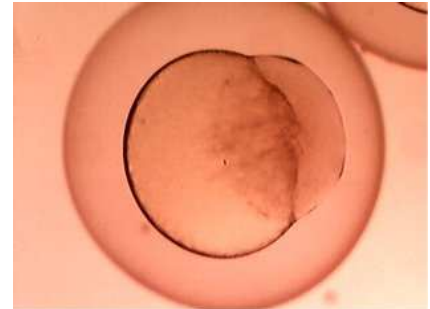


## Organismi modello e insegnamento delle bioscienze



A. Crimi,<sup>1</sup> G. Forni,<sup>1</sup> S. Lippo,<sup>1</sup> A. Pascucci<sup>1</sup> e M. Sirgiovanni

<sup>1</sup> Gruppo Diffusione Cultura Scientifica Open Science

E-mail: [giulia.forni@istruzione.it](mailto:giulia.forni@istruzione.it)

**ABSTRACT:** La storia della scienza e in particolare quella della biologia è stata continuamente contraddistinta dalla ricerca degli strumenti più adatti per affrontare l'indagine scientifica. Molto spesso per capire un problema complesso risulta utile scegliere e utilizzare un modello più semplice nel quale il fenomeno biologico da indagare si presenti in modo particolarmente "puro" ed esemplare. Tutto ciò che verrà capito nel modello sarà poi estrapolato e verificato in contesti più complessi. Il continuo intreccio tra semplicità e complessità, tra strutture e relazioni che si realizza in tal modo consente alle conoscenze scientifiche di progredire. Così da quasi un decennio i soci fondatori di Open Science, autori di questo articolo, hanno scelto ed usato gli organismi modello nella didattica delle scienze.

**PAROLE CHIAVE:** Organismi modello, fenomeni biologici, bioscienze .

La storia della scienza e in particolare quella della biologia è stata continuamente contraddistinta dalla ricerca degli strumenti più adatti per affrontare l'indagine scientifica. Molto spesso per capire un problema complesso risulta utile scegliere e utilizzare un "modello" più semplice nel quale il fenomeno biologico da indagare si presenti in modo particolarmente "puro" ed esemplare. Tutto ciò che verrà "capito" nel modello sarà poi estrapolato e verificato in contesti più complessi. Il continuo intreccio tra semplicità e complessità, tra strutture e relazioni che si realizza in tal modo consente alle conoscenze scientifiche di progredire.

Dai piselli di Mendel, alle uova e agli embrioni degli anfibi<sup>1</sup> e del riccio di mare, dall'assone gigante del calamaro, alle ghiandole salivari della drosophila... e ancora, dal sistema immunitario del topo al sistema nervoso dell'aplysia....la biologia moderna si è progressivamente costruita su sistemi-modello.

Per essere un "buon modello" per la ricerca sperimentale un organismo animale o vegetale deve presentare alcune caratteristiche particolari, come un ciclo vitale breve e una progenie numerosa, in modo da consentire lo studio di numerosi individui per varie generazioni, ma anche la facilità di allevamento e manipolazione, nonché il basso costo. Tali caratteristiche sono tutti elementi fondamentali nella "scelta" di un organismo "modello".

Il lievito *Saccharomyces cerevisiae*, il moscerino delta frutta *Drosophila melanogaster*, la piccola pianta *Arabidopsis thaliana*, il verme nematode *Caenorhabditis elegans*, e, tra i vertebrati, il pesciolino *Danio rerio*, presentano gran parte di tali caratteristiche e perciò hanno avuto ed hanno enorme importanza nella ricerca scientifica, specialmente in biologia molecolare.

Ogni organismo modello presenta sia dei vantaggi che degli svantaggi, per cui la scelta di un particolare modello viene fatta principalmente in funzione del tipo di ricerca che si vuole affrontare.

Ma vediamo ora i motivi del successo di alcuni di essi.

La *Drosophila*, un organismo "storico" per le ricerche di genetica, deve la sua fortuna alla facilità con la quale si possono seguire nelle generazioni gli effetti delle mutazioni genetiche. Più recentemente il successo del nematode *C. elegans*, un organismo costituito da poco più di 1000 cellule, è in buona parte dovuto agli studi di genetica dello sviluppo: il suo basso numero di cellule ha infatti consentito di ricostruire a partire dallo zigote l'intera discendenza cellulare, permettendo di trarre una serie di conclusioni che vanno diritto al cuore di uno dei maggiori problemi della biologia dello sviluppo, il differenziamento cellulare e la sua determinazione progressiva<sup>2</sup>. Il riccio di mare, *Paracentrotus lividus*, è da sempre usato nei laboratori di ricerca per lo studio dei meccanismi connessi all'interazione fra gameti ed allo sviluppo embrionale. Tra i vertebrati lo zebrafish, il *Danio rerio*, si sta rivelando estremamente potente per la facilità di osservazione e di manipolazione dell'embrione.

Gli organismi modello, oltre che nella ricerca, possono essere efficacemente utilizzati anche in ambito didattico: essi possono costituire un interessante e versatile "strumento" per affrontare lo studio sia dei meccanismi biologici di base, sia delle più complesse e recenti tematiche biomolecolari.

Così da quasi un decennio i soci fondatori di Open Science,<sup>3</sup> autori di questo articolo, hanno scelto ed usato gli Organismi Modello nella didattica delle Scienze. I motivi della "scelta" non sono stati occasionali, ma frutto di una lunga esplorazione e ricerca di strategie e strumenti didattici.

Abbiamo cominciato negli anni '90 con il primo percorso sperimentale e teorico "La *Drosophila* va a

<sup>1</sup> *Xenopus laevis*

<sup>2</sup> E. Boncinelli *Biologia dello sviluppo* Carrocci Roma 2001

<sup>3</sup> Gruppo Diffusione Cultura Scientifica Open Science, Associazione non-profit di insegnanti di scienze

scuola ed insegna la genetica”<sup>4</sup>. L’efficacia didattica, la sua fertilità ed il suo rigore scientifico, pur nella relativa semplicità delle attività sperimentali, furono subito chiari.

Proponiamo<sup>5</sup> dunque qui sinteticamente alcuni dei “percorsi di conoscenza” sviluppati in anni di ricerca didattica e di collaborazione con scienziati di università ed enti di ricerca. Tali percorsi permettono di affrontare nuclei tematici fondamentali nello studio delle Scienze della Vita attraverso esperienze laboratoriali significative e flessibili, realizzabili anche in classe<sup>6</sup> in quanto non necessitano di strumentazioni sofisticate né di laboratori attrezzati.

Tutti gli organismi usati, pur nella diversità, hanno il vantaggio di essere piccoli, economici, facili da crescere e far sopravvivere in laboratorio; permettono di introdurre ed approfondire lo studio delle caratteristiche anatomiche di invertebrati o vertebrati, del dimorfismo sessuale, della fecondazione, dell’embriogenesi e del ciclo vitale; ed ancora delle variazioni della durata del ciclo vitale o dell’embriogenesi o della prolificità in relazione al variare di fattori ambientali quali la temperatura o la quantità di cibo, inoltre offrono fertili spunti per parlare di storia della genetica, delle mutazioni, delle malattie genetiche o della terapia genica e delle sue implicazioni in bioetica.

I vari percorsi sono caratterizzati dall’essere strutturati in esperienze indipendenti e graduate per difficoltà di temi e per complessità di attività laboratoriali finalizzate all’acquisizione di diverse abilità e livelli cognitivi; si va infatti da esperienze più semplici in cui viene sviluppata la capacità di osservazione (ciclo vitale, dimorfismo, mutanti) ad altre in cui si debbano individuare, separare e misurare variabili (studio della variazione della durata del ciclo vitale e della prolificità in relazione al variare della condizioni ambientali) ad attività complesse quali progettazione ed esecuzione da parte degli studenti stessi di esperienze(test-crossing). Questa caratteristica “modulare” permette di utilizzare vari organismi a partire dalle scuole elementari.

Sebbene i percorsi abbiano finalità e temi comuni, tuttavia ognuno ha sue precise peculiarità che possono indirizzare la scelta in didattica.

Esaminiamo ora le caratteristiche degli organismi modello utilizzati nei percorsi didattici che più avanti sinteticamente esporremo

## 1. *Paracentrotus lividus*



Il *Paracentrotus lividus*, diffuso nelle nostre coste, è caratterizzato, come tutti gli Echinoidei regolari dalla presenza di formazioni scheletriche calcaree saldate insieme che formano un guscio duro ricoperto dall’epidermide. A simmetria pentaraggiata presenta la bocca sulla porzione inferiore, l’apertura anale si trova sulla parte superiore. I due sessi sono separati e la fecondazione è esterna. In questa specie non c’è un chiaro dimorfismo sessuale e i gameti si distinguono dal colore: rosa-arancio le uova, biancastri gli spermatozoi.

<sup>4</sup> Il percorso fu realizzato in collaborazione con scienziati dell’Istituto di Genetica e Biofisica del CNR di Napoli.

dalla prof Maria Carmela Sirgiovanni nella SMS Pirandello di Napoli che ha collaborato alla realizzazione di tutti i percorsi qui proposti.

<sup>5</sup> I protocolli sperimentali sono stati sviluppati grazie alla consulenza scientifica di ricercatori dell’Istituto di Genetica e Biofisica del CNR di Napoli. Il percorso didattico con *Danio rerio* è stato sviluppato in collaborazione con l’Università Federico II di Napoli, il percorso didattico con *Paracentrotus lividus* è in via di realizzazione in collaborazione con la stazione zoologica “Anton Dohrn” di Napoli

<sup>6</sup> Solo il percorso su *Arabidopsis* deve essere eseguito in un laboratorio di ricerca in quanto utilizza piante transgeniche

Nel 1875, utilizzando ricci di mare (*Paracentrotus lividus*), Oskar Hertwig poté osservare per la prima volta la fusione dello spermatozoo con la cellula uovo al momento della fecondazione. Solo qualche decennio più tardi, Hans Driesch, in una serie di esperimenti condotti a Napoli con lo stesso organismo, intuì che, allontanando le due cellule ottenute dalla prima divisione mitotica di uno zigote, non si ottengono due mezzi embrioni, bensì due embrioni completi. Da allora il riccio di mare è diventato un organismo modello prezioso per lo studio dell'embriologia.

In un laboratorio didattico si induce, con una tecnica non invasiva, la deposizione dei gameti che, raccolti, si possono osservare con microscopi e stereomicroscopi ad uso didattico. E' possibile osservare sia la motilità dello sperma che tratti strutturali dell'uovo nonché procedere alla fecondazione in vitro che consente di osservare dalle fasi iniziali dell'interazione fra i gameti fino allo sviluppo della larva (pluteo) che avviene in 48h.

## 2. *Caenorhabditis elegans*

Lo studio di questo piccolo verme nematode di appena 1mm, è molto diffuso tra i genetisti perché condivide con gli organismi più complessi molte caratteristiche essenziali che sono problematiche centrali nella biologia.

“Nel 2002 il premio Nobel per la medicina è stato assegnato a Brenner, Horvitz e Sulston proprio grazie agli studi condotti su *C. elegans* che questi ricercatori hanno utilizzato per la prima volta come



organismo modello realizzando importanti scoperte sul *lignaggio cellulare* (descrizione spaziale e temporale di tutte le divisioni cellulari durante lo sviluppo) e sull'*apoptosi* (morte cellulare programmata).

Piccolissimo (una capsula Petri ne contiene migliaia), facile da allevare e resistente, *C. elegans* presenta un corpo trasparente che ne permette l'osservazione degli organi interni e dell'embriogenesi al microscopio. Ha larga disponibilità di mutanti e pochi cromosomi. Durante il breve ciclo vitale, di circa tre giorni a 20°C, con una maturità raggiunta dopo quattro stadi larvali, presenta una possibilità veramente sorprendente: per mancanza di cibo o per altre condizioni avverse, le larve entrano nella fase larvale dauer, abbassando il loro metabolismo. Tale fase può durare anche vari mesi. Le favorevoli condizioni ambientali inducono la ripresa del ciclo vitale.

Queste alcune delle caratteristiche che rendono *C. elegans* molto versatile anche per attività didattiche laboratoriali poiché permettono di trattare temi quali l'embriogenesi, l'ermafroditismo e i processi di autofertilizzazione, la determinazione del sesso, il ciclo vitale, il rallentamento dei processi metabolici, il comportamento legato a differenti stimoli ambientali, l'anatomia, la fisiologia e il comportamento legati a differenti mutazioni genetiche.

## 3. *Drosophila melanogaster*

*Drosophila melanogaster*, detta comunemente moscerino della frutta, è un piccolo insetto lungo circa 3mm. La si studia da oltre cento anni ed attualmente è oggetto di ricerca per migliaia di scienziati. Hunt Morgan nel 1933, Hermann Muller nel 1946 e Ed Lewis, Christiane Nusslein-Volhard e Eric Wieschaus nel 1995 furono insigniti del premio Nobel per la medicina per gli studi condotti su quest'insetto. Il suo genoma è stato interamente sequenziato e condivide quasi il 70% dei suoi geni con l'uomo. Gli aspetti fondamentali dell'uso sperimentale della *Drosophila* oltre che nella genetica dello sviluppo, risiedono nella possibilità di seguire gli effetti delle



mutazioni geniche nelle generazioni e nella sua doppia vita (prima larva, poi insetto), così spesso le mutazioni letali che non possono essere studiate nell'adulto possono essere osservate nella larva.

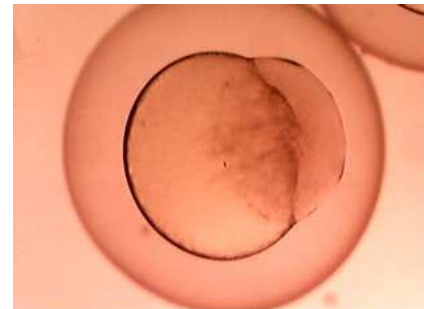
La *Drosophila*, quale strumento didattico, è utilizzata oltre che nello studio della biologia dello sviluppo soprattutto nello studio delle modalità di trasmissione dei caratteri ereditari recessivi e dominanti in organismi omozigoti ed eterozigoti e delle modalità di trasmissione

dei caratteri legati al sesso. Attraverso le esperienze col moscerino si possono ripercorrere tappe fondamentali della storia della genetica come i famosi incroci che convinsero Morgan della validità dell'ipotesi di Sutton: i geni si trovano sui cromosomi. Un'altra attività molto formativa consiste nel far progettare ed eseguire test-crossing su mutanti.

#### 4. Danio rerio

Zebrafish è un piccolo pesce tropicale oggi molto utilizzato nella ricerca scientifica.

La caratteristica fondamentale di *Danio rerio*, è di presentare embrioni trasparenti che permettono l'osservazione, in un'aula scolastica, di tutte le fasi dell'embriogenesi di un vertebrato. Si possono facilmente distinguere le prime divisioni mitotiche dello zigote, la formazione dei foglietti embrionali, la comparsa dei metameri, i primi battiti del cuore e la formazione di tutti gli organi, dall'occhio allo sviluppo completo delle pinne.



Facilmente reperibile in qualsiasi negozio di acquariologia, economico, piccolo e resistente non necessitando di cure particolari, *Danio rerio* è un ottimo organismo per le esperienze didattiche.

La necessità di allestire, per il percorso didattico, due acquari (uno per la riproduzione e l'altro per l'allevamento degli avannotti), permette inoltre di affrontare fondamentali problematiche ambientali quali gli equilibri di un modello di ecosistema, i cicli della materia, le reti alimentari, i flussi di energia. Il Danio nel suo acquario è dunque un organismo modello in un ecosistema modello.

#### 5. Arabidopsis thaliana

L'*Arabidopsis thaliana* è una piccola pianta angiosperma a infiorescenza della famiglia delle Brassicaceae, famiglia a cui appartiene anche il cavolo. Infesta molti dei nostri giardini, non ha alcun valore commerciale e riesce a sopravvivere un po' ovunque sulla Terra. E' salita agli onori della cronaca da quando è stata utilizzata come organismo modello negli studi di genetica ed è oggi la pianta più studiata nel campo delle biotecnologie.

L'*Arabidopsis thaliana*, raggiunge in media i 12 cm di altezza, compie il ciclo vitale in 8 settimane e ha solo 5 cromosomi, deve la sua fortuna in genetica alla notevole disponibilità di mutanti e alla facilità nel divenire transgenica

Le ricerche sull'*Arabidopsis* sono essenziali per lo studio dei processi metabolici delle piante e della loro resistenza alle condizioni climatiche, agli insetti, alle malattie, alle sostanze chimiche.

*Arabidopsis* è stata la prima pianta che nel 2000 ha visto il suo genoma completamente sequenziato e col “Progetto 2010” si ha l'obiettivo di determinare la funzione di tutti i suoi geni e di tutte le sue proteine per crearne anche il primo modello virtuale, la prima versione digitale della storia.

In didattica si può utilizzare in esperimenti che confrontino i fenotipi di piante di *Arabidopsis Thaliana* selvatiche e mutanti le cui caratteristiche sono utilizzate per realizzare incroci e verificare sperimentalmente le leggi di Mendel.

## 6. Protocolli sperimentali con *Paracentrotus lividus*



### Materiale occorrente:

Pipette Pasteur, siringa, KCl 0.5 M, vetrini con pozzetto, vetrini coprioggetto, microscopio ottico e stereomicroscopio, eppendorf, piccolo acquario in vetro o in plastica con filtro oppure in sostituzione una vaschetta, sale marino, aeratore, una decina di esemplari di *Paracentrotus lividus*<sup>7</sup>,

### Attività didattiche

#### Attività 1: Induzione del rilascio dei gameti

Nel periodo di massima maturazione dei gameti, è possibile ottenere il rilascio dei gameti, semplicemente scuotendo più volte il riccio, se questa operazione non dovesse dare buoni risultati, si praticano una o più iniezioni di KCl per un totale di circa 1 ml nella, cavità celomatica del riccio, avendo cura di inserire l'ago della siringa ai lati della lanterna di Aristotele (polo orale), si agita leggermente l'animale e dopo poco è possibile osservare il colore dei gameti emessi. Il cloruro di potassio causa la contrazione dei muscoli delle gonadi con conseguente rilascio dei gameti.

Se sono rosa-arancio si tratta di uova che devono essere raccolte nel becker contenente circa 100 ml di acqua di mare quindi si capovolge il riccio (il polo anale deve essere rivolto verso il basso) sul becker stesso.

Se i gameti sono biancastri si tratta di spermatozoi che devono essere prelevati con una pipetta Pasteur e raccolti in una eppendorf che verrà riposta nel ghiaccio. Tale sperma “secco” e “non attivato” potrà essere conservato in frigo per alcuni giorni ad una temperatura di 4 gradi.

Una volta terminata l'emissione dei gameti, si possono porre i ricci in un acquario per fauna marina oppure in una vaschetta con aeratore sostituendo l'acqua tutti i giorni.

#### Attività 2: Osservazione dei gameti femminili

Le uova immerse nella soluzione di acqua marina tendono a depositarsi sul fondo, quindi si prelevano con una pipetta delle gocce di sospensione (le uova si riconoscono ad occhio nudo). Si dispongono in una piccola piastra Petri e si osservano le uova allo stereomicroscopio, in questo modo è possibile valutarne le dimensioni e la forma.

<sup>7</sup> Il *Paracentrotus lividus* è molto diffuso sulle nostre coste e si può reperire in pescheria o presso ristoranti

Si adagia poi qualche goccia della sospensione su un vetrino a pozzetto e con l'obiettivo 10x del microscopio ottico si possono notare la cortex con i granuli corticali ed il nucleo. Si possono riconoscere inoltre, grazie alla maggiore dimensione del nucleo, le uova immature (oocita primario) dalle uova mature pronte per la fecondazione.

### Attività 3: Fecondazione, osservazione dell'interazione uovo- spermatozoi

Si prepara la sospensione di sperma utile per la fecondazione diluendo una goccia di sperma con 1 ml circa di acqua marina (il colore deve essere appena lattescente). Tale sperma non potrà essere conservato, ma bisognerà utilizzarlo subito in quanto, nel tempo, diminuisce la capacità di fertilizzazione. Per il successo dell'esperienza si consiglia una bassa concentrazione di sperma, in questo modo si riduce la possibilità di polispermia.

Si agita la sospensione con le uova, in quanto queste tendono ad adagiarsi sul fondo del beker, se ne preleva qualche goccia con una pipetta e si adagia su un vetrino a pozzetto.

Si aggiunge quindi una goccia di sospensione di sperma alle gocce di sospensione di uova.

La fertilizzazione attiva immediatamente una serie di eventi dei quali il più significativo è il sollevamento della membrana di fertilizzazione. La durata della segmentazione ed in generale lo sviluppo embrionale dipende dalla temperatura dell'acqua. Per l'osservazione dei diversi stadi embrionali è necessario sostituire più volte la soluzione di acqua marina.

- Da 0 a 30 secondi dopo l'inseminazione gli spermatozoi si legano all'involucro vitellino
- Dopo 30 - 60 sec si osserva il sollevamento della membrana di fecondazione

## 7. Protocolli sperimentali con *Caenorhabditis elegans*



Uova

### Materiale occorrente:

Microscopio, e stereomicroscopio; capsule Petri con agar + E.coli + *C.elegans*<sup>8</sup> N2 (wild type); capsule Petri con agar + E.coli; capsule Petri con agar + E.coli + mutanti di *C.elegans* (dumpy, unc, blister, him); capsule Petri per gli incroci; ansa di platino o eventualmente ciglia; pipette da 1 ml

### Attività didattiche

Le piastre con i vermi vengono mantenute in frigorifero a 4°C. Riportati a temperatura ambiente (circa 20°C) riprendono la normale motilità.

E' possibile, a meno di contaminazioni di muffe, peraltro non frequenti, mantenere i vermi in una fase di "letargo" (dauer) per almeno due mesi. L'allevamento successivo richiede la disponibilità di piastre fresche con batteri ed il taglio con il "trasferimento" di un pezzettino di terreno di coltura+vermi in una nuova piastra di crescita.

### Attività 1: Osservazione di *C. elegans*

Sistemando le piastre Petri contenenti i piccoli nematodi sul tavolino portaoggetti dello stereomicroscopio, è possibile l'osservazione dell'adulto e dei quattro stadi larvali del ciclo vitale. Si passerà poi al riconoscimento del

<sup>8</sup> Il *C. elegans* è oggi disponibile solo negli Istituti di Ricerca, tuttavia un progetto europeo sta valutando la possibilità di renderlo disponibile per attività didattiche

dimorfismo sessuale, si potrà notare infatti la coda allungata dell'ermafrodita e la caratteristica coda a ventaglio del maschio, fondamentale accessorio per l'accoppiamento. Sempre allo stereomicroscopio si osserveranno la forma delle uova; le sottili e immobili larve della fase dauer; il particolare fenotipo dei mutanti e il diverso comportamento in presenza di differenti fattori quali: cibo, temperatura e luce. Usando un microscopio ottico, poiché *C.elegans* è trasparente, si potranno analizzare l'anatomia degli organi interni (bocca, faringe, intestino, gonadi, uova) e, davvero straordinario!... lo zigote, la prima mitosi dell'uovo e i diversi stadi dell'embriogenesi.

### Attività 2: Autofertilizzazione dell'ermafrodita e ripresa del ciclo vitale a partire dalla fase dauer

Nella prima esperienza, introdotto in una capsula Petri un solo adulto ermafrodita, si osserverà, dopo qualche giorno, lo sviluppo di una numerosa progenie; nella seconda esperienza, introdotti in una capsula Petri dei vermi nella fase larvale dauer, si potrà seguire la ripresa del ciclo vitale e lo sviluppo fino alla fase di adulto. E' necessario sterilizzare l'ansa di platino usata per il trasferimento dei vermi in quanto le piastre vengono facilmente contaminate dalle muffe.

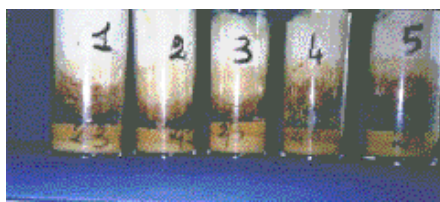
### Attività 3: Incroci di ermafroditi wild type x maschi ed incroci di mutanti ermafroditi x maschi

In una piastra Petri da incrocio si trasferiscono due ermafroditi e dieci maschi. Alla prima progenie, se l'incrocio sarà andato a buon fine, si noterà una popolazione costituita da individui che presenteranno fenotipi secondo le leggi mendeliane

## 8. Protocolli sperimentali con *Drosophila melanogaster*

### Materiale occorrente:

*Drosophila melanogaster*<sup>9</sup> selvatica, mutanti di *Drosophila melanogaster*, stereomicroscopio, contenitori di plastica con terreno di coltura, etere, eterizzatore (barattolo di vetro con tappo di sughero ricoperto di garza).



Provette con terreno di coltura e con drosophile



Barattolo di vetro con tappo di sughero ricoperto di garza (eterizzatore)

<sup>9</sup> Le *Drosophila* selvatiche e mutanti ed il terreno di coltura possono essere fornite da ditte specializzate. Chi fosse interessato può contattarci attraverso la redazione di Ulisse

Le *Drosophila* sono molto resistenti e vivono a temperatura ambiente tutto l'anno, tuttavia alcune attività potrebbero richiedere l'uso di una camera termostata.

## Attività didattiche

### Attività 1: Osservazione di *Drosophila melanogaster*

Le *Drosophila* vengono inserite nell'eterizzatore per pochi secondi, il tempo necessario per narcotizzarle; vengono quindi deposte su di un cartoncino ed osservate allo stereomicroscopio: si notano immediatamente i grandi occhi rossi e le ali lunghe e ben distese.

### Attività 2: Il dimorfismo sessuale in *Drosophila melanogaster*

I docenti sanno che la *Drosophila* presenta uno spiccato dimorfismo sessuale: la femmina è più grande del maschio ed ha l'addome più appuntito. Il maschio presenta una zona molto scura all'estremità del corpo e strutture simili a pettini sugli arti anteriori utilizzate per bloccare la femmina durante l'accoppiamento: tutto ciò non viene insegnato teoricamente ai ragazzi, ma essi vengono guidati attraverso un riconoscimento "spontaneo"

Gli alunni notano dapprima le molto evidenti differenze sopra elencate, quindi separano gli individui morfologicamente diversi e se poi allevano i due generi separatamente in pochi giorni sono in grado di associare al dimorfismo il genere in quanto solo nel contenitore delle femmine saranno presenti le larve

### Attività 3: Osservazione del ciclo vitale in *Drosophila melanogaster*

Si inseriscono in un contenitore 10 maschi e 10 femmine. Dopo la deposizione delle uova gli adulti vengono allontanati e nei giorni successivi è possibile seguire allo stereomicroscopio la metamorfosi dell'insetto.



Larva



Prepupa



Pupa

La durata della metamorfosi dipende dalla temperatura: a 25 gradi è di circa due settimane, mentre a 18 gradi è di quasi un mese: può essere molto interessante studiare la relazione temperatura-durata del ciclo vitale.

### Attività 4: Osservazione di mutanti di *Drosophila melanogaster*

Le *Drosophila* vengono inserite nell'eterizzatore per pochi secondi, il tempo necessario per narcotizzarle; vengono quindi deposte su di un cartoncino ed osservate allo stereomicroscopio per evidenziare le mutazioni

- Rispetto al colore degli occhi;
- Rispetto al colore del corpo ;
- Rispetto alla struttura delle ali

**Attività 5: Allestimento di incroci finalizzati alla verifica delle modalità di trasmissione dei caratteri ereditari legati ai cromosomi sessuali**

In una prima esperienza, gli studenti incrociano femmine mutanti yw (occhi bianchi e corpo giallo) e maschi selvatici con occhi rossi. Nella prima generazione F1 si ottengono tutti i maschi con occhi bianchi e corpo giallo e tutte le femmine con gli occhi rossi. Infatti il carattere occhi rossi è regolato da un gene dominante che si trova solo sul cromosoma X.

Per eseguire questa esperienza è necessario utilizzare femmine vergini<sup>10</sup> poiché la femmina ha una spermateca nella quale conserva tutti gli spermatozoi dei maschi con cui si accoppia. Le femmine vergini si distinguono in quanto hanno il corpo molto chiaro, strie di pigmentazione poco evidenti, addome piatto, assenza dell'area genitale esterna (che nel maschio vergine appare come una "rosellina" marrone).

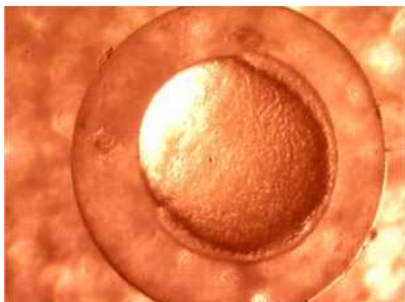
**Attività 6: Test-crossing**

Un'altra interessante esperienza consiste in un test crossing che prevede l'allestimento di incroci finalizzati a stabilire se il gene cy che specifica il carattere della mutazione ali arricciate è dominante o recessivo.

Gli studenti saranno guidati a formulare varie ipotesi e a verificarle.

- Prima ipotesi: ali arricciate è una mutazione conferita da un gene recessivo: incrociando *Drosophila* wt e *Drosophila* ali arricciate si otterranno nella prima generazione solo *Drosophila* dal fenotipo wt.
- Seconda ipotesi: ali arricciate è una mutazione conferita da un gene dominante, si hanno in questo caso due possibilità:
  1. Prima possibilità: gli individui ali arricciate a disposizione sono omozigoti per questa mutazione: incrociando *Drosophila* wt e *Drosophila* ali arricciate si otterranno nella prima generazione solo *Drosophila* dal fenotipo ali arricciate
  2. Seconda possibilità: gli individui ali arricciate a disposizione sono eterozigoti per questa mutazione: incrociando *Drosophila* wt e *Drosophila* ali arricciate si otterranno nella prima generazione una progenie formata per il 50% da *Drosophila* dal fenotipo ali arricciate e per il restante 50% da *Drosophila* dal fenotipo wt.

Attraverso l'osservazione della progenie risultante dagli incroci gli studenti arrivano alla conclusione che il carattere ali arricciate è dominante e che gli individui "ali arricciate" a disposizione sono eterozigoti per questa mutazione.



**9. Protocolli sperimentali con Danio rerio**

**Materiale occorrente:**

Un acquario fornito di: luce, timer, filtro, termostato; un acquario fornito di luce e termostato; un sifone per la pulizia dell'acquario; un termostato; un microscopio e uno stereomicroscopio per le osservazioni; due becker da 250 millilitri; mangime: scaglie, artemie, granulato 00 per gli embrioni; indicatori dei 5 parametri fondamentali (nitriti, nitrati, pH, GH, KH); fiale contenenti batteri nitrificanti non patogeni; vaschette per la deposizione delle uova; biglie di vetro; capsule Petri; pipette Pasteur di plastica; ricambi per il filtro; piante di Egeria densa o altre piante resistenti; sabbia e fertilizzante; acqua demineralizzata; un colino; un retino; vetrini a goccia (con

<sup>10</sup> Anche per eseguire questa esperienza è necessario utilizzare femmine vergini

uno o più pozzetti); 1 esemplare di *Danio rerio*<sup>11</sup> per ogni 1,5 litri di acqua (fare attenzione che tra questi ci sia un certo numero di femmine)

## Attività didattiche

### Attività 1: Studio delle caratteristiche ecologiche di *Danio rerio* e dell'ecosistema acquario

Quindici giorni prima di iniziare l'esperienza si allestiscono due acquari in modo che l'acqua "maturi":

- Il primo acquario, da 30 lt, per gli esemplari adulti che si dovranno riprodurre, deve essere completo di luce, termostato e filtro e simulare l'ambiente in cui vive il Danio. Deve contenere 1/3 di acqua dell'acquedotto, 2/3 di acqua demineralizzata e una fialetta di batteri non patogeni, nitrificanti che servono per realizzare una filtrazione biologica e la digestione dei rifiuti dell'acquario, infine deve essere regolato ad una temperatura di 28°C con luce dalle 8.00 alle 17.00.
- l'altro acquario, per l'accrescimento degli avannotti, è più piccolo privo di filtro, ma con termostato, luce, e piante

I due acquari vengono riempiti di acqua. Dopo 15 giorni, se le analisi dei parametri fondamentali dell'acqua lo permettono, si procede all'inserimento di 15 - 20 esemplari di Danio nel primo acquario. Intanto il secondo acquario si sarà arricchito di limnee e protozoi per la presenza delle piante e si sarà creato l'ambiente adatto ad accogliere gli avannotti.

I pesci vanno alimentati due volte al giorno e la vasca tenuta pulita, utilizzando, possibilmente tutti i giorni, il sifone per eliminare i residui del fondo ed una piccola quantità di acqua che va subito sostituita

### Attività 2: Osservazione e studio delle caratteristiche anatomiche del *Danio rerio*.

I ragazzi possono osservare le caratteristiche anatomiche e il dimorfismo sessuale degli zebrafish.

Un adulto di *Danio* raggiunge generalmente 4-5 cm di lunghezza, ha un corpo compresso lateralmente ed è caratterizzato da belle strisce longitudinali. La femmina è leggermente più grande del maschio da cui si distingue facilmente solo quando si riempie di uova e diventa più "tozza", con il ventre pieno, mentre il maschio rimane snello e longilineo.

### Attività 3: Il comportamento e la riproduzione

*Danio rerio* si riproduce alle prime luci dell'alba quando il maschio corteggia la femmina rincorrendola, solo così questa depone le uova che vengono immediatamente fecondate. Ma lo zebrafish si nutre anche delle sue uova; perciò per farli riprodurre bisogna usare una "vaschetta nido" nella quale non devono poter entrare mai gli adulti: deve essere chiusa lateralmente, la griglia superiore deve essere coperta da un velo o da una rete a maglie strette e su di esso vanno poste tante biglie colorate.

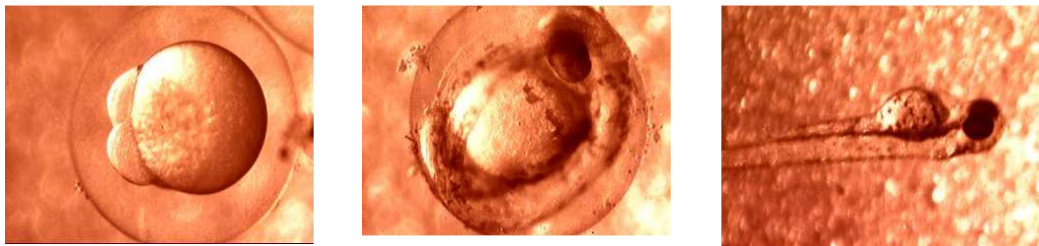


<sup>11</sup> Il *Danio rerio* (conosciuto anche come zebrafish ed ancora come *Brachydanio rerio* dagli acquariologi) si compra in qualsiasi negozio di acquariologia, è molto resistente e facile da allevare.

Il “nido” viene introdotto nell’acquario nel primo pomeriggio o in tarda mattinata e al mattino successivo si possono raccogliere gli embrioni. Le uova deposte vengono pulite cioè risciacquate utilizzando un simplice colino da tè e cambiando più volte l’acqua, sistemate in un becker con acqua minerale naturale e poste in una camera termostata a 28 gradi, dove rimarranno per una settimana. In questo periodo bisogna soltanto sostituire due dita di acqua ogni giorno. Dopo 8 giorni gli embrioni vengono inseriti nel secondo acquario dove si cibano dei parameci contenuti nell’acqua e di cibo granulato 00 oppure del cibo utilizzato per gli adulti preventivamente polverizzato.

#### Attività 4: Osservazione dell’embrione.

Gli embrioni vengono osservati appena raccolti cioè poco dopo l’avvenuta fecondazione dell’uovo, ed il più spesso possibile nei tre giorni immediatamente successivi. L’osservazione viene compiuta allo stereomicroscopio e/o al microscopio ottico usando i vetrini a pozzetto (quelli a due o più pozzetti sono utili per il confronto di diversi stadi embrionali). E’ facile immaginare quanto sia emozionante seguire nel giro di tre giorni, tutte le trasformazioni che portano dallo stadio di zigote, poi blastula e gastrula fino alla completa organogenesi, si assiste cioè dal “vivo” al rapido moltiplicarsi delle cellule di questo piccolo organismo tanto vicino a noi.



## 10. Protocolli sperimentali con Arabidopsis Thaliana



Con questa esperienza (che non si può eseguire a scuola ma in un laboratorio di un centro di ricerca) si può verificare che l’*Arabidopsis thaliana* selvatica che si indica con wt non è resistente alla kanamicina, mentre lo è l’*Arabidopsis thaliana* transgenica resistente alla kanamicina che si indica con KANR

Si può inoltre risalire agli incroci da cui sono state ottenute miscele di semi di *Arabidopsis* wt e KANR osservandone la germinazione e la crescita e applicando le leggi di Mendel.

## Fasi dell'esperienza

### 1. Sterilizzazione

Si sterilizzano i semi

### 2. Vernalizzazione

Si lasciano i semi al buio ed al freddo per sincronizzare le successive fasi di germinazione.

### 3. Semina

Con la pipetta Pasteur si dispongono:

in capsule Petri *senza Kanamicina*:

- i semi di *Arabidopsis thaliana* wt
- i semi di *Arabidopsis thaliana* KANR
- le miscele di semi

in capsule Petri *con Kanamicina*:

- i semi di *Arabidopsis thaliana* wt
- i semi di *Arabidopsis thaliana* KANR
- le miscele di semi

### 4. Osservazione

Si lasciano le piastre per 10 giorni alla luce e a temperatura ambiente.

Al decimo giorno sulle piastre senza kanamicina si osserva la germinazione di tutti i tipi di semi, mentre sulle piastre con Kanamicina la crescita delle sole piante transgeniche

Dalla conta dei semi mix germinati sulle piastre con Kanamicina, applicando le leggi di Mendel, si può risalire agli incroci da cui sono state ottenute le miscele.