Centre for Plant Sciences
Faculty of Biological Sciences
[redacted]
[redacted]

Analisi degli effetti del Geocomposito C.B. **sulla crescita delle radici – relazione finale**

1. Introduzione

Ci è stato chiesto di valutare se il tessuto Geocomposito Copper Barrier contenente rame, fosse efficace nell'inibizione della crescita delle radici, in particolare rispetto alla ***Reynoutria japonica*** (Poligono asiatico). In tal caso, ci è stato chiesto di indagare sul meccanismo con cui Geocomposito C.B. influenza la crescita delle radici.

2. Il Geocomposito Copper Barrier inibisce la crescita delle radici?

Per verificare se il Geocomposito C.b. inibisse la crescita delle radici, abbiamo utilizzato una serie di approcci e specie di piante differenti.

a) Coltura sterile:

Inizialmente ci siamo concentrati su esperimenti che sfruttassero le colture sterili.

Questo ci ha permesso di visualizzare direttamente gli effetti del Geocomposito C.B. sulla crescita delle radici. Abbiamo usato la specie vegetale Arabidopsis thaliana per questi esperimenti. Come mostra la Figura 1, una striscia di Geocomposito C.B. incorporata in un piastra di agar crea una "zona di inibizione" attorno ad essa. Le radici crescono verso questa zona, ma cessano ad una distanza di circa 1-1,5 cm dallo strato del Geocomposito C.B.

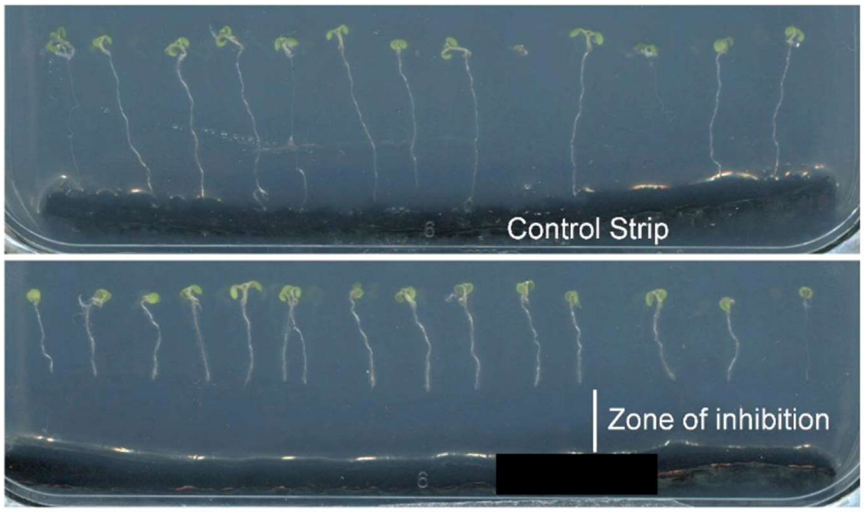


Figura 1: Confronto della crescita delle radici delle piantine di Arabidopsis thaliana in presenza di un controllo o di una striscia di [redacted]. I semi sono stati piantati a 20 mm di distanza dal fondo del piatto e lasciati crescere per 7 giorni

Abbiamo coltivato piantine a diverse distanze dal Geocomposito C.B. ma indipendentemente dal loro punto di partenza, tutte le radici si sono fermate in corrispondenza della zona di inibizione. Le radici cresciute su piastre senza Geocomposito C.B. continuano a crescere fino a raggiungere il fondo del piatto. Questi risultati mostrano che Geocomposito C.B. sembra essere molto efficace nell'inibire localmente la crescita delle radici.

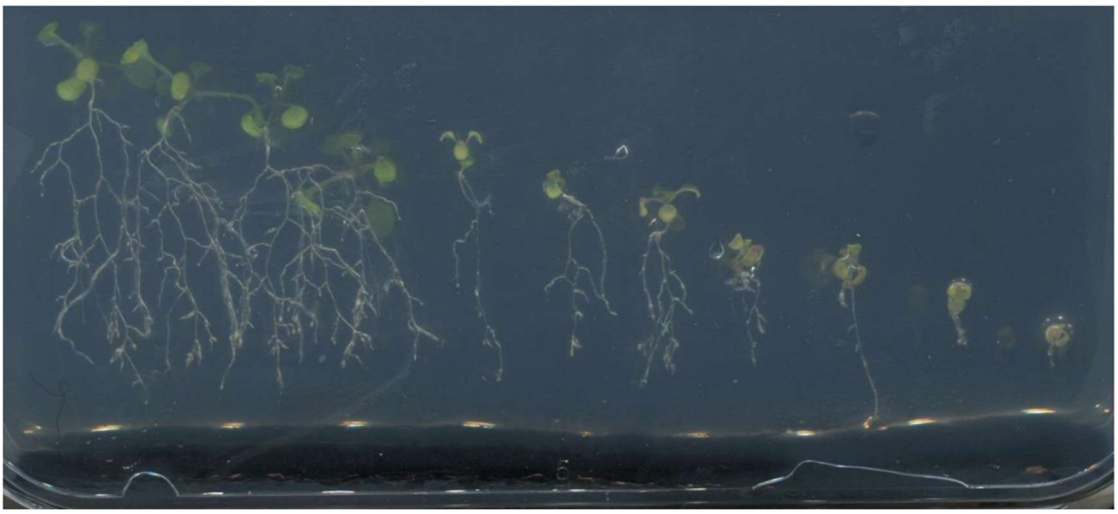


Figura 2: Confronto della crescita delle radici di piantine di Arabidopsis thaliana a distanze progressivamente più vicine ad una barriera costituita dal Geocomposito C.B. (da 40 mm a 10 mm) a 14 giorni.
Le piantine che si trovano più vicine al Geocomposito C.B. sono rachitiche e gialle.

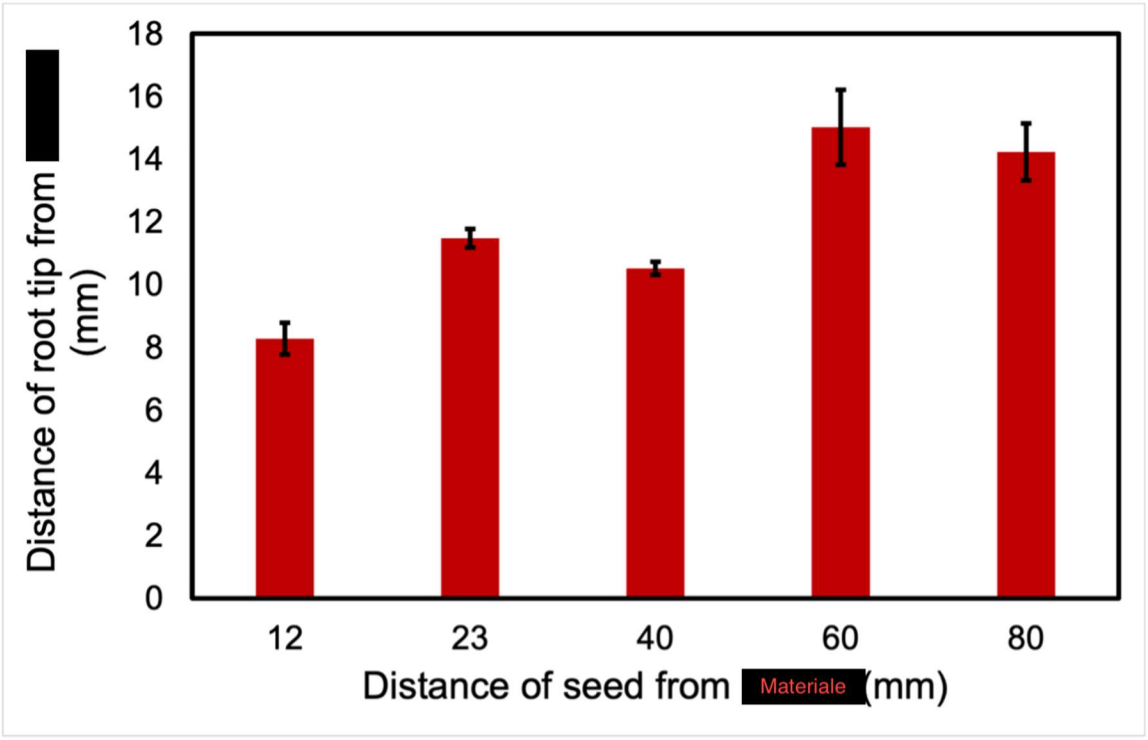


Figura 3

Figura 3: Il grafico mostra “la distanza di arresto” delle radici di Arabidopsis thaliana piantate a varie distanze dal Geocomposito C.B. (asse-x). Le misurazioni dello spazio tra la punta della radice e lo strato Geocomposito C.B. sono state effettuate dopo 14 giorni. I dati sono la distanza media (n = 16-24 piantine), le barre nere indicano l’errore standard della media. La zona di inibizione è quindi generalmente profonda 10-15 mm, fatta eccezione per le piantine piantate molto vicine al Geocomposito C.B.

Come si può vedere nella figura 2, le piantine che sono state piantate vicine alla barriera del Geocomposito C.B. sono gialle e non crescono correttamente. Le piantine piantate più lontano non soffrono di questi sintomi. Ciò suggerisce che il Geocomposito C.B. potrebbe avere una forte tossicità locale per le piante.
Inoltre abbiamo rimosso il foglio di rame da un campione di Geocomposito C.B. e l’abbiamo usato isolatamente in un sistema di coltura sterile. Le conclusioni sono state le medesime del precedente esperimento, ciò conferma che il rame è il componente attivo/responsabile nelle barriere del Geocomposito C.B. (Figura 4)

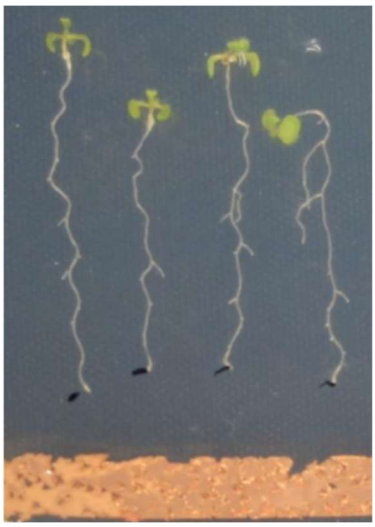


Figura 4

b) Crescita nel suolo - Arabidopsis

Abbiamo anche coltivato piantine di Arabidopsis nel terreno, confinate da barriere di Geocomposito C.B. in questi esperimenti nessuna radice ha attraversato il Geocomposito C.B. ma sembravano esserci poche prove di inibizione della crescita delle radici nelle vicinanze del Geocomposito C.B. in effetti le radici sono cresciute abbastanza facilmente a ridosso dello strato di tessuto Geocomposito C.B. (Figura 5). Ciò suggerisce che la zona di inibizione è inferiore nel terreno che nell’agar a parità di tempo di esposizione del Geocomposito C.B.

Figura 5: Nel suolo, le radici di Arabidopsis thaliana possono crescere in prossimità di [redacted] senza un'inibizione evidente.

c) Crescita nel suolo - pomodoro

Successivamente abbiamo testato piantine di pomodoro (Solanum lycopersicum). Abbiamo usato vasi in cui il nucleo centrale del terreno era circondato in modo discontinuo, su tutti i lati, da sezioni di Geocomposito C.B. o da tessuto di controllo. In questi esperimenti nessuna radice è cresciuta in direzione del Geocomposito C.B. ma anche pochissime radici sono cresciute attraverso il tessuto di controllo. In generale, le radici hanno preferito crescere attraverso gli spazi tra il Geocomposito C.B. ed il tessuto di controllo, piuttosto che attraverso i tessuti stessi. Abbiamo quindi provato vasi con dischi di Geocomposito C.B. posizionati a metà del vaso nel senso del diametro (orizzontalmente), separando il terreno nelle sezioni superiore e inferiore. Non abbiamo trovato radici cresciute nella sezione inferiore quando è stato fatto uso del Geocomposito C.B. ma allo stesso modo abbiamo trovato poche radici nella sezione inferiore con il tessuto di controllo. In generale, le radici di pomodoro erano riluttanti a crescere attraverso entrambi i tessuti quando non avevano incentivi nel farlo.

d) Crescita in vermiculite/terreno - frumento

Abbiamo quindi modificato il nostro sistema, utilizzando tesi con il Geocomposito C.B. e tesi con geotessuto per la tesi di controllo. Abbiamo separato lo strato superiore di vermiculite dallo strato inferiore di compost maturo. Lo strato di vermiculite non ha sostanze nutritive, e quindi la crescita a lungo termine di una pianta in questi vasi dipende dalla crescita attraverso il tessuto per accedere al terreno. Questa configurazione offre quindi alle piante ogni incentivo a crescere attraverso i dischi di separazione se sono in grado di farlo.

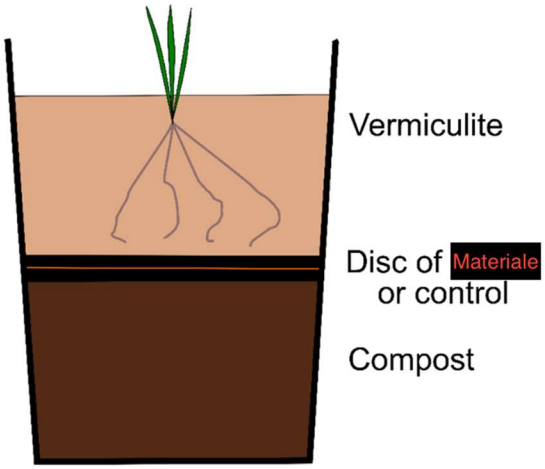


Figura 6:

Mentre molte radici sono cresciute attraverso il tessuto di controllo, nessuna radice è cresciuta attraverso il Geocomposito C.B., ancora una volta, le radici sembravano non essere in grado di attraversare lo strato di Geocomposito C.B., ciò conferma la capacià di inibizione determinata dall'effetto alone prodotto dal rame

e) Crescita in vermiculite/terreno – poligono giapponese

Il poligono giapponese è una specie invasiva che si diffonde soprattutto attraverso il suo apparato radicale. Ha una crescita radicale molto più vigorosa rispetto alle specie precedentemente descritte. Come per il grano, abbiamo coltivato le piante in vermiculite priva di sostanze nutritive e compost ricco di sostanze nutritive (Figura 4) che a secondo della tesi è stato usato un disco di separazione in Geocomposito C.B. ed in geotessuto a seconda delle tesi. I dischi sono stati fissati nei vasi per impedire alle radici di crescere attorno alla periferia dei dischi.

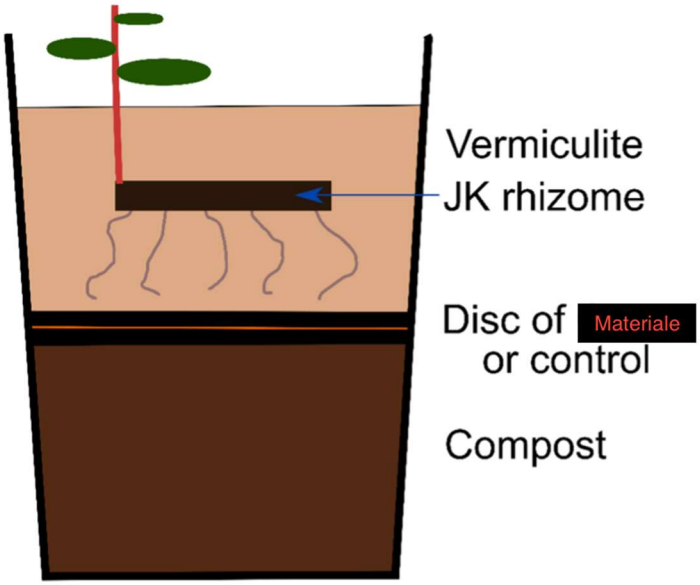


Figura 7: Esperimento con ***Reynoutria japonica***

- In entrambi i tipi di vaso, c'era una vigorosa crescita del sistema di germogli (Figura 8) e una forte crescita del sistema di radici all'interno dello strato di vermiculite, che ha creato una solida "zolla radicale" nella vermiculite (Figura 9).

- Nei vasi di controllo, c'era una chiara crescita delle radici attraverso il disco di geotessuto (Figura 11), portando a una densa massa di radici nello strato di compost. Queste radici hanno unito tutti i materiali attraversati in una stretta "zolla di radici" (Figura 12) e sono cresciute con forza al di fuori del fondo del vaso (Figura 13). Alcune delle radici sviluppate attraverso il disco di geotessuto di controllo sono di dimensioni considerevoli (Figura 14). Abbiamo riscontrato un'alta densità di radici nella sezione inferiore del vaso cresciute attorno al bordo del disco di geotessuto superando il nastro adesivo che sigillava il disco sul vaso: evidentemente non era completamente a prova di radice (Figura 9).

- Al contrario, nei vasi con diaframma di separazione in Geocomposito C.B. c'era generalmente pochissima presenza di radici nello strato di compost (Figura 12), e poche radici sono emerse dal fondo del vaso (Figura 13). Tutte le radici presenti nello strato di compost hanno avuto origine da radici che erano cresciute attorno al bordo del disco di Geocomposito C.B. Nei vasi in cui le radici non erano cresciute attorno al disco di Geocomposito C.B. non c'era praticamente alcuna massa radicale nello strato compost (Figura 10).

Figura 8: Vigorosa crescita dei rizomi sotto queste condizioni sperimentali

Figura 9: Campione rimosso intatto dal vaso. In questo campione di controllo, le radici legano gli strati di vermiculite e compost in "sfere radicali" solide separate e legano il disco di tessuto sia agli strati di vermiculite che di compost. Nonostante le precauzioni, alcune radici sono cresciute attorno al bordo del disco di tessuto (freccia verde).

Figura 10: campione di ***Reynoutria japonica***, poligono giapponese, senza crescita di radici attraverso o intorno allo strato di Geocomposito C.B. La crescita vigorosa delle radici può essere vista nello strato di vermiculite.

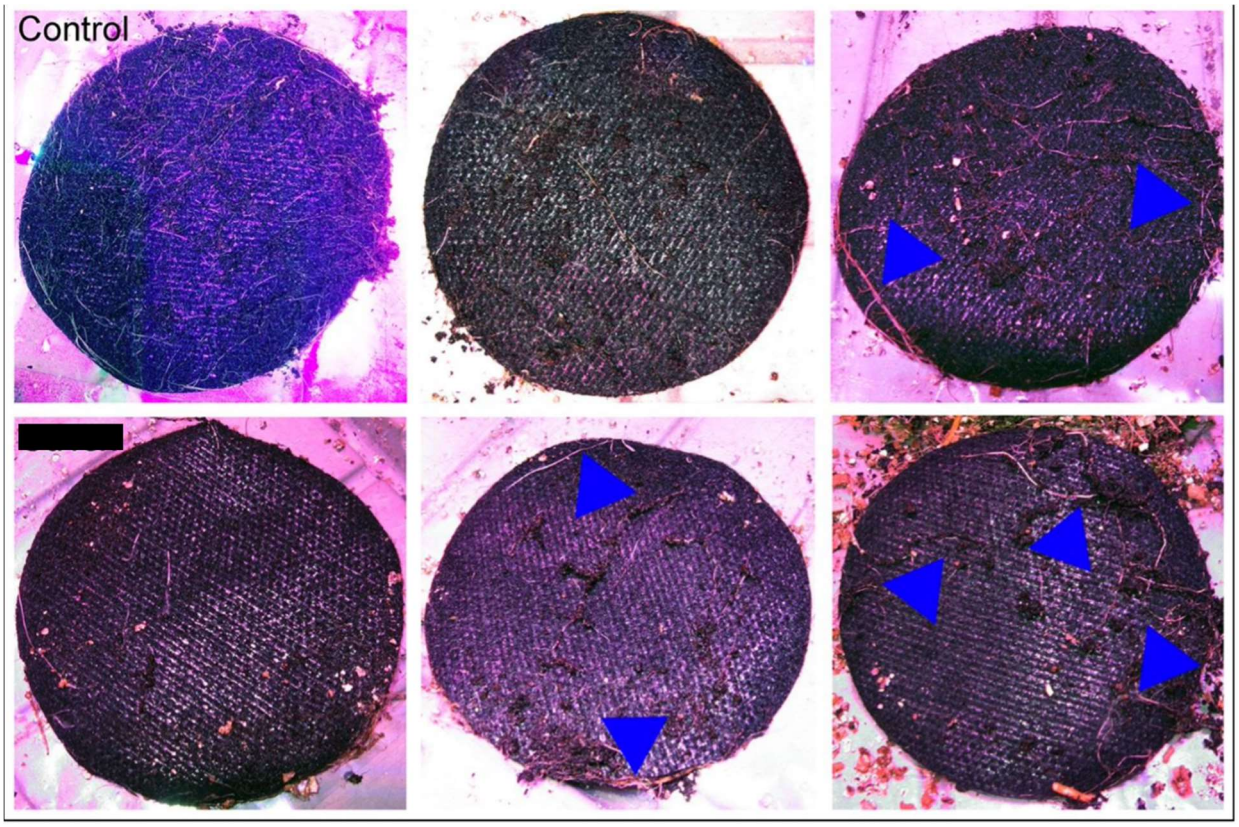
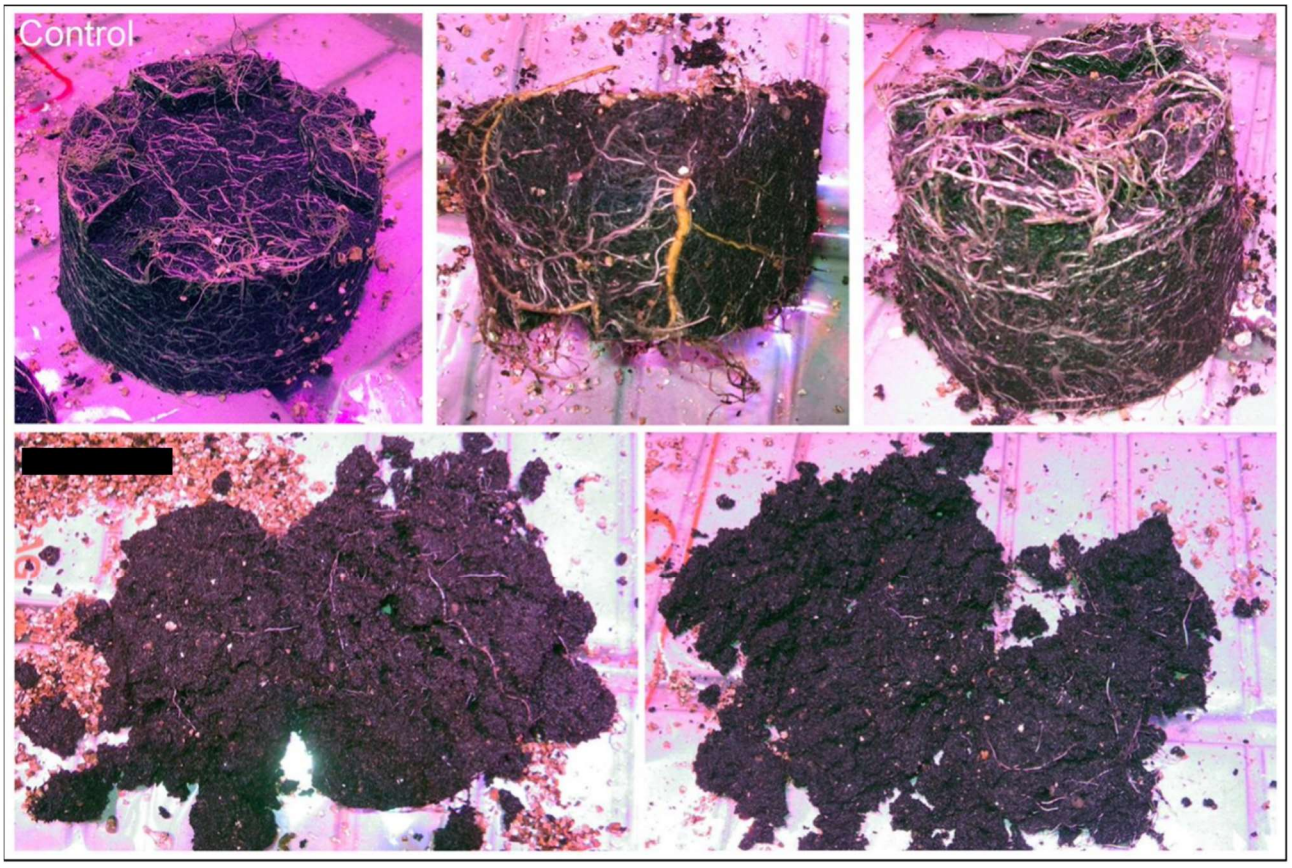


Figura 11 e 12 : Lato inferiore dei dischi in Geocomposito C.B. e di controllo in geotessuto. Le radici che sono cresciute intorno al bordo del disco sono indicate con frecce blu.



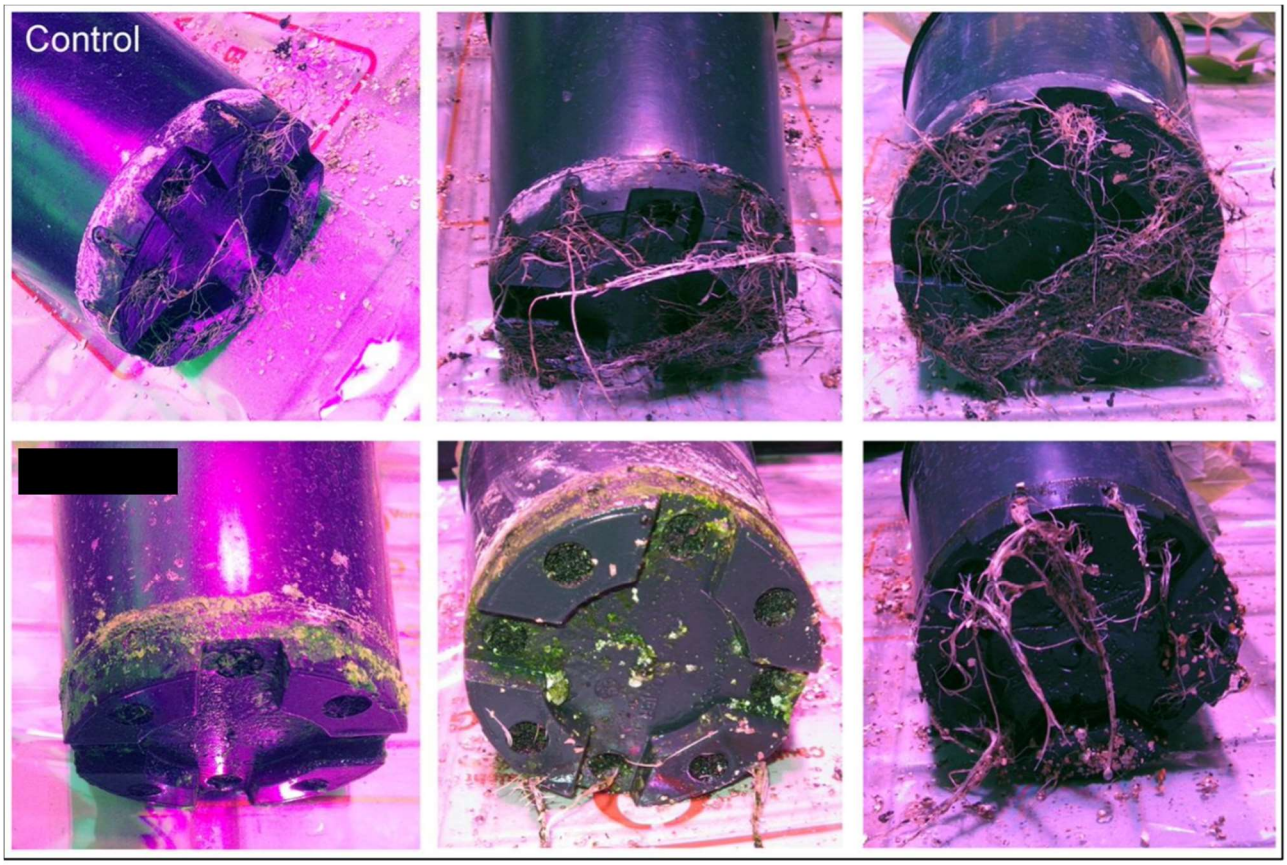


Figura 13: I vasi di controllo hanno un'abbondante crescita di radici dal fondo del vaso. Non c'è alcuna crescita delle radici dal fondo dei vasi testati con Geocomposito C.B.

Figura 14: Le radici principali sono cresciute attraverso il tessuto di controllo (freccia verde).

f) Conclusione

Da questa combinazione di esperimenti, concludiamo che il Geocomposito C.B. è davvero una barriera efficace contro la crescita delle radici, anche da specie a forte radicamento come la ***Reynoutria japonica,*** poligono giapponese.
Nel sistema di coltura sterile, il Geocomposito C.B. è efficace suggerendo che la diffusione di ioni Cu2+ dal materiale crea una barriera chimica e una "zona di inibizione". Tuttavia, risulta che nei brevi tempi utilizzati per la sperimentazione il Geocomposito C.B. risulta meno efficace nel terreno. Ciò suggerisce che la barriera chimica è più lenta a formarsi nel suolo, effetto alone. Appena installato nel terreno, in un primo tempo, il Geocomposito C.B. è più efficace come barriera pseudo-fisica; solo successivamente quando la soluzione circolante nel terreno, prossima alla barriera di rame, si arricchisce dello ione ceduto dalla barriera, le radici nelle prossimità ne vengono inibite.

3. L'efficacia di "materiale" aumenta con il tempo?

Dati i risultati nel sistema di coltura sterile, abbiamo ipotizzato che il Geocomposito C.B. nel suolo potrebbe eventualmente formare un'efficace barriera chimica, dopo un periodo di alcuni mesi, soprattutto in presenza di umidità sufficiente, necessaria agli ioni Cu2+ per diffondersi nel suolo.

Abbiamo testato questa idea nel nostro sistema di coltura sterile, pre-incubando Geocomposito C.B. o geotessuto di controllo nel terreno agar per 4 settimane. Abbiamo quindi seminato i semi di Arabidopsis sui piatti. L'effetto è sorprendente: la crescita della piantina è quasi completamente inibita sulle piastre di Geocomposito C.B. indicando una zona di inibizione molto più ampia e più forte (Figura 15). Questi risultati dimostrano chiaramente che il Geocomposito C.B. può formare una barriera chimica, a seguito della diffusione la diffusione degli ioni Cu2+.

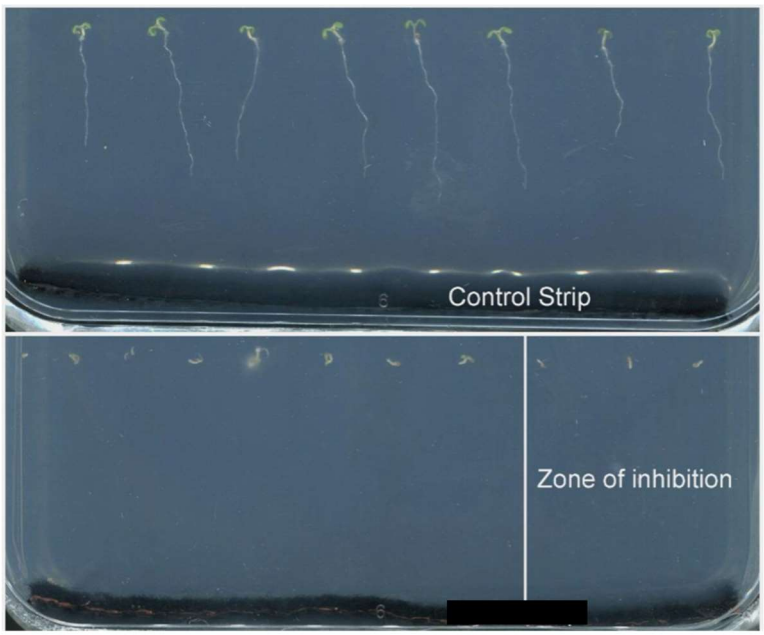


Figura 15:
Confronto della crescita delle radici di piantine di Arabidopsis thaliana cresciute su piastre pre-incubate per 4 settimane con un controllo o una striscia [redacted].
I semi sono stati piantati a 40 mm di distanza dal fondo del piatto e lasciati crescere per 7 giorni.

4. Geocomposito C.B. è sicuro?

Poiché Geocomposito C.B. funziona rilasciando ioni Cu2+ nel terreno, abbiamo preventivamente testato la biosicurezza di Geocomposito C.B. valutando come influisce sulla salute e sulla crescita complessiva delle piante. Finora, non abbiamo trovato prove che la presenza di Geocomposito C.B. sia dannosa per la crescita complessiva delle piante nel terreno. La biomassa delle piante di Arabidopsis thaliana coltivate nel terreno circondato da Geocomposito C.B. non è diversa dalla biomassa delle piante coltivate senza Geocomposito C.B. (Figura 16). L'ovvio avvertimento qui è che questi esperimenti durano solo 8 settimane. È possibile che l'esposizione a lungo termine a Geocomposito C.B. possa avere alcuni effetti deleteri sulla crescita delle piante (anche se riteniamo che ciò sia improbabile).

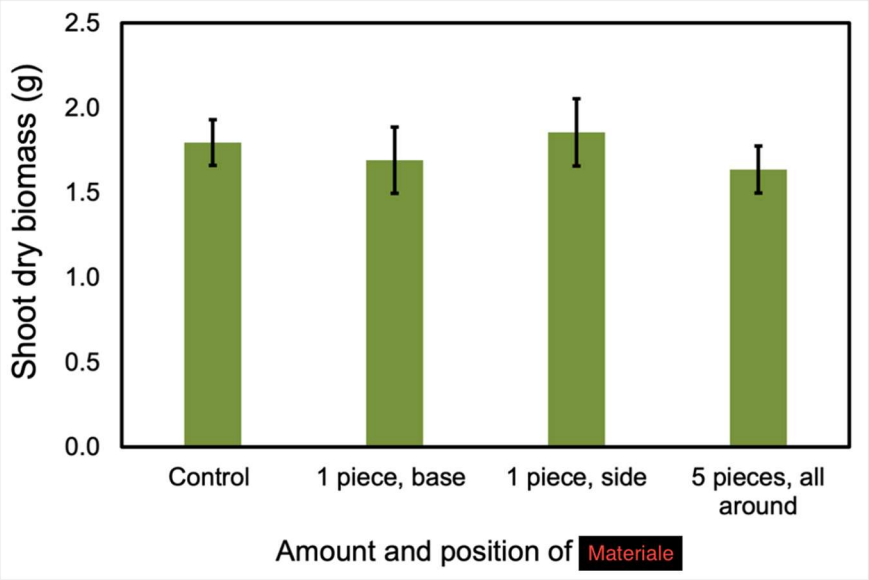


Figura 16: Grafico che mostra la biomassa media dei germogli secchi di piante di Arabidopsis thaliana coltivate su terreno contenente quantità variabili di Geocomposito C.B. N=8 per trattamento, le barre nere indicano l'errore standard della media.

Abbiamo eseguito esperimenti simili sulla sicurezza con piante di pomodoro e ugualmente non è stato riscontrato alcun effetto dovuto alla presenza di Geocomposito C.B. sulla crescita o sulla biomassa della pianta (Figura 17).

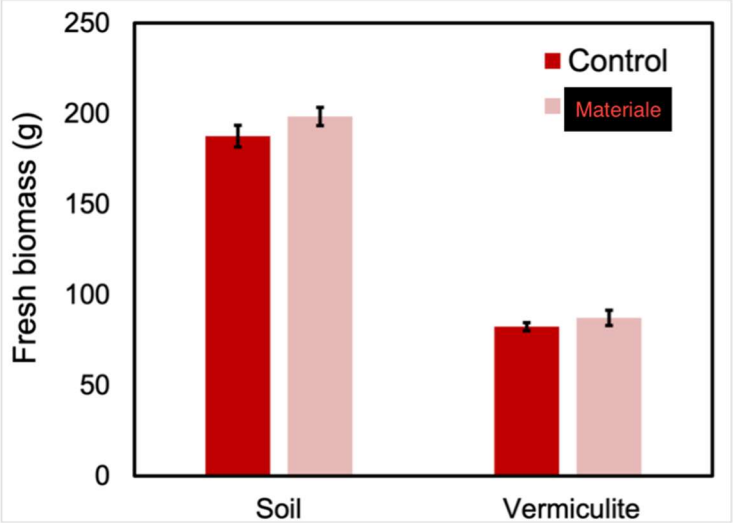


Figura 17: Grafico che mostra la biomassa media dei germogli freschi di piante di pomodoro coltivate su terreno o vermiculite in presenza di un Geocomposito C.B. o di un disco di controllo. N=6-8 per trattamento, le barre nere indicano l'errore standard della media.

5. In che modo Geocomposito C.B. inibisce la crescita delle radici?

È abbastanza chiaro che Geocomposito C.B. agisce rilasciando ioni Cu2+ in soluzione. Ma qual è l'effetto di questo sulle radici stesse? Inizialmente ci siamo chiesti se Geocomposito C.B. potesse causare la deflessione delle radici (cioè alterare la loro direzione di crescita) o causare l'inibizione della crescita delle radici di per sé. I risultati esemplificati nella Figura 1 suggeriscono fortemente che Geocomposito C.B. inibisce la crescita delle radici. Per ottenere una visione più approfondita di questo processo, abbiamo utilizzato la microscopia confocale a scansione laser (CLSM[1]) e la microscopia a interferenza a contrasto differenziale (DCIM[2]). Abbiamo analizzato la morfologia degli apici radicali di piante coltivate in presenza e assenza di Geocomposito C.B. I risultati dimostrano chiaramente che quando le punte delle radici si avvicinano alla zona di inibizione, subiscono un progressivo "collasso". Le cellule in divisione all'estremità della radice (il "meristema") muoiono e le cellule sopra il meristema si differenziano (Figura 18). Tutte le indicazioni finora suggeriscono che la tossicità del rame è la principale modalità d'azione di Geocomposito C.B. sulle radici delle piante. Tuttavia, questa tossicità del rame è chiaramente un effetto molto locale all'interno del sistema radicale: solo la parte della radice esposta alla "zona di inibizione" sembra essere interessata e, nel complesso, l'effetto complessivo sulla pianta è scarso.

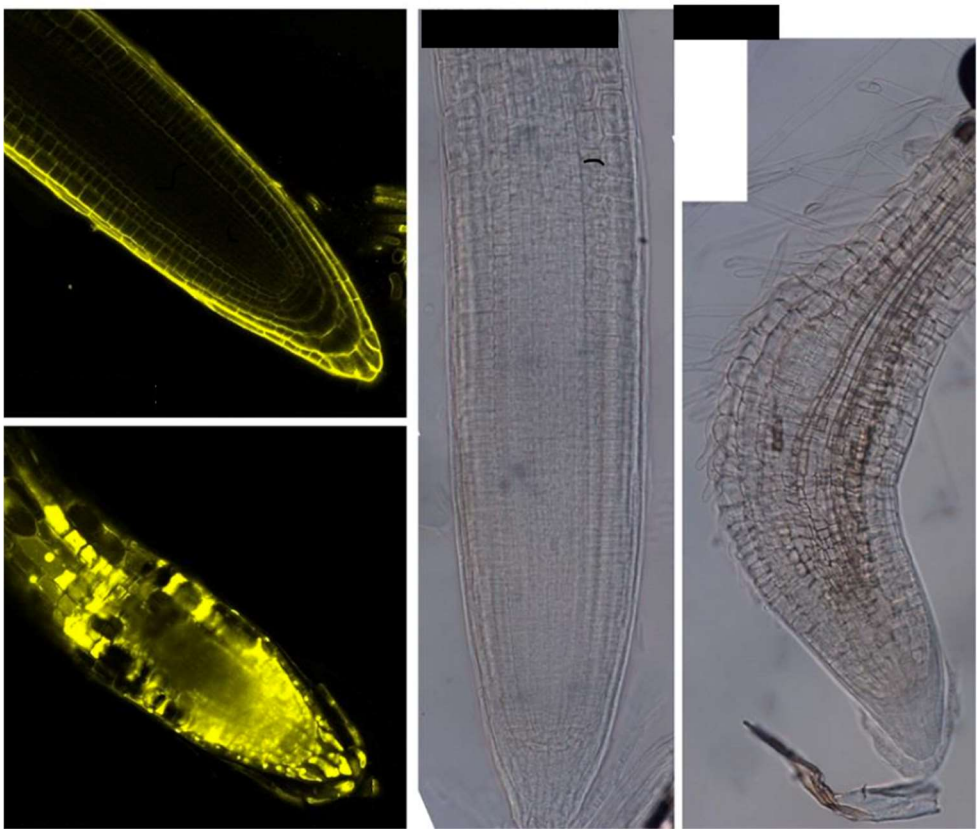


Figura 18: Lato sinistro: immagini CLSM[1] degli apici delle radici di Arabidopsis thaliana cresciuti in presenza o assenza di Geocomposito C.B. Le radici sono state colorate con il colorante fluorescente ioduro di propidio (giallo), che marca l'esterno delle cellule vive intatte. In assenza di Geocomposito C.B. gli apici radicali hanno la loro caratteristica morfologia. In presenza di Geocomposito C.B. lo ioduro di propilio è entrato nelle cellule, indicando che sono morte o morenti.
Lato destro: immagini DCIM[2] degli apici delle radici di Arabidopsis thaliana cresciuti in presenza o assenza di Geocomposito C.B. Anche in questo caso, in assenza di Geocomposito C.B. gli apici radicali hanno la loro caratteristica morfologia. In presenza di Geocomposito C.B. le cellule sono morte o differenziate, con i peli radicali visibili, cosa che normalmente non si verifica.

6. Conclusioni generali

Dai dati che abbiamo raccolto, Geocomposito C.B. è chiaramente un materiale efficace e sicuro per bloccare la crescita delle radici. Riteniamo che il Geocomposito C.B. in un primo momento, per quanto riguarda il terreno, agisca in gran parte come una barriera pseudo-fisica, nel senso che le radici devono entrare in contatto con il rame per essere inibite da esso. I nostri risultati indicano chiaramente che il Geocomposito C.B. può formare una barriera chimica, ma il processo è lento anche in condizioni favorevoli. Ciò suggerisce che l'efficacia del Geocomposito C.B. nel terreno aumenterà nel tempo.

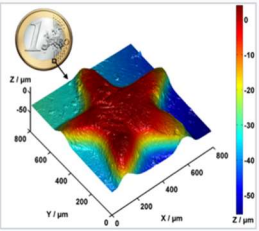
1. Note reperibili nell'appendice
2. Note reperibili nell'appendice

APPENDICE:

1. Microscopio confocale:

1. https://it.wikipedia.org/wiki/Microscopio_confocale
2. https://inis.iaea.org/collection/NCLCollectionStore/_Public/40/091/40091794.pdf

Caratteristiche generali [modifica | modifica wikitesto]



Misura di una stella su una moneta da un euro, ottenuta tramite microscopio confocale in riflessione.

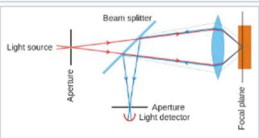
Lo strumento opera nel campo convenzionale degli ingrandimenti della normale microscopia ottica, ed è schematicamente costituito da un normale microscopio a trasmissione a cui viene sovrapposto un apparato che si occupa di illuminare e rilevare l'immagine di un campione illuminato con una scansione punto a punto.

Esistono diverse tecniche per ottenere questo risultato: a disco rotante (*Nipkow disk*), Programmable Array Microscopes (PAM), e laser. Quest'ultimo tipo, il più diffuso e denominato CLSM, acronimo di *Confocal Laser Scanning Microscope*, è un evoluto microscopio a fluorescenza che permette di focalizzare con estrema precisione un laser sul preparato, aumentando notevolmente la risoluzione e la profondità di campo.

La sua sorgente luminosa è costituita da uno o più laser, generalmente a semiconduttore, per ogni diversa frequenza di eccitazione richiesta. Il meccanismo di direzione del fascio luminoso viene gestito da sistemi computerizzati. Le immagini ottenute, sincronizzando col fascio di eccitazione il dispositivo di rivelazione, sono particolarmente definite e spettacolari, e possono permettere di evidenziare con differenti colori le diverse molecole presenti nel preparato, permettendo di apprezzarne la tridimensionalità (esempio particolarmente apprezzabile in campo biologico, utilizzando tecniche di immunofluorescenza, la fotomicrografia a lato con actina in rosso, tubulina del citoscheletro in verde e DNA del nucleo in blu).

Principio di funzionamento [modifica | modifica wikitesto]

Marvin Minsky (1957).



Struttura schematica essenziale di un microscopio confocale in riflessione; per semplicità è stato omesso l'oculare, posizionando il rivelatore nel punto di formazione dell'immagine intermedia. Il percorso di formazione dell'immagine è ispirato al brevetto originale di Minsky, dove si sfrutta l'illuminazione critica.

Il metodo di formazione dell'immagine in un microscopio confocale differisce da quello di un microscopio composto convenzionale per il fatto che, mentre nel secondo il fascio di illuminazione investe l'intero campione e forma istantaneamente l'immagine sul rivelatore, nel primo la luce proveniente dalla sorgente illumina l'oggetto un solo punto per volta ed è necessaria una scansione per formare l'immagine finale. L'uso di questa tecnica permette di raggiungere risoluzioni assiali molto ridotte. Infatti un'immagine così ottenuta viene comunemente chiamata "sezione ottica", in riferimento al fatto che è possibile indagare il campione nelle tre dimensioni spaziali con un metodo non invasivo.

In microscopia confocale lo spot di luce puntiforme è prodotto da un pinhole posto davanti alla sorgente, ossia in sostituzione del diaframma di campo, che risulta così fisso è molto ridotto. La luce viene poi focalizzata dal collettore e dal condensatore (o dall'obiettivo, nel caso di configurazione in luce riflessa) sul campione, per poi essere raccolta dall'obiettivo e dall'eventuale oculare e focalizzata su un secondo pinhole. In corrispondenza di questo è presente anche il rivelatore d'immagine, che produce un segnale proporzionale all'intensità della luce che lo colpisce.

Il pinhole di illuminazione e quello di rivelazione appartengono a piani focali coniugati e si dicono dunque *confocali*, da cui il nome di questa particolare tecnica microscopica.

La quasi totalità dei sistemi confocali moderni utilizza la configurazione in luce riflessa, che, come anticipato da Minsky stesso, aumenta la simmetria e la risoluzione del sistema a spese della luminosità, che si riduce per la presenza dello specchio dicroico o del beam-splitter.

2. Microscopia a interferenza a contrasto differenziale:

1. https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/techniques/dic/dicintro/
2. https://en.wikipedia.org/wiki/Differential_interference_contrast_microscopy