

## I Corso Microscopia elettronica e confocale in ambito botanico

Modena, 4-5 Dicembre 2017

### IL CONTRIBUTO DELLA MICROSCOPIA ELETTRONICA A SCANSIONE NELLO STUDIO DEI RAPPORTI PIANTA - AMBIENTE

Elisabetta Sgarbi

Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Modena e Reggio Emilia

E-mail: [elisabetta.sgarbi@unimore.it](mailto:elisabetta.sgarbi@unimore.it)

Gli organismi vegetali, per loro natura “immobili”, non possono sfuggire alle variazioni ambientali e dunque hanno evoluto un sofisticato sistema per coordinare la crescita, lo sviluppo, tutte le funzioni vitali, con l’ambiente nel quale vivono. Lo studio di alcuni tratti morfologici e micromorfologici consente un primo importante approccio alla comprensione delle strategie di adattamento delle piante e alle loro capacità di risposta agli stress biotici e abiotici. Una breve parte introduttiva presenta le semplici tecniche di preparazione e allestimento dei campioni per l’osservazione al SEM. Sono poi illustrati i risultati di analisi micromorfologiche condotte su tratti fogliari di genotipi di vite (*Vitis vinifera*) che ne hanno consentito la caratterizzazione e che sono correlabili alla resistenza a stress. Passando dal macro- al micro-ambiente: l’osservazione al SEM ha permesso di seguire lo sviluppo di foglie in piante *in vitro*, in diverse condizioni di un micro-ambiente “artificiale”, valutandone alcuni tratti in relazione alla funzionalità e alla capacità di rispondere in maniera ottimale allo stress del trapianto durante l’acclimatazione.

### LA MICROSCOPIA ELETTRONICA A SCANSIONE APPLICATA ALLO STUDIO DELLE MICROALGHE

Tiziana Romagnoli

Dipartimento di Scienze della Vita e dell’Ambiente, Università Politecnica delle Marche

E-mail: [t.romagnoli@univpm.it](mailto:t.romagnoli@univpm.it)

Per lunghi anni lo studio delle microalghe è stato fatto esclusivamente mediante l’uso della microscopia ottica, portando a identificazioni imprecise a causa della scarsa risoluzione. Con l’avvento della microscopia elettronica a scansione (SEM) è stato possibile evidenziare dettagli ultrastrutturali rilevanti che hanno permesso di fare chiarezza in merito alle questioni tassonomiche, tanto più importanti quando si tratta di riconoscere specie rilevanti dal punto di vista ambientale (specie potenzialmente tossiche, specie bioindicatorie, etc.). L’uso del SEM, mediante una opportuna preparazione, permette inoltre di fare studi sulla struttura di comunità, che si rivelano particolarmente utili per conoscere il rapporto delle microalghe con i substrati, e di valutare la composizione dei popolamenti in termini di forme di crescita e delle loro variazioni temporali e spaziali.

## MICROSCOPIA E IMMUNOMICROSCOPIA ELETTRONICA NELLO STUDIO DELLE INTERAZIONI PIANTA/PATOGENO

Rita Musetti

*Dipartimento di Scienze Agroalimentari, Ambientali e Animali, Università di Udine*

*E-mail: rita.musetti@uniud.it*

Molti sono i microorganismi che vivono in stretto contatto con le piante. In alcuni casi, da semplice “coesistenza” il rapporto si è evoluto in vere e proprie relazioni simbiotiche (come nel caso delle micorrize, dei batteri rizobi, degli endofiti). In altri casi il rapporto si è evoluto in modo sbilanciato, con effetti dannosi per la pianta, come nel caso dei microrganismi patogeni, quali funghi, virus, batteri e fitoplasmii. Le relazioni tra pianta e patogeni si rendono manifeste attraverso l’espressione di sintomi macroscopici, dietro i quali però si nascondono complesse interazioni regolate a livello biochimico, molecolare e ultrastrutturale.

## MICROSCOPIA NELLO STUDIO DI SPECIE OFFICINALI

Claudia Giuliani, Martina Bottoni, Gelsomina Fico

*Dipartimento di Scienze Farmaceutiche (DISFARM), Orto Botanico “G. E. Ghirardi” - Toscolano Maderno (Brescia), Università degli Studi di Milano*

*E-mail: claudia.giuliani@unimi.it*

La lezione sarà incentrata su specie officinali-target, appartenenti alle famiglie Lamiaceae e Cannabaceae, conservate presso l’Orto Botanico Ghirardi di Toscolano Maderno (Brescia). Tali entità rappresentano gli elementi cardine di un progetto di ricerca quadriennale (codice identificativo IRIS - progetto 2014-PDF-0363) avviato nel 2015 presso il Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell’Università di Milano. Il progetto si fonda su una duplice visione, in quanto le specie-target sono presentate non solo secondo la classica visione antropocentrica che le propone come cibo, come fonte di principi attivi a fini terapeutici o cosmetici, ma anche secondo una visione fitocentrica. Una visione che palesa ai nostri occhi le interazioni che le piante pongono in essere con la componente biotica ambientale (ad esempio, attrazione nei confronti di pronubi, relazioni con i microrganismi della fillosfera, difesa verso patogeni o erbivori) attraverso lo studio della produzione ed emissione dei metaboliti secondari che mediano tali interazioni. Nell’ottica di questo duplice approccio di indagine, il progetto di ricerca

integra analisi multidisciplinari, a partire dalla valutazione delle caratteristiche morfologiche dei tessuti secretori e dalla caratterizzazione del profilo fitochimico dei metaboliti secondari fino a casi di studio specifici sul loro ruolo ecofunzionale. Come attività preliminare, abbiamo focalizzato la nostra attenzione sulla micromorfologia e anatomia delle strutture secernenti responsabili della produttività in composti organici volatili e deposizioni epicuticolari. I campioni sono stati sottoposti alle procedure di preparazione standard per l’indagine morfologica tramite microscopia ottica ed elettronica, consentendo di studiare a) la morfologia e la distribuzione dei tessuti secretori sugli organi vegetativi e riproduttivi, b) la natura istochimica delle sostanze secrete, c) le modalità di produzione e di rilascio di queste sostanze, nonché l’ultrastruttura dei tessuti.

Nel corso della lezione sarà presentato come tali informazioni risultino determinanti nella comprensione delle strategie di interazione tra le specie-target e la componente biotica ambientale.

## LOW-VACUUM SEM+EDX SU CAMPIONI “FRESCHI” DI PIANTE

Marta Marmiroli

*Dipartimento di Scienze Chimiche della Vita e della Sostenibilità Ambientale, Università di Parma*

*E-mail: marta.marmiroli@unipr.it*

Grazie alle moderne innovazioni tecnologiche in ambito del funzionamento dei microscopi a scansione è diventato possibile analizzare campioni vegetali (o di altri regni) anche se non sono compatibili con il vuoto. L’utilizzo di nuovi principi di funzionamento e di nuovi detector rende possibile mantenere un grado di basso vuoto, 70-80 Pa (Low-vacuum), o addirittura di condizioni ambientali (Environmental SEM, ESEM) all’interno della camera ospitante i campioni. Di conseguenza essi possono essere osservati senza ricorrere a preparazioni di disidratazione chimica, tramite basse temperature o essiccamento. I principali vantaggi di poter analizzare i campioni subito dopo la raccolta sono: i) conservazione delle strutture; ii) possibilità di procedere con la microanalisi EDX in modo diretto e senza l’interferenza dei reagenti usati nelle preparazioni. Durante la presentazione verranno mostrati esempi di analisi morfologiche di organi e tessuti vegetali in modalità Low-vacuum ed ESEM, accompagnate da microanalisi su macro- e micro-nutrienti. Tuttavia ogni tecnica pone delle problematiche e degli svantaggi che verranno illustrati, sempre tramite esempi.

## **VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA DELLE PIANTE AD APPROCCI AGRONOMICI ECO-SOSTENIBILI ATTRAVERSO STUDI ULTRASTRUTTURALI IN MICROSCOPIA ELETTRONICA**

Alessandra Trinchera

*Centro di ricerca Agricoltura e Ambiente – Roma, Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA)*

*E-mail: alessandra.trinchera@crea.gov.it*

L'uso del microscopio a scansione elettronica operante in pressione variabile (30-10 Pa), equipaggiato con *Beam-Sleeve Technology* e lampada LaB<sub>6</sub> ad alta brillantezza, permette di osservare campioni biologici ad alto tenore di umidità, come i vegetali, anche senza pre-trattamento di metallizzazione. Tale tecnica analitica può essere utilmente applicata a studi ultrastrutturali nel settore agronomico, ad esempio, per verificare l'efficacia dell'introduzione di soluzioni agronomiche eco-compatibili ai fini della riduzione d'uso degli input chimici per la fertilizzazione e la protezione delle colture. Diverse ricerche vengono quindi richiamate, quali esempi di studi ultrastrutturali di settore, ed in particolare:

- lo studio della compatibilità innesto-portinnesto nelle ortive per fronteggiare le fisiopatologie, attraverso l'osservazione delle strutture vascolari di neo-formazione durante il processo di innesto;
- l'effetto della gestione agronomica sulle interazioni rizosferiche simbiotiche, mediante valutazione della micorrizzazione radicale della pianta coltivata;
- la verifica delle interazioni allelopatiche tra differenti specie vegetali (ad es., colture per servizio agroecologico ed erbe infestanti) mediante inibizione della germinazione o riduzione dell'allungamento radicale.

## **CRIO-MICROSCOPIA ELETTRONICA A SCANSIONE E MICROANALISI A RAGGI X DI CAMPIONI VEGETALI MANTENUTI IDRATATI-CONGELATI DURANTE L'ANALISI STRUTTURALE E ANALITICA**

Antonio Minnocci

*Cryo Scanning Electron Microscopy and Energy-dispersive X-ray Microanalysis Lab, Istituto Scienze della Vita, Scuola Superiore Sant'Anna, Pisa*

*E-mail: antonio.minnocci@santannapisa.it*

L'analisi di campioni vegetali criofissati opportunamente e mantenuti in uno stato idratato-congelato attraverso l'uso

di un Cryo-SEM (-180°C), accoppiato ad un sistema di rilevamento di microanalisi a raggi X, offre numerose peculiari possibilità di indagine: si possono immobilizzare i campioni rapidamente in un certo momento fisiologico, annullando le modificazioni del loro naturale stato chimico e strutturale e mantenendo tale condizione fino al termine dell'analisi. Questo permette di analizzare materiali superficiali normalmente rimossi dalle fissazioni chimiche, di esporre strutture interne attraverso freeze-fracturing *in situ*, di analizzare processi fisiologici dipendenti dal grado di idratazione delle cellule. Le informazioni strutturali così ottenute possono essere integrate con i risultati sulla distribuzione degli ioni all'interno dei diversi organi, anche attraverso la produzione di mappe qualitative di distribuzione dei maggiori elementi presenti al di sopra del rumore di fondo.

## **LA MICROSCOPIA CONFOCALE IN AMBITO VEGETALE: BASI TEORICHE E APPLICAZIONI NELLO STUDIO DELLE INTERAZIONI PIANTE-MICRORGANISMI**

Andrea Genre

*Dipartimento di Scienze della Vita e Biologia dei Sistemi, Università di Torino*

*E-mail: antonio.minnocci@santannapisa.it*

L'introduzione della microscopia confocale e delle proteine fluorescenti ha segnato una svolta fondamentale nella biologia cellulare vegetale, quanto e più che in altri ambiti. La cellula vegetale, per le sue caratteristiche, rappresenta infatti un soggetto particolarmente adatto all'applicazione delle diverse capacità di questa metodica in studi di imaging *in vivo*. La lezione presenterà un'introduzione alle basi teoriche della microscopia a fluorescenza e in particolare della microscopia confocale a scansione laser, descrivendo la struttura e il funzionamento di un microscopio confocale, i vantaggi e limiti di questo approccio. Nella seconda parte della lezione, particolare attenzione verrà dedicata alle applicazioni della microscopia confocale ai campioni vegetali, con riferimento alle potenzialità e ai problemi più ricorrenti in questi studi.