

Il ciclo vitale e gli stadi larvali di ***C. elegans***

Obiettivo Osservare allo stereomicroscopio e al microscopio esemplari di *C. elegans* per riconoscere gli stadi larvali

Autore Assunta Croce, PhD



Materiali e reagenti

- Piastre di *C. elegans* N2 (wild type)
- Vetrini porta oggetto
- Vetrini copri oggetto
- Acqua deionizzata
- Pipetta Pasteur
- Pennarello indelebile



Strumenti

- Stereomicroscopio
- Microscopio ottico
- Pick



Sicurezza

- Camice



Tempo

10 minuti per la preparazione dei vetrini
30 minuti per l'osservazione di piastre e vetrini



Procedimento

1. Con una pipetta Pasteur trasferire una goccia di acqua al centro di un vetrino porta oggetto, marcato precedentemente con la dicitura “N2 adulto”.
2. Posizionare una piastra di vermi sotto lo stereomicroscopio e individuare un esemplare adulto. Con il pick trasferire l'esemplare dalla piastra alla goccia d'acqua. Procedere in questo modo e trasferire altri 2-3 esemplari nella stessa goccia. Coprire con un vetrino copri oggetto e osservare al microscopio ottico. I vermi in acqua tenderanno a nuotare ma dopo un po' i movimenti rallentano e questo permette una migliore osservazione del preparato. Per la preparazione del pick si rimanda al protocollo “Rinnovo delle colture di *C. elegans*: picking e chunking”.
3. Procedere in questo modo con esemplari di altri stadi di sviluppo, utilizzando la tabella sottostante come riferimento per individuarli e riconoscerli in piastra.

STADIO LARVALE	TRATTI DISTINTIVI
Stadio embrionale (uova)	Ben visibili in piastra come elementi tondi un po' allungati. Al massimo ingrandimento allo stereomicroscopio, quando si trova alla fine dello stadio embrionale, è possibile distinguere chiaramente un verme che si muove nelle uova che stanno per schiudersi.
L1-L2	Primi due stadi larvali; i vermi sono molto piccoli, non è possibile distinguere in modo apprezzabile delle strutture nel corpo dell'esemplare. Identificabile il capo (più arrotondato) rispetto alla coda (più appuntita).
L3	Terzo stadio larvale; i vermi sono più grandi, allungati, si riconosce chiaramente la faringe nel terzo anteriore del corpo del verme come struttura chiara e pulsante. Nel resto del corpo è riconoscibile l'intestino, come porzione più scura rispetto alla faringe.
L4	Quarto stadio larvale, precede lo stadio adulto; i vermi sono più grandi, si riconosce chiaramente in posizione ventrale a metà del corpo la presenza di quella che sarà la vulva (struttura più chiara dell'intestino a forma di mezzaluna).

Adulto ermafrodita	Sono gli individui più grandi in piastra; intestino molto scuro, la vulva non è più chiaramente visibile poiché le gonadi sono occupate dalla presenza delle uova, che completano le prime divisioni embrionali nel corpo dell'ermafrodita. Faringe molto visibile, come organo pulsante che risucchia e tritura i batteri ingeriti dall'animale. La coda è allungata e prima della punta in posizione ventrale è visibile l'ano. Strisciando sulla piastra, l'ermafrodita adulto lascia delle tracce ben visibili sui batteri.
Adulto maschio	Sono più piccoli rispetto all'ermafrodita adulto e presenti in proporzione ridotta nella popolazione (circa 1 maschio ogni 1000 esemplari). La percentuale dei maschi aumenta in situazioni di stress, come l'aumento della temperatura di crescita. Si distinguono dall'ermafrodita per la coda che è a ventaglio e possiede 9 raggi, visibili solo al microscopio ottico ad alto ingrandimento, utilizzati durante l'accoppiamento.
Larva dauer	Si tratta di una forma di resistenza, capace di vivere in assenza di cibo anche per 6 mesi. Si può trovare nelle piastre quando il substrato nutritivo (batteri <i>E. coli</i>) è stato esaurito e la coltura non è stata rinnovata da tempo. Spesso immobile, con la faringe non pulsante, si riconosce perché è molto sottile, risultato di un processo di riassorbimento dei tessuti interni.

Risorse online

Riferimenti bibliografici per comprendere l'utilizzo di questo sistema modello e la sua anatomia:

- *Introduzione a C.elegans*
http://www.wormbook.org/chapters/www_celegansintro/celegansintro.html
- *Anatomia di esemplari ermafroditi*
<https://www.wormatlas.org/hermaphrodite/introduction/Introframeset.html>
- *Anatomia di esemplari maschi*
<https://www.wormatlas.org/male/malehomepage.htm>