

# Application Note

## Immagini SEM al profumo di basilico. Analisi su tessuti vegetali senza preparativa.

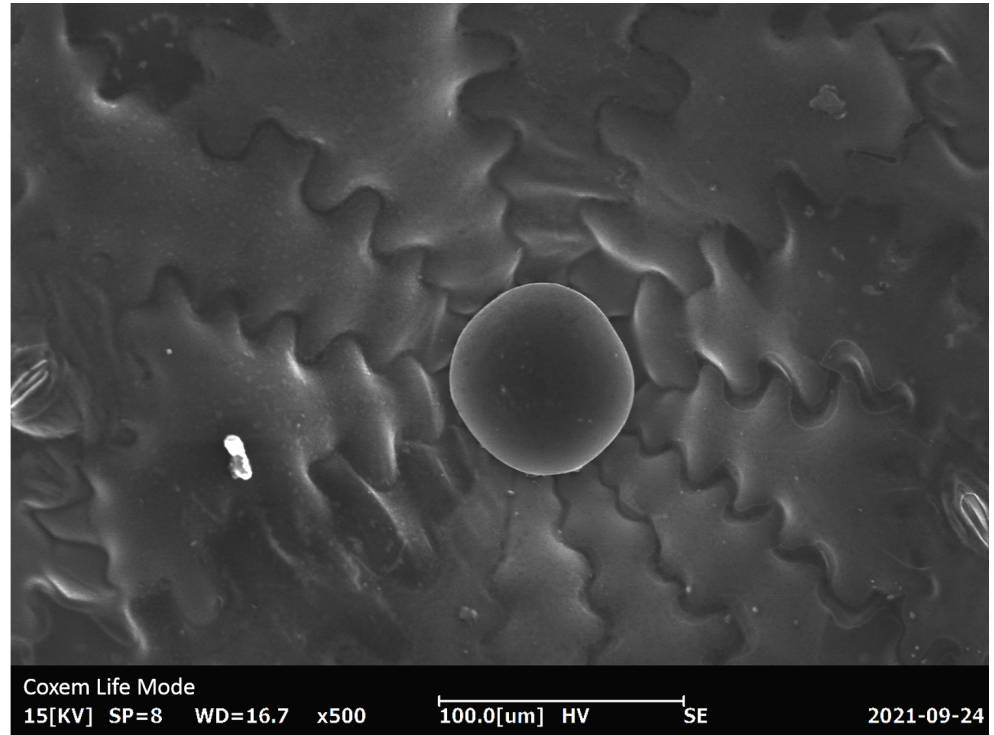


Fig.1 - Immagine SEM-SE in modalità Life (-15°C) su una ghiandola secretoria contenente gli oli aromatici, situata sulla pagina inferiore di una foglia di basilico (15 kV, 500x).

### Introduzione

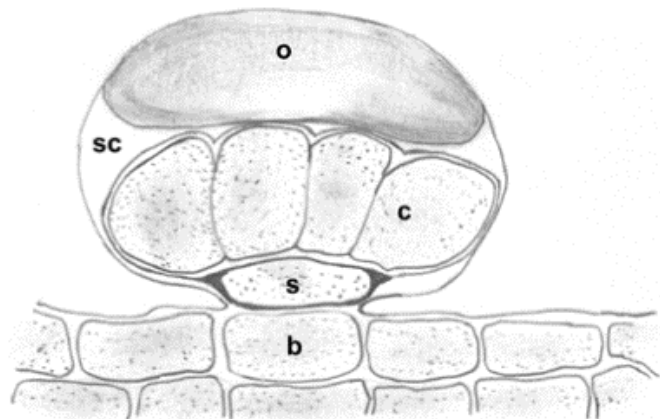
L'osservazione al microscopio elettronico di campioni vegetali richiede tradizionalmente una fase preparativa lunga e complessa tramite la fissazione con aldeidi e la successiva deidratazione con un CPD (*Critical Point Dryer*), o in alternativa l'impiego della tecnica criomicroscopica (*Cryo-SEM*), in cui un campione idratato viene analizzato al SEM in una camera criogenica, raffreddata generalmente con azoto liquido.

Un'alternativa molto più rapida e meno costosa, che garantisce al contempo immagini SEM prive di quegli artefatti che possono essere introdotti con il processo di deidratazione del campione, ci viene offerta dalla **Modalità Life** di Coxem. Grazie ad un particolare sample holder dotato di sistema di raffreddamento ad acqua a circuito chiuso, è possibile ottenere immagini SE (*Secondary Electrons*) e BSE (*Back-Scattered Electrons*) ad alta risoluzione delle principali strutture che compongono i tessuti vegetali da analizzare, senza che il campione richieda alcun tipo di preparazione. Questa tecnologia si rivela particolarmente utile per un ampio spettro di applicazioni, come ad esempio l'identificazione di funghi e parassiti o la caratterizzazione di particolari cellule e organelli.

## Il profumo delle piante aromatiche

Sui tessuti vegetali sono presenti strutture secretorie che sono responsabili della produzione e del rilascio di componenti aromatici e oli essenziali e che normalmente non sono visibili ad occhio nudo. Esistono diversi tipi di strutture secretorie (cellule, dotti, tricomi e cavità), che variano a seconda della famiglia a cui appartiene la pianta e della loro specifica funzione. Secondo la classificazione proposta da Werker [1], le ghiandole capitate sono ghiandole a vita breve, specializzate nella sintesi di sostanze non-terpeniche, che si trovano più frequentemente nelle foglie giovani e che hanno una funzione protettiva nei confronti dei predatori. Le ghiandole peltate, invece, sono ghiandole presenti nelle foglie lungo tutto l'arco della loro vita, specializzate nella sintesi delle sostanze terpeniche responsabili del tipico profumo aromatico.

Fig.2 - Tricomi ghiandolari (peltati) nelle Lamiaceae, famiglia di cui fa parte la pianta di basilico. Nel disegno [2] sono rappresentate le cellule secretorie (c), la cellula pedunculare (s) e la cellula basale (b). I terpeni prodotti dalle cellule secretorie sono accumulati nella cavità subcuticolare (sc) sotto forma di gocce di olio (o).



L'osservazione al SEM delle ghiandole peltate ha permesso di scoprire che esse non sono dotate di pori attraverso i quali le sostanze secrete possano uscire, e questo fa sì che il tipico profumo venga rilasciato solo nel momento della rottura della cuticola che racchiude gli oli essenziali.

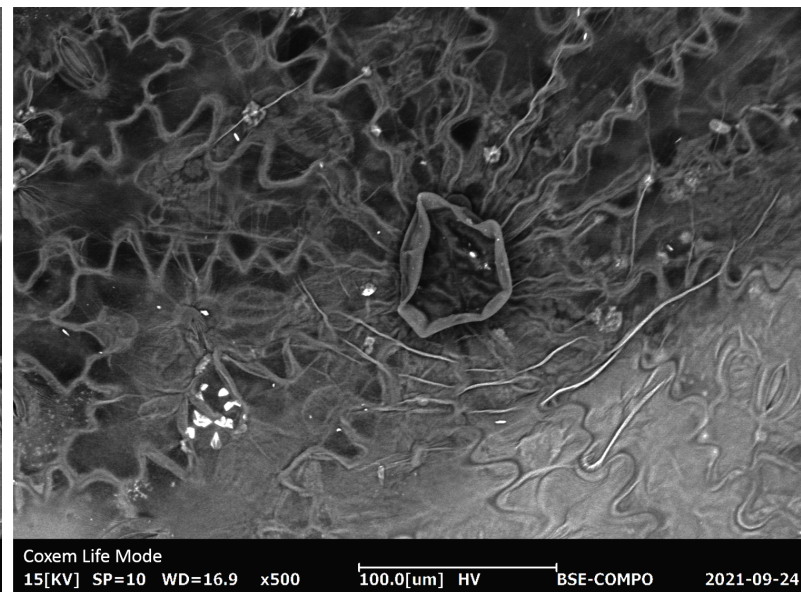
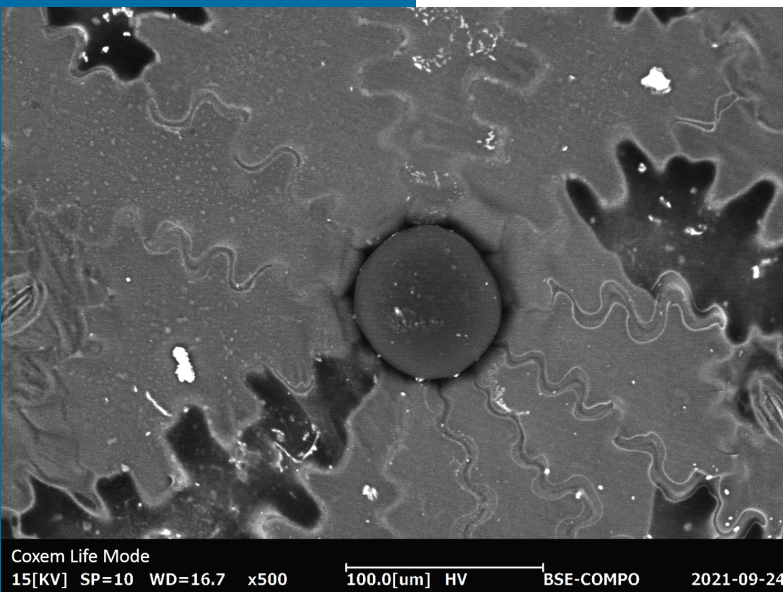


Fig.3-4 - Immagini SEM-BSE ottenute in modalità Life (-15°C) su una ghiandola peltata di basilico con cuticola intatta e su una ghiandola con cuticola aperta (15 kV, 500x).

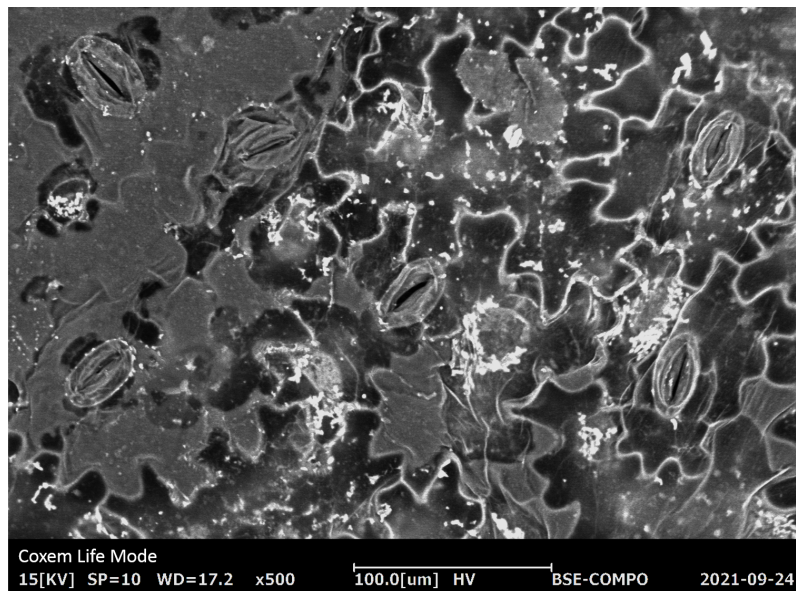
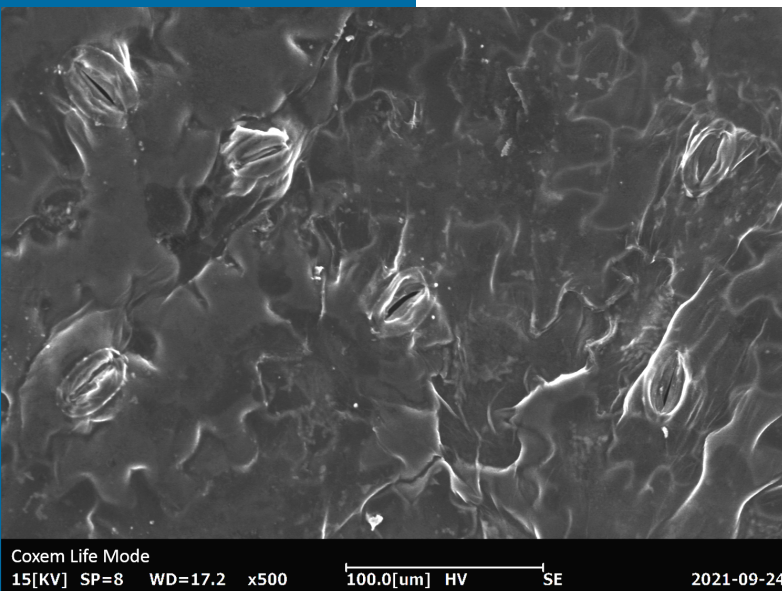
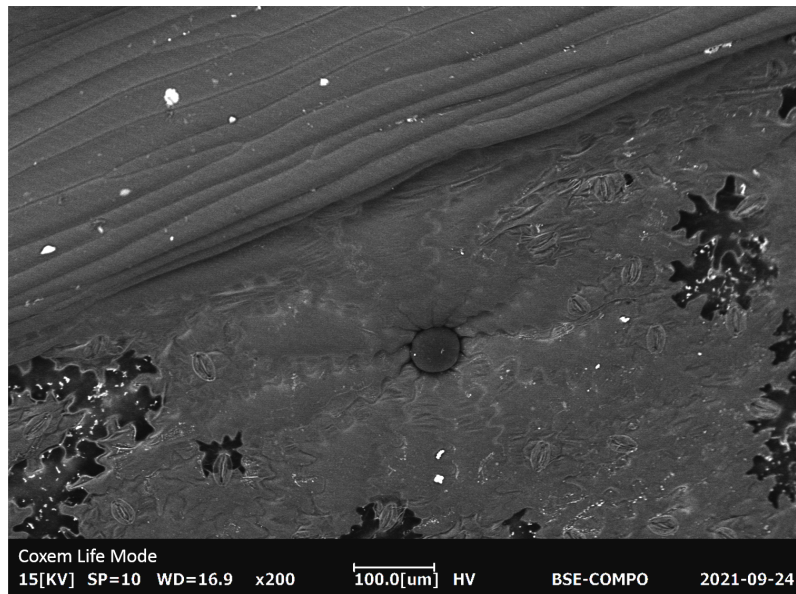
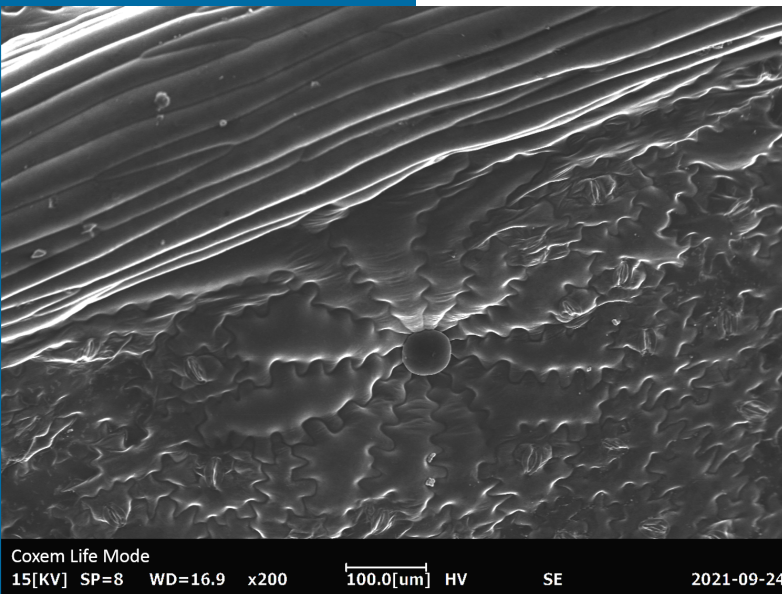
Nella pianta di basilico, le ghiandole peltate mostrano una certa variabilità nel numero di cellule secretorie contenute al loro interno (in genere 4 o 8). Nell'immagini SEM-BSE in Fig.3 è possibile vedere una ghiandola peltata con la cuticola intatta, mentre nell'immagine di Fig.4 è riportata una ghiandola con la cuticola già aperta, che lascia intravedere ciò che resta delle cellule secretorie dopo il rilascio dei terpeni.

### Immagini SE e BSE a $-15^{\circ}\text{C}$

Il congelamento del campione a  $-15^{\circ}\text{C}$  consente di analizzare al SEM la foglia di basilico tale e quale a come è stata prelevata dalla pianta, e allo stesso tempo permette di preservarla da eventuali danneggiamenti indotti dal fascio elettronico. Le immagini SE e BSE sono acquisite ad una tensione di accelerazione di 15 kV, in modo da osservare la morfologia della superficie della foglia senza danneggiare le cellule.

Questo aspetto risulta particolarmente importante nello studio di strutture e tessuti molto sottili. La cuticola che riveste le ghiandole peltate, ad esempio, è spessa nelle ghiandole immature, mentre si assottiglia notevolmente man mano che la ghiandola cresce e viene prodotto l'olio essenziale [3], rendendo la cuticola più suscettibile alla rottura.

Figg.5-6 - Immagini SEM ottenute con SE e BSE su una ghiandola peltata matura, incassata nella superficie della foglia di basilico vicino ad una nervatura (15 kV, 200x,  $-15^{\circ}\text{C}$ ).



Figg.7-8 - Immagini SEM ottenute con SE e BSE su foglia di basilico. In evidenza stomi e pareti cellulari. (15 kV, 500x,  $-15^{\circ}\text{C}$ )

Le immagini ottenute con elettroni secondari e retrodiffusi forniscono informazioni di diverso tipo, spesso complementari tra loro: le immagini SE mettono maggiormente in risalto la morfologia superficiale, mentre le immagini BSE aiutano a distinguere porzioni di tessuto vegetale che differiscono per composizione chimica.

Nell'immagine SE di Fig.9 (1000x), ad esempio, è possibile distinguere la struttura di uno stoma. Gli stomi sono piccole aperture situate nell'epidermide (soprattutto nella pagina inferiore delle foglie), che hanno

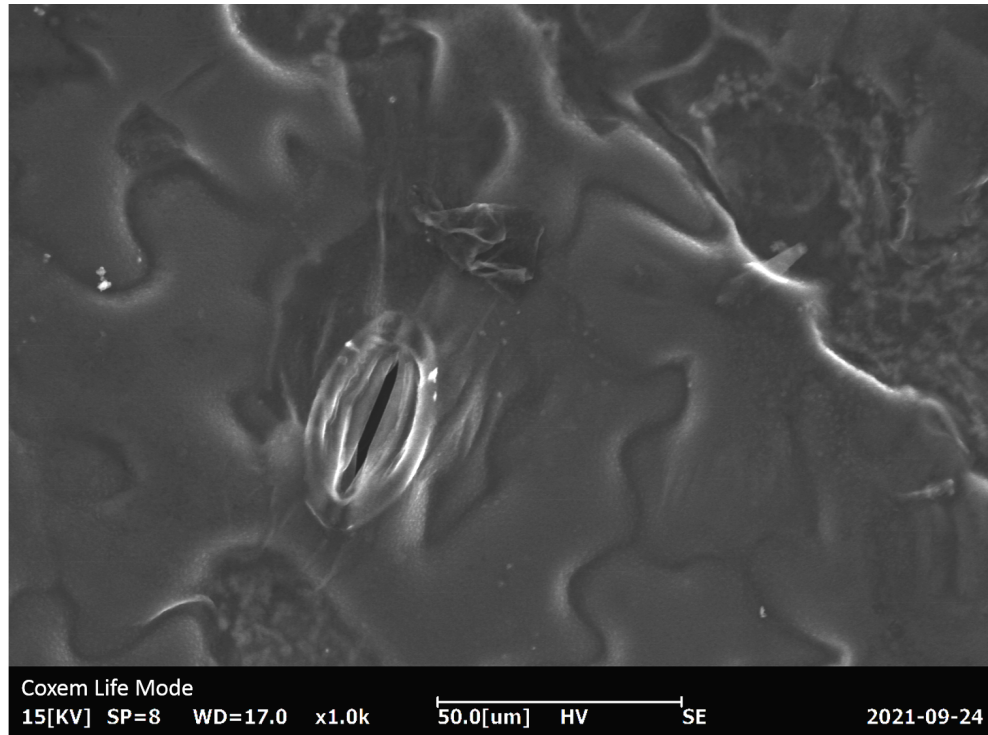


Fig.9 - Struttura di uno stoma su foglia di basilico. Immagine SEM-SE (15 kV, 1000x, -15°C).

il compito di garantire alla pianta gli scambi gassosi con l'ambiente esterno. Purtroppo queste stesse strutture sono utilizzate anche da parassiti e funghi come la *Peronospora* e l'*Alternaria* per replicarsi e diffondersi su tutta la pianta durante le prime fasi del processo di infezione [4].

### Cell outline imaging

La maggior parte delle immagini SEM di tessuti vegetali reperibili in letteratura sono acquisite con detector SE, allo scopo di apprezzare la tridimensionalità delle strutture e degli organelli che si trovano sulla superficie, come i tricomi e gli stomi sopra citati.

D'altra parte le immagini BSE presentano diversi vantaggi, tra cui quello di ottenere, con un'opportuna scelta dei parametri di acquisizione, immagini di cellule con i bordi (pareti cellulari) altamente contrastati. La **Modalità Life** di Coxem apre dunque le porte per uno studio approfondito della forma e delle dimensioni delle cellule anche con un SEM tabletop equipaggiato con software di image processing, senza la necessità di particolari metodi di preparazione del campione.

Una tensione di accelerazione di 15 kV rappresenta un buon compromesso per mettere in risalto sia i dettagli superficiali delle strutture che i bordi delle cellule.

In particolare, poiché c'è una correlazione tra il numero atomico medio e il segnale BSE generato, è evidente che il segnale più chiaro visibile sui bordi delle pareti cellulari deve scaturire dalla presenza di elementi a più alto numero atomico presenti all'interno delle pareti stesse.

Uno studio condotto tramite analisi SEM-EDS su foglie di Arabetta comune (*Arabidopsis thaliana*) trattate con il chelante EDTA, ha dimostrato che il segnale più luminoso delle pareti cellulari in questi tessuti vegetali è dovuto in maniera preponderante al calcio [5].

Per condurre un'analisi sulle pareti cellulari con software di image processing è consigliabile impostare un ingrandimento di 200x, in modo da riuscire a misurare circa 30-40 cellule e mantenere comunque una buona risoluzione dell'immagine. Per analizzare aree più estese è possibile acquisire immagini adiacenti tra loro ed eseguire uno stitching utilizzando la funzione Panorama di Coxem. Se l'analisi prevede anche lo studio di stomi e altre cellule che appaiono meno contrastate rispetto alle pareti cellulari, è opportuno utilizzare ingrandimenti maggiori (es. 500x).

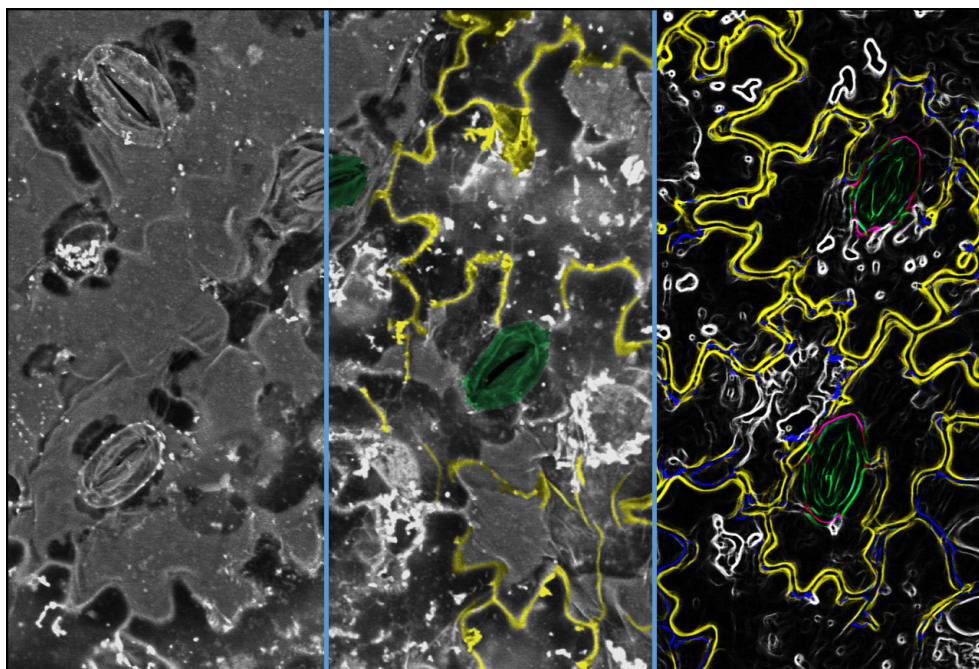


Fig.10 - Esempio di image processing su immagine SEM-BSE (15 kV, 500x, -15°C): identificazione delle pareti cellulari (in giallo) e colorazione differenziale degli stomi (in verde).

## Bibliografia

- [1] Werker E., Putievsky E., Ravid U., Dudai N., Katzir I. "Glandular hairs and essential oil in developing leaves of *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae)." *Ann Bot* 71 (1993): 43-50
- [2] Kowalski, R., Kowalska, G., Jankowska, M., Nawrocka, A., Kałwa, K., Pankiewicz, U., Włodarczyk-Stasiak, M. "Secretory structures and essential oil composition of selected industrial species of Lamiaceae." *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus* (2019), 18(2), 53-69.
- [3] David R. Gang, Jihong Wang, Natalia Dudareva, Kyoung Hee Nam, James E. Simon, Efraim Lewinsohn, Eran Pichersky "An Investigation of the Storage and Biosynthesis of Phenylpropenes in Sweet Basil" *Plant Physiology* (2001), Vol. 125, pp. 539-555
- [4] Guirong Zhang, Arthur Thompson, David Schisler, Eric T. Johnson "Characterization of the infection process by *Peronospora belbahrii* on basil by scanning electron microscopy." *Heliyon* 5 (2019) e01117.
- [5] Mark J. Talbot, Rosemary G. White "Cell surface and cell outline imaging in plant tissues using the backscattered electron detector in a variable pressure scanning electron microscope." *Plant Methods* (2013), 9:40



**MEDIA SYSTEM  
LAB**

### MEDIA System Lab srl

Via Visconti di Modrone, 31 - 20846 Macherio (MB)  
Via delle Zigherane, 4/A - BeFactory - 38068 Rovereto (TN)  
Office: +39.351.5694492 [info@m-s.it](mailto:info@m-s.it) [www.m-s.it](http://www.m-s.it)