delle radici.

Il tirocinio ha previsto una parte di lavoro in campo (raccolta dei campioni) e una parte sperimentale in laboratorio (analisi cromatografica). L'attività di campionamento si è basata sulla raccolta, in differenti settori dell'arco alpino, di numerose radici appartenenti a sei diverse specie forestali (faggio, abete rosso, larice, betulla, frassino maggiore, nocciolo). L'attività di laboratorio ha riguardato l'estrazione di molecole chimiche dai campioni e la loro successiva analisi cromatografica. In particolare quest'ultima è stata effettuata mediante la tecnica della HPLC, che ha dato come risultato finale dei cromatogrammi. I picchi migliori (di ogni campione analizzato) presenti nel grafico, sono stati selezionati ed immediatamente tabulati in una matrice di dati per essere poi sottoposti a *cluster analysis*. Quest'ultima, condotta mediante l'utilizzo di un software, ha permesso che i campioni analizzati con simile *fingerprint* venissero precisamente raggruppati. Il risultato finale della sperimentazione è stato un dendrogramma in cui è apparso ben evidente la distinzione di sei grandi gruppi di campioni; i quali corrispondono, esattamente, alle sei specie arboree prese in esame.

Dai primi risultati ottenuti con questo lavoro (tuttora in fase d'avanzamento), è stato quindi evidenziato che le radici di piante, appartenenti alla stessa specie, presentano una serie di molecole chimiche molto simili fra loro; le quali, una volta analizzate mediante HPLC, potrebbero costituire un nuovo metodo per l'identificazione delle piante.

# INDICE

<b>1.0</b>	<b>INTRODUZIONE.....</b>	<b>1</b>
<b>2.0</b>	<b>STATO DELL'ARTE.....</b>	<b>2</b>
2.1.	<i>I principali metodi per il riconoscimento delle specie vegetali.....</i>	<i>2</i>
2.2	<i>La radice.....</i>	<i>8</i>
2.3	<i>Caratteristiche delle specie considerate.....</i>	<i>10</i>
2.3.1	FAGGIO ( <i>Fagus sylvatica</i> L.).....	10
2.3.2	FRASSINO MAGGIORE ( <i>Fraxinus excelsior</i> L. ).....	15
2.3.3	BETULLA ( <i>Betula pendula</i> R.).....	19
2.3.4	NOCCIOLO ( <i>Corylus avellana</i> L.).....	23
2.3.5	ABETE ROSSO ( <i>Picea abies</i> L.).....	25
2.3.6	LARICE ( <i>Larix decidua</i> Miller).....	29
<b>3.0</b>	<b>MATERIALI E METODI.....</b>	<b>33</b>
3.1	<i>Aree di campionamento.....</i>	<i>33</i>
3.2	<i>Analisi di laboratorio .....</i>	<i>37</i>
3.3	<i>Analisi statistiche.....</i>	<i>51</i>

<b>4.0</b>	<b>RISULTATI.....</b>	<b>53</b>
<b>5.0</b>	<b>DISCUSSIONE E CONCLUSIONI .....</b>	<b>57</b>
<b>6.0</b>	<b>RINGRAZIAMENTI .....</b>	<b>59</b>
<b>7.0</b>	<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>61</b>

# 1.0 INTRODUZIONE

Le principali modalità che consentono di determinare la specie d'appartenenza di un organismo vegetale ignoto, si basano prevalentemente sull'analisi morfologica delle strutture del fiore e, in minor misura, di quelle di foglia, frutto e fusto. Ad oggi esistono una moltitudine di chiavi dicotomiche ("Flore") che consentono la determinazione delle specie vegetali dei vari territori (PIGNATTI, 1982; TUTIN et al., 1993; AESCHIMANN et al., 2004; LAUBER & WAGNER, 2012;). Tali chiavi, a cui sempre più spesso si affiancano moderne analisi molecolari, rappresentano ancor oggi gli strumenti più utilizzati dai botanici per l'identificazione dei vegetali. Le Flore pur essendo molto utili, facilmente reperibili ed economiche, non consentono però (nella maggior parte dei casi) di determinare la specie di un organismo vegetale partendo dall'analisi morfologica delle sue radici. Il superamento di tale problematica consentirebbe notevoli sviluppi per quelle discipline che si occupano dello studio dei rapporti vegetazione-suolo in natura, come quelle che si occupano della stabilità dei versanti montuosi.

Il seguente lavoro, frutto di un tirocinio formativo condotto presso il Centro Studi Applicati Ge.S.Di.Mont. di Edolo (BS) a conclusione del ciclo di studi in "Tutela e Valorizzazione dell'Ambiente e del Territorio Montano", ha l'obiettivo di caratterizzare le radici delle principali piante arboree diffuse sulle Alpi mediante la tecnica cromatografica HPLC (cromatografia liquida ad alta prestazione). Ciò al fine di evidenziare le differenze fra le varie specie e capire se è possibile elaborare un nuovo metodo che consenta l'identificazione delle piante partendo dall'analisi del *fingerprint* cromatografico dei succhi estratti delle loro radici.

## **2.0 STATO DELL'ARTE**

### **2.1. I principali metodi per il riconoscimento delle specie vegetali**

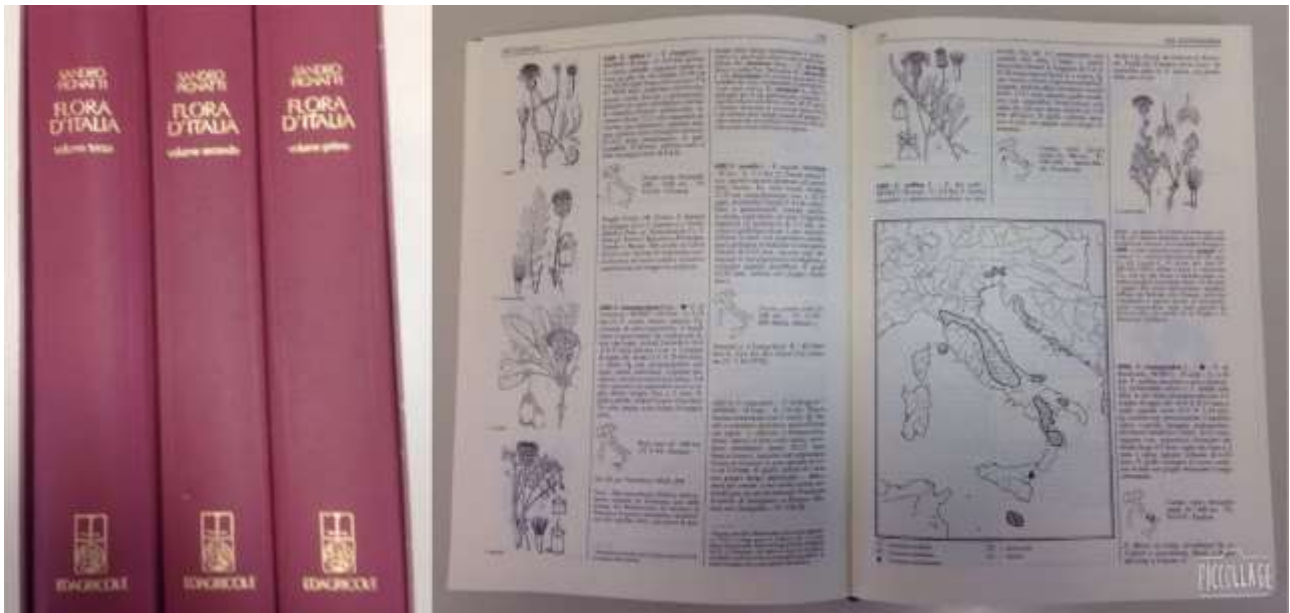
Da sempre l'uomo è stato affascinato dal mondo vegetale ponendosi delle domande a cui cercare di dare delle risposte. Le molteplici tematiche che lo hanno incuriosito variano da quelle più filosofiche, in cui si chiedeva se le piante fossero munite di un'anima e d'intelligenza, a quelle più naturalistiche trattanti sia lo studio della biologia e fisiologia vegetale che le relazioni con l'ambiente.

Oltre a questi interessantissimi aspetti, trattati nella pubblicazione "Verde Brillante" (Mancuso & Viola, 2013), un argomento che è sempre stato oggetto di studio è la classificazione delle specie vegetali. Il primo botanico naturalista che svolse tale compito fu Carl Nilsson Linneo (1707-1778) riconosciuto come "grande classificatore" e considerato padre fondatore della botanica moderna. Il suo lavoro di classificazione inizialmente prese in considerazione, come principale criterio tassonomico, gli organi riproduttivi delle piante. Tale metodo, ancor oggi adottato, fu poi ampliato con l'analisi di morfologia, fenologia e portamento dei vari componenti dell'apparato epigeo (foglie, fusto, frutto).

Attualmente l'identificazione delle piante si basa sull'osservazione e la raccolta in campo dei campioni. Quest'ultimi, dopo esser stati dettagliatamente esaminati con strumenti ottici (lente, stereoscopio, ecc...), vengono determinati attraverso la consultazione delle precipue Flore. Di seguito vengono elencate e descritte le opere, maggiormente utilizzate, per l'identificazione delle piante presenti sulle Alpi:



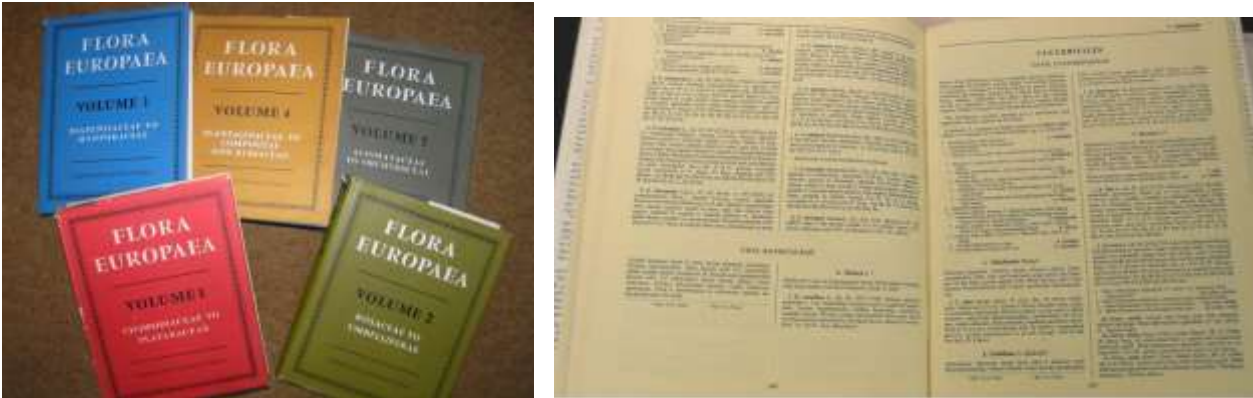
a) **Flora d'Italia** (Pignatti, 1982)



**Figura 1: copertina ed illustrazione interna dell' opera Flora d'Italia**

Rappresenta la chiave dicotomica più utilizzata e completa per la determinazione delle piante vascolari caratterizzanti la flora italiana. L'opera descrive tutti i vegetali superiori della flora italiana. Nella Flora d'Italia, costituita da 3 volumi, vengono fornite informazioni di carattere ecologico, biologico, corologico e tassonomico di 5599 specie presenti sul territorio italiano e nelle aree adiacenti.

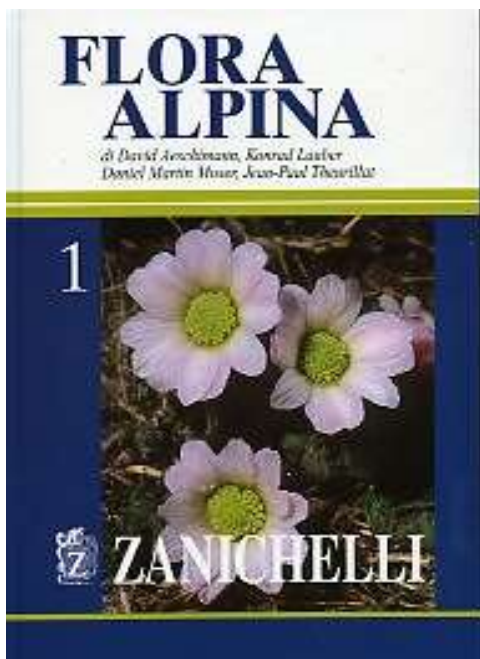
b) **Flora Europea** ( Tutin et al., 1993).



**Figura 2: i cinque volumi e illustrazione interna dell'opera Flora Europea.**

L'opera è uno strumento di riconoscimento (chiave dicotomica) delle specie presenti sul territorio europeo. All'interno della descrizione delle 11500 specie sono incluse anche le sottospecie esistenti. L'opera fornisce le informazioni riguardanti la corologia e la tassonomia degli organismi vegetali caratterizzanti la flora del continente. Ciò nasce con l'intento di evitare uno sciovinismo ed un'incomprensione tassonomica tra i popoli, così geograficamente che culturalmente diversi, costituenti l'Europa. L'opera è suddivisa in cinque volumi ed è scritta in inglese.

c) **Flora Alpina** (Aeschimann et al., 2004)

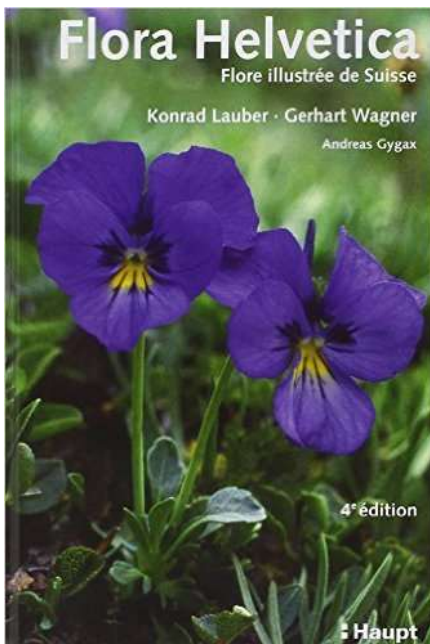


**Figura 3: copertina ed illustrazione interna dell' atlante Flora Alpina.**

L'opera, a differenza delle precedenti, è un atlante illustrato delle principali piante vascolari diffuse sull'arco alpino. I tre volumi contengono schede che riportano informazioni succinte e aggiornate in materia di nomenclatura, biologia, fenologia, corologia, ecologia e fitosociologia.

Flora Alpina è un manuale di concezione grafica in quanto le 4500 specie presenti (in totale 148 famiglie) sono illustrate da fotografie, mentre mancano descrizioni morfologiche e chiavi per la determinazione. Questo permette a Flora Alpina di essere una pubblicazione a vocazione internazionale.

d) **Flora Helvetica, avec Clef de determination** ( Lauber & Wagner, 2012).



**Figura 4: copertina ed illustrazione interna dell'opera Flora Helvetica.**

L'opera contiene la maggior parte delle piante selvatiche della Svizzera corredata da illustrazioni grafiche e corrispettive descrizioni utili per la determinazione. Il testo contiene la nomenclatura latina, tedesca, francese e italiana, nonché informazioni sulla tassonomia, ecologia e corologia, carte di distribuzione e indici di frequenza. Inoltre racchiude indicazioni riguardanti la tossicità, l'utilità farmaceutica e protezione giuridica delle diverse specie. Flora Helvetica fornisce le chiavi di determinazione che permettono l'identificazione delle specie descritte.

Un ulteriore sistema, attualmente utilizzato per l'identificazione e la classificazione delle specie vegetali, consiste nell'analisi del DNA (JACKSON et al., 1999). Questa tecnica, attraverso l'analisi di marcatori molecolari, permette un'indagine dettagliata del patrimonio genetico. Ciò permette la determinazione della variabilità genetica a livello del materiale ereditario ovviando così, alla mancata espressione genotipica causata dagli effetti ambientali. Inoltre l'analisi genetica, con l'utilizzo dei marcatori molecolari, comporta il vantaggio di fornire un'analisi ben dettagliata contenente un'elevato grado d'informazioni genetiche. Gli aspetti che rendono questa tecnica poco accessibile sono l'elevato costo economico e la difficoltà d'analisi. Entrambe questi limiti sono legati alla necessità di possedere sia competenze tecniche ottimali che una strumentazione avanzata. In ultimo una nuova tecnica identificativa, consiste nell'analisi di sostanze biochimiche prodotte dal metabolismo dei vegetali, quali terpeni oppure proteine. Tra queste ultime, particolarmente adatte risultano quelle enzimatiche: gli isoenzimi.

## 2.2 La radice

La radice è l'organo della pianta specializzato nell'assorbimento di acqua e sali minerali dal suolo, fondamentali per la vita dell'essere vegetale. L'apparato radicale costituisce, ad eccezione di alcune specie, la porzione ipogea della pianta vascolare. Tra le molteplici funzioni svolte dalle radici troviamo le seguenti:

- l'ancoraggio: necessario per conferire stabilità e resistenza all'organismo. Principalmente questo compito è svolto dalle radici più grosse e lignificate, ma risulta fondamentale per consentire alle radici più deboli assorbenti, di svolgere la loro funzione ed esplorare nuove zone
- conduzione degli assimilati e metaboliti: tale compito è fondamentale per il trasporto di sostanze nutritive assorbite oppure accumulate, ad altre parti della radice/pianta.
- l'accumulo di metaboliti come sostanze di riserva: essa è importante per riuscire a mantenere delle pronte molecole organiche all'inizio del periodo vegetativo.
- l'intesa attività sintetica: ciò è meramente svolta nella zona del meristema apicale, dove avviene sia la continua divisione cellulare che la generazione d'importanti fitoregolatori (acido abscissico e citochinine, ecc...).

Nel corso della storia, in particolare dall'Ottocento, molteplici studi sono stati condotti sulle radici determinando, con scoperte eccezionali, una svolta fondamentale in campo della biologia e fisiologia vegetale ma non solo.

Nel 1844 Théodore de Saussure (1767-1845) pubblicò l'opera *le Recherches chimiques sur la vegetation*. Il saggio propone la spiegazione organica del

processo della fotosintesi clorofilliana. Il naturalista elvetico capì che l' aumento di massa della pianta durante la crescita non era dovuto alla sola anidride carbonica, sottratta dall'atmosfera, ma anche all' acqua e sostanze nutritive assorbite dalle radici. Nel 1858 il professor Guido Pollacci (1831-1913), riuscì a dimostrare che le radici emettendo acido carbonico ricavano, dalla componente minerale del suolo, molecole inorganiche (insolubili) necessarie per la propria nutrizione (POLLACCI, 1861). Il primo botanico, naturalista che condusse un' attenta osservazione e sperimentazione sull'apparato ipogeo fu Charles Darwin (1809-1882). Egli, dopo una serie di esperimenti condotti insieme al figlio Francis, descrive e interpreta nell'opera *The Power of Moviments of Plants* (1880), gli innumerevoli movimenti delle piante. In particolare quest'ultimi riguardano principalmente l'apparato radicale tanto che, nell'ultimo paragrafo del saggio, l'autore afferma d'essersi convinto che l' apice radicale sia dotato di un centro di comando, simile ad un cervello umano, in grado di percepire gli stimoli ambientali e di prendere decisioni sui movimenti da compiere (MANCUSO & VIOLA, 2013). Dalla fine del secolo scorso gli studi principalmente effettuati sulle radici hanno riguardato l'influenza della vegetazione forestale sulla stabilità del versante (REUBENS et al., 2007) e sulle condizioni idrologiche del suolo. In particolare sono stati svolti dei lavori in cui è stata analizzata sia la massima profondità (CANADELL et al., 1996), l' espansione e la densità dell' apparato radicale nel suolo (EDWARD & GILMAN, 1990 ). In altri studi recenti sono state esaminate le proprietà meccaniche delle radici come la resistenza alla forza di trazione e di taglio (BISCHETTI et al., 2005).

## 2.3 Caratteristiche delle specie considerate

Le piante arboree, oggetto di campionamento di questa sperimentazione, appartengono a 6 specie ampiamente diffuse sull'arco alpino (faggio, larice, abete rosso, nocciolo, betulla, frassino maggiore).

Di seguito vengono descritte le loro peculiari caratteristiche botaniche, forestali ed ecologiche.

### 2.3.1 FAGGIO (*Fagus sylvatica* L.).



#### **Morfologia**

È un angiosperma dicotiledone appartenente alla famiglia delle Fagaceae.



È una fanerofita arborea, di buona longevità (fino a 300 anni), che può raggiungere un'altezza di 30 m con diametri importanti (140 cm) .

L'albero presenta un fusto con corteccia sottile, liscia, di color grigio-scuro, con lenticelle grigie puntiformi. Le foglie caduche, possiedono lamina ellittica (40-47 × 60-70 mm) con base rotonda leggermente asimmetrica, punta ottusa e margine quasi intero ondulato (PIGNATTI, 1982). La faccia superiore appare glabra e lucida, mentre nella pagina inferiore presenta ciuffi di peli rossastri. All'inizio del periodo vegetativo si contraddistinguono per una colorazione verde-chiaro, la quale diventa più scura fino ad assumere una colorazione giallo-arancione in autunno. La chioma solitamente è ampia a volta.

La pianta è monoica con i fiori maschili riuniti in amenti tondi e penduli, lungamente picciolati. L'infiorescenza femminile, accoppiata in un involucro detto 'cupola', possiede un ovario triloculare. La fioritura inizia il mese di maggio ma può variare a seconda della stazione geografica. Il frutto è una nocula (detta faggiola) completamente inclusa in una cupola legnosa a 4 (5) valve con deboli aculei erbacei incurvati o patenti. La produzione di seme è ciclica ed ogni 5- 6 anni si presenta abbondante (pasciona), presupposto fondamentale affinché possa verificarsi la rinnovazione.

Le radici fini e dense costituiscono un'architettura ipogea ben fascicolata. Secondo BAGNARA & SABITANO (1997), l'apparato radicale del faggio si sviluppa in senso orizzontale entro l'area corrispondente alla proiezione della chioma e, in senso verticale, entro i primi 60 cm di suolo a prescindere dalla profondità del profilo.

### **Inquadramento ecologico**

Il faggio è molto diffuso sul territorio nazionale, dalle Alpi agli Appennini isole comprese (esclusa la Sardegna). Sull'arco alpino è molto comune grazie alla sua

elevata plasticità ecologica, la quale gli permette di adattarsi a differenti ambienti.

Il fattore responsabile della variabilità riguardante l'inquadramento tipologico è il clima. Le condizioni di "optimum" si verificano prevalentemente nelle Prealpi; in particolare nella regione esalpica (dalla fascia submontana alla altimontana) e in quella mesalpica (dalla fascia montana alla altimontana) (DEL FAVERO, 2004). Questi ambienti sono contraddistinti dal possedere un clima, di tipo oceanico, caratterizzato dalle seguenti condizioni:

- Limitate escursioni termiche (solitamente < 20° C). Esse si riferiscono sia a quelle giornaliere che annuali.
- Elevate precipitazioni (circa 1000-1400 mm). Principalmente distribuite nei periodi equinoziali determinando così, estati fresche ed inverni miti.

Perciò, la presenza del faggio, è legata in prima approssimazione a: "ambienti livellati con inverni freddi, ma non troppo, primavere piovose, nebbiose e senza gelate, periodi vegetativi lunghi, ma senza eccessi d'evapo-traspirazione, suoli con ottime caratteristiche fisiche" (BERNETTI, 1995).

Il faggio riprende l'attività vegetativa già all'inizio della primavera completando la fogliazione nella prima parte dell'estate. Durante questo periodo esso necessita di un' elevata disponibilità idrica nel suolo. Non potendo rifornirsi di acqua in profondità perché il suo apparato radicale è spesso superficiale (BORGHETTI E MAGNANI, 1999), deve captare l'acqua meteorica che cade al suolo o che percola lungo il fusto (*stem flow*). Di conseguenza, può diffondersi solo là dove le precipitazioni primaverili sono abbondanti e il suolo ha condizioni fisiche tali da rendere disponibile l'acqua negli orizzonti esplorati dalle radici. Le correnti d'aria ricche d'umidità, provenienti dal mare o dai grandi laghi limitrofi, possono non solo originare precipitazioni, ma garantire una costante saturazione dell'aria (precipitazione occulta), la quale comporta una minor evapotraspirazione delle piante ed un aumento di acqua disponibile.

Se durante il periodo vegetativo, le condizioni ottimali non si dovessero verificare, il faggio sottoposto a forti stress idrici, può andar in difficoltà. Le conseguenze possono essere molteplici da un progressivo ingiallimento della chioma con anticipata filloptosi, a danni tecnologici e d'incremento di massa legnosa.

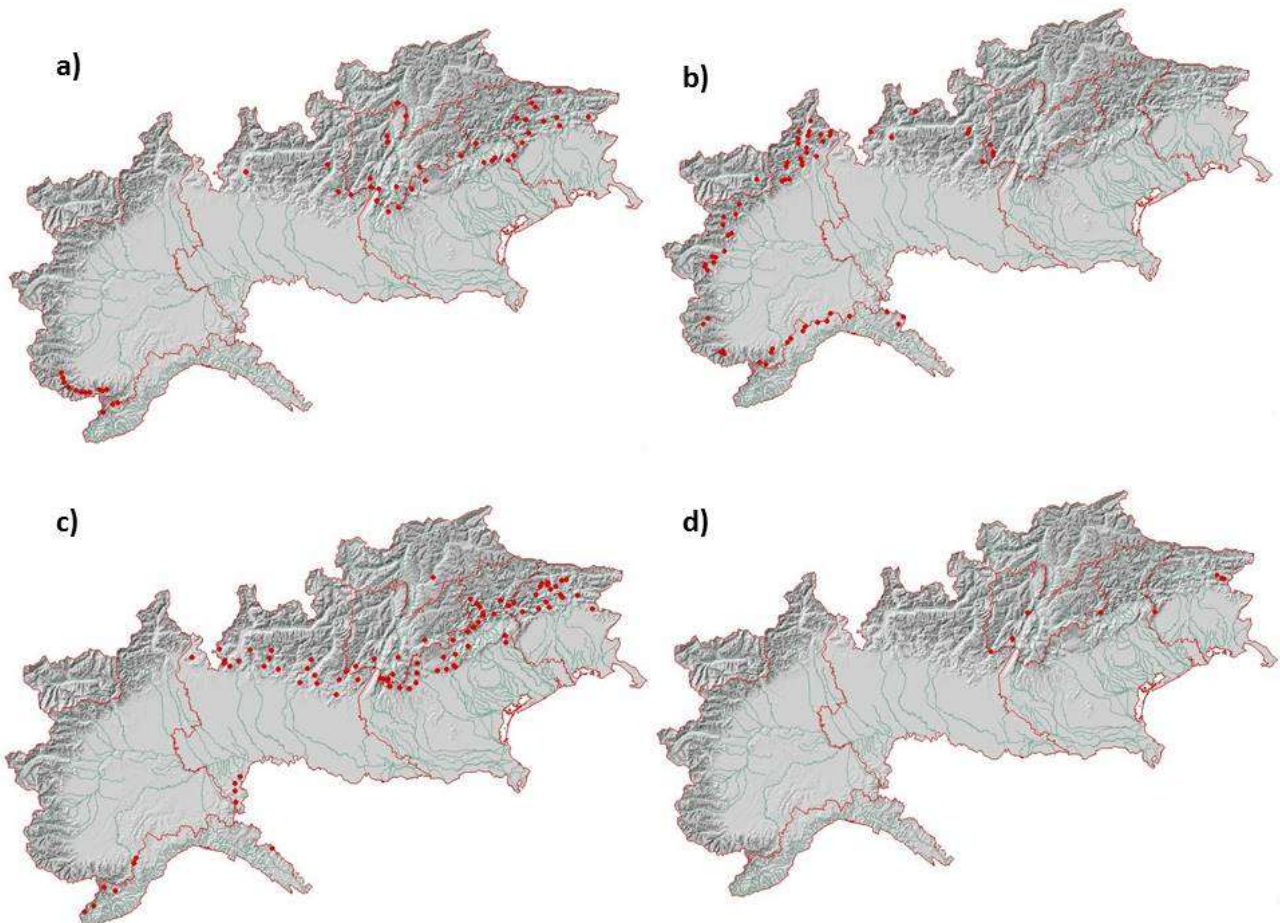
La natura della roccia madre non sembra incidere sulla crescita di tale pianta forestale. Il faggio, prevalentemente, predilige substrati carbonatici; tuttavia, grazie alla capacità di tamponare l'acidità nell'area d'influenza della rizosfera (SANESI & CECCHINI, 1999), riesce ad affermarsi anche su substrati silicatici.

Tale plasticità ambientale determina, nella categoria delle faggete, ben 13 formazioni vegetali differenti, le quali vengono raggruppate, in relazione all'altimetria, nelle seguenti sottocategorie (DEL FAVERO, 2004):

- SOTTOCATEGORIA FAGGETE AZONALI.  
Faggeta primitiva.
- SOTTOCATEGORIA FAGGETE SUBMONTANE.  
Faggeta submontana dei substrati carbonatici dei suoli xerici.  
Faggeta submontana dei suoli mesici.  
Faggeta submontana dei substrati silicatici dei suoli acidi.
- SOTTOCATEGORIA FAGGETE MONTANE.  
Faggeta montana dei substrati carbonatici dei suoli xerici.  
Faggeta montana dei substrati carbonatici tipica esalpica.  
Faggeta montana dei substrati carbonatici tipica mesalpica.  
Faggeta montana dei substrati silicatici dei suoli mesici.  
Faggeta montana dei substrati silicatici dei suoli acidi.
- SOTTOCATEGORIA FAGGETE ALTIMONTANE E SUBALPINE.  
Faggeta altimontana dei substrati carbonatici tipica.  
Faggeta altimontana dei substrati carbonatici dei suoli decalcificanti.

Faggeta subalpina.

Faggeta altimontana dei substrati silicatici.



**Figura 5: distribuzione sull'arco alpino di alcune formazioni vegetali appartenenti alla categoria "faggete".**

a) faggeta altimontana dei substrati carbonatici tipica; b) faggeta montana dei substrati silicatici dei suoli acidi; c) faggeta subalpina; d) faggeta

### 2.3.2 FRASSINO MAGGIORE (*Fraxinus excelsior* L. ).



#### **Morfologia**

Il frassino maggiore è un angiosperma dicotiledone appartenente alla famiglia delle Oleacee.

È una fanerofita arborea, di buona longevità (fino a 200 anni), che può raggiungere un'altezza di 40 m con diametri importanti.

L'albero presenta un fusto slanciato, con corteccia di colore grigio chiaro, che appare liscia e verdastra nelle piante giovani mentre si presenta ruvida con fessurazioni a cratere, in età adulta.

Le foglie imparipennate (composte da 3-7 paia di foglioline più quella apicale) sono di forma lanceolata ed ellittica con margine seghettato ed apice appuntito. All'inizio della stagione vegetativa si presentano di color verde scuro poi, con l'avvicinarsi dell'autunno, diventano gialle-arancioni. La chioma appare ampia ed arrotondata in primavera mentre risulta spoglia in inverno, presentando però sui rami, le tipiche gemme apicali nere a forma di zoccolo.

La pianta è poligama con fiori unisessuali, a forma di pannocchie brevi, privi di calice e corolla e con antere purpuree. L'epoca di fioritura (da marzo) precede l'emissione delle foglie. I frutti sono samare, lunghe 3-4 cm, appiattite e portate a grappoli vistosi. La particolare forma del frutto, oltre all'abbondante fruttificazione caratteristica della specie, permette che il seme avvolto e dotato di un margine alato possa essere facilmente diffuso attraverso il vento. Inoltre esso si contraddistingue per il fatto di possedere una buona germinabilità, la quale determina una rapida crescita dei giovani esemplari. Tutti questi fattori sono indispensabili per stabilire il frassino maggiore come una frequente specie ricolonizzatrice.

L'apparato radicale è di tipo inizialmente fascicolato e molto sviluppato, in seguito può scendere molto in profondità tramite radici a fittone con robuste radici laterali che si sviluppano a candelabro.

### **Inquadramento ecologico**

È una specie largamente diffusa su tutto l'arco alpino, predilige per la crescita luoghi temperati, freschi e umidi. Si diffonde spontaneamente nei boschi di latifoglie, nelle selve non curate, nei prati dei maggenghi o comunque in vecchi coltivi oramai abbandonati.

È una pianta arborea il cui "optimum" si trova nelle regioni alpine esalpiche, mesalpiche e raramente endalpiche (DEL FAVERO, 2004). Si localizza a quote variabili tra i 500 - 1200 m, soprattutto nei medio-basso versanti e negli impluvi, con una certa indifferenza per i substrati. In genere la presenza di questa pianta, considerata dalla letteratura forestale come "latifolia nobile", è legata ad ambienti con un clima oceanico, in quanto necessità di abbondanti precipitazioni (sopra i 1500 mm medi annui) e di una buona e continua disponibilità idrica nel suolo. Il frassino maggiore è considerato una specie

scarsamente efficiente nei riguardi dei sistemi di trattenuta dell'acqua. Come sostenuto da DUFLOT (1995), durante l'estate un frassino adulto evapo-traspira giornalmente almeno 200 l d'acqua. Ciò è reso possibile dalla presenza di un doppio apparato radicale, in parte superficiale, che non deve essere interessato da ristagni idrici, e in parte profondo, che recupera acqua nella falda e funziona a mo' di pompa. Se esso pesca in una falda inquinata si ha l'insorgere di malattie e di biforcazioni nel fusto. L' apparato radicale del frassino maggiore è notevolmente più sviluppato di quello dell'acero di monte.

In realtà, se queste considerazioni sembrano ampiamente confermate nelle regioni orientali d' Italia (in particolare in Friuli-Venezia Giulia), non sembrano totalmente rispondenti nelle regioni occidentali ed in particolare in Valle d' Aosta. In queste regioni il frassino è presente anche in ambienti in cui la disponibilità idrica del suolo è decisamente minore, nonché su suoli marcatamente primitivi (DEL FAVERO et al., 2002).

Allo stato attuale delle conoscenze non è facile spiegare questo comportamento anomalo; tuttavia merita di essere citato il gran lavoro svolto da BERNETTI riguardante le variabilità genetica tra le popolazioni di una specie. I risultati ottenuti riguardanti il frassino maggiore, sottolineano l'effettiva presenza di elevati livelli di variabilità genetica tra le popolazioni del Piemonte e della Lombardia. Al contrario, la variabilità genetica risulta molto modesta tra i popolamenti (oggetto d'analisi) rilevati, all'interno del territorio piemontese (BERNETTI E MONTELEONE, 2000).

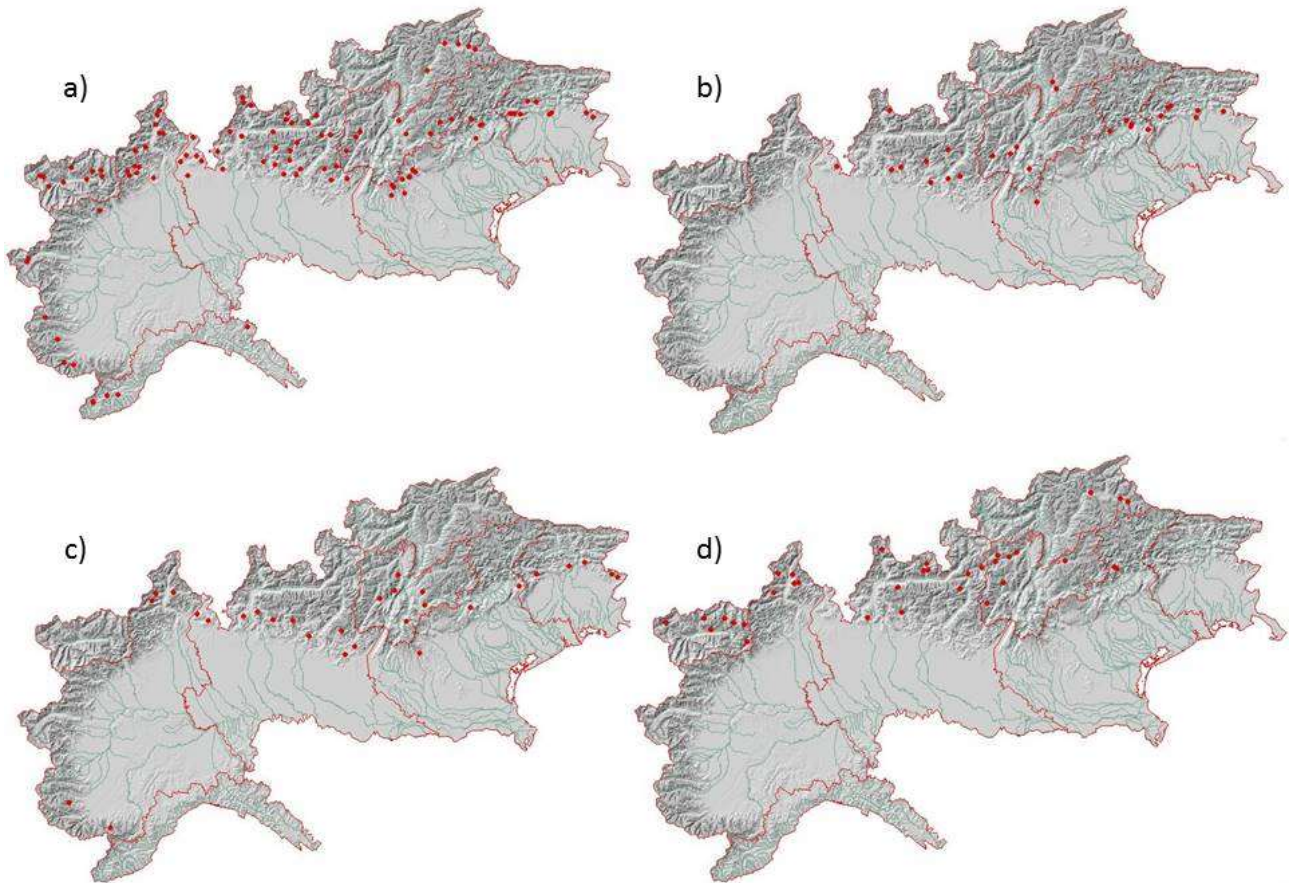
Il frassino può essere presente sia in piccoli gruppi o come pianta isolata, oppure creare dei consorzi misti con altre specie (acero e tiglio). Le principali formazioni vegetali a cui partecipa, sono le seguenti (DEL FAVERO, 2004):

- ACERI- FRASSINETI.  
Aceri-frassineto tipico.  
Aceri-frassineto con ostria.

Aceri- frassineto con faggio.

Aceri- frassineto con ontano bianco.

Aceri-frassineto con ontano nero.



**Figura 6: distribuzione sull'arco alpino di alcune formazioni vegetali appartenenti alla categoria degli "acero-frassineti".**

a) acero-frassineto tipico; b) acero-frassineto con ostraia; c) acero-frassineto con faggio; d) acero-frassineto con ontano bianco.



### 2.3.3 BETULLA (*Betula pendula* R.).



#### **Morfologia**

È un angiosperma dicotiledone appartenente alla famiglia delle Betulaceae. È una fanerofita arborea che presenta una limitata longevità (in casi eccezionali può arrivare a 100 anni), raggiungendo altezze fino a 30 m e diametri di 70 cm. La betulla presenta un fusto eretto, elegante con una corteccia sottile di color bianco lucente sfibrata in liste trasversali. I rami giovani sono esili e rugosi. Le foglie, a forma triangolare-rombiche ( $2-4 \times 3-6$  cm), sono acuminate alla sommità con margine dentato a loro volta seghettato (doppia dentatura). La lamina superiore appare dapprima glutinosa, poi glabrescente, quella inferiore invece è densamente ghiandolosa con ciuffi di peli persistenti sulle nervature. La chioma appare leggera, quasi rada ed irregolare. La betulla è una specie monoica le infiorescenze sono amenti penduli per entrambe i sessi. I frutti sono dei piccoli acheni contenuti in infruttescenze a forma di cono. Gli acheni (frutti che giunti a maturità non si aprono per lasciare uscire l'unico seme contenuto), sono strutture ovoidali circondate da due ali membranacee che vengono facilmente

trasportate dal vento allorché, a maturità, vengono rilasciati dagli amenti. L'apparato radicale appare profondo riuscendo a radicarsi e penetrare anche nei suoli poco evoluti.

### **Inquadramento ecologico**

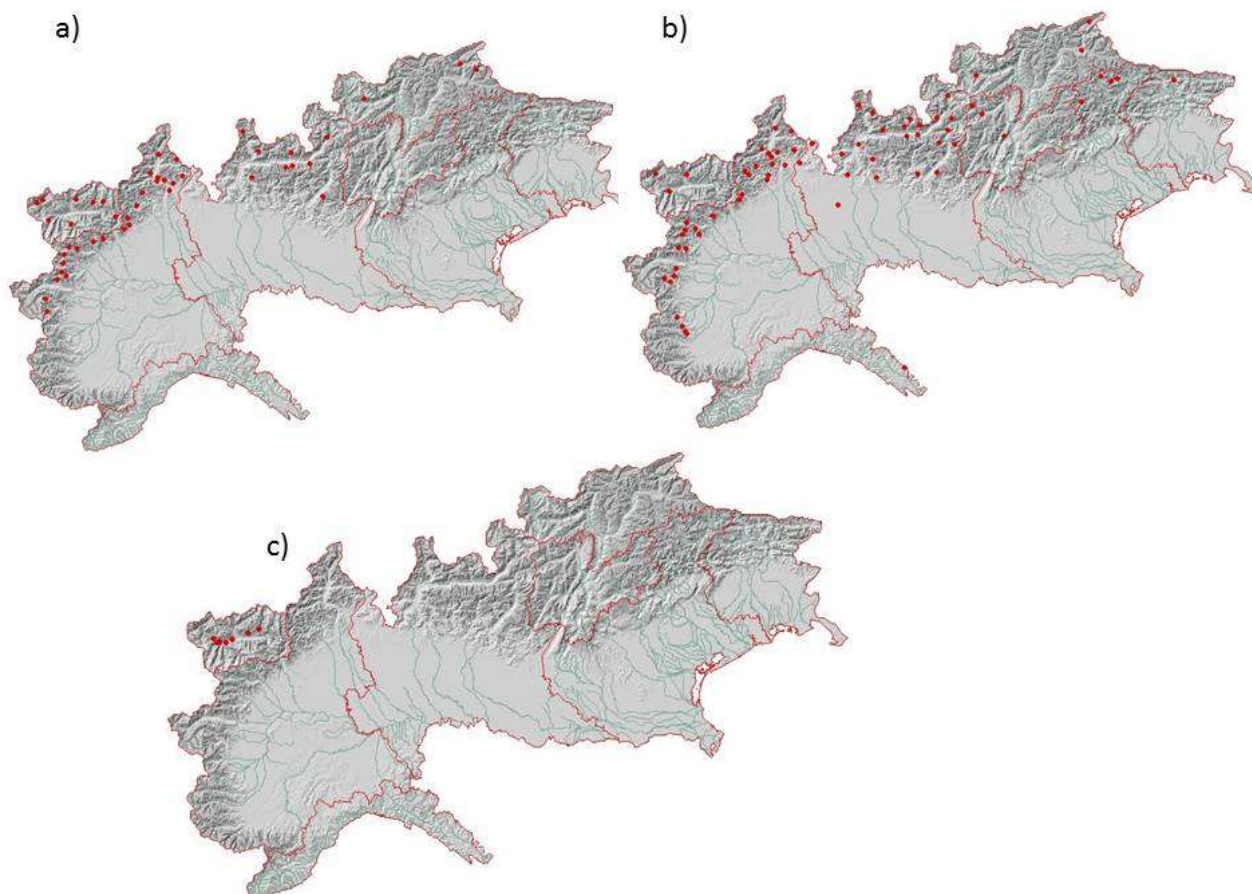
La betulla è una specie largamente diffusa nei boschi dell'arco alpino italiano. È frequente sia sulle Prealpi che nelle Alpi, occupando la regione esalpica, mesalpica ed endalpica dalle fasce planiziali alle subalpine (DEL FAVERO, 2004). Nonostante la pianta sia una latifoglia, la temperatura non sembra essere un fattore condizionante, in quanto è in grado di spingersi fino a quote elevate (2000 m s.l.m). La betulla è una specie eliofila e dunque, come tale, predilige crescere su versanti solivi, direttamente illuminati dalla luce solare. Ciò fa sì che frequentemente si sviluppi nelle chiarie, oppure ai margini dei boschi, costituendo la vegetazione degli alberi sparsi, del limite del bosco. La betulla può partecipare alla composizione, della maggior parte dei tipi forestali, come specie minoritaria oppure creare delle formazioni vegetali effimere: i betuleti

I betuleti presentano un'elevata capacità di adattamento alle diverse proprietà fisiche del suolo, mentre risultano selettivi nei confronti della roccia madre. Prediligono crescere su substrati silicatici dove, raramente, possono costituire delle formazioni durevoli nel tempo. Ciò è possibile in quanto la betulla sopporta valori di pH anche inferiori a 3,3 (CAMERON,1996 ), condizioni estreme che impediscono la crescita di altre piante arboree competitive (BERNETTI, 1995). Sui substrati carbonatici la presenza della betulla risulta sporadica comparando più regolarmente in quelle zone dove la decalcificazione degli orizzonti superficiali del suolo è maggiore. Per quanto riguarda l'humus, la betulla si adatta a varie situazioni, da quelle in cui lo strato di materiale organico è profondo a quelle in cui è più sottile (KINNAIRD, 1974; GIUDICI & PIVIDORI, 2002). Per quanto riguarda la disponibilità idrica del suolo, la betulla riesce a

vivere in suoli ricchi d'acqua (asfittici), grazie alla sua capacità di trasportare ossigeno dalle parti aeree alle radici (HUIKARI, 1959). Sopporta anche condizioni d'aridità edafica grazie ad un apparato radicale molto profondo e un ciclo vegetativo rapido (BERNETTI, 1995). Tale adattabilità rende la betulla un'ottima colonizzatrice dei più disperati ambienti in cui sono presenti i suoli primitivi, gli ex coltivi o aree attraversate da disturbi fisici. Inoltre su suoli instabili o poveri, i betuleti hanno la funzione d'accelerare un processo di riequilibrio della componente viva del suolo. La lettiera poco lignificata, priva di resine, ma ricca di proteine (da cui il rapporto C/N basso) e di ceneri (SUSMEL, 1990; ZANELLA e alt., 2001) comporta una prevalente mineralizzazione della sostanza organica rispetto all'umificazione, con successiva formazione di humus di tipo mull (DELL'AGNOLA, 1989). Tutto questo porta ad un miglioramento delle condizioni trofiche per le piante, ma con il passare del tempo ciò può ripercuotersi sulle proprietà del suolo come la struttura, la capacità di scambio cationico, ecc.. con successive conseguenze riguardanti l'accumulo di acqua, di basi, a volte la stessa nutrizione delle piante e la germinazione dei semi, che risentono della mancanza dell'effetto ormonale dei componenti umici (DELL'AGNOLA, 1989).

Queste caratteristiche ne fanno una delle principali specie pioniere presenti sull'arco alpino. Essa con il suo insediamento temporaneo, crea formazioni arboree transitorie (betuleti) necessarie affinché si possano verificare le condizioni ecologiche ottimali per la rinnovazione della vegetazione potenziale. Alla categoria dei betuleti appartengono le seguenti formazioni vegetali (DEL FAVERO, 2004):

- Betuleto primitivo.
- Betuleto primitivo con frassino.
- Betuleto secondario.



**Figura 7: distribuzione sull'arco alpino delle formazioni vegetali appartenenti alla categoria dei "betuleti".**

a) betuleto primitivo; b) betuleto secondario; c) betuleto con frassino.

### 2.3.4 NOCCILOLO (*Corylus avellana* L.)



#### **Morfologia**

È un' angiosperma dicotiledone, la quale può assumere sia un portamento cespuglioso che arboreo raggiungendo un'altezza fino a 8 m. Esso non possiede una buona longevità (60-70 anni), ma presenta un'elevata attività d'emissione di polloni basali. Il fusto eretto è spesso ramificato alla base e presenta una corteccia, grigio-bruna lucida, con lenticelle dapprima piccole e longitudinali poi trasverse. La chioma ben espansa è costituita da foglie di color verde scuro, le quali presentano una forma cuoriforme alla base mentre l'apice è acuto. Il margine fogliare è doppiamente dentato ed il picciolo appare breve ed irsuto. Il nocciolo è una pianta monoica con un'elevata proterandria. Le infiorescenze sono per entrambi i sessi degli amenti. Quella maschile è un amento pendulo (6-10 cm) di color giallo all'antesi, mentre l'infiorescenza femminile è un amento

simile ad una gemma (3 × 6 mm) con un ciuffo di stimmi purpurei. Le nocchie (nucule) sono frutti secchi monocarpici indeiscenti. Le radici formano un apparato molto rigoglioso ed espanso, anche se non tanto profondo. Esso ha una grande capacità di produrre polloni, i quali sviluppandosi conferiscono alla parte epigea, un aspetto subsferico.

### **Inquadramento ecologico.**

Il nocciolo è una specie termofila molto diffusa nell'arco alpino dalla fascia planiziale a quella submontana rifuggendo i suoli, in cui vi è una aridità edafica più marcata. È una delle principali specie colonizzatrici delle aree abbandonate dall'agricoltura costituendo, assieme a vari arbusti del pruneto, la flora indicatrice del progressivo avanzamento del bosco. I corileti, solitamente, sono delle formazioni vegetali transitorie, le quali possono perdurare nel tempo se trovano le condizioni pedoclimatiche ottimali. Quest'ultime sono influenzate dall'azione di disturbo esercitata da particolari eventi, come il fuoco, lo sfalcio, il pascolamento, che si oppongono al naturale sviluppo forestale.

### 2.3.5 ABETE ROSSO (*Picea abies* L.).



#### **Morfologia**

È una gimnosperma molto longeva (oltre 200 anni) e di grandi dimensioni. Questa conifera può crescere fino a 50 m d'altezza raggiungendo diametri consistenti anche 200 cm ed è caratterizzata dal possedere un portamento polimorfico, spesso ereditario, da strettamente colonnare a pendulo, più o meno ramificato. L'abete rosso è una fanerofita arborea che presenta una corteccia di color grigio-bruna, spessa e squamata a piastre.

Le foglie aghiformi a sezione quadrangolare, pungenti e di color verde scuro, inserite perpendicolarmente sul ramo secondo linee spirali.

Le infiorescenze maschili chiamate coni (strobili maschili) sono piccoli e gialli. Essi sono maggiormente presenti sulla punta dei rami bassi per diminuire la probabilità di autofecondazione con le infiorescenze femminili della stessa pianta. Quest'ultime sono anch'esse dei piccoli coni (strobili femminili) di color viola, i quali situati nella parte più sommitale ed esterna della pianta favoriscono il successo dell'impollinazione di tipo anemofila. L'apparato radicale dell'abete rosso è fascicolato e superficiale.

### **Inquadramento ecologico**

L'abete rosso è la conifera più comune dell'arco alpino. Ciò è dovuto alla sua elevata plasticità, che le consente d'adattarsi a differenti condizioni pedoclimatiche, ed all'azione antropica, la quale in passato ha svolto un ruolo fondamentale alla rapida diffusione.

L'abete rosso, specie emisciafila, risulta la conifera dominante della fascia altimontana e subalpina delle regioni mesalpine ed endalpine, (DEL FAVERO, 2004). Nonostante ciò il peccio nell'arco alpino lo si può trovare anche a bassa quota (300 m s.l.m.). La sua plasticità su quote altitudinali, non sembra essere vincolata dalle temperature minime assolute, in quanto ben tollerate, ma da altri fattori limitanti che possono essere i seguenti:

- breve periodo con condizioni favorevoli al completamento del ciclo vegetativo: ciò può avere delle conseguenze sulla riproduzione e sulla successiva rinnovazione (ZANZI- SULLI, 1981). L' abete rosso necessita per il completamento delle attività vitali di almeno due mesi e mezzo con temperature maggiori di 10°C (RUBNER, 1960), ma le condizioni ideali sarebbero tre mesi e mezzo con temperature superiori a 14° C (BERNETTI, 1995), condizioni non insolite sull'arco meridionale delle Alpi.
- stress idrico nella stagione invernale: tale sbilancio idrico è dovuto all'impossibilità dell' apparato radicale di assorbire acqua, la quale

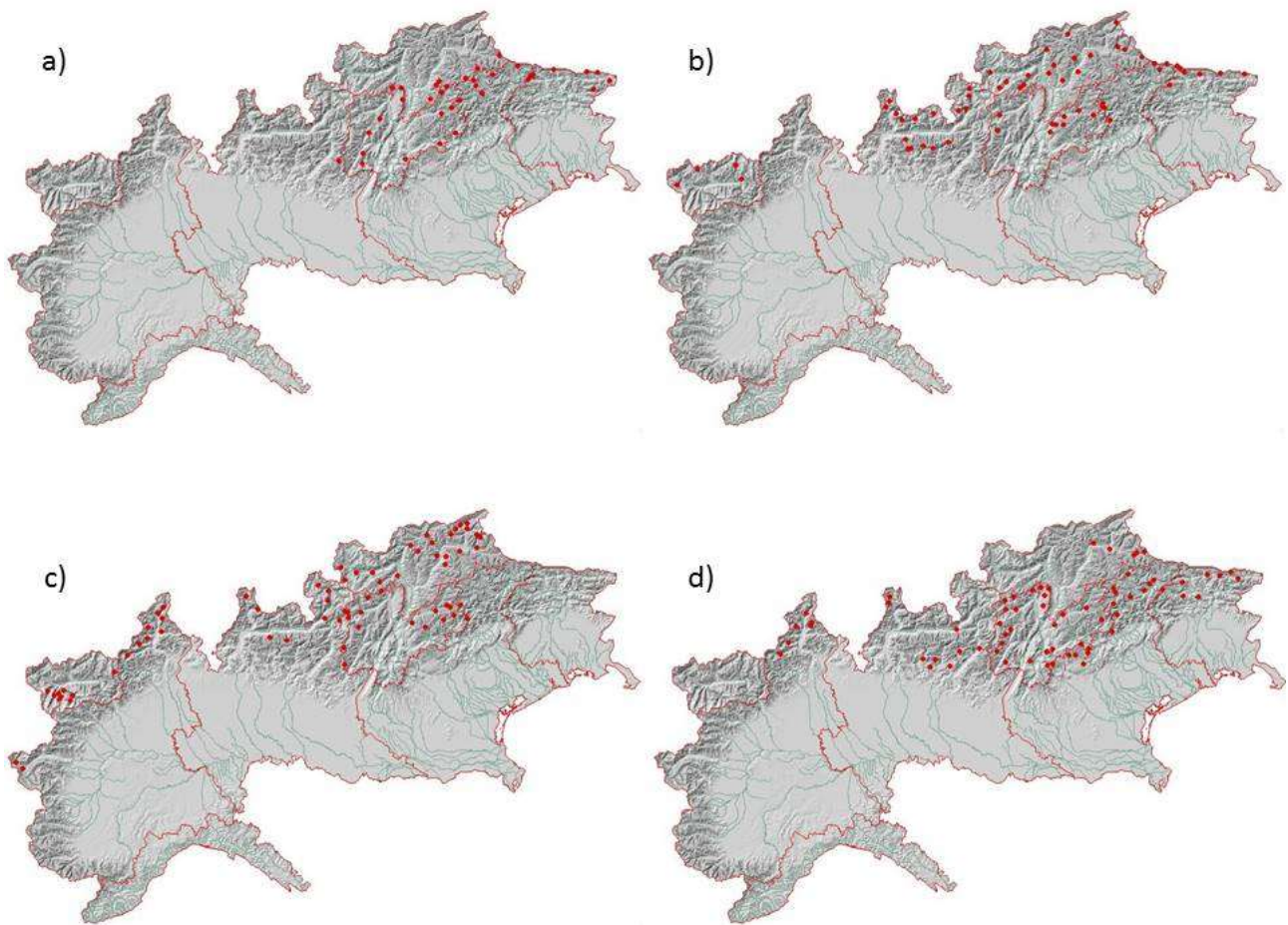


fisicamente è presente ma indisponibile essendo il suolo congelato. Contemporaneamente però il verificarsi della traspirazione fogliare comporta delle continue perdite di vapore acqueo che mettono la pianta in forte stress idrico. A risentire maggiormente di ciò sono le foglie dell'anno ancora immature, ma se le condizioni perpetuano per un lungo periodo, i danni coinvolgono l'intero apparato epigeo portando la pianta anche alla morte.

- frequenti cicli di gelo-disgelo nel periodo primaverile: ciò risulta particolarmente dannoso quando si verifica a discapito degli aghi vecchi. La pianta successivamente inizia ad andare in difficoltà diventando sempre più attrattiva e vulnerabile verso gli attacchi degli agenti patogeni.

La natura del substrato invece non influenza la diffusione della conifera , in quanto si adatta a crescere sia su suoli silicatici che carbonatici. Al contrario su suoli, con carenze idriche troppo spinte, il peccio risulta scarsamente competitivo per via del suo apparato radicale superficiale e fascicolato. In queste circostanze aride, l' abete rosso può costituire formazioni miste con *Pinus sylvestris*. Principalmente l'abete rosso, sull'arco alpino, determina boschi puri (pecceta altimontana, pecceta subalpina) oppure costituisce le seguenti formazioni miste:

- Piceo-abieteti: abete rosso con abete bianco.
- Piceo-faggeti: abete rosso con faggio.
- Piceo- lariceti: abete rosso con larice.



**Figura 8: distribuzione sull'arco alpino di alcune formazioni vegetali appartenenti alla categoria delle "peccete".**

a) Pecceta subalpina dei substrati carbonatici; b) pecceta altimontana e subalpina dei substrati silicatici dei suoli mesici; c) pecceta altimontana dei substrati silicatici dei suoli xerici; d) pecceta secondaria.

### 2.3.6 LARICE (*Larix decidua* Miller).



#### **Morfologia**

Il larice è l'unica gimnosperma decidua presente, allo stato spontaneo, in Italia. Tale conifera è un albero di prima grandezza (alto fino a 55 metri) che può raggiungere diametri anche di 200 cm. È una specie molto longeva (oltre i 500 anni), contraddistinta, solitamente, da un accrescimento iniziale medio-lento.

Il larice è una fanerofita arborea la quale presenta una corteccia spessa, di color grigio-bruno e desquamata a piastre. Le foglie (caduche) sono aghi lineari e teneri riuniti in mazzetti da 10 a 30 elementi, i quali sono inseriti su brachiblasti. La pianta è monoica ed i fiori femminili, disposti alla base dei brachiblasti, sono

piccoli coni “strobili” di color rosso-fucsia all’inizio della stagione vegetativa. Quest’ultimi, in seguito all’impollinazione, aumentano di volume ed iniziano a lignificare dando così origine allo strobilo vero e proprio. Le infiorescenze maschili sono piccoli coni “strobili” di color giallo situati anch’essi alla base del brachiblasto. L’apparato radicale del larice è profondo (2 m) e robusto, proprietà che gli conferisce una buona stabilità su suoli instabili.

### **Inquadramento ecologico**

Il larice è la conifera, dopo l’abete rosso, più comune sull’arco alpino, tuttavia la sua diffusione non appare uniforme. Tale gimnosperma è maggiormente concentrato nelle zone alpine centro-occidentali (Piemonte e Lombardia), mentre diminuisce verso ovest (Trentino e Veneto) fino a risultare sporadico o assente (Friuli-Venezia Giulia). La causa principale che ha contribuito, dove geopedologicamente possibile, alla sua diffusione è stata l’attività antropica. Essa infatti ha inciso sia recentemente, attraverso l’applicazione dei rimboschimenti artificiali, che in passato con i disboscamenti delle aree forestali per la creazione di aree dedite al pascolo. Il larice da sempre è stato particolarmente apprezzato dalle popolazioni alpine in quanto, oltre a fornire un ottimo legname per la costruzione delle baite, svolgeva un importante ruolo per l’attività di pascolo. La chioma, decidua e leggera, permette una migliore crescita della sottostante cotica erbosa e contemporaneamente fornisce un’ombra fresca al bestiame, durante il pascolamento estivo (FENAROLI, 1938; CREDARO & PIROLA, 1975). Il larice non presenta un’elevata plasticità ecologica. Ciò è dovuto in parte alla sua fisiologia, la quale è fortemente condizionata dalla caratteristica di perdere annualmente le foglie. La riduzione del numero di giorni disponibili per la fotosintesi viene, infatti, compensato da un aumento dell’assimilazione, cui corrisponde anche una maggiore perdita d’acqua per

traspirazione che continua anche in presenza di forti venti, senza che vi sia la chiusura degli stomi (TRANQUILLINI, 1979).

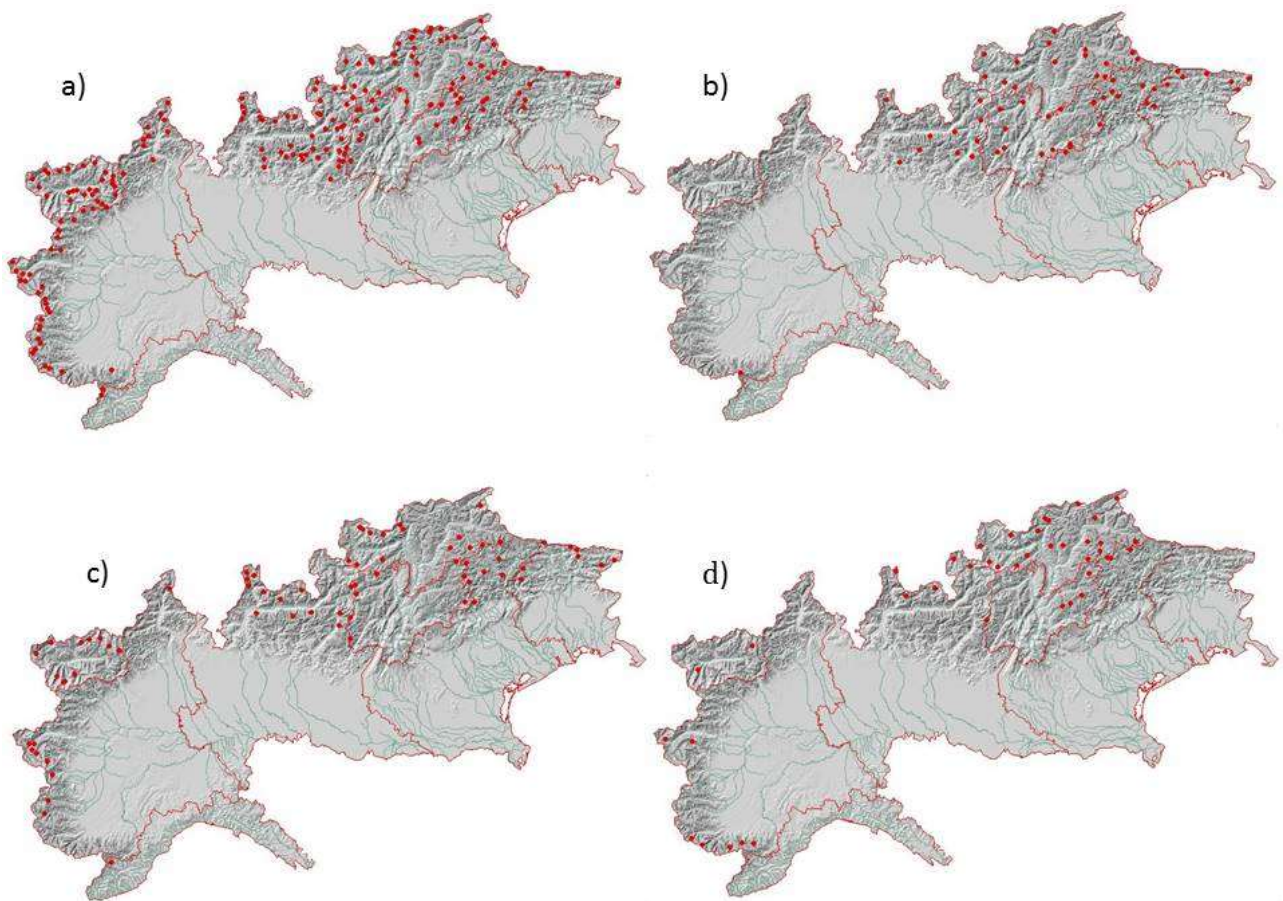
La necessità di mantenere elevata la traspirazione rende il larice poco efficiente nei climi con forte umidità atmosferica e su suoli con scarsa disponibilità idrica.

Affinché il larice si possa sviluppare necessita di almeno 700 mm di precipitazioni annue (MORANDINI, 1956) e dove tale esigenza è difficilmente soddisfatta (grandi vallate trasversali) la conifera si rifugia nelle esposizioni a nord o alle quote superiori, costituendo (in certe circostanze) le formazioni vegetali rappresentanti il limite del bosco. Perciò il suo ambiente di crescita ottimale ricade dalla fascia montana alla subalpina, su substrati acidi; mentre sui massicci carbonatici e dolomitici, dove la disponibilità di riserva idrica s'aggrava ulteriormente, si estende dalla fascia altimontana-subalpina. Tuttavia su quest'ultimi substrati i lariceti sono spesso sporadici o addirittura assenti.

La crescita del larice non sembra essere vincolata dalle temperature minime in quanto ben tollerate dalla conifera (fino a  $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) al contrario, la presenza è fortemente condizionata dalla disponibilità di luce (specie eliofila) e dalla durata del suo periodo vegetativo. Pertanto occupa principalmente i versanti solivi dove la neve sciogliendosi anticipatamente rispetto ai versanti in ombra, conferisce un' immediata disponibilità idrica durante il risveglio vegetativo. Questi fattori climatici ed ambientali limitanti fanno sì che la conifera riesca ad insediarsi in quelle aree in cui per un qualche accidente la vegetazione, arborea ed erbacea, non è in grado di esercitare alcuna competizione. Tale capacità rende il larice una specie pioniera e ricolonizzatrice d'alta quota, in grado di costituire formazioni vegetali transitorie o durevoli nel tempo. La categoria dei lariceti comprende le seguenti formazioni vegetali (DEL FAVERO, 2004):

- Lariceto primitivo.
- Lariceto tipico.
- Lariceto in successione con pecceta.

- Lariceto a megaforbie.
- Lariceto-cembreto primitivo.
- Lariceto-cembreto con abete rosso.
- Lariceto cembreto con ontano verde.
- Lariceto in successione con faggeta o con abieteteto o cembreta.



**Figura 9: distribuzione sull'arco alpino di alcune formazioni vegetali appartenenti alla categoria dei "lariceti".**

a) Lariceto tipico; b) lariceto in successione con pecceta; c) lariceto primitivo; d) lariceto-cembreto tipico.

### 3.0 MATERIALI E METODI

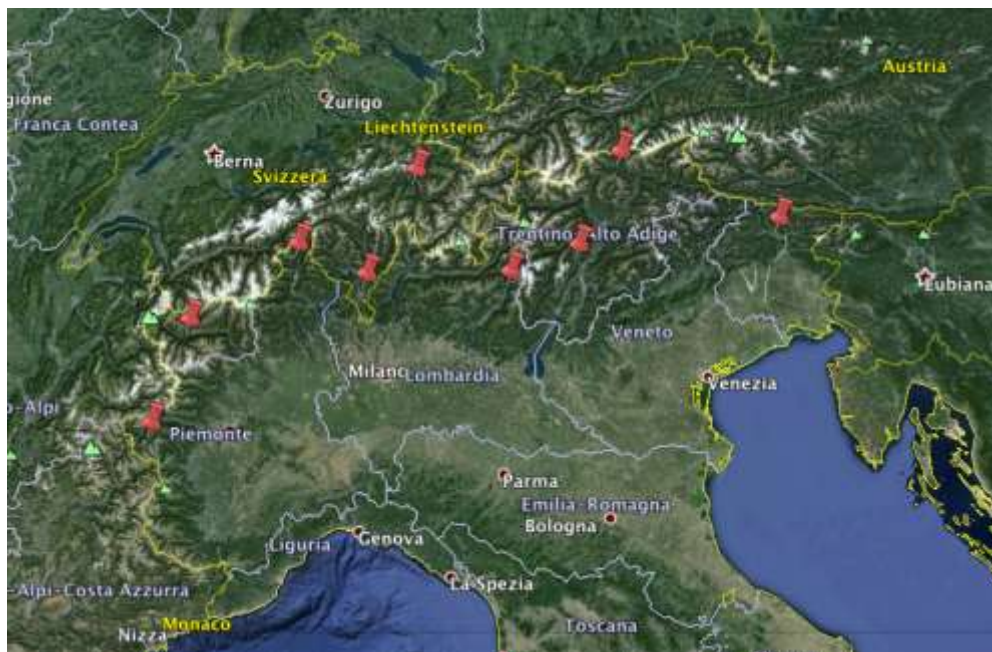
Durante la stagione estiva 2015 sono stati raccolti circa cinque campioni, per ciascuna specie forestale sopra descritta, in nove aree di saggio distribuite lungo tutto l'arco alpino (totale campioni = 270 circa).

L'estrazione fenolica e l'analisi cromatografica, è stata effettuata su 35 campioni (tabella I) in quanto il lavoro è ancora in svolgimento.

AREE DI CAMPIONAMENTO	SPECIE OGGETTO D'ANALISI					
	faggio	larice	abete rosso	frassino maggiore	nocciolo	betulla
Trentino Occidentale	GD25F	GD11L	GD7AR	GD52FM	GD46N	GD33BE
Valle Camonica	LF09F	LF18L	LF12A	LF25FE	LF04N	LF28B
Alpi Cozie	GDS05F	GDS03L	GDS04A	GDS05FM	GDS05N	GDS03B
Alpi Carniche	GDSF01F	-	GDSF02A	GDSF01FM	GDSF02N	GDSF01B
Verbania	GR4F	GR5L	GR4A	GR6FM	GR5N	GR5B
Svizzera	ABFS01	ABLD01	ABPE01	ABFE01	ABCA01	ABBP01

**Tabella I: Aree di campionamento e rispettivi campioni effettuati.**

### 3.1 Aree di campionamento



Le aree di campionamento sono state scelte in modo da ottenere una distribuzione equa, lungo tutto l'arco alpino. Di seguito vengono riportate le ubicazioni delle zone di prelievo delle radici (tabella II).

Regione	Area di campionamento e provincia
Piemonte	Alpi Cozie – Torino e Cuneo
Piemonte	Alpi Lepontine - Verbania
Valle d'Aosta	Alpi Graie - Aosta
Lombardia	Alpi Retiche - Brescia
Trentino	Alpi Retiche - Trento
Trentino	Alpi Noriche - Bolzano
Svizzera	Alpi Retiche - Coira
Svizzera	Prealpi Lombarde - Lugano
Friuli- Venezia Giulia	Alpi Carniche – Udine

**Tabella II: ubicazioni delle zone di prelievo dei campioni radicali.**



La modalità di prelievo dei campioni radicali ha interessato i soggetti arborei situati a diverse altitudini e condizioni ambientali (versanti solivi, all'ombra, impluvi, ecc.), cosicché l'influenza esercitata dagli elementi climatici e ambientali fosse differente. In alcune specie (betulla e l'abete rosso) è stato possibile campionare soggetti presenti nelle differenti fasce altitudinali. Quest'ultime vengono classificate, all'aumentare di quota, secondo la seguente distinzione (DEL FAVERO, 2004):

- Fascia basale: caratterizzata, oltre che per la limitata altitudine (fino a 250 m s.l.m), anche per la ridotta pendenza (inferiore al 5%).
- Fascia submontana: presenta pendenze ed altezze maggiori (fino a 800-1000 m s.l.m).
- Fascia montana: fascia con maggiori pendenze. Essa si spinge fino a quota 1400 m s.l.m.
- Fascia altimontana: si estende fino a 1700 m s.l.m.
- Fascia submontana: fascia altimetrica il cui limite raggiunge i 1900 m s.l.m nelle Alpi Orientali, mentre nelle Alpi Occidentali si spinge fino a 2200 m s.l.m.

Diversamente nelle specie dove ciò non è stato possibile, a causa delle limitazioni climatiche, i campionamenti sono stati effettuati cercando di mantenere la massima variabilità ambientale ed altimetrica.

Di seguito sono elencate le procedure impiegate per la raccolta dei campioni:

- Una volta identificata la pianta d'interesse è stata scavata una buca nei pressi delle radici più grosse utilizzando una pala e piccone.



**Figure 10: prelievo dei campioni radicali.**

- Successivamente è stata effettuata una attività di scavo attorno alla radice primaria fino all'individuazione delle radici secondarie più sottili. La porzione asportata, delle radici più fini, ha riguardato i primi 20 cm del tratto apicale. Per ogni estirpazione sono stati raccolti almeno 10 grammi di campione.



**Figure 11: parte apicale asportata.**

- È stata svolta, mediante una leggera scrollatura, un' immediata pulitura grossolana dei campioni con le quali è stato possibile rimuovere gran parte delle particelle terrose aderenti alle radici raccolte.
- Ogni campione raccolto è stato posto in un sacchetto ed in seguito gli è stato attribuito un codice alfanumerico di riconoscimento (es: GDSP01F).
- Mediante l'uso di un altimetro o dispositivo GPS è stato rilevato il livello altimetrico e le coordinate geografiche dei rispettivi punti di raccolta dei campioni.
- Infine è stata effettuata la compilazione di una scheda di campo in cui sono stati inseriti i codici alfanumerici dei campioni ed i dati stazionali relativi alla raccolta.



**Figura 12: campione di radici appena raccolto con aggregati terrosi ben aderenti in evidenza**

## **3.2 *Analisi di laboratorio***

Il lavoro svolto in laboratorio è stato condotto durante il periodo autunnale e invernale del 2015. Parte della preparazione dei campioni e la cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) sono state effettuate presso i laboratori del Ge.S.Di.Mont (Edolo), mentre la macinazione a secco e l'estrazione delle sostanze chimiche sono state eseguite nei laboratori a Milano. Nelle pagine seguenti vengono descritte sia le operazioni svolte che le procedure, condotte in laboratorio, riguardanti l'analisi dei campioni. Queste ultime possono essere distinte in tre fasi principali:

- 1) Preparazione dei campioni.
- 2) Estrazione fenolica.
- 3) Cromatografia liquida.

### **PREPARAZIONE DEI CAMPIONI**

La preparazione dei campioni di radici, svolta successivamente all'attività di campo, ha previsto le seguenti operazioni:

#### ***a) Pulitura***

La pulizia delle radici raccolte è stata effettuata mediante lavaggi con acqua distillata. Tale procedura è servita per rimuovere le particelle terrose presenti sulle radici; possibili agenti di contaminazione dei componenti chimici radicali.

#### ***b) Essiccazione***

L'essiccazione è stata eseguita mediante l'utilizzo di una stufa. In quest'ultima i campioni sono rimasti per 24 ore ad una temperatura di 60 °C.



**Figure 13: essiccazione dei campioni in stufa.**

### ***c) Macinazione a secco delle radici***

La macinazione a secco delle radici è stata attuata attraverso l'utilizzo di un vibromulino. Tale strumento si avvale di giare e sfere, entrambe d' acciaio, all'interno delle quali è stato introdotto il campione oggetto d'analisi. In seguito all'avviamento il vibromulino ha svolto una macinazione delle radici per circa 30 secondi. I forti moti oscillatori orizzontali delle giare (fig.14 b) determinano un movimento violento delle sfere contenute, le quali impattando sia sulla parete delle stesse giare che sul campione contenuto, creano una miscelazione e polverizzazione omogenea.



a)



b)

**Figure 14: a) vibromulino in azione; b) tipologie di giare e sfere.**

Successivamente il campione polverizzato è stato filtrato con un setaccio a maglia fine. Ciò ha permesso di separare le parti più fini (utilizzate per le analisi) da quelle più grossolane (scartate).



**Figure 15: setacciamento dei campioni polverizzati.**

La quantità di campione polverizzato, utilizzata per l'estrazione, è stata di 2 grammi. Tale massa è stata poi introdotta in una provetta a fondo conico, codificata e raggruppata in base alla specie.

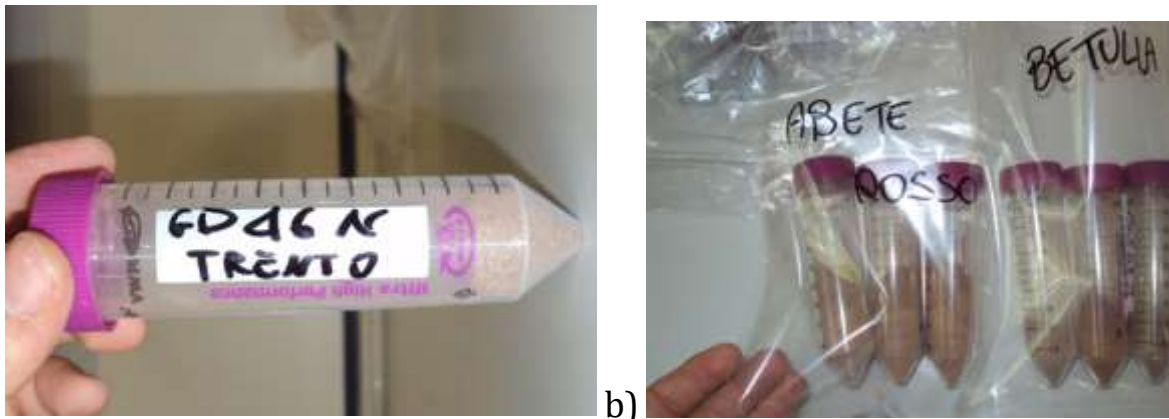


Figure 16: a) campione polverizzato all'interno (2 g) di provetta a fondo conico codificata; b) raggruppamento delle provette codificate.

## 2)ESTRAZIONE FENOLICA

All'estrazione fenolica è stata dedicata gran parte della sperimentazione in quanto, tale tecnica articolata, comporta l'esecuzione di molteplici fasi con l'utilizzo di varie strumentazioni. Nelle pagine seguenti vengono descritte le principali procedure, che hanno permesso l'isolamento delle sostanze chimiche analizzate dai campioni radicali di partenza.

### ESTRAZIONE CON SOLVENTE ACCELERATO (ASE)

L'estrazione con solvente accelerato, indicata con la sigla ASE (*Accelerated Solvent Extraction*), è una delle più moderne tecniche utilizzate per l'estrazione solido-liquida. Questo metodo, introdotto da Dionex nel 1995, utilizza solventi (o miscele di essi) conferendo come risultato dei campioni allo stato semi-solido o liquido. Tale tecnica permette, utilizzando un solvente in condizioni sub-critiche (temperature tra 40 e 200°C e pressioni di 1500-2000 psi), di velocizzare l'estrazione degli analiti dalla matrice solida, di ridurre la quantità di solvente necessaria e di automatizzare il tutto.

In questa sperimentazione, il criterio di scelta dei solventi e dei parametri del metodo, sono stati effettuati rifacendosi a lavori simili presenti in letteratura ed

a sperimentazioni pilota, precedentemente condotti in laboratorio. L'estrazione con l'ASE è stata effettuata mediante utilizzo di un solo solvente ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) decidendo di operare a temperatura ambientale ( $20^\circ\text{C}$ ), in quanto l'utilizzo di temperature elevate avrebbe determinato l'ossidazione fenolica.

### ***Descrizione procedura con tecnica ASE.***

Il campione, prima di sottoporsi all'azione dell'ASE, deve essere preparato e caricato all'interno delle celle dell'ASE. Tale procedura è stata effettuata eseguendo le seguenti operazioni:

- Miscelazione del campione: la procedura è stata eseguita mescolando 2 grammi di campione polverizzato con 2 grammi di terre diatomee (farine fossili abrasive che favoriscono la reazione e l'omogeneizzazione). Successivamente tutto il composto (solido) è stato reso omogeneo mediante l'utilizzo di un mortaio e pestello.
- Caricamento della cella ASE: con questa operazione il campione omogeneo è stato introdotto all'interno delle celle, nelle quali sono state deposte, da entrambe i lati, le rispettive membrane filtranti.



a)

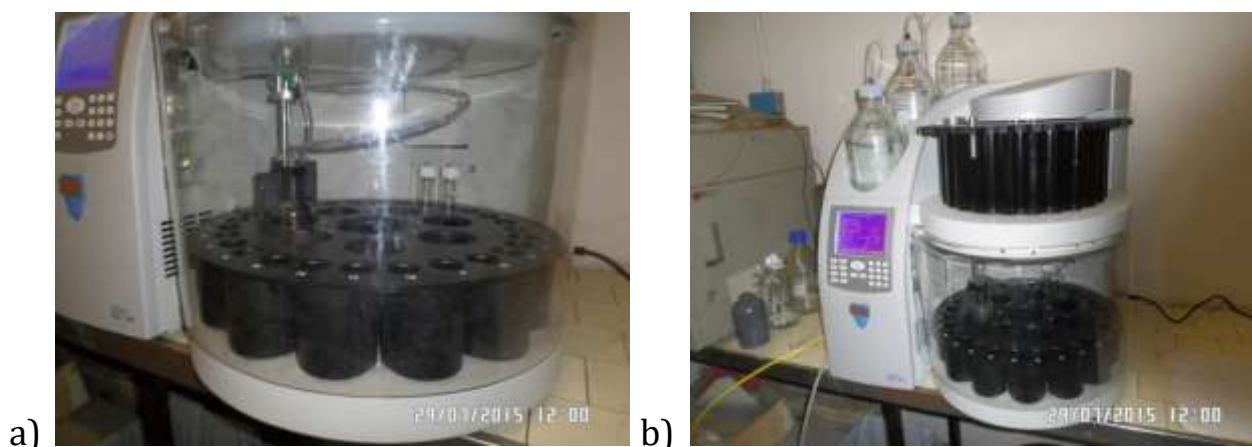


b)

**Figure 17: a) riempimento cella d'estrazione; b) cella d'estrazione.**



Terminata la fase di caricamento delle celle ASE è stato possibile effettuare l' estrazione liquida con solvente accelerato. La procedura d'estrazione ha previsto 3 cicli da 5 minuti per ogni cella, in cui ad ogni ciclo, sono stati introdotti circa 10 ml di metanolo.



**Figure 18: strumento ASE in azione.**

Il risultato ottenuto, alla fine del processo d'estrazione, è stato 30 ml di soluzione (campione) contenuti in una provetta per ogni campione solido analizzato. Tale soluzione contiene oltre alle molecole chimiche oggetto d'analisi (acidi fenoli), altre sostanze chimiche come gli acidi volatili ed i pigmenti colorati; in particolare quest'ultimi, sono responsabili delle differenti tonalità riguardanti la colorazione del liquido.



**Figure 19: campioni in soluzione, dopo l'estrazione con solvente accelerato.**

Terminata la fase d'estrazione con solvente accelerato è stato opportuno, per l'isolamento delle molecole chimiche contenute nel campione, procedere con l'evaporazione della soluzione e la successiva estrazione in fase solida.

## **EVAPORAZIONE ACIDI VOLATILI**

### ***Descrizione procedura con Rotavapor.***

Affinché tale processo possa verificarsi è stato opportuno effettuare una rimozione preliminare dell'acqua dalla soluzione (campione). Per far ciò sono stati introdotti 2 cucchiaini di sodio solfato ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), all'interno della soluzione la quale è stata poi centrifugata per 5 minuti. In seguito, attraverso l'uso di una pipetta, la soluzione (campione) è stata rimossa facendo attenzione a non aspirare il solfato di sodio depositato sul fondo. Il campione è stato poi introdotto all'interno di un pallone a fondo conico, il quale è stato immediatamente tappato e rivestito fino al collo con della carta d'alluminio per evitare l'evaporazione e la foto-ossidazione.



**Figure 20: soluzioni di campioni contenute in palloni a fondo conico.**

Successivamente mediante l'utilizzo di un rotavapor (evaporatore rotante), è stato possibile portare a secco il campione. Il pallone contenente la soluzione, dopo esser stato agganciato all' evaporatore rotante, è stato introdotto all'interno del bagno rotante ( $T=38^{\circ}\text{C}$ ) fino alla completa evaporazione del campione (10 minuti). Il risultato ottenuto è stato il seguente:

- Un pallone contenente il solvente condensato, in cui sono racchiusi gli acidi volatili presenti nel campione estratto (lo scarto).
- Un pallone contenente il residuo del campione, nel quale vi sono le molecole chimiche da analizzare (acidi fenolici).

In quest'ultimo sono stati poi aggiunti 12 ml di metanolo, il quale è stato poi omogeneamente mescolato, grazie all'utilizzo di un vortex, fino al scioglimento completo del residuo. Tale diluizione è necessaria per l'esecuzione della successiva estrazione in fase solida.



**Figure 21: rotavapor in azione**

## **ESTRAZIONE IN FASE SOLIDA ( SPE)**

L'estrazione in fase solida (*Solid-Phase Extraction*), indicata comunemente con l'acronimo SPE è una tecnica di estrazione che utilizza l'affinità di una matrice solida (fase sorbente), generalmente impaccata in colonnine, verso uno o più composti presenti in una sostanza semplice o complessa. Il campione (fase mobile) viene fatto passare attraverso la fase solida, la quale trattiene gli analiti, utili da estrarre e concentrare, oppure quelli interferenti da eliminare. Le sostanze intrappolate dalla matrice, con il lavaggio della colonnina tramite un solvente appropriato, vengono eluite e raccolte in apposite provette. L'estrazione in fase solida prevede le seguenti fasi:

- Fase di condizionamento della matrice utilizzata.
- Fase di caricamento del campione.
- Fase di raccolta del campione

### ***Fase di condizionamento della matrice utilizzata***

Questa fase, eseguita per preparare la colonnina a ricevere il campione, comporta l'attivazione della matrice solida contenuta nelle cartucce SPE (*Super Clean LC8*). Tale procedura è stata svolta riempiendo con 5 ml di CH<sub>3</sub>OH (1 ml × 5 volte), le cartucce SPE, facendo però attenzione ad introdurre il solvente prima che il menisco toccasse la matrice. Successivamente, la cartuccia è stata riempita con altri 5 ml di acqua distillata (1 ml × 5 volte), accertandosi, sempre del livello del menisco. Questo accorgimento è fondamentale per mantenere la matrice continuamente attiva. La matrice C8 possiede un'elevata affinità fenolica; condizione necessaria affinché, tali molecole utili per la sperimentazione, vengano catturate. La scelta di utilizzare questa componente solida si è basata su pubblicazioni precedenti in letteratura riguardanti analisi simili.

### ***Fase di caricamento del campione***

Questo fase prevede l'introduzione, all'interno delle cartucce di SPE, di 3 ml campione che è stato introdotta secondo le modalità descritte per la fase precedente (1 ml alla volta facendo attenzione al livello del menisco). Le molecole della soluzione non trattenute della matrice, sono state raccolte in un becher ed eliminate in quanto non oggetto d'analisi cromatografica. Queste sono rappresentate prevalentemente da pigmenti colorati, come le clorofille e i carotenoidi. Il desorbimento dei fenoli, contenuti nella matrice, è avvenuto in seguito al lavaggio della colonnina con 2 ml di metanolo.



a)



b)



c)

**Figure 22: a) e b) fase di caricamento del campione; c) depressione del collettore.**

### ***Fase di raccolta del campione***

Dalle provette sono stati estratti, per ogni campione radicale, circa 2 ml di campione liquido immediatamente immesso all'interno di un piccolo *vial*. Dopo aver sigillato il tappo con del nastro PTFE, le *vials* sono state codificate e conservate in freezer ad una temperatura di  $-80^{\circ}\text{C}$ .



**Figure 23: estratti di campione in vials codificati.**

### **3) CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTE PRESTAZIONI (HPLC)**

L'HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) è uno strumento analitico derivato dalla cromatografia classica (TLC) e si basa sugli stessi principi.

Nell'HPLC la forza che permette all'eluente di scorrere nella colonna, facendo sì che la fase mobile scorra all'interno della fase stazionaria, è rappresentata dalla pressione applicata da una pompa in testa alla colonna. Tale energia non solo rende il processo più rapido, ma permette di ottenere un maggior numero di piatti teorici il che, vuol dire, una migliore risoluzione. La separazione dei componenti avviene con tempistiche diverse, in relazione all'interazioni che si creano fra i costituenti della miscela e le due fasi. Mediante l'utilizzo di un rivelatore, differente a seconda della natura del campione, è possibile misurare l'assorbimento della luce ultravioletta o della luce visibile, da parte degli analiti. Generalmente vengono indagate lunghezze d'onda che vanno dai 200 ai 280 nm, in quanto forniscono cromatogrammi con picchi migliori.

### ***Descrizione procedura con HPLC.***

In questa sperimentazione, essendo gli analiti composti aromatici grandi e pesanti, la cromatografia liquida ad alta prestazione è stata eseguita mediante l'utilizzato di un solvente. Nel nostro caso, per distinguere bene i picchi, sono stati utilizzati due solventi differenti:

- metanolo (CH<sub>3</sub>OH)
- H<sub>2</sub>O con 0.05% di acido formico (COOH)

Durante la cromatografia (durata 65 minuti) le differenti percentuali dei solventi sono state introdotte in momenti precisi (tabella III). Inoltre nel corso dell'analisi è variata anche la quantità del flusso introdotta. Inizialmente essa è stata di 1ml/min , poi nel corso dell'analisi è aumentata di 0.2 µl finché non è stato raggiunto un livello di pressione costante nel tempo. Le molecole uscenti dalla colonna sono state percepite mediante l'utilizzo di rilevatori in grado di misurare l'assorbimento della luce UV da parte del campione.

Nel caso di studio è stato scelto di utilizzare una lunghezza d'onda di 280 nm, in quanto a tale valore è stato possibile individuare i picchi migliori. Le tipologie dei solventi utilizzati e le loro percentuali, introdotte all'interno della colonna durante la cromatografia, sono state scelte sulla base di precedenti sperimentazioni e letterature trattanti HPLC di composti aromatici (ZOU et al., 2005; TANG et al.,2010).



Istante	CH <sub>3</sub> OH	H <sub>2</sub> O 0.05% Ac. Formico
0 minuti	20%	80%
0-3 minuti	20%	80%
3-20 minuti	45%	55%
20-30 minuti	80%	20%
30-40 minuti	100%	-
40-50 minuti	100%	-
50-60 minuti	20%	80%
60-65 minuti	20%	80%

**Tabella III: tabella relativa alle differenti percentuali di solvente introdotte nella colonna durante lo svolgimento della HPLC.**

### ***3.3 Analisi statistiche***

I dati restituiti dall'analisi cromatografica di ciascun campione sono stati organizzati in una matrice contenente la presenza/assenza dei picchi relativi ai vari tempi di ritenzione (+ = presenza di picco, - = assenza di picco)[tabella IV] .

Tale matrice è stata poi analizzata statisticamente mediante *cluster analysis* al fine di raggruppare i campioni con il medesimo *fingerprint* cromatografico.

La *cluster analysis* è stata condotta in binario utilizzando l'indice di Jaccard. Tale indice varia da 0 (campioni identici) a 1 (campioni completamente diversi).

L'analisi statistica è stata effettuata usando il software R 3.2.1 (R Development Core Team, 2015).

Frassino						Larice					Abete rosso					
GDS05	GD52	LF25	GRSFM	GDSF01	ABFE01	GDS03	GD11	ABLD01	GRSL	LF18	GDS04	GD7	GR4A	GDSF02A	ABPE01	LF12
-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+

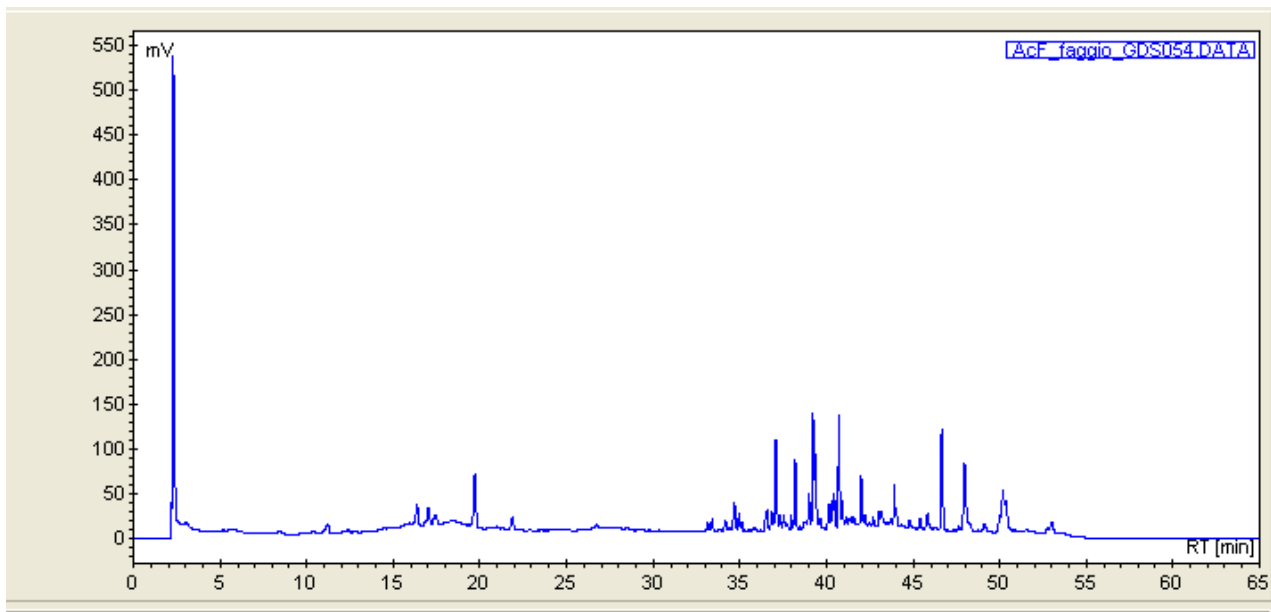
Rt	Faggio						Frassino						
	GDS05	GD25	GR4F	ABFS01	GDSF01F	FAG01	GDS05	GD52	LF25	GRSFM	GDSF01	ABFE01	
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
5,6	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	
6,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
6,8	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
7	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	
7,8	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
8,1	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	
8,4	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
8,5	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	
8,6	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	
8,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
9,7	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

**Tabella IV: dati tabulati dei picchi rilevati mediante analisi cromatografica.**

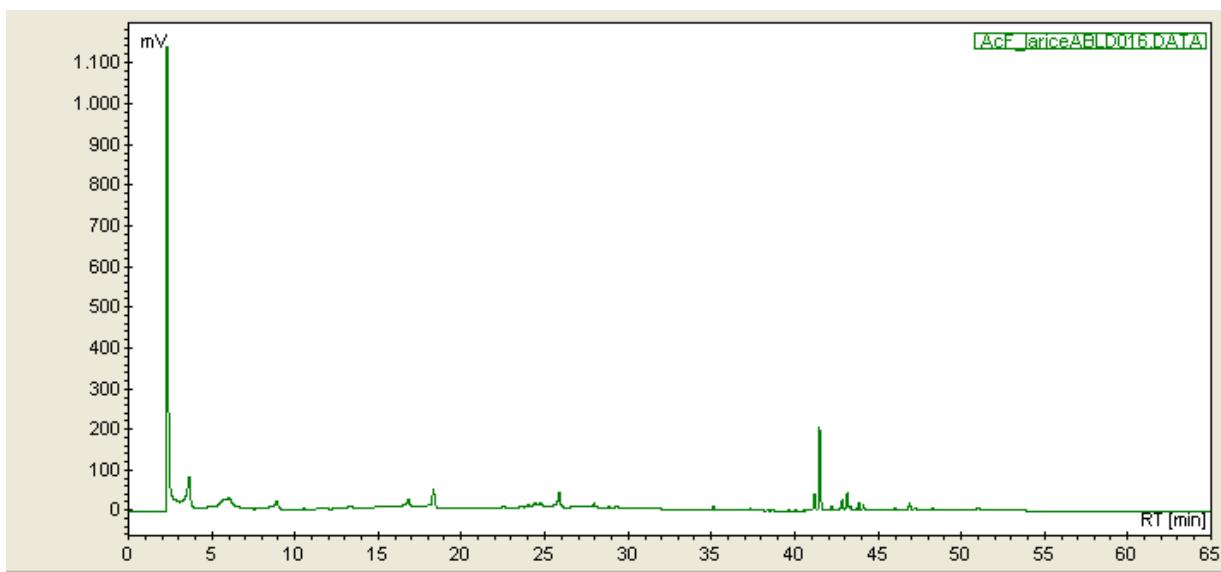
## 4.0 RISULTATI

L'analisi cromatografica HPLC ha restituito un cromatogramma per ogni singolo campione analizzato. Di seguito vengono riportati sei cromatogrammi relativi a sei campioni riferiti alle differenti specie considerate in questo elaborato.

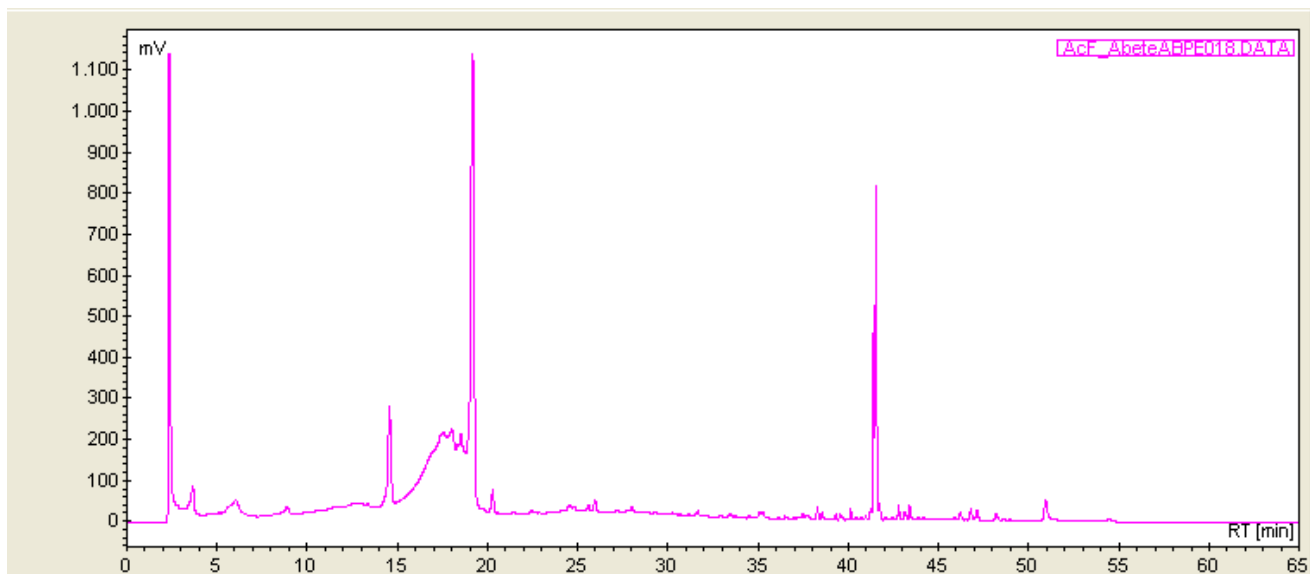
- Cromatogramma di un campione di *Fagus sylvatica* (cod. GDS05):



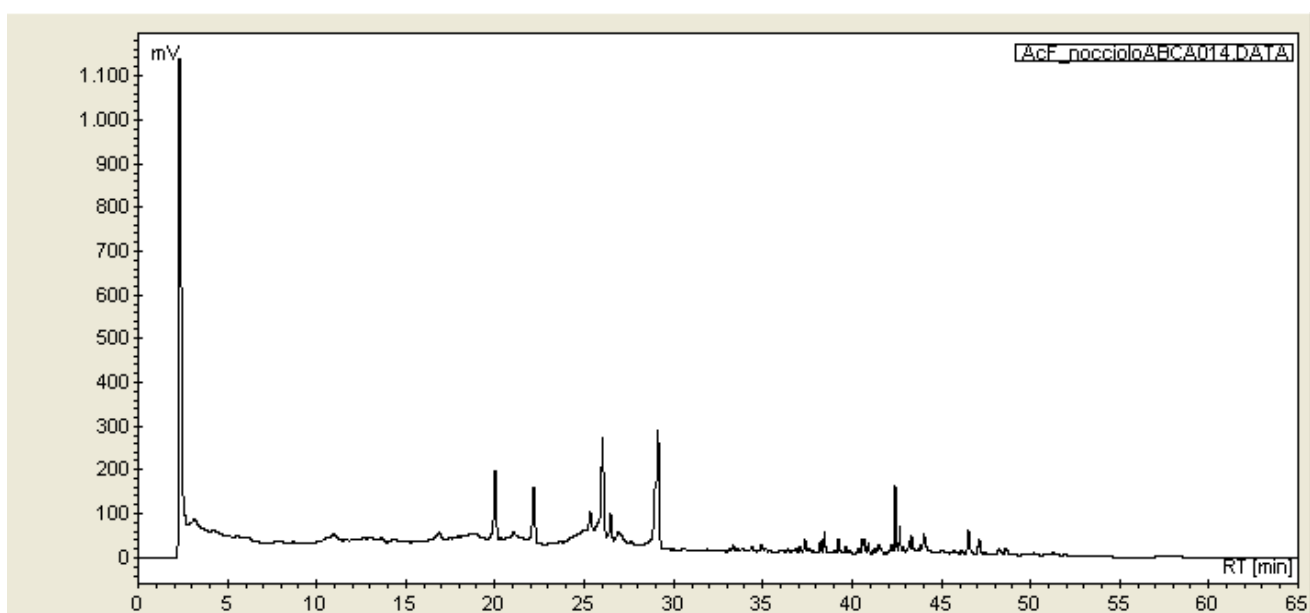
- Cromatogramma di un campione di *Larix decidua* (cod. ABLD01):



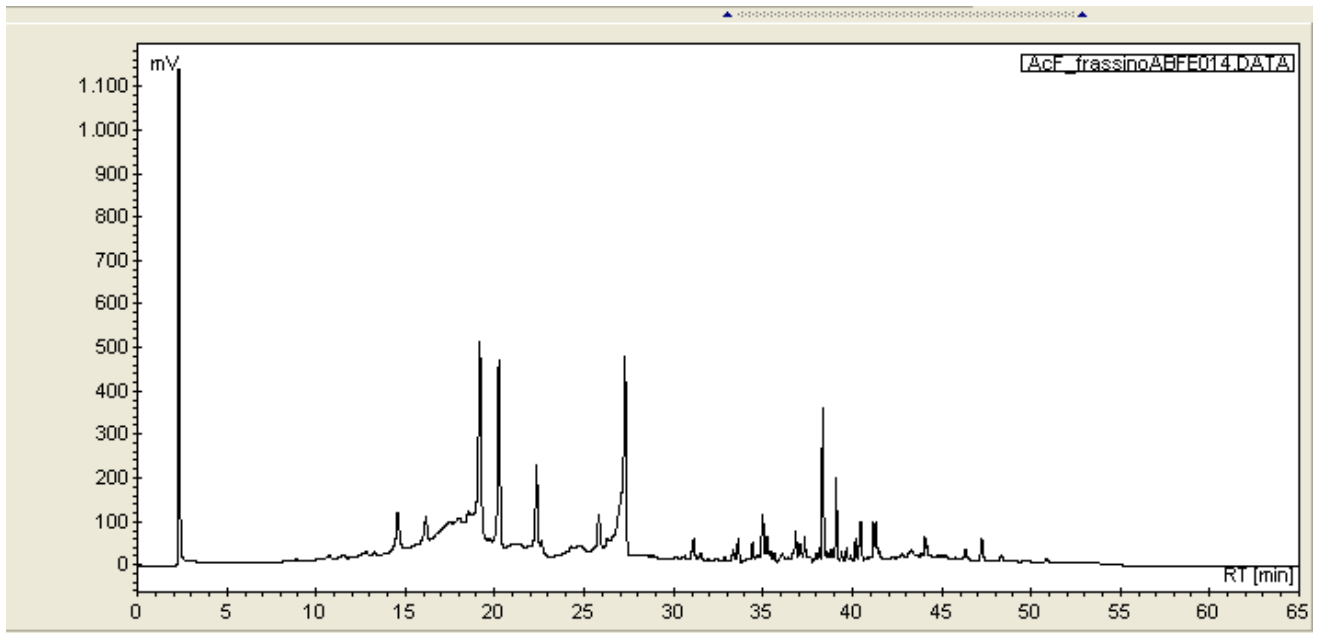
- Cromatogramma di un campione di *Picea abies* (cod. ABPE01):



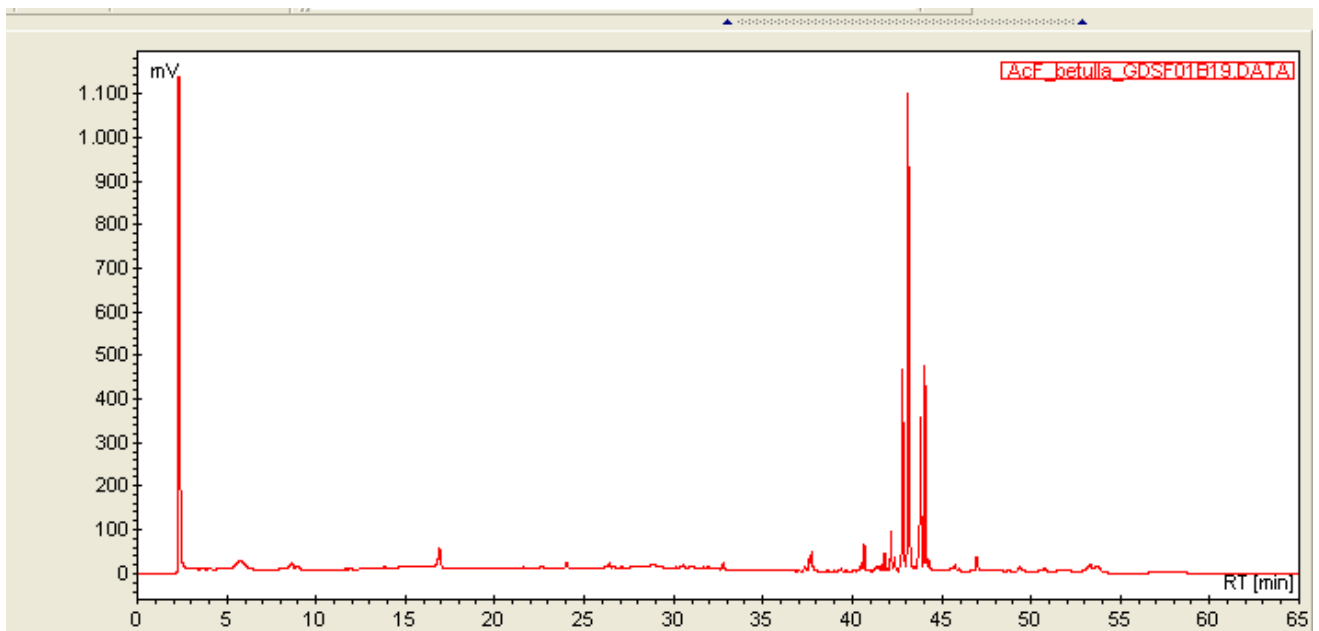
- Cromatogramma di un campione di *Corylus avellana* (cod. ABCA01):



- Cromatogramma di un campione di *Fraxinus excelsior* (cod. ABFE01 )



- Cromatogramma di un campione di *Betula pendula* (cod. GDSF01B):



In figura 24 è riportato il dendrogramma dei campioni analizzati restituito dalla *cluster analysis*.

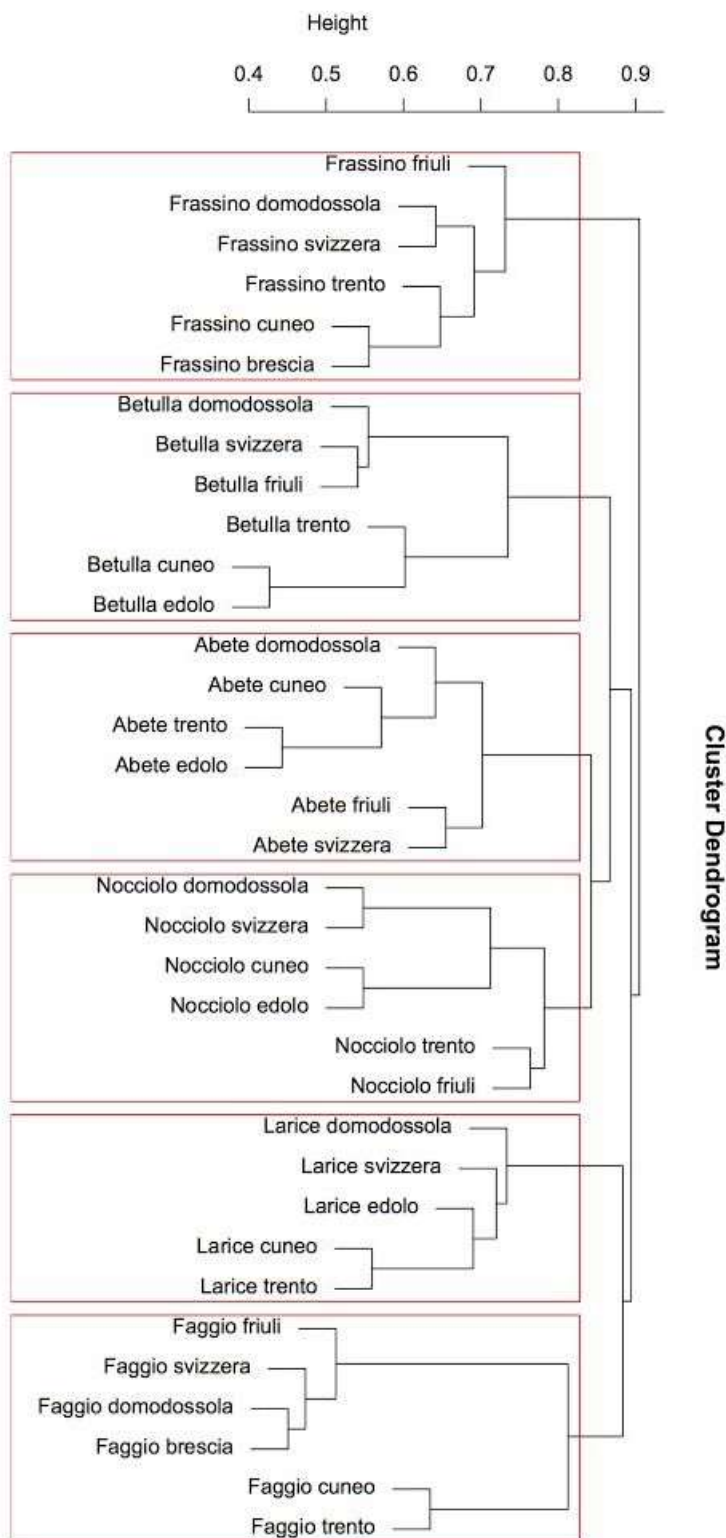


Figure 24: dendrogramma ottenuto con *cluster analysis*.

## 5.0 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Dall'analisi dei cromatogrammi restituiti dall'analisi HPLC degli estratti dei vari campioni di radici, è stato osservato che i campioni di piante appartenenti alla stessa specie presentano grafici molto simili fra loro. Tali osservazioni sono state confermate dall'analisi statistica infatti, come si può osservare dal dendrogramma restituito dalla *cluster analysis* (Fig. 24), i vari campioni analizzati sono stati raggruppati in sei grandi gruppi (*cluster*) che corrispondono esattamente alle sei specie investigate. Questo risultato convalida il fatto che nonostante organismi di una stessa specie possano essere dislocati in aree ed ambienti differenti (dell'arco alpino), i metaboliti presenti nelle loro radici sono molto simili seppur vi sia una leggera variabilità intraspecifica. La causa di tale variabilità è per lo più dovuta all'azione esercitata dall'ambiente, il quale è in grado di influenzare la fisiologia dell'organismo vegetale e quindi della radice.

Purtroppo con l'analisi svolta in questa sperimentazione non è stato possibile determinare la natura delle molecole chimiche responsabili dei picchi osservati nei cromatogrammi, in quanto ciò avrebbe necessitato della spettrometria di massa ad alta risoluzione; una tecnica molto costosa e poco accessibile. Probabilmente gran parte dei picchi evidenziati nei cromatogrammi sono dovuti a fenoli, ma ciò andrebbe confermato da ulteriori studi.

Attraverso l'osservazione dei *fingerprints* (appartenenti a campioni della stessa specie) è stato possibile osservare la coincidenza, a determinati tempi di ritenzione, di alcuni picchi; fenomeno che sta a dimostrare l'esistenza di molecole chimiche comuni all'interno delle radici di piante della stessa specie. Al contrario altri picchi non coincidono in campioni della stessa specie. Questa caratteristica conferma quanto detto precedentemente riguardante l'influenza ambientale. Studi più specifici potrebbero essere condotti per investigare quali molecole siano imputabili ad effetti ambientali e quali siano questi effetti.

Nonostante in questo lavoro siano stati analizzati solo alcuni dei campioni raccolti, la sperimentazione condotta fin qui ha portato a risultati interessanti che potranno essere da spunto per possibili future sperimentazioni. Inoltre sarebbe opportuno che tale lavoro venisse ampliato alle specie erbacee ed arbusti, in modo da capire se quanto osservato nelle sei specie forestali investigate sia valido anche per altre specie.

In conclusione in seguito ai risultati ottenuti dai campioni analizzati, è possibile rispondere affermativamente alla domanda posta nel titolo dell'elaborato finale, in quanto questo studio ha dimostrato che è possibile l'identificazione di una specie vegetale analizzando gli estratti delle radici. Inoltre ritengo che questa bellissima esperienza di tirocinio, svolta sia in campo che in laboratorio, sia stata estremamente utile per integrare la mia formazione inerente al percorso di studi intrapreso. Questo lavoro mi ha permesso d'apprendere nuove conoscenze in ambito ecologico, forestale, botanico ed acquisire competenze teoriche e pratiche riguardanti le strumentazioni e le tecniche in laboratorio chimico-biologico.



## 6.0 RINGRAZIAMENTI

Un ringraziamento speciale a...

- mio padre Marino: per gli sforzi intrapresi in questi anni affinché potessi compiere questo importante percorso di studio.
- mia madre Loredana: per l'aiuto e il supporto datomi durante gli studi e per il tempo dedicatomi ad ascoltarmi prima e dopo ogni esame dimostrandomi sempre d'essere fiera di me.
- mia sorella Barbara: per essersi sempre ricordata di me sostenendomi anche nei momenti più difficili e di sconforto.
- Ramona: per aver sempre creduto in me e per avermi costantemente sopportato ed incoraggiato prima di ogni esame.
- mia nonna Maria: per aver acceso un cero e pregato ad ogni esame sostenuto e per avermi tramandato, con i suoi saggi consigli, certe pratiche agricole di montagna che solo l'esperienza può insegnare!
- mia zia Rosella: per i suoi utilissimi consigli.
- al naturalista dott. Luca Giupponi: per il fondamentale aiuto e supporto datomi durante la stesura di codesto elaborato. Inoltre è lecito porgere a Luca un ulteriore ringraziamento per le molteplici esperienze intraprese assieme e per le preziose spiegazioni fornitemi in quest'anni, le quali hanno contribuito ad integrare ed approfondire le mie conoscenze riguardanti il mondo vegetale.
- alla professoressa Annamaria Giorgi: per i suoi preziosi suggerimenti in merito alla modalità di stesura dell'elaborato finale.
- alla dottoressa Alessandra Manzo: per la sua cordiale disponibilità ed assistenza rivoltami durante le attività svolte in laboratorio.

- all'amico Roberto Spadaccini: per il suo costante supporto fornitomi in questo importante percorso di studi. In particolare un immenso grazie per avermi accompagnato durante l'attività di raccolta dei campioni in questa sperimentazione e per aver così condiviso bellissime esperienze, a cui resterò legato per tutta la vita!

- A Fabio, Stefano, Mariarosa, Michele e Gianluigi: per i bellissimi momenti passati in loro compagnia come in pausa pranzo o sul treno, durante quel viaggio dalle volte infinito!

Un grazie di cuore a tutti coloro che hanno sempre creduto in me e che mi hanno aiutato a diventare la persona che oggi sono.



## 7.0 BIBLIOGRAFIA

AESCHIMANN D., LAUBER K., MOS D.M., 2004 - *Flora alpina* – Zanichelli, 2600 pp.

BAGNARA L. & SALBITANO F., 1997 - *Aspetti architettureali di apparati radicali in cedui di faggio avviati all'altofusto*. - Atti I Congresso SISEF, Legnaro 4-6 Giugno, 317 – 319.

BERNETTI G., 1995 - *Selvicoltura speciale*.- U. T. E. T., Torino, 415 pp.

BERNETTI P. & MONTELEONE I., 2000 - *Variabilità genetica in popolazioni di frassino ed acero di monte dell'Italia settentrionale*.- S.I.S.E.F., Atti II° Convegno, Bologna, 243 - 247.

BISCHETTI G., CHIARADIA E.A., SIMONATO T., SPEZIALI B., VITALI B., VULLO P & ZOCCO A., 2005 - *Root strength and root area ratio of forest species in Lombardy (Northern Italy)*- Springer - Plant and Soil 278:11–22.

BORGHETTI M. & MAGNANI F., 1999 - *Relazioni idriche del faggio* – In Scarascia Mugnozza G.; *Ecologia strutturale e funzionale di faggete Italiane*.- Edagricole, Bologna pp. 107-131.

CAMERON A. D., 1996 - *Managing birch woodlands for the production of quality timber* - Forestry, 69: 357-371.

CANADELL J., JACKSON R.B., EHLERINGER J.R., MOONEY H.A., SALA O.E, SCHULZE E.D., 1996 - *Maximum rooting depth of vegetation types at the global scale* - Springer-Verlag – Oecologia., 108:583-595.

CREDARO V. & PIROLA A., 1975 - *La vegetazione della provincia di Sondrio*- Amm. Prov. Di Sondrio, 104 pp.

DARWIN C. & DARWIN F., 1880 - *The Power of Movement in Plants* - John Murray, London.

DELL'AGNOLA G., 1989 - *Evoluzione della sostanza organica al suolo.* - Dipartimento Foreste, Regione Veneto, Mestre- Venezia, 69 - 74.

DEL FAVERO R., 2004 - *"I boschi delle regioni Alpine italiane"*- Coop. Libreria Editrice Università di Padova" , Padova, 602 pp.

DEL FAVERO R., ANDRICH O., DE MAS G., LASENC., POLDINI L., 1990 - *La vegetazione forestale del Veneto. Prodromi di tipologia forestale.* - Regione Veneto, Dipartimento Foreste, Mestre-Venezia, 177 pp.

DUFLOT H., 1995 - *Le frêne en liberté.* - IDF, Paris, 192 pp.

EDWARD F. & GILMAN., 1990 - *Tree Root Growth and Development. I. Form, Spread, Depth and Periodicity* - J. Environ. Hort. 8(4): 215-220.

FENAROLI L., 1938 - *Il larice nelle provincie lombarde.*- L'Alpe, n 11-12, 408- 413.

GIUDICI F. & PIVIDORI M., 2002 - *La betulla. Una specie forestale poco conosciuta.* - Sherwood, 83, 31- 37.

HUIKARI O., 1959 - *Experiments on the effect of anaerobic media upon the roots of birch pine and spruce seedlings* - Commun. Insitut. Forest. Fenn., 50, 16 pp.

JACKSON B., MOORE L.A., HOFFMANN W.A., POCKMAN W.T., LINDER C.R., 1999 - *Ecosystem rooting depth determined with caves and DNA*- Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 96, pp. 11387–11392.

KINNAIRD J.W., 1974 - *Effect of the site conditions on the regeneration of birch* - Journal of Ecology, 62, 467-472.

LAUBER K., WAGNER G., GYGAX A., 2012 - *Flora Helvetica* – Haupt, 1946 pp.

MANCUSO S. & VIOLA A., 2013 - *Verde brillante* - Giunti, Firenze, 135 pp.

MORANDINI R. 1956 - *Il larice nella Venezia Tridentina*.- Pubbl. Staz. Sperim. Di Selvicoltura, Firenze, 270 pp.

PIGNATTI., 1982 - *Flora d' Italia*.- 3 voll., Edagricole, Bologna

POLLACCI G., 1865 - *Sulla traspirazione dell'acido carbonico per le radici delle piante e, applicazione di questo fenomeno alla loro nutrizione* - Estratto dal repertorio italiano di chimica e farmacia, Anno I, Vol. I – N ° 6 Giugno 1865.

R CORE TEAM, 2015 - *R: A language and environment or statistical computing*. - Vienna, Austria: R Fondation for Statistical Computing.

REUBENS B., POESEN J., DANJON F., GEUDENS G., MUYS B., 2007 - *The role of fine and coarse roots in shallow slope stability and soil erosion control with a focus on root system architecture: a review* - Trees - 21:385 – 402.

RUBNER D., 1960 - *Die pflanzengeographischen Grundlagen des Waldbaus.*- 620 pp.

SANESI G. & CECCHINI G., 1999 - *I suoli delle faggete: caratteristiche ed aspetti funzionali.* - In: Scarascia Mugnozza G., *Ecologia strutturale e funzionale di faggete italiane.*- Edagricole, Bologna, 71 - 79.

SUSMEL L., 1990 - *Principi di ecologia.*- CLEUP, Padova, 1206 pp.

TANG D., 2010 - *Simultaneous chemical fingerprint and quantitative analysis of Ginkgo biloba extract by HPLC-DAD* - Springer-Verlag China, 396:3087-3095.

TRANQUILLINI W., 1979 - *Physiological Ecology of the Alpine Timberland.* - Springer-Verlag, Berlin, 137 pp.

TUTIN T.G., HEYWOOD V.H., BURGESS N.A., VALENTINE D.H., 1976 - *Flora europea* – Cambridge university press., 534 pp.

ZANELLA A., TOMASI M., DE SIENA C., FRIZZERA L., JABOL B., NICOLONI G., 2001- *Humus forestali.*- Edizioni Centro Ecologia Alpina, Trento, 321 pp.

ZANZI-SULLI A., 1981- *Studi sulla produzione di seme nelle peccete subalpine di Paneveggio.*- Ann. Acc. Sc. For., 63-86.

ZOU P. , HONG Y., KOH H.L., 2005 - *Chemical fingerprint of Isatis indigotica root by RP-HPLC and hierarchical clustering analysis* - Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 38, 514-520.