

STUDIO DI VITIS VINIFERA MEDIANTE INDAGINI DI MICROSCOPIA A RAGGI X

Simone Codato

In un articolo intitolato "Science and Complexity" del 1948, il matematico e padre della biologia molecolare Warren Weaver elaborò un'analisi sui problemi fino ad allora affrontati dalla scienza [1]. Ne ricavò una suddivisione tra "problemi semplici" e "complessità disorganizzata di problemi", quest'ultima influenzata da numerose variabili gestibili solo con il ricorso all'analisi probabilistica. Tra questi due estremi collocò i problemi riferibili a una "complessità organizzata" cioè influenzata da un numero di variabili e interrelazioni che non possono essere né ricondotte alla sola probabilità né ridotte ad una semplice formula.

Oggi giorno ci si riferisce a questo con il concetto di "sistema complesso", costituito da sottoinsiemi interagenti tra loro; con variabili fortemente interconnesse che evolvono nel tempo. Ciò presuppone che non sia sufficiente la conoscenza di ognuna di esse singolarmente per poter stabilire o prevedere l'evoluzione complessiva del sistema. Nello stesso articolo Weaver indicò nella potenza di calcolo dei computer e nella collaborazione interdisciplinare le risorse necessarie per affrontare una complessità organizzata.

Un vigneto si inserisce a pieno titolo nel concetto di sistema com-

plesso ed è compito della scienza aggregare tecnologie e competenze multidisciplinari per comprendere i meccanismi funzionali che regolano la fisiologia della vite e la loro dipendenza da fattori biotici e abiotici, al fine di definire mezzi e protocolli agronomici per una gestione efficace del patrimonio viticolo.

Gli aspetti anatomici rivestono un ruolo fondamentale in questo, indagati tradizionalmente con strumenti di analisi come il microscopio ottico. Il susseguirsi dei progressi tecnologici ha permesso di mettere a disposizione altre tecniche, su tutte quelle derivanti dallo sfruttamento dell'interazione tra materia e raggi X, come nel caso della micro tomografia computerizzata ad alta risoluzione (Micro Computed X-Ray Tomography, μ CT), una tecnica di analisi e visualizzazione digitale tridimensionale tra le più versatili ed efficaci nella comprensione dei complessi meccanismi che regolano lo sviluppo e la funzionalità degli organismi viventi.

In un tomografo il campione viene posto tra una sorgente di raggi X e una matrice di sensori (A). Il fascio di raggi X, opportunamente collimato e focalizzato sull'asse di rotazione del campione, subisce nell'attraversarlo una serie di fenomeni di parziale attenuazione, in funzione delle sue

caratteristiche anatomiche e strutturali. La frazione non assorbita genera un segnale che viene tradotto in una immagine della sezione bidimensionale del campione per ogni frazione di angolo di rotazione.

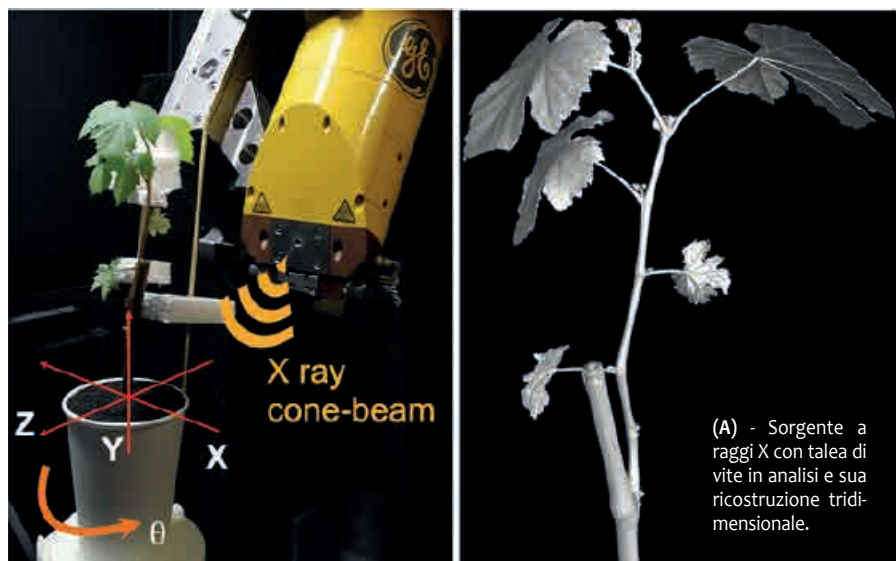
Elaborando tramite software computazionali la serie di sezioni registrate, è possibile generare una ricostruzione volumetrica tridimensionale, con informazioni sulle caratteristiche anatomiche - strutturali analizzabili e misurabili senza la necessità di sezionare o alterare il campione.

Le diverse strutture della pianta assorbono facilmente i raggi X, con attenuazioni in funzione della loro composizione. Questo permette un'alta definizione di analisi, rendendo la tomografia un mezzo ideale sia nello studio di tessuti legnosi che di campioni fortemente idratati. Queste tecniche consentono anche di effettuare analisi in vivo e ripetute, permettendo di seguire l'evoluzione morfologica della pianta al progredire della stagione vegetativa.

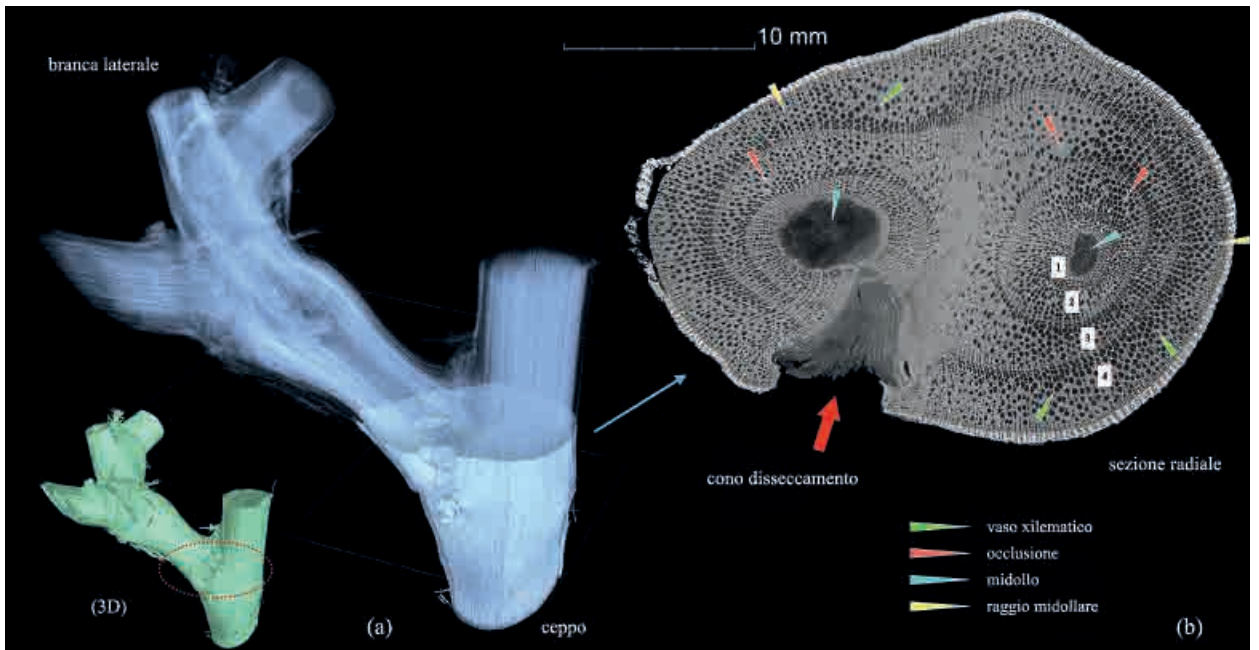
Casi studio

A partire dal 2019 sono state effettuate una serie di analisi che hanno permesso di visualizzare a livello micrometrico molti dettagli anatomico-strutturali di campioni di vite prelevati in vigneto o in vivo su piante allevate in vaso [2, 3].

In figura (B) è rappresentata un'analisi tomografica condotta su un campione di vite di quattro anni. Il forte contrasto di assorbimento di raggi X tra i tessuti legnosi e l'aria ha permesso di evidenziare con ottima risoluzione le componenti strutturali e la presenza di vasi xilematici occlusi. La formazione di occlusioni può essere innescata da eventi di disidratazione ed embolia o in risposta ad attacchi di patogeni ma anche come conseguenza di un modello programmato di senescenza dei tessuti che nel



(A) - Sorgente a raggi X con talea di vite in analisi e sua ricostruzione tridimensionale.



(B) - Rappresentazione solida e in semi trasparenza (a) del campione di vite e relativa proiezione di sezione radiale (b).

tempo perdono il ruolo funzionale di conduzione linfatica e ne assumono uno strutturale.

La ricostruzione anatomica ottenuta mediante tomografia si è dimostrata ideale per lo studio dell'organizzazione spaziale del sistema di trasporto xilematico della vite. La rappresentazione tridimensionale in semi trasparenza (a) ne evidenzia la complessità, con dettagli non ottenibili con tecniche tradizionali [4]. Quanto osservato riflette le dinamiche di sviluppo della pianta al susseguirsi dei cicli annuali e delle modificazioni indotte dagli interventi di potatura, per i quali la μ CT ha permesso di evidenziare i dettagli del conseguente sviluppo di coni di disseccamento e aree necrotiche, come evidenziato dall'analisi di figura (C), condotta su un campione di circa venticinque anni.

I ripetuti tagli annuali, concentrati sulla parte apicale del ceppo, avevano portato nel tempo allo sviluppo di un'ampia zona di legno morto. Negli ultimi otto anni di vita della pianta il sistema di potatura era stato modificato a due branche contrapposte, evitando tagli invasivi e selezionando i capi a frutto nella parte dorsale delle branche, allo scopo di distribuire su queste i coni di disseccamento e preservare una sezione di legno vivo lungo la porzione ventrale.

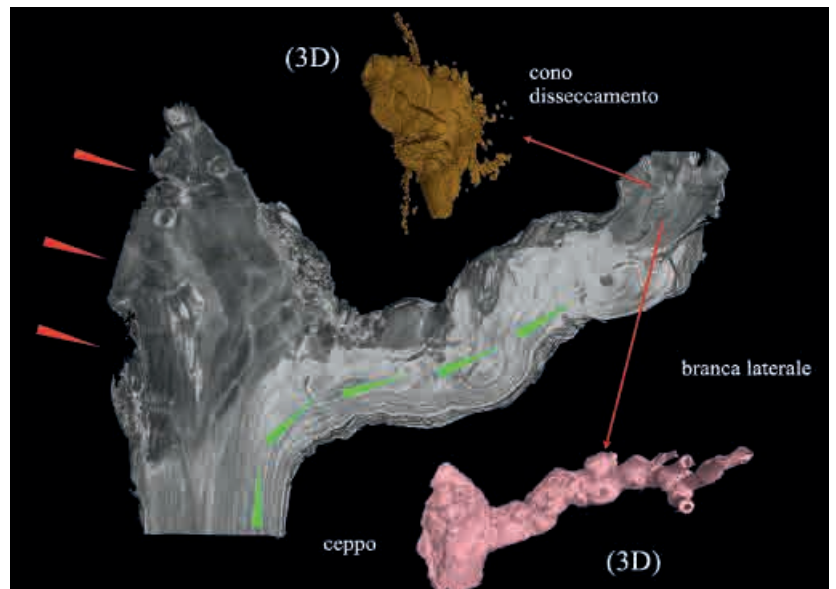
Allo scopo di studiare i meccanismi della neogenesi tessutale sono

state costituite mediante taleggio una serie di piante in vaso, sottoposte ad analisi in vivo ripetute nel tempo.

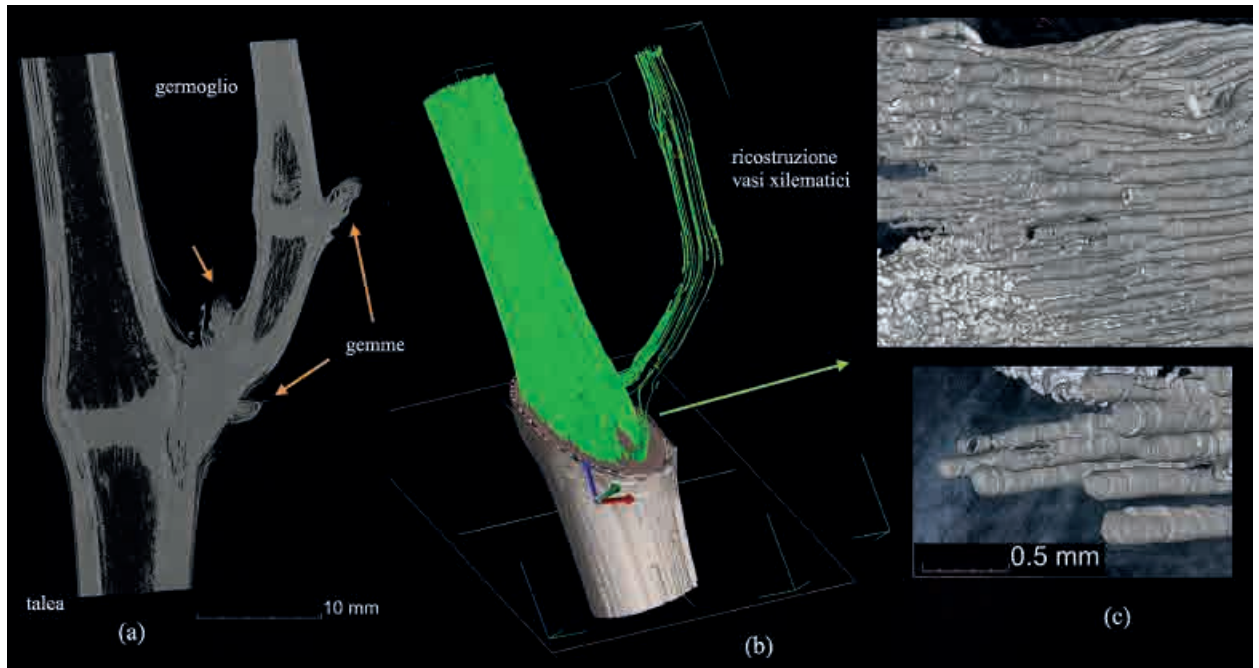
La figura (D) riporta una sezione longitudinale e una ricostruzione tridimensionale dei vasi xilematici di una talea con germoglio in via di sviluppo, dimostrando l'efficacia della tecnica nel ricostruire dettagli microscopici anche su tessuti verdi fortemente idratati, permettendo di visualizzare chiaramente gemme e vasi in formazione.

Un altro importante meccanismo di neo formazione di tessuti riguarda

l'innesto e con analisi μ CT su barbatelle commerciali è stato possibile ricostruirne i particolari anatomici (E). Oltre a informazioni sulla connessione e sviluppo condiviso della vascolarizzazione xilematica (a), le analisi hanno evidenziato una asimmetria nello sviluppo dei tessuti collegata al profilo a omega dell'innesto e una estesa discontinuità tra i due bionti (b, c), con presenza di aree necrotiche che potrebbero risultare potenziali siti di attività di patogeni e spiegare l'incidenza crescente delle malattie del legno anche su giovani vigneti.



(C) - Sezione longitudinale di vite di circa venticinque anni e ricostruzione tridimensionale di un cono di disseccamento.



(D) - Sezione longitudinale (a) e ricostruzione tridimensionale della vascolarizzazione su talea di vite (b, c).

Studio delle malattie del legno della vite

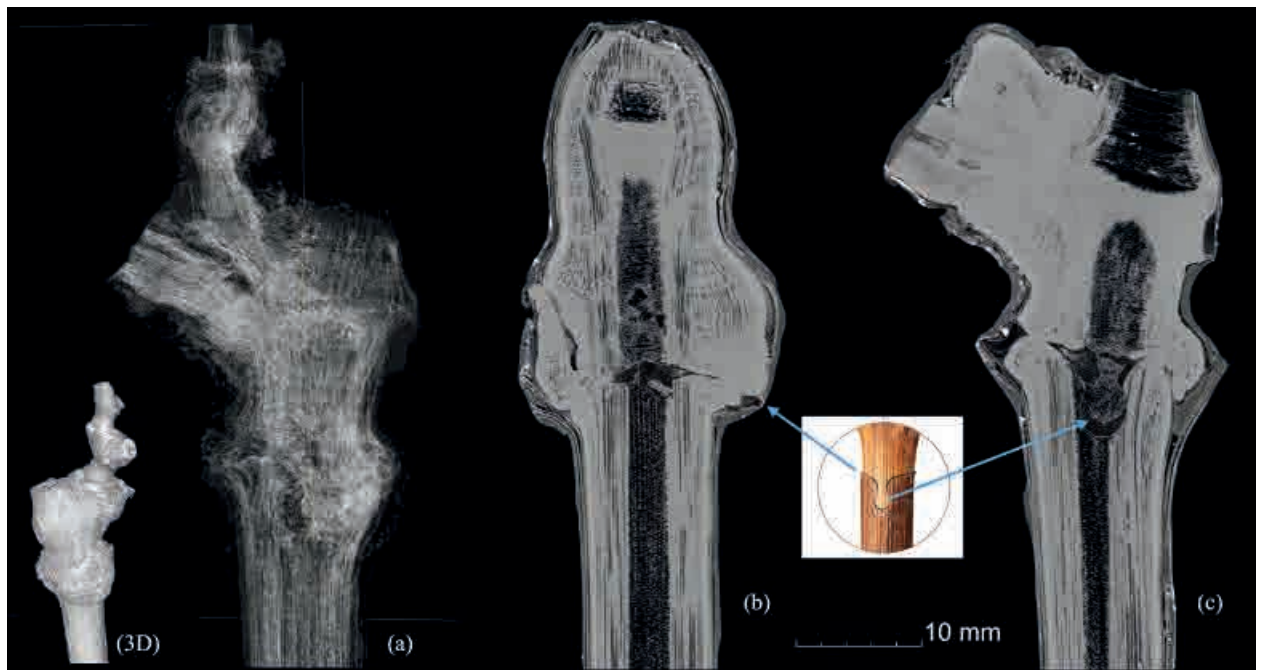
Il complesso delle malattie del legno della vite ("Grapevine Trunk Diseases" - GTDs) si riferisce ad un gruppo di patologie associate alla presenza di funghi patogeni che colonizzano i tessuti legnosi della pianta. I molteplici agenti della malattia, naturalmente presenti in vigna, possono vincere le

difese della pianta, portando ad una progressiva severa sindrome degenerativa con compromissione della produzione e deperimento della pianta fino a morte apoplettica.

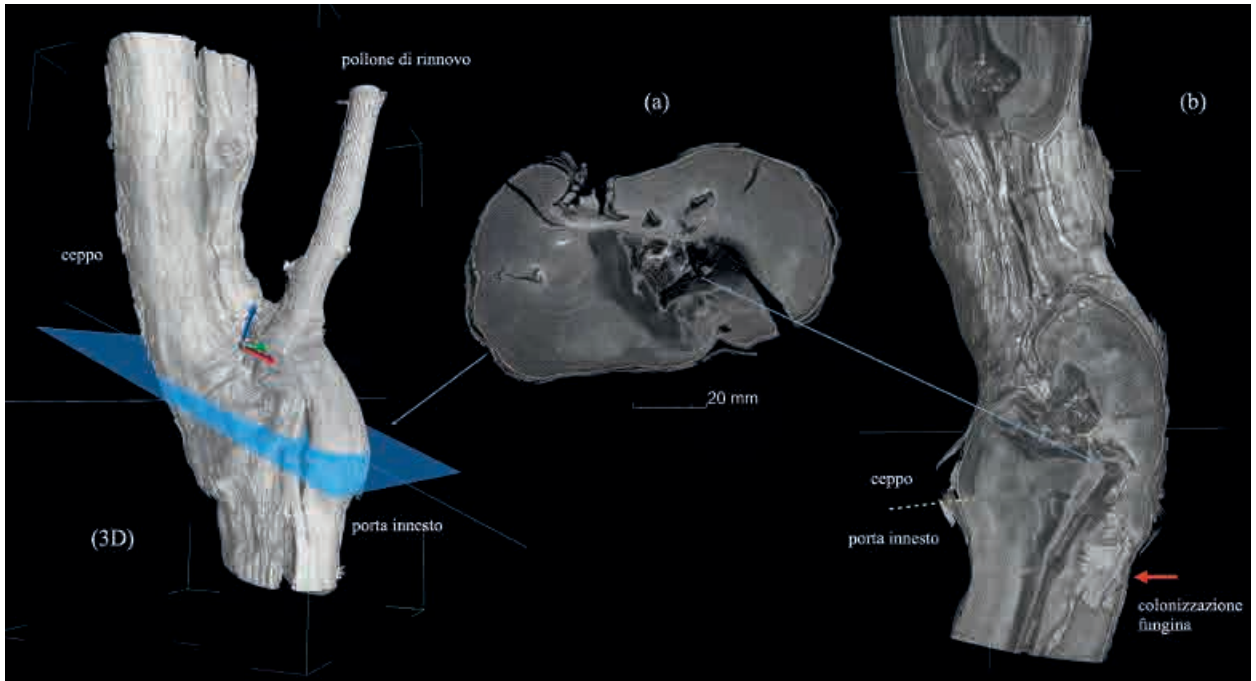
Le GTDs sono una delle maggiori minacce per la viticoltura e la loro incidenza è in costante ascesa, nonostante gli enormi sforzi prodotti a livello di ricerca scientifica e pratiche agronomiche per contenerle.

A fronte della grande complessità dell'eziologia e delle influenze da fattori biotici ed abiotici che ne condizionano la patogenicità e progressione, la ricerca punta ad un approccio multidisciplinare che comprenda lo studio degli aspetti genetici, fisiologici e anatomici coinvolti nei meccanismi di interazione patogeno-pianta.

Le analisi tomografiche condotte su vari campioni hanno dato utili



(E) - Ricostruzione tridimensionale della vascolarizzazione di una barbatella (a) e proiezioni di sezioni longitudinali dell'innesto (b,c).



(F) - Ceppo di vite colpito da colpo apoplettico e relative proiezioni in sezione (a,b), con evidenza di aree necrotiche e di colonizzazione fungina.

informazioni sull'evoluzione delle caratteristiche strutturali della vite in risposta alle potature, sfruttando il marcato contrasto tra tessuti vivi e disseccati - necrotizzati.

Tagli o ferite accidentali portano a un progressivo disseccamento di porzioni di legno, in seguito ai meccanismi di difesa attivati dalla vite. Il volume di disseccamento diventa sito di ingresso per patogeni che colonizzano i tessuti morti e che possono in seguito anche spostarsi verso porzioni sane della pianta. In questo modo l'infezione evolve, influenzando negativamente lo stato di salute della vite fino a causarne il declino e la morte. I ripetuti tagli annuali, soprattutto quelli di ritorno, moltiplicano le porzioni disseccate, reiterando lo sviluppo di numerose zone di legno morto con compromissione nel tempo di parti significative e critiche dei tessuti vitali.

Particolarmente interessante è stata un'analisi condotta su una vite di circa vent'anni morta in vigna per colpo apoplettico. La particolarità di questo campione era data dalla selezione di un nuovo pollone con lo scopo di rinnovare la pianta tramite suo successivo capitozzamento e da un intervento di curettage del tronco effettuato qualche anno prima, in seguito al manifestarsi dei primi sintomi a carico della parte aerea. Questo tipo di intervento, dopo una temporanea remissione dei

sintomi, non era stato sufficiente a evitare la progressione silente della malattia fino alla morte della pianta.

Le analisi condotte hanno infatti evidenziato una rimozione solo parziale dei tessuti necrotizzati e una loro diffusione fino alla regione dell'innesto con evidente compromissione della stessa e propagazione della colonizzazione fungina al porta innesto. (F)

Il dibattito sulle GTDs è di grande attualità, coinvolgendo aspetti portanti della viticoltura quali sistemi di allevamento e potatura, tecniche di innesto, conduzione del vigneto ed evidenzia la necessità di riformulare tecniche agronomiche che mirino a preservare la vitalità dei tessuti e del sistema vascolare, limitando lo sviluppo dei coni di disseccamento in numero e dimensione, favorendo così la resistenza ai patogeni e la longevità delle piante. La μ CT si pone in questo ambito come risorsa per comprendere i meccanismi di interazione patogeno - pianta, l'eziologia dell'infezione e le influenze che fattori biotici e abiotici hanno sulla patogenicità e progressione temporale della malattia.

Conclusioni

La Micro Tomografia a Raggi X ha dimostrato di essere una potente tecnica di analisi nella ricostruzione dell'architettura delle strutture e-

sterne e interne della vite, fornendo dettagliate informazioni tridimensionali sui fenomeni di risposta all'innesto, alla potatura e alla colonizzazione e diffusione di patogeni del legno. Integrata in un approccio multidisciplinare ad altre competenze può contribuire efficacemente alla comprensione dei complessi meccanismi fisiologici che regolano una pianta.

Una sua sistematica applicazione allo studio della vite potrebbe facilitare l'evoluzione delle tecniche agronomiche, con l'obiettivo di preservare la salute a lungo termine del vigneto a fronte delle criticità determinate da condizioni di stress biotici e abiotici, garantirne un ottimale equilibrio vegeto - produttivo e la sostenibilità economica, anche a fronte della necessità di diminuire l'impatto ambientale della coltura viticola.

L'estratto con riferimenti bibliografici può essere richiesto all'autore.

Ringraziamenti:

Le analisi sono state condotte presso il laboratorio Labormet Due S.r.l. (TO) che si ringrazia per la competenza, la professionalità e per la concessione di uso gratuito della strumentazione tomografica.

Simone Codato
Ricercatore Scientifico Indipendente
codato.simone@gmail.com