



uniss
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI



Piano Lauree Scientifiche in Biologia e Biotecnologie

**Laboratori di biodiversità animale e microscopia ottica:
invertebrati d'acqua dolce come modello per la
didattica sperimentale**

Docenti:

Dr.ssa Renata Manconi rmanconi@uniss.it

Dr.ssa Giacinta Angela Stocchino stocchin@uniss.it

Dipartimento di Medicina Veterinaria

Referente Progetto PLS-Sassari: Prof. Marilena Formato

Dipartimento di Scienze Biomediche

E-mail: formato@uniss.it



uniss
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI



Piano Lauree Scientifiche in Biologia e Biotecnologie

**Laboratori di biodiversità animale e microscopia ottica:
invertebrati d'acqua dolce
come modello per la didattica sperimentale**

Concetti e parole chiave:

**livelli di organizzazione biologica
comunità animale d'acqua dolce
organismi pluricellulari (invertebrati)
adattamenti morfo-funzionali
identificazione (tassonomia)
cicli vitali
planarie come modello sperimentale
riproduzione sessuale ed ermafroditismo
riproduzione asessuale e rigenerazione
cellule staminali
ciclo cellulare, cromosomi e cariologia**

INVERTEBRATI D'ACQUA DOLCE

Il **Regno Animale** è il più grande tra i 5 regni dei viventi (Monera, Protisti, Funghi, Piante, Animali). Nell'ambito di questo regno gli **invertebrati** sono predominanti, comprendendo circa il **90% di tutte le specie animali**.

Gli invertebrati sono un gruppo di organismi estremamente eterogeneo e rappresentato da un **elevatissimo numero di specie** (taxa). Il loro studio fornisce preziose indicazioni per la **valutazione della biodiversità** e quindi nella **gestione e conservazione ambientale**. Molte specie sono utilizzate come **modelli sperimentali** in svariati **campi scientifici**, di base e applicativi.

Molti **invertebrati d'acqua dolce** sono utilizzati come **indicatori di qualità ecologica** nel **monitoraggio biologico** di qualità delle acque. Lo studio tassonomico e biologico degli invertebrati è fondamentale per la **tutela della biodiversità** dei fiumi, laghi e sorgenti.

Gli invertebrati d'acqua dolce possono essere sia planctonici sia bentonici (Fig. 1):

- il **plancton** è costituito da organismi, galleggianti o in sospensione, invisibili ad occhio nudo per le dimensioni **inferiori al millimetro (mm)**: rotiferi, piccoli crostacei (copepodi, cladoceri, ostracodi);
- il **benthos** è costituito da organismi che vivono a livello del fondo e che hanno in media dimensioni **superiori al mm**, ma possono anche avere dimensioni < 1 mm: poriferi, cnidari, platelminti, nematodi, anellidi, molluschi, crostacei (es. anfipodi, isopodi), insetti (larve e adulti).

Durante l'**attività di laboratorio** saranno utilizzate delle **schede con chiavi dicotomiche** per il **riconoscimento** degli animali. I vari gruppi saranno riconosciuti sulla base di **presenza/assenza di caratteri morfologici** diagnostici (es. occhi, zampe, branchie). Alcuni animali potranno essere osservati e riconosciuti A) ad **occhio nudo in vivo**, B) con lo **stereomicroscopio in vivo**, C) con il **microscopio a luce trasmessa** (vetrini).

Oltre al riconoscimento del gruppo (taxon), il lab consentirà l'osservazione di **stadi del ciclo vitale** (larve/adulti) e dei loro **adattamenti morfo-funzionali** (es. nuoto, resistenza alla corrente).

BIODIVERSITÀ ANIMALE



**Fig. 1. Comunità d'acqua dolce:
invertebrati**

**Stereomicroscopio, osservazione in vivo di forma e funzione,
fase del ciclo vitale e identificazione del gruppo animale**

LE PLANARIE D'ACQUA DOLCE

Le **planarie** o tricladi (Phylum Platyhelminthes) sono animali molto comuni nelle nostre acque dolci, sia superficiali sia sotterranee (Fig. 2). Si tratta di **piccoli vermi** (15-20 mm) dal corpo **appiattito dorso-ventralmente** privi di strutture scheletriche, di apparato circolatorio e respiratorio. Hanno un sistema digerente molto semplice formato dalla bocca (**poro faringeo** situato a metà circa della superficie ventrale) che si apre in una cavità contenente un **faringe** tubulare muscoloso (simile a una piccola proboscide). Il faringe, che viene estroflesso durante la nutrizione (per aspirare piccoli frammenti e liquidi del cibo-preda), comunica con un intestino ramificato **privo di apertura anale**. Le particelle non digerite vengono espulse dalla bocca. Le planarie sono **predatrici** (ma possono nutrirsi anche di animali morti) e sono in grado di sopravvivere per lunghi periodi in assenza di cibo pur rimanendo attive.

Nella regione del capo sono presenti due o più **occhi** in grado di percepire l'intensità e la direzione della luce, sono cioè sensori che non formano immagini. Il sistema nervoso è composto da un **cervello** molto semplice e da due **cordoni nervosi** che decorrono ai lati del corpo.

Le planarie sono in grado di rispondere a stimoli di varia natura per la presenza di chemiorecettori, tagmorecettori, fotorecettori, reorecettori concentrati soprattutto nella regione del capo. Hanno comportamenti tipici quali la **fototassi e reotassi negativa**. Sono animali lucifughi, tendono cioè ad evitare la luce e vivono in ambienti bui di fiumi e laghi, generalmente sotto i sassi e le foglie di piante acquatiche e tendono a muoversi controcorrente. Rispondono a sostanze chimiche presenti nell'acqua e reagiscono rapidamente alla presenza di cibo dirigendosi direttamente verso di esso.

La riproduzione può essere **sessuale e/o asessuale**. Alcune specie si riproducono solo sessualmente (si accoppiano e producono prole), altre solo asessualmente (scissione binaria), altre specie sono invece in grado di riprodursi in entrambi i modi.

Le planarie che si **riproducono sessualmente** rientrano nella categoria degli animali **ermafroditi simultanei**, cioè ciascun individuo produce sia cellule germinali maschili (**spermatozoi**) sia femminili (**cellule uovo**) che si sviluppano in organi distinti (testicoli e ovari) e maturano contemporaneamente. Tuttavia, non si ha mai autofecondazione, ma gli animali si **accoppiano** con **scambio reciproco** di spermatozoi (fecondazione interna). Le **uova fecondate** sono inglobate all'interno di piccole sfere cornee (**bozzoli**) che vengono rilasciate all'esterno del corpo attraverso il **poro genitale** situato caudalmente a quello faringeo. Dai bozzoli dopo alcune settimane fuoriescono dei piccoli completamente formati (Fig. 2).

La **riproduzione asessuale** comporta la **divisione o scissione in due parti** (una anteriore con il capo e una posteriore con la coda) dell'animale (Fig. 3). Durante la divisione l'estremità posteriore dell'animale aderisce strettamente al substrato, mentre la metà anteriore continua a muoversi in avanti fino a quando l'animale si lacera in due parti. Ciascuna metà, in seguito, rigenera completamente la parte mancante.

Le planarie sono caratterizzate da un'**eccezionale capacità rigenerativa** dovuta alla presenza nei loro tessuti di cellule indifferenziate **totipotenti** o **cellule staminali**. Queste cellule dette **neoblasti** sono sparse in tutto il corpo dell'animale. Sono cellule piccole con un alto rapporto nucleo/citoplasma (grande nucleo e scarso citoplasma) e possono **differenziarsi in tutti i tipi cellulari**, comprese le cellule germinali (**spermatozoi e cellule uovo**). Le **cellule staminali (neoblasti)** sono le **uniche cellule** dell'animale adulto **in grado di dividersi** e perciò presiedono al *turnover* di tutte le cellule differenziate dell'organismo.

Quando l'animale si divide, vicino alla superficie di taglio si forma dapprima una membrana che chiude la ferita, in seguito, dai tessuti circostanti si ha la migrazione dei neoblasti che si accumulano al di sotto della membrana e iniziano a **dividersi intensamente**. Il prodotto della proliferazione cellulare porta alla formazione di una massa incolore di cellule indifferenziate, il **blastema rigenerativo**. Successivamente i neoblasti iniziano a differenziarsi dapprima per formare il cervello, gli occhi e quindi tutti gli altri organi mancanti.

Grazie alla loro straordinaria capacità rigenerativa le planarie sono state oggetto di esperimenti sin dalla fine dell'800. Già da allora si scoprì che anche un frammento corrispondente alla 279esima parte dell'animale è in grado di rigenerare l'intero animale.

Le planarie rappresentano un eccellente modello sperimentale perché sono animali semplici da trovare e allevare in laboratorio, ma sufficientemente complessi per lo studio della biologia delle cellule staminali e dei meccanismi molecolari che stanno alla base dei processi rigenerativi.

L'attività di laboratorio comprenderà:

- a) osservazione allo stereomicroscopio di planarie in vivo (in movimento, sottoposte a vari stimoli);
- b) frammentazione sperimentale in vivo di esemplari modello e osservazione di frammenti con blastema in fasi successive di rigenerazione (Fig. 4);
- c) osservazione di apparati riproduttori in sezioni istologiche (MO luce)

Modello sperimentale: le planarie



Riproduzione sessuale
in animali ermafroditi

Fig. 2



Fig. 3. Riproduzione asexuale Fig. 4. Rigenerazione
Cellule staminali

Stereomicroscopio:

- osservazione in vivo di animale intero e frammenti in fasi successive di rigenerazione
- frammentazione sperimentale

Microscopio luce trasmessa:

- osservazione apparati riproduttori in sezioni istologiche

CICLO CELLULARE - CROMOSOMI

Tutte le cellule di un organismo derivano dalla **divisione e proliferazione di cellule preesistenti**. Nelle specie che si riproducono sessualmente tutte le cellule si sono originate dalla **divisione** di una singola cellula, lo **zigote**, che si forma dall'**unione** (fecondazione) di una cellula **uovo** e di uno **spermatozoo**.

Ciascuna cellula ha una **vita di durata definita** e l'organismo, per continuare a sopravvivere, deve ad ogni istante provvedere a generare nuove cellule destinate a sostituire quelle vecchie, danneggiate o che progressivamente muoiono (es. globuli rossi, strato superficiale della cute).

Le cellule del corpo (cellule **somatiche**) proliferano mediante un processo di divisione cellulare detto **mitosi** (suddiviso in **profase, metafase, anafase, telofase**) (Fig. 5). L'intervallo della vita di una cellula posto tra due mitosi successive è detto **interfase**, formato a sua volta da altri tre stadi (*G1, S, G2*). L'insieme di tutti questi stadi costituisce il **ciclo cellulare**.

Durante la mitosi vengono ripartite alle due cellule figlie tutte le componenti cellulari duplicate durante le fasi precedenti del ciclo cellulare. In particolare, nella cellula madre in divisione si forma un complesso apparato (**apparato mitotico**) che assicura la corretta suddivisione dei cromosomi tra le due cellule figlie.

I **cromosomi**, che sono i **depositari dei caratteri ereditari**, sono formati da filamenti di **DNA** (acido desossiribonucleico) e **proteine** (Fig. 6) e sono visibili come **entità distinte** solamente durante la mitosi, in seguito ad un processo di **forte spiralizzazione del DNA**.

L'**insieme dei cromosomi** presente in ogni cellula rappresenta il **corredo cromosomico** che è **costante e tipico di ciascuna specie**. Nell'uomo (specie: *Homo sapiens*), per esempio, ogni cellula del corpo ha 46 cromosomi (eccetto la cellula uovo e lo spermatozoo), e tutti gli individui appartenenti a questa specie condividono lo stesso numero di cromosomi. La cellula uovo e lo spermatozoo hanno 23 cromosomi (numero **aploide**) in modo tale che al momento della fecondazione si possa ripristinare il numero cromosomico (**diploide**) tipico della specie. Nell'uomo variazioni nel numero e nella forma dei cromosomi possono essere incompatibili con la vita o causare malattie (es. sindrome di Down).

In altre specie del regno animale molte anomalie cromosomiche non comportano danni all'organismo.

L'insieme delle caratteristiche che identificano un particolare corredo cromosomico costituisce il **cariotipo** della specie che può essere rappresentato da un diagramma denominato **cariogramma** nel quale i vari cromosomi del corredo sono **allineati e appaiati** (nel caso di un corredo diploide) secondo un ordine decrescente di lunghezza (Fig. 7).

Tenendo conto del fatto che i cromosomi possono essere osservati solo durante la mitosi tutte le tecniche di studio comportano necessariamente l'utilizzo di **sostanze in grado di bloccare** le cellule durante lo stadio mitotico (**metafase**) in cui i cromosomi raggiungono il massimo grado di spiralizzazione.

Attività di laboratorio:

- utilizzo delle planarie come modello per l'ottenimento e osservazione dei cromosomi sfruttando la presenza nei loro tessuti di **cellule staminali**, costantemente impegnate nell'intensa **attività mitotica** del **turnover** cellulare. La divisione cellulare viene ulteriormente **stimolata** per frammentazione sperimentale dell'animale in modo da ottenere più **frammenti in rigenerazione** con un grande numero di cellule in mitosi.

-costruzione di un **cariogramma**

Ciclo cellulare e Cromosomi

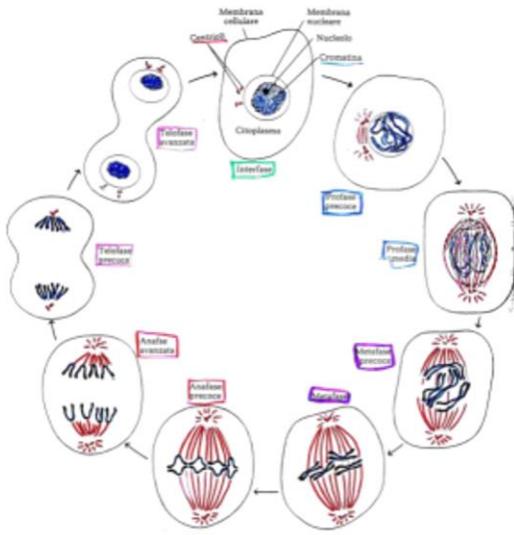


Fig. 5

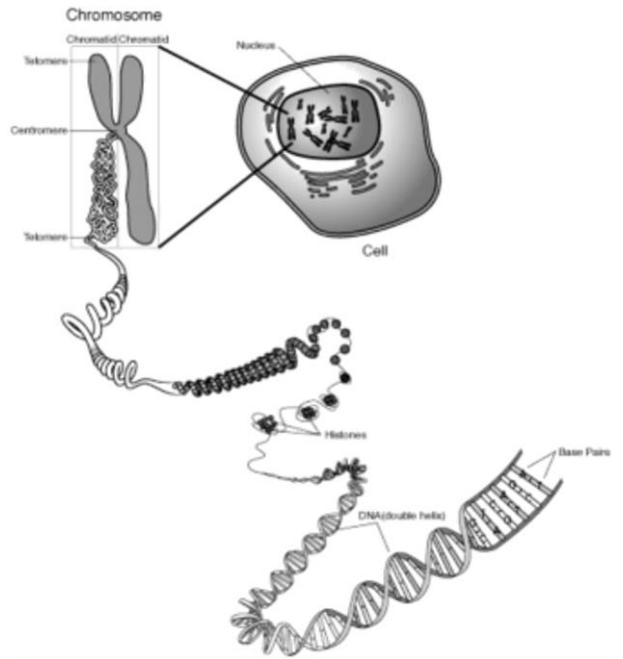


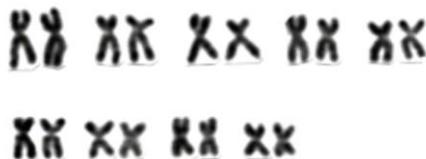
Fig. 6

Cariologia

piastra cromosomica



cariogramma



Tecnica per ottenimento piastre cromosomiche

Costruzione cariogrammi

Fig. 7

Norme generali di sicurezza in laboratorio

- Qui di seguito sono elencate alcune norme elementari di sicurezza, che devono essere tassativamente rispettate.
- Entrando in laboratorio, individuare le vie di fuga, indicate dalla segnaletica verde.
- In laboratorio indossare sempre il camice. Il camice deve essere chiuso sul davanti, con maniche lunghe e polsini ad elastico. Al termine delle attività, prima di lasciare il laboratorio, togliersi il camice. In ogni caso, non uscire dal laboratorio, per recarsi in altre aree (biblioteca, uffici, bar, ecc.), senza aver prima tolto il camice.
- Non introdurre in laboratorio borse, zaini o altro materiale non necessario.
- Indossare guanti monouso durante la manipolazione di sangue o di materiale da esso derivato non fissato. I guanti devono essere rimossi con attenzione e sostituiti quando sono visibilmente contaminati. I guanti si sfilano rovesciandoli e vanno gettati negli appositi contenitori.
- Gli studenti che presentano dermatiti o altre lesioni sulle mani, devono indossare guanti protettivi in tutte le fasi di lavoro.
- I guanti vanno tolti, quando si usino strumenti di qualsiasi natura (telefono, tascheria, strumenti scientifici, maniglie, ecc.). I guanti usati non vanno riutilizzati.
- Lavare le mani routinariamente, immediatamente dopo la manipolazione di materiali contaminati e, in ogni caso, dopo la fine delle attività, anche quando sono stati indossati i guanti. Lavare sempre le mani prima di lasciare il laboratorio.
- In laboratorio è vietato mangiare, bere, fumare, portare oggetti alla bocca ed applicare cosmetici.
- Non pipettare mai con la bocca, ma utilizzare le apposite propipette.
- Non appoggiare recipienti contenenti liquidi biologici vicino al bordo del banco di lavoro.
- Tutto il materiale biologico d'origine umana (sangue, ecc.) deve essere considerato come potenzialmente infetto e pertanto trattato con le necessarie precauzioni.
- Segnalare immediatamente al personale docente ogni spargimento di materiale biologico (ad es. schizzi di sangue) sul piano di lavoro, affinché si provveda alla decontaminazione con un germicida chimico appropriato (candeggina, ecc.).
- Decontaminare e pulire sempre, al termine del loro utilizzo, le apparecchiature scientifiche e, al termine della attività, i piani di lavoro.
- Seguire scrupolosamente le indicazioni di sicurezza riportate nei protocolli di esperimento.
- Raccogliere tutti i liquidi biologici (sangue, terreni di coltura venuti a contatto con le cellule, cellule, ecc.) in speciali contenitori per rifiuti, che verranno successivamente eliminati previo trattamento con candeggina al 15%.
- Mettere il materiale monouso (pipette, fiasche ecc.) venuto a contatto con materiale biologico in un sacco apposito, che verrà smaltito mediante incenerimento.
- Stante i costi elevati dello smaltimento, ridurre il più possibile l'uso del materiale monouso.
- Segnalare immediatamente al personale docente qualsiasi incidente o la mancanza di materiale di protezione

Utilizzo della centrifuga

- chiudere accuratamente il tappo delle provette, per evitare la fuoriuscita di liquido e la formazione di aerosol
- assicurarsi che il rotore sia bilanciato: provette di ugual peso devono essere inserite negli alloggiamenti diametralmente opposti
- chiudere il coperchio della centrifuga prima di avviarla
- non cercare di aprire il coperchio prima del completo arresto del rotore
- in caso di fuoriuscita di liquido dalle provette, avvertire il personale docente

Utilizzo dell'apparecchiatura per elettroforesi

- assicurarsi che l'alimentatore sia spento, prima di collegare i morsetti
- assicurarsi che il coperchio della vaschetta sia correttamente posizionato, prima di collegare i morsetti
- alla fine della corsa, prima di rimuovere il coperchio della cella elettroforetica, spegnere l'alimentatore e staccare i morsetti