

Micromorfologia e sistematica vegetale

Premessa

Lo studio della morfologia, cioè della forma esterna di un organismo, ha costituito per molto tempo un prerequisito indispensabile delle indagini sistematiche in quanto i vari schemi di classificazione si basavano quasi esclusivamente sulla comparazione fra caratteri morfologici. Nell'era della biologia molecolare un simile tipo di analisi, pur avendo perso centralità nell'indagine delle relazioni filogenetiche, resta comunque un valido strumento di lavoro in campo tassonomico e non solo.

Pur nelle linee generali la cosiddetta morfologia dei sistematici tratta dei caratteri visibili ed in questo senso può essere definita come la scienza dei caratteri e degli stati dei caratteri (Kaplan 2001). Dato che questi sono molto più soggetti a omoplasia (termine con il quale vengono indicati fenomeni di convergenza, reversione e parallelismo) rispetto ai dati molecolari (Sanderson & Hufford 1996; Givnish & Sytsma 1997) e dato l'impressionante incremento nell'uso di questi ultimi per la loro indubbia efficacia nell'integrare e frequentemente rivoluzionare precedenti schemi di classificazioni, è sorta di recente la questione riguardante ruolo e prospettive future delle indagini morfologiche nella sistematica vegetale (Stuessy et al. 2003).

Classicamente i dati morfologici possono essere considerati di due tipi, macro e micromorfologici, che insieme costituiscono il fenoma o fenotipo di un organismo. I primi hanno il vantaggio di essere facilmente osservabili, essendo rilevabili ad occhio nudo o con l'aiuto di una lente di ingrandimento; rispetto ad altri tipi di caratteri la loro variabilità è facile da apprezzare e ciò è particolarmente vero con il materiale d'erbario sul quale è basato buona parte del lavoro tassonomico.

I caratteri micromorfologici sono quelli invece rilevabili per mezzo di microscopi ottici e di microscopi elettronici, distinzione basata sul tipo di sorgente di illuminazione del campione (fotoni o elettroni) ma ben più sostanzialmente sul differente potere di risoluzione; qui ci riferiremo esclusivamente ai dati ricavabili dai secondi.

Gli strumenti

La diffusione e commercializzazione nei primi anni '50 del secolo scorso del microscopio elettronico a trasmissione (TEM) e successivamente del microscopio elettronico a scansione (SEM) permise di accedere ad una nuova fonte di informazioni che andava ad integrare i dati macromorfologici classici nonché quelli cariologici, anatomici ed embriologici già utilizzati da alcune decine di anni con l'ausilio del microscopio ottico convenzionale.

Sebbene l'applicabilità del TEM nelle ricerche di sistematica vegetale sia stata dimostrata piuttosto presto, la sua effettiva utilizzazione in questo campo è stata tardiva e limitata, sia per le difficoltà tecniche nella preparazione dei campioni sia per il presupposto che non vi fossero differenze interspecifiche ed intergeneriche a livello subcellulare. Di conseguenza nella fase iniziale le indagini si concentrarono soprattutto sugli aspetti morfo-funzionali dei vari organuli cellulari e sulla loro complessa interazione - dominio dei citologi - mentre solo in un secondo momento videro la luce i primi lavori applicati alla sistematica vegetale che, come era logico, riguardavano soprattutto gruppi di alghe e crittogame di dimensioni assai ridotte.

Al contrario l'introduzione della microscopia elettronica a scansione negli anni '70 ebbe rapido sviluppo nell'indagine sistematica delle spermatofite grazie ad una più semplice tecnica di allestimento dei preparati e alla possibilità di integrare facilmente i dati già esistenti con quelli ottenuti con altri metodi di indagine.

Pur senza entrare nei dettagli dei differenti metodi di preparazione dei campioni per la microscopia elettronica a trasmissione e per quella a scansione, che vanno al di là degli scopi del presente trattato, è comunque importante ricordare brevemente alcuni punti. Nella tecnica di routine per il TEM il materiale viene processato attraverso una serie di tappe - fissazione, disidratazione, inclusione - ciascuna costituita da un'ulteriore serie di passaggi i cui tempi variano in relazione alla consistenza del materiale sotto indagine; una volta inclusi (generalmente in resine epossidiche quali Epon, Araldite, Spurr) i campioni dovranno essere sezionati con l'ausilio di ultramicrotomi (ad avanzamento termico e forniti di lame di diamante) e le sottili sezioni, una volta montate sui supporti di rame (retini), trattate con soluzioni contrastanti a base di sali di metalli pesanti (quali piombo ed uracile) prima dell'osservazione finale. E' evidente che una simile procedura comporta alcuni giorni di lavoro non necessari invece per l'allestimento dei campioni da osservare al SEM. Addirittura nel caso di materiale disidratato, quale quello prelevato dagli exsiccata, questo può essere direttamente montato sui portacampioni di alluminio ed osservato dopo metallizzazione, operazione che consiste nel ricoprire i campioni con un sottilissimo strato di oro o di platino per mezzo di uno strumento detto appunto metallizzatore. Solo nel caso di materiale fresco, e perciò idratato, dopo una rapida fissazione è necessario operare una accurata disidratazione per poi trattare i campioni in un "critical point dryer"; grazie a tale strumento, che permette la sostituzione del liquido di disidratazione con anidride carbonica, viene mantenuta integra la forma originale delle strutture esterne dei campioni che potranno così essere montati, metallizzati ed infine osservati. Nell'insieme tutto ciò richiede al massimo qualche ora prima dell'osservazione definitiva in quanto il materiale non deve essere incluso nè tantomeno sezionato come necessario per il TEM.

Quali dati dai campioni d'erbario

In linea generale le caratteristiche ultrastrutturali interne agli organi, tessuti ed organuli cellulari della pianta, visibili solitamente con l'ausilio del TEM, risultano più costanti e di conseguenza utili sistematicamente agli alti livelli della gerarchia tassonomica (ordine, famiglia), rispetto alle caratteristiche superficiali, microstereostrutturali visibili al SEM, più variabili e perciò utilizzabili ai livelli inferiori di tale gerarchia (genere, specie).

Tuttavia la necessità, per indagini al TEM, di disporre di materiale fresco in un numero sufficiente di taxa ha limitato fortemente il numero dei contributi in questo campo oltre a rendere in gran parte inutilizzabili i campioni d'erbario.

Pochissime sono le eccezioni. Fra queste sono certamente da ricordare le indagini dettagliate dell'ultrastruttura della parete dei granuli di polline (sporoderma), analisi ben incorporate nella tradizione ottica della palinologia. Rispetto ad altre strutture infatti essa non viene alterata dall'essiccamento essendo in gran parte costituita da sporopollenina, sostanza resistente al trattamento con acidi forti tipico dell'acetolisi. Sarebbe fuori luogo ed assai lungo elencare i lavori in questo settore che hanno fornito contributi alla sistematica di molte famiglie o gruppi di Angiosperme. Mi limito qui a ricordare quelli su Asteraceae (Skvarla et al.1977) e Monocotiledoni (Zavada 1983), anche per la loro importanza in campo allergologico.

Ben più sostanziale è stato l'apporto del SEM alla sistematica delle spermatofite. Sebbene non tutti i caratteri analizzabili su materiale idratato raccolto in natura lo siano altrettanto su campioni d'erbario, l'essiccamento non sempre compromette la loro dettagliata osservazione. Talvolta è anzi indispensabile lavorare su questo tipo di materiale, come nel caso delle escrezioni epicuticulari (soprattutto cere) dove il trattamento con solventi - asportando parte di tali secrezioni - renderebbe impossibile il riconoscimento delle differenti tipologie (Barthlott 1993).

Oltre alle sovrastrutture cuticulari è inoltre possibile determinare con una certa accuratezza le caratteristiche delle cellule dell'epidermide nonché la struttura dei tricomi di rivestimento e ghiandolari che nell'insieme costituiscono il cosiddetto indumento. Tuttavia per una analisi comparativa attendibile in questi casi si rendono necessarie osservazioni preliminari su campioni freschi, in un ridotto ma rappresentativo numero di taxa, prima di operare su una quantità molto maggiore di campioni d'erbario.

Oltre alle strutture vegetative buona parte dell'indagine microstereostrutturale su exsiccata è focalizzata sulle strutture riproduttive, in particolare granuli di polline e semi. Dei primi esiste una letteratura ancora più vasta di quella riguardante i dati al TEM in quanto numerose e differenti sono le ornamentazioni del tectum, cioè dello strato più esterno dello sporoderma, rilevabili al SEM. Una tale eterogeneità strutturale riscontrabile ai differenti livelli tassonomici, da quello infraspecifico

fino a quello di famiglia ed oltre, ha comportato l'adozione di una specifica terminologia che si avvale naturalmente anche delle indagini all'ottico e al TEM (Punt et al. 1994).

Dopo il polline le strutture vegetali più spesso indagate con il SEM per il loro valore sistematico riguardano i semi o più in generale le unità di dispersione, in particolare l'elaborata sculturazione del tegumento. Come nel caso della sculturazione del tectum dei granuli di polline il grande incremento dei caratteri sulla superficie dei semi rilevabili al SEM ha comportato come conseguenza la necessità di una terminologia adeguata. Quella attualmente adottata è stata proposta da Behnke e Barthlott (1983) dove i caratteri vengono descritti in ordine di grandezza, seguendo la pratica tassonomica convenzionale, con quelli riguardanti l'intero seme per primi, seguiti dalle strutture multicellulari, dalle caratteristiche delle singole cellule ed infine dalle componenti subcellulari della testa.

Per concludere questa breve rassegna è doveroso accennare alla possibilità di impiegare su materiale secco particolari tipi di detergenti con forte potere di reidratazione, quali ad esempio il solfosuccinato di sodio, conosciuto commercialmente come Aerosol-OT. La loro introduzione ha ampliato la possibilità di osservare al SEM buona parte delle strutture fiorali mature e soprattutto i differenti stadi di sviluppo dei fiori durante l'ontogenesi (Erbar 1995). Dato che l'uso di tali detergenti permette l'inclusione del materiale in paraffina o in resine, è prevedibile che in un prossimo futuro tutto ciò potrà contribuire all'aumento delle indagini non solo microsterostrutturali al SEM ma anche quelle anatomico-comparative al microscopio ottico su campione d'erbario.

Prelievo dai campioni d'erbario.

La scelta dei campioni ed il prelievo di frammenti da exsiccata per indagini di microscopia elettronica devono essere eseguiti con una accuratezza ancora maggiore di quanto riportato per le indagini molecolari. Per queste è infatti sufficiente prelevare da pochi milligrammi a qualche grammo di foglie, con un danno al campione solo in caso di imperizia o di scarsa considerazione del suo valore scientifico; completamente diverso è il caso delle strutture utilizzate nelle indagini al TEM e SEM, che come abbiamo visto in precedenza sono in parte riproduttive. Ciò può comportare un notevole danno agli exsiccata, essendo tale pratica comunque invasiva. E' dunque necessario che il campionamento avvenga in presenza del conservatore dell'erbario seguendo alcune semplici indicazioni quali i) prelevare il materiale strettamente necessario, ii) da campioni raccolti il più recentemente possibile, iii) senza privare l'esemplare di parti essenziali al suo riconoscimento e iv) utilizzando, se disponibile, il materiale presente nelle buste allegate al campione senza intervenire direttamente sullo stesso.

BIBLIOGRAFIA

- Barthlott W. 1993 – Epicuticular wax ultrastructure and systematics. In Behnke H.D. & Mabry T. J. (Eds.) “Evolution and Systematics of the Caryophyllales” pp. 75-86. Springer-Verlag, Berlin.
- Behnke H.-D., Barthlott W., 1983 – New evidence from ultrastructural and micromorphological fields in angiosperm classification. **Nordic J. Bot.**, 3: 43-66.
- Erbar C., 1995 – On the floral development of *Sphenoclea zeylanica* (Sphenocleaceae, Campanulales) – SEM investigation on herbarium material. **Bot. Jahrb. Syst.**, 117(4): 469-483.
- Givnish T.J., Sytsma K.J., 1997 – Homoplasy in molecular and morphological data: the likelihood of correct phylogenetic inference. In: Givnish T.J., Sytsma K.J. (Eds.) “Molecular evolution and adaptive radiation”, pp. 55-100. Cambridge University Press, Cambridge.
- Kaplan D. R., 2001 – The science of plant morphology: definition, history, and role in modern biology. **Amer. J. Bot.**, 88: 1711-1741.
- Punt W., Blackmore S., Nilsson S. & Le Thomas A., 1994 – Glossary of Pollen and Spore Terminology. LPP Contributions Series. LPP Foundation, Utrecht.
- Sanderson M.J., Hufford L, 1996 – Homoplasy. The recurrence of similarity in evolution. Academic Press, San Diego.
- Skvarla J.J., Turner B.L., Patel V.C., Tomb S.A., 1977 – Pollen morphology in the Compositae and in morphologically related families; in: Heywood V.H., Harborne J.B., Turner B.L. (Eds.) “The Biology and Chemistry of the Compositae” vol. 1:141-265. Academic Press, San Diego.
- Stuessy T. F., Mayer V., Hörandl E., 2003 – Deep Morphology: Toward a Renaissance of Morphology in Plant Systematics. Gantner Verlag, Ruggell, Liechtenstein.
- Zavada M. S., 1983 – Comparative Morphology of Monocot Pollen and Evolutionary Trends of Apertures and Wall Structure. **Bot. Rev.**, 49: 331-379.