



Rapporti

ISTISAN

13/27



Linea guida del test dei micronuclei
in *Vicia faba* per la valutazione di effetti
mutageni in acque dolci e sedimenti



ISSN 1123-3117

A cura di B. Gustavino,
S. Cacioli e L. Mancini

www.iss.it

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Linea guida del test dei micronuclei in *Vicia faba*
per la valutazione di effetti mutageni
in acque dolci e sedimenti**

A cura di
Bianca Gustavino (a), Silvana Caciolli (b) e Laura Mancini (b)

(a) Dipartimento di Biologia, Università degli Studi "Tor Vergata", Roma

*(b) Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria,
Istituto Superiore di Sanità, Roma*

ISSN 1123-3117

Rapporti ISTISAN

13/27

Istituto Superiore di Sanità

Linea guida del test dei micronuclei in *Vicia faba* per la valutazione di effetti mutageni in acque dolci e sedimenti.

A cura di Bianca Gustavino, Silvana Caciolli e Laura Mancini

2013, ii, 32 p. Rapporti ISTISAN 13/27

Nella presente linea guida viene descritto un metodica standardizzata per l'esecuzione del test dei Micronuclei (MN-test) in apici radicali di *Vicia faba*, uno dei test maggiormente impiegati per lo studio degli effetti mutageni di ambienti di acque dolci poiché considerato tra i più sensibili e affidabili. La linea guida contiene: la metodologia per la germinazione e la crescita delle radici dai semi di *Vicia faba*, su cui eseguire il test; la metodologia per l'allestimento dei preparati cellulari da apici radicali per l'analisi microscopica; i criteri e le modalità di esposizione alle matrici ambientali da sottoporre al test; i criteri per l'identificazione dei micronuclei e per l'analisi della loro frequenza; altri parametri citogenetici utili per una corretta interpretazione dei risultati del test e del loro significato biologico/ambientale. L'impiego di questo test è altresì collegata alla riduzione dell'uso di test su animali, che lo rende particolarmente adatto per attività di monitoraggio in ambienti inquinati. Pertanto le procedure, i materiali utilizzati e le parti esplicative sulla pianificazione sperimentale forniscono un utile supporto per la formazione di tecnici specializzati per queste ricerche.

Parole chiave: Micronuclei; *Vicia faba*; Eco-genotossicologia; Mutagenesi ambientale; Acqua; Sedimenti

Istituto Superiore di Sanità

Guideline of the micronucleus test in *Vicia faba* for the evaluation of mutagens in freshwaters and sediments.

Edited by Bianca Gustavino, Silvana Caciolli and Laura Mancini

2013, ii, 32 p. Rapporti ISTISAN 13/27 (in Italian)

In the present guideline a standardized method is described for the execution of the MicroNucleus test (MN-test) in *Vicia faba* root tip cells, which represents one of the most performed test for the detection of mutagenic effects in freshwater environments, due to its high sensitivity and reliability. This guideline contains: the methodology for germination and root growth from *Vicia faba* seeds; the methodology for cell preparation and for microscopic analysis; basic criteria for an appropriate exposure of roots to the environmental matrices to be tested; the criteria for micronucleus identification and analysis of their frequency; other cytogenetic parameters for a correct interpretation of results and their biological/environmental significance. The use of this test is also linked to the reduction in the use of animal testing which makes it particularly suitable for monitoring of polluted environments. Therefore, the procedures, the materials and the explanatory texts on the experimental planning, provide a useful support for the training of technicians engaged for these investigations.

Key words: Micronucleus; *Vicia faba*; Eco-genotoxicology; Environmental mutagenesis; Water; Sediments

Autori del rapporto sono:

Bianca Gustavino (*Dipartimento di Biologia, II Università degli Studi "Tor Vergata", Roma*)

Silvana Caciolli, Camilla Puccinelli, Stefania Marcheggiani, Laura Mancini (*Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma*)

Owczarek Malgorzata (*Arpa Lazio, Rieti*)

Per informazioni su questo documento scrivere a: silvana.caciolli@iss.it

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: www.iss.it.

Citare questo documento come segue:

Gustavino B, Caciolli S, Mancini L (Ed.). *Linea guida del test dei micronuclei in Vicia faba per la valutazione di effetti mutageni in acque dolci e sedimenti*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2013. (Rapporti ISTISAN 13/27).

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità e Direttore responsabile: *Fabrizio Oleari*

Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988 (serie: *Rapporti e congressi ISTISAN*)

Redazione: *Paola De Castro e Sandra Salinetti*

La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.



INDICE

Introduzione	1
Test dei micronuclei in mutagenesi ambientale	4
Micronuclei come <i>end-point</i> di mutagenesi.....	4
Progettazione del test	7
Modalità di esposizione	7
Tempi di fissaggio	7
Controlli.....	9
Controllo negativo.....	9
Controllo positivo	10
Metodologia per l'esecuzione del test	11
Allestimento della coltura idroponica	12
Germinazione e sviluppo delle radici primarie	12
Sviluppo delle radici secondarie	14
Esposizione delle radici alla matrice ambientale	15
Fissaggio delle radici secondarie	16
Colorazione delle radici secondarie.....	17
Preparazione dei vetrini	17
Allestimento	17
Montaggio permanente.....	18
Codifica.....	18
Analisi al microscopio	19
Osservazione dei preparati.....	19
Analisi dell'indice mitotico	20
Analisi della frequenza dei micronuclei.....	21
Analisi statistica	23
Protocollo per il test dei micronuclei	24
Scopo	24
Principio.....	24
Reagenti, materiali e apparecchiature	24
Reagenti	25
Materiali e apparecchiature	25
Metodologia.....	26
Allestimento della coltura idroponica	26
Sviluppo delle radici primarie.....	26
Sviluppo delle radici secondarie	26

Esposizione alla matrice.....	27
Tempi di esposizione	27
Fissaggio.....	27
Controllo negativo.....	28
Controllo positivo	28
Colorazione	28
Fase preliminare.....	28
Reidratazione	28
Preparazione dei vetrini.....	29
Montaggio dei vetrini (preparato permanente).....	29
Codifica dei vetrini.....	29
Analisi microscopica	30
Bibliografia.....	31

INTRODUZIONE

La maggior parte dei composti organici e inorganici provenienti da residui di prodotti industriali e dai loro rifiuti, dall'attività agricola, dall'allevamento, scaricati in corsi d'acqua o rilasciati sul suolo possono penetrare e diffondersi nel terreno, causando la contaminazione di suoli e di acque superficiali e sotterranee.

L'immissione di tali agenti, soprattutto se persistenti nell'ambiente, può costituire una fonte di rischio per la salute di tutti gli organismi (compreso l'uomo) che si trovano esposti in modo continuativo agli effetti che essi, direttamente o attraverso il metabolismo, possono esercitare a livello di cellule, tessuti e organismi.

La valutazione del rischio derivante dall'interazione tra organismi e agenti contaminanti (xenobiotici) ha l'obiettivo di identificare molecole o miscele capaci di esercitare effetti nocivi che in particolare possono essere distinti in due principali categorie: effetti tossici ed effetti mutageni.

Gli effetti tossici sono generalmente associati all'esposizione a concentrazioni relativamente alte di xenobiotici: a livello di cellule proliferanti possono inibire la progressione del ciclo cellulare e la mitosi, mentre livelli superiori di tossicità possono indurre letalità cellulare, compromettere la funzionalità di organo o di tessuto o causare la morte dell'organismo (Brusick, 1987).

In condizioni di esposizione cronica, concentrazioni relativamente basse possono indurre effetti sugli individui delle popolazioni esposte tale da indurre la loro idoneità biologica, innescando processi selettivi che portano alla riduzione della variabilità genetica delle popolazioni stesse. Più in generale quindi, questi effetti possono determinare l'alterazione della struttura della comunità biotica. Infine, gli effetti tossici spesso si manifestano in un tempo relativamente breve dopo l'esposizione (Brusick, 1987).

Alcuni agenti tossici possono esercitare anche un effetto mutageno: in tal caso questo si manifesta solo a concentrazioni inferiori a quelle tossiche a causa del prevalere di effetti citotossici o letali indotti da queste ultime.

Un esempio di quanto descritto è mostrato in Figura 1, in cui la curva continua rappresenta gli effetti tossici (letali) indotti da concentrazioni crescenti di un agente, espressi come riduzione delle cellule sopravvivenenti, mentre la linea tratteggiata indica la frequenza percentuale di cellule mutanti indotte, in funzione delle stesse concentrazioni: nella parte iniziale della curva, al di sotto della Dose Letale al 50% (DL_{50}), si osserva la manifestazione degli effetti mutageni, che aumentano con la dose e raggiungono un massimo in corrispondenza di concentrazioni che ancora non inducono elevata tossicità.

L'effetto mutageno, se presente, si manifesta all'interno di questo intervallo (area in grigio), mentre l'aumentata frazione di cellule uccise dalle concentrazioni superiori non permette la manifestazione dell'eventuale danno mutageno subito, perché sovrastato dall'effetto di inibizione della proliferazione, o di letalità (Brusick, 1987).

Per quanto riguarda gli effetti negativi sulla salute di individui e popolazioni, l'esposizione ambientale a tali agenti non causa cambiamenti immediatamente 'visibili' (es. l'insorgenza di patologie funzionali), ma è responsabile dei cosiddetti 'effetti tardivi', quali la trasformazione neoplastica, l'aumento del rischio di sviluppo del cancro nell'individuo e la riduzione del tempo di vita degli organismi.

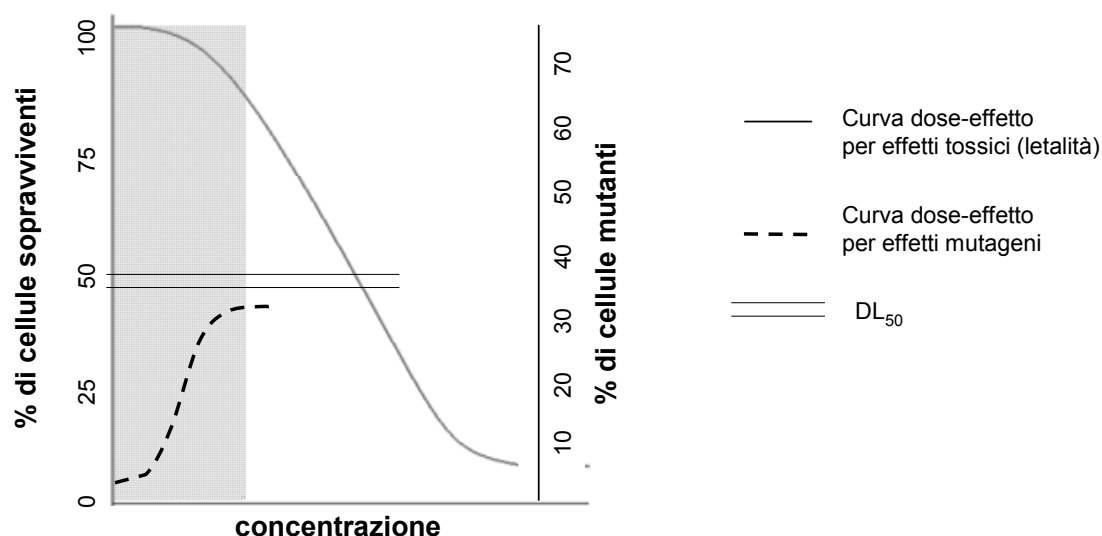


Figura 1. Esempificazione degli effetti tossici (% di cellule sopravvivenenti) e mutageni (% di cellule mutanti) indotti da concentrazioni crescenti di un ipotetico agente tossico e mutageno in un sistema cellulare esposto

Mentre fino a pochi anni fa i risultati di ricerche sugli effetti mutageni a livello germinale portavano ad escludere un ruolo importante nell'insorgenza di cambiamenti nel pool dei gameti, studi recenti condotti su animali e sull'uomo dimostrano che il potenziale mutageno di inquinanti presenti nell'aria può causare danni al DNA di cellule germinali maschili e mutazioni (Somers, 2011).

Da questi ed altri risultati è stata quindi riconsiderata l'ipotesi che anche la linea germinale possa essere coinvolta nel rischio genetico conseguente ad esposizione a mutageni ambientali (Demarini, 2012), ponendo quindi un serio allarme per l'uomo e per l'intero ecosistema, in quanto l'aumento di mutazioni nella linea germinale può causare sia malattie genetiche che cambiamenti nella composizione genetica a livello di popolazioni (Yauk *et al.*, 2008).

Il rilevamento del potenziale genotossico di contaminanti introdotti nell'ambiente, cioè la capacità di indurre alterazioni alla molecola di DNA (o danno primario) e di quello mutageno (di indurre mutazioni) rappresentano un importante strumento per la tutela della salute umana, soprattutto a causa della diretta correlazione tra mutazioni somatiche acquisite e lo sviluppo del cancro. Infatti la conversione del danno primario in mutazione, attraverso la replicazione del DNA e/o i processi di riparazione, possono scatenare gli eventi iniziali della trasformazione neoplastica, che rappresenta il principale pericolo per l'esposizione umana ad ambienti inquinati da mutageni, in particolare in ambienti urbani ed extra-urbani fortemente influenzati dall'attività dell'uomo.

È importante sottolineare che l'identificazione del potenziale genotossico di uno xenobiotico rivela la sua capacità di produrre alterazioni alla macromolecola di DNA, ma non fornisce informazioni sul risultato finale dei diversi processi che seguono, responsabili della

trasformazione del danno al DNA in mutazione. Infatti, a differenza dei test di genotossicità*, i test di mutagenesi misurano l'effettivo potenziale mutageno di un agente negli organismi esposti.

Nella presente linea guida viene quindi proposto l'utilizzo del test dei micronuclei come test di mutagenesi, per valutare il potenziale mutageno di contaminanti presenti in corpi d'acqua inquinati.

* Viene chiamato genotossico l'effetto immediato che risulta dall'interazione di un determinato agente con il DNA: esso consiste nella produzione di un'alterazione strutturale del DNA (lesione pre-mutazionale), cioè un danno 'primario', potenzialmente mutageno. Volendo confrontare idealmente il numero di lesioni al DNA (danno primario) con il numero di mutazioni effettivamente indotte da un agente, risulterebbe un valore elevato delle prime rispetto a quello delle seconde. Queste infatti rappresentano il risultato finale del processo mutazionale e, a causa dell'intervento dei sistemi di riparazione del danno indotto al DNA, l'intero processo porterà alla produzione di una certa quantità di mutazioni che varierà in funzione del tipo di lesioni indotte e dell'efficienza dei processi per la loro rimozione.

TEST DEI MICRONUCLEI IN MUTAGENESI AMBIENTALE

Il test dei micronuclei (*MicroNucleus test*, MN-test) è considerato uno dei metodi più idonei per identificare la risposta integrata all'esposizione ad una miscela complessa di contaminanti perché rappresenta un indice del danno genetico accumulato complessivamente durante la vita di un organismo esposto. Esso è in grado di misurare gli effetti mutageni che risultano dall'interazione degli inquinanti presenti in un ambiente a cui gli organismi sono esposti, rilevandone sia gli effetti clastogeni, cioè che producono rotture alla doppia elica di DNA, sia quelli aneugeni, che inducono mal-distribuzione cromosomica e aneuploidia (White & Claxton, 2004; Ohe *et al.*, 2004).

Questo test è largamente impiegato sia come test a breve termine nell'uomo, sia per il rilevamento del potenziale mutageno di inquinanti presenti nell'aria, nell'acqua e nel suolo, in programmi di monitoraggio ambientale.

Grazie alla sua elevata sensibilità e affidabilità questo test viene eseguito in cellule e tessuti di un gran numero di specie, selvatiche e non, sia acquatiche (tritoni, policheti, molluschi, pesci) che terrestri, sia animali che vegetali (Bolognesi & Hayashi, 2011).

La sua applicazione in sistemi vegetali, particolarmente indicata per la rilevazione di mutageni presenti nelle acque e nel suolo (Beraud *et al.*, 2007; El Hajjouji *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2007; Yi *et al.*, 2010) permette l'analisi di matrici ambientali grezze, evitando processi di purificazione e concentrazione (White & Claxton, 2004).

Tra i sistemi vegetali *Vicia faba*, *Allium cepa* e *Tradescantia* sp. sono le specie più utilizzate in mutagenesi ambientale, in particolare per l'esecuzione del MN-test (Foltête *et al.*, 2011; Feretti *et al.*, 2012).

Nel presente rapporto viene presentato una linea guida per l'esecuzione del MN-test in apici radicali di *Vicia faba*; per la sua sensibilità ed affidabilità tale sistema di saggio rappresenta uno dei metodi maggiormente impiegati negli studi di genotossicità degli ambienti acquatici, limitando altresì l'uso di test su animali. Infine il suo basso costo e la semplicità di esecuzione lo rendono particolarmente adatto per il monitoraggio di ambienti inquinati.

In questo testo verranno descritti:

- la metodologia per l'allestimento dei preparati citologici di cellule di apici radicali di *Vicia faba* su cui eseguire l'analisi microscopica;
- i criteri e le modalità di esposizione alle matrici ambientali da esaminare;
- i criteri per l'identificazione e lo studio della frequenza dei micronuclei;
- altri parametri citologici e citogenetici per una corretta interpretazione dei risultati del test e del loro significato biologico/ambientale.

La parte metodologica sarà preceduta da una breve introduzione sul significato biologico dei micronuclei, come espressione degli effetti mutageni.

Micronuclei come *end-point* di mutagenesi

I micronuclei si presentano come piccoli nuclei accanto al nucleo principale in cellule in interfase (Figura 2) e la loro comparsa è legata alla formazione di frammenti cromosomici o alla

perdita di interi cromosomi durante la divisione cellulare (mitotica o meiotica). Essi originano sia dalla perdita di frammenti cromosomici, a causa della mancanza del centromero (Figura 2a), sia dalla perdita di interi cromosomi, dovuta a danni funzionali indotti al fuso mitotico o all'inibizione delle funzioni di altre strutture, tra cui l'interazione tra il centromero-cinetocoro e le fibre del fuso mitotico, coinvolte nel processo di segregazione (Figura 2b). Una volta indotti, sia il frammento che il cromosoma perso, non legandosi alle fibre del fuso risultano esclusi dal processo di segregazione.

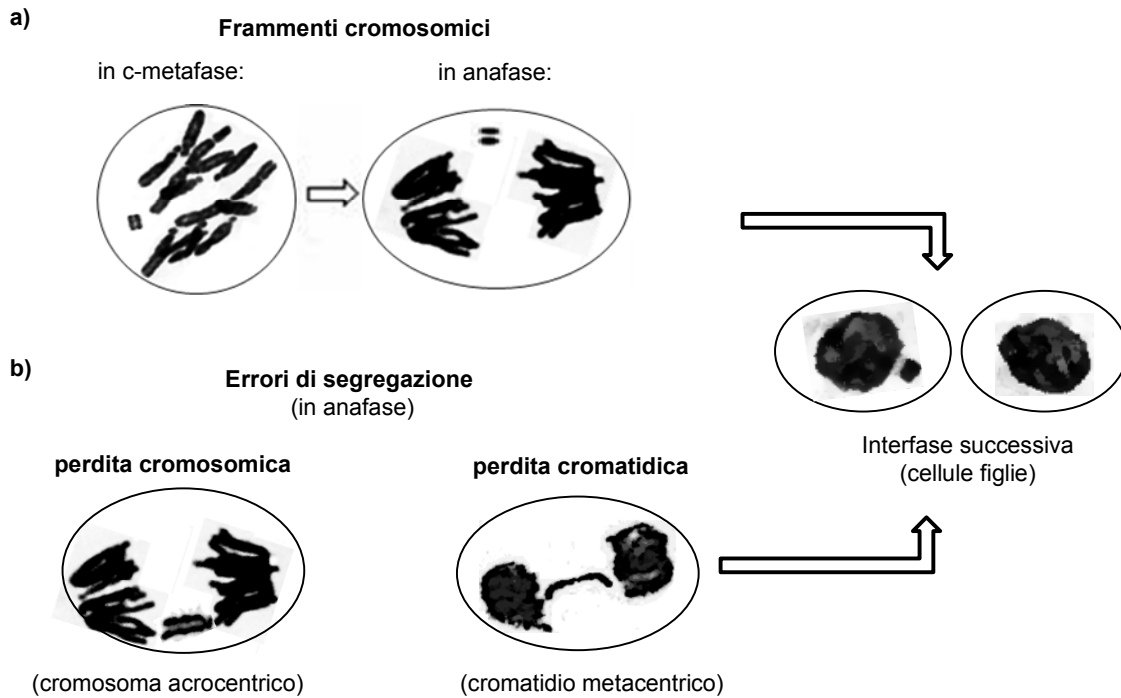


Figura 2. Schema del meccanismo di formazione di micronuclei indotti da agenti mutageni: (a) ad effetto clastogeno che producono frammenti cromosomici; o (b) ad effetto mitoclastico che determinano errori di segregazione in anafase, con la manifestazione di eventi di perdita di interi cromosomi o di cromatidi

Durante l'anafase questi elementi di cromatina vengono quindi distribuiti in modo casuale, rimanendo delocalizzati e distanti da ciascuno dei poli. Dalla telofase in poi saranno avvolti da una propria membrana nucleare, dando luogo alla formazione di un piccolo nucleo, il micronucleo, che apparirà all'interno del citoplasma, accanto al nucleo principale di una delle due cellule figlie.

La scelta di utilizzare i micronuclei come *end-point* di mutagenesi è legata proprio al vantaggio che essi offrono, poiché consentono l'identificazione di effetti mutageni sia di tipo clastogeno che mitoclastico.

Dal momento della loro comparsa, che si verifica alla/e prima/e generazione/i cellulare/i dopo un'esposizione acuta al mutageno, in cui la frequenza dei micronuclei raggiunge il valore massimo, essa tenderà a diminuire con il passare del tempo per effetto di una progressiva diluizione attraverso le generazioni, poiché ad ognuna di esse dimezza il numero di cellule che li

ereditano (Figure 3 e 4). Oltre a questo processo, un'ulteriore riduzione della loro frequenza può essere determinata da meccanismi di eliminazione delle cellule micronucleate (per incompatibilità con la sopravvivenza cellulare dovuta agli effetti genetici della mutazione) o dalla possibilità che i cromosomi all'interno dei micronuclei vengano reintegrati nel nucleo principale durante la/e mitosi successiva/e (Rizzoni *et al.*, 1989; Gustavino, 2006).

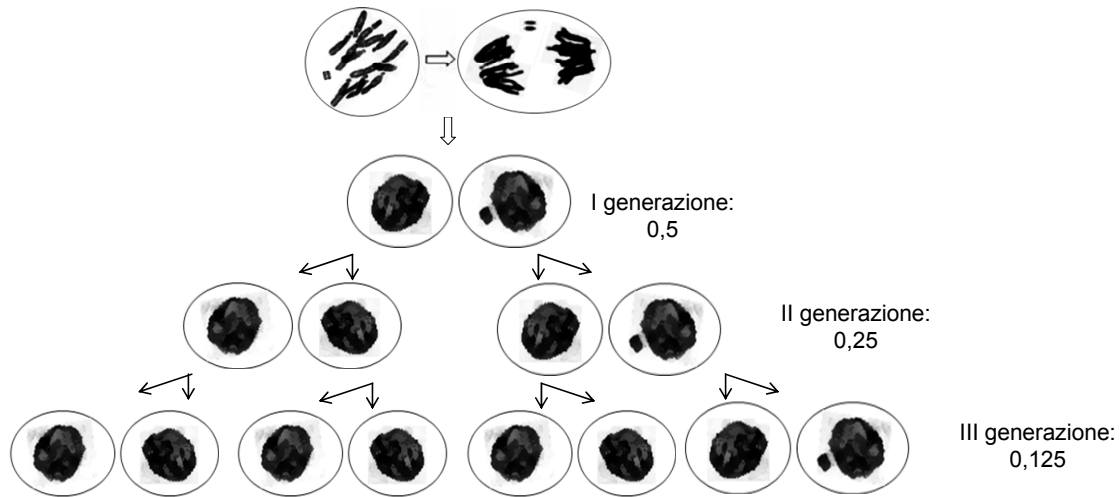


Figura 3. Insorgenza di un micronucleo, a partire dalla formazione di un frammento cromosomico rilevato in mitosi (delezione), presente in una delle due cellule figlie prodotte dalla prima divisione mitotica (la sua frequenza iniziale viene dimezzata ad ogni ciclo di divisione cellulare successivo, risultando 1/4 nella popolazione di II generazione, e 1/8 in quella di III generazione)

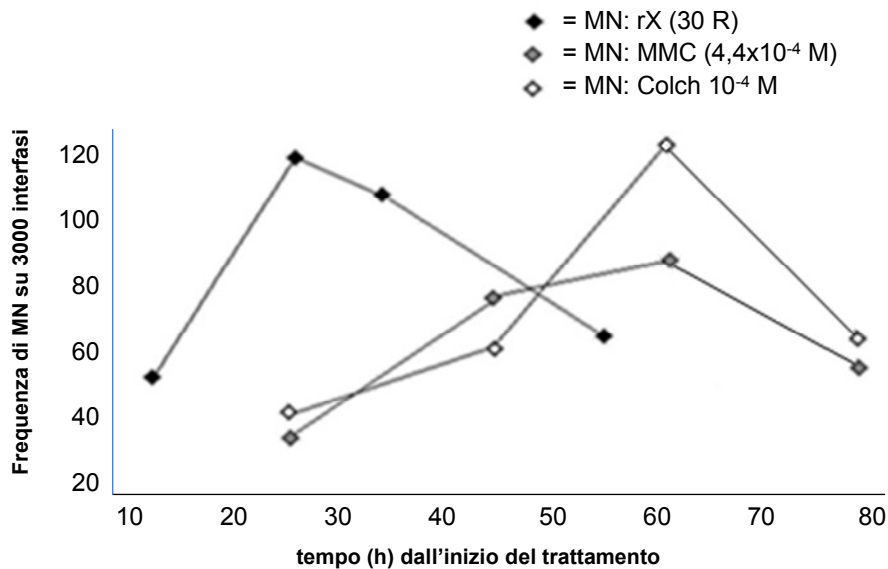


Figura 4. Frequenze di micronuclei in apici radicali di *Vicia faba* dopo intervalli di tempo crescenti dall'esposizione ad agenti mutageni che differiscono per meccanismo d'azione: raggi X (agente clastogeno diretto, rX); mitomicina C (agente clastogeno indiretto ad effetto S-dipendente, MMC); colchicina (agente mitoclastico, Colch)

PROGETTAZIONE DEL TEST

Modalità di esposizione

La durata del tempo di esposizione all'agente di cui si intende studiare l'effetto mutageno può influenzare notevolmente la risposta del sistema cellulare, in particolare rispetto all'induzione di micronuclei; si possono infatti verificare due situazioni opposte:

- 1) *Trattamento breve*: l'esposizione per un tempo molto breve può essere già efficace nell'indurre frammentazione cromosomica e manifestare immediatamente l'aumento della frequenza di micronuclei, mentre tempi di esposizione più prolungata possono determinare l'arresto della proliferazione e/o la morte del tessuto: un esempio può essere rappresentato da esposizioni a radiazioni ionizzanti, come i raggi X (*vedi* Figura 4 e Figura 5a).
- 2) *Trattamento terminale*: un trattamento prolungato nel tempo che mima un'esposizione cronica (o 'terminale', cioè fino al momento dell'osservazione), può determinare un effetto mutageno lieve e risultare compatibile con la sopravvivenza e la proliferazione cellulare; in seguito ad esposizione prolungata gli effetti mutageni saranno esercitati in modo continuativo e la formazione di micronuclei, dopo un iniziale aumento, sarà costante. Un esempio può essere rappresentato da esposizioni a concentrazioni molto basse di agenti mutageni sia clastogeni che mitoclastici (*vedi* Figura 4 e Figura 5b).

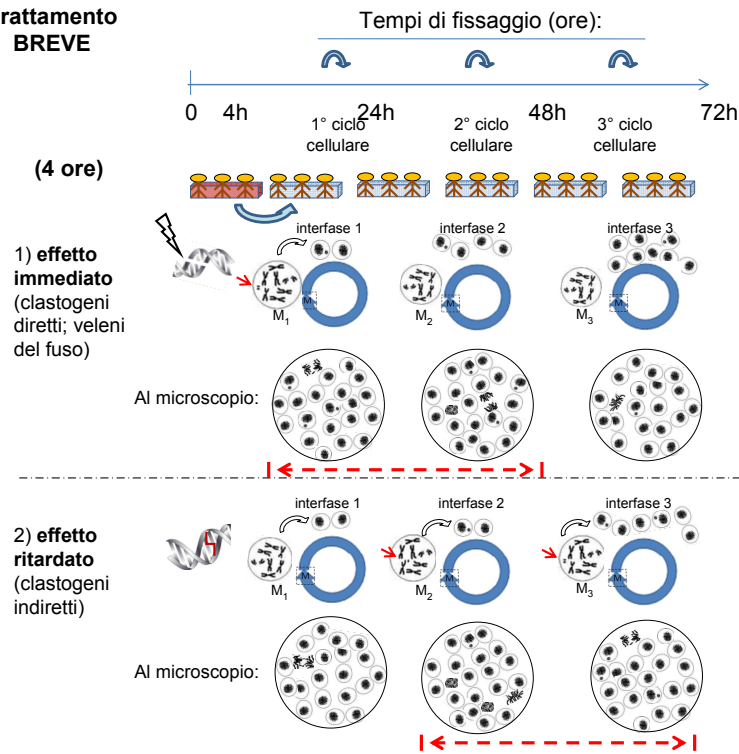
Quindi l'adozione di un protocollo che preveda due diverse modalità di esposizione, una di breve durata ed una prolungata, o terminale, permette di recuperare l'eventuale perdita di informazioni sugli effetti mutageni di un agente, dovute a possibili effetti citotossici indotti da esposizioni prolungate che, riducendo la produzione di micronuclei, determinerebbe una sottostima della loro frequenza ed una valutazione errata degli effetti mutageni osservati.

In base a tali considerazioni, nei casi più comuni in cui si intenda studiare il potenziale mutageno di matrici ambientali, si può fare riferimento ad un trattamento di 4 ore per l'esposizione di breve durata, seguito da un lavaggio delle radichette e dei semi e dal loro ricollocamento nella soluzione di coltura idroponica, in acqua di fonte o soluzione di Hoagland, fino ai tempi di fissaggio stabiliti (tempo di recupero). Per l'esposizione 'terminale' i semi vengono invece mantenuti a contatto con l'agente fino all'ultimo tempo di fissaggio (Figura 6).

Tempi di fissaggio

La durata dell'intervallo di tempo che intercorre tra l'inizio dell'esposizione del sistema biologico ad un agente contaminante e la comparsa di micronuclei nelle sue cellule proliferanti (eventualmente indotti dal suo effetto mutageno) è determinato principalmente dalla durata del loro ciclo cellulare e dalla fase del ciclo cellulare in cui esse si trovano al momento dell'esposizione. In *Vicia faba* questo corrisponde, per le cellule proliferanti degli apici radicali, a circa 22 ore; questo implica che in tale sistema cellulare dall'inizio dell'esposizione devono trascorrere almeno 22 ore affinché un agente mutageno possa manifestare il suo massimo effetto attraverso la comparsa di micronuclei (punto massimo della curva: *vedi* Figura 4). Un esempio di questo tipo è rappresentato da agenti ad effetto clastogeno diretto (es. radiazioni ionizzanti), che inducono immediatamente frammentazione cromosomica e la frequenza dei micronuclei raggiunge già il suo valore massimo all'interfase successiva, cioè dopo le prime 22-26 ore dall'esposizione (Figura 5a).

a) Trattamento BREVE



b) Trattamento TERMINALE

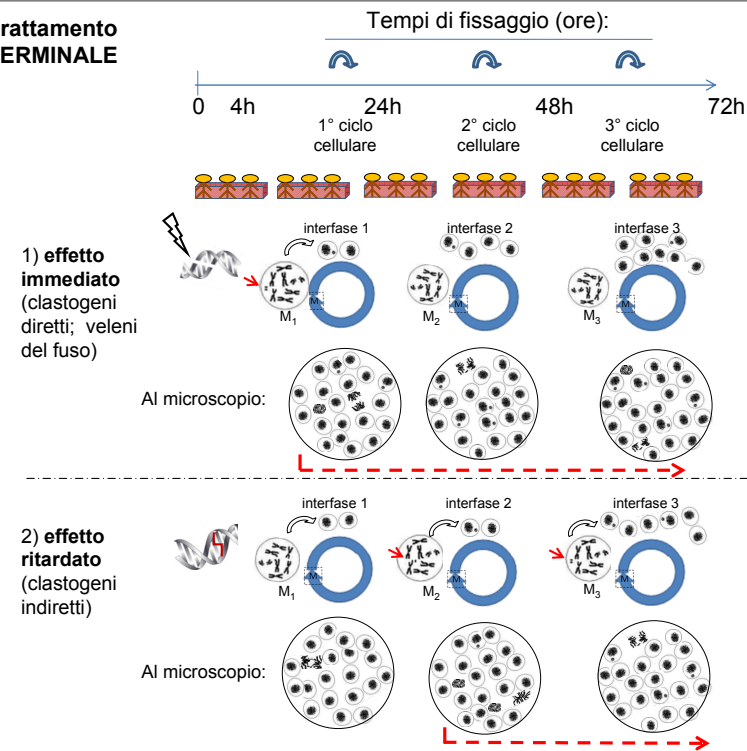


Figura 5. Tempi di comparsa delle aberrazioni cromosomiche (nelle cellule in mitosi) e dei micronuclei (nelle cellule in interfase) in relazione a durata del trattamento: breve (a) e terminale (b) e al suo possibile effetto mutageno diretto o indiretto

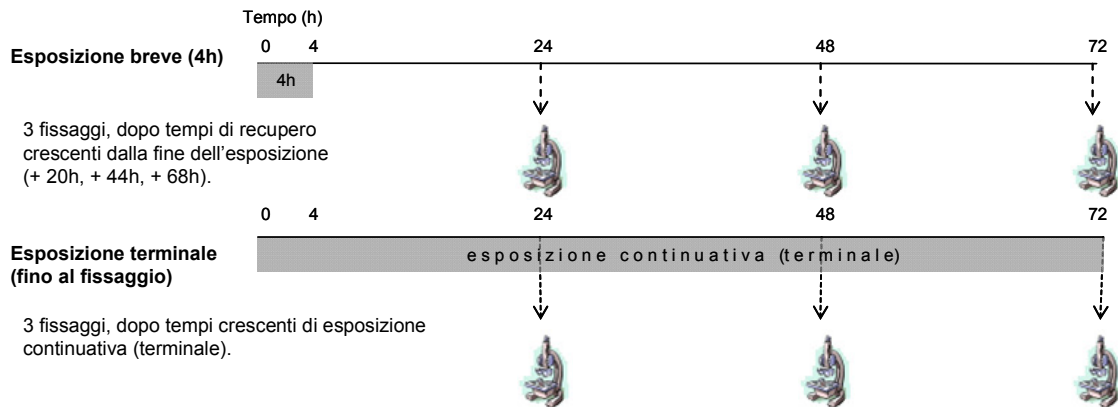


Figura 6. *Vicia faba*: schema dell'impianto sperimentale per l'MN-test: sono indicate due modalità di esposizione all'agente mutageno (breve e terminale) e i tempi di fissaggio delle radici per l'analisi al microscopio della frequenza dei micronuclei

Altri agenti, a seconda del loro meccanismo d'azione, possono invece indurre effetti mutageni con effetto ritardato e, dal momento della loro comparsa, i micronuclei possono quindi raggiungere la loro massima frequenza entro un ulteriore ciclo cellulare, cioè dopo almeno 48 ore dall'inizio dell'esposizione (vedi Figura 5a). Dopo questo tempo la loro frequenza comincia a diminuire, prevalentemente per un effetto di diluizione: questo può comportare una riduzione pari al dimezzamento della loro frequenza ad ogni ciclo cellulare attraversato dopo l'esposizione al mutageno (vedi Figura 3-5).

Risulta quindi comprensibile che l'assenza di induzione di micronuclei rilevata ad un solo intervallo di tempo dopo un trattamento non è sufficiente ad escludere il suo potenziale mutageno, ma è necessario eseguire osservazioni a tempi di fissaggio crescenti, per essere in grado di rilevare gli effetti di agenti mutageni a diverso meccanismo d'azione. Per queste ragioni è quindi utile adottare un protocollo che preveda almeno 2 tempi di fissaggio nell'arco delle prime 66-72 ore successive all'inizio del trattamento (corrispondenti ai primi 2-3 cicli cellulari), il primo intorno a 24-44 ore e il secondo a 66-72 ore, eventualmente inserendo un tempo intermedio, a 48 ore (vedi Figure 5 e 6).

Controlli

Controllo negativo

Come è noto, nella progettazione di qualsiasi saggio è necessario avere un punto di riferimento che rappresenti il "rumore di fondo" (bianco) del sistema e misurarne l'entità: questo è il controllo negativo. Tra i punti sperimentali, quindi, deve essere inserito un ulteriore punto in cui il sistema biologico utilizzato non è sottoposto ad alcun tipo di trattamento. Nell'esecuzione di un test di mutagenesi, come l'MN-test, lo scopo consiste nel misurare la frequenza spontanea degli eventi mutazionali che, nel caso specifico, è rappresentata dalla frequenza spontanea dei micronuclei.

Per il gruppo di piantine da utilizzare come controllo negativo le radici secondarie saranno esposte alla sola soluzione usata per la coltura idroponica (acqua di fonte, soluzione di Hoagland) fino ai tempi di fissaggio stabiliti dalla linea guida.

Controllo positivo

Allo scopo di dimostrare l'effettiva sensibilità del sistema biologico agli effetti mutageni, nella pianificazione del test si inserisce un ulteriore punto sperimentale rappresentato dal controllo positivo. A tale scopo, un gruppo di piantine viene sottoposto a trattamento con un agente mutageno forte il cui effetto sia ben documentato dalla letteratura; tra questi possono essere utilizzate radiazioni ionizzanti (es. raggi X) o altri mutageni chimici.

Come agente mutageno di riferimento da utilizzare per il gruppo di piantine del controllo positivo, viene impiegato l'Idrazide Maleica (*Maleic Hydrazide*, MH), un composto il cui effetto è altamente mutageno nei vegetali. Il trattamento con questo agente viene effettuato esponendo le radici ad una concentrazione di 10^{-4} M, per 4 ore, seguito da un tempo di recupero di 44 e/o 68 ore, in acqua di fonte (o soluzione di Hoagland).

METODOLOGIA PER L'ESECUZIONE DEL TEST

L'esecuzione del test dei micronuclei che viene proposta, si riferisce alla valutazione di matrici ambientali tal quali. Questo tipo di esposizione, sebbene rappresenti la condizione ideale, non sempre è percorribile, soprattutto in situazioni in cui si manifestino effetti tossici più o meno intensi. In questi casi si rende necessario sottoporre i campioni a test preliminari di tossicità e, sulla base dei risultati ottenuti, definire le diluizioni opportune per l'esecuzione dei test di mutagenesi.

Per una valutazione dell'esistenza di effetti tossici esercitati dall'esposizione ad un agente in piantine di *Vicia faba* possono essere utilizzati come parametri di riferimento l'Indice di Germinazione (IG) e la Lunghezza della Radice Primaria (LRP).

Questi parametri sono ottenuti attraverso la stima della frequenza di semi germinati in presenza dell'agente da saggiare e della lunghezza media delle radici primarie delle piantine (Figura 7) sviluppate dopo un determinato intervallo di tempo dall'inizio della germinazione in presenza della matrice, cioè a partire dal momento della semina, e prelevate dopo un intervallo di tempo (4 giorni o più), stabilito in base al protocollo sperimentale (De Marco *et al.*, 2005).

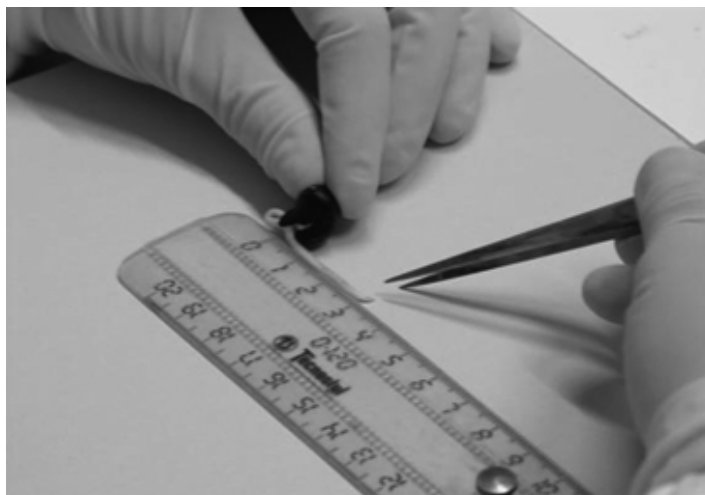


Figura 7. Misurazione della lunghezza della radice primaria di *Vicia faba*

La relazione che unisce questi parametri per determinare l'IG è la seguente:

$$IG \% = \frac{G_S * LRP_S}{G_C * LRP_C} * 100$$

dove:

G_S è il numero di semi germinati nel campione;

G_C è il numero di semi germinati nel controllo;

LRP_S è la lunghezza della radice primaria del campione;

LRP_C è la lunghezza della radice primaria del controllo.

Il test dei micronuclei può essere condotto sugli apici sia di radici primarie che secondarie: i dati presenti nella letteratura scientifica dimostrano la stessa sensibilità ed affidabilità del test in entrambi i casi (Ma *et al.*, 1995; Rizzoni *et al.*, 1995). Il vantaggio dell'utilizzo degli apici secondari è dato dalla maggior resa quantitativa di radici che si ottengono per ciascun punto sperimentale (in media 4-5 radici secondarie /seme), e dalla loro migliore maneggiabilità nella preparazione dei vetrini, soprattutto durante lo schiacciamento, poiché gli apici primari possono risultare più resistenti rispetto agli apici secondari. Infine, nell'elaborazione statistica dei dati, l'uso degli apici secondari offre la possibilità di stimare anche il contributo della variabilità tra apici dello stesso seme (variabilità intra-individuale) oltre a quella inter-individuale (tra semi diversi), qualora si volessero considerare anche questi fattori.

Allestimento della coltura idroponica

Per l'esecuzione di questo test viene utilizzata la specie *Vicia faba*, varietà minor (Figura 8). Le piantine vengono preparate per l'esposizione alla matrice da saggiare partendo dalla fase di germinazione dei semi secchi, mantenuti in un ambiente fresco e asciutto, al riparo dalla luce; per una resa di germinazione ottimale, i semi possono essere utilizzati entro un tempo di conservazione preferibilmente non superiore ad un anno. Questa fase di preparazione può avere una durata variabile, compresa tra 10 e 14 giorni, principalmente in funzione del tempo di conservazione dei semi utilizzati.



Figura 8. *Vicia faba*: differenti varietà di semi secchi

Germinazione e sviluppo delle radici primarie

In condizioni di buona conservazione, i semi secchi, commercialmente disponibili presso vivai o rivenditori di prodotti agrari, possono essere direttamente impiegati per la reidratazione, immergendoli in acqua di rubinetto per circa 24 ore e mantenuti a temperatura ambiente. In situazioni nelle quali si sospetta la presenza di spore e muffe sul tegumento, può rendersi

cautelativo un trattamento disinfettante, che può essere realizzato mantenendo i semi immersi in una soluzione commerciale di ipoclorito di sodio diluita (vedi “Protocollo per il test dei micronuclei”). Dopo la reidratazione i semi vengono risciacquati abbondantemente e adagiati sopra su un supporto di materiale poroso e assorbente (es. uno strato di argilla espansa) precedentemente imbibito di acqua corrente e ricoperto fino alla superficie (Figura 9), avendo cura di mantenere i semi sulla superficie e non immersi nell’acqua, per evitare che marciscano, e distanziati tra loro (circa 1 cm).



Figura 9. *Vicia faba*: semi reidratati adagiati sopra uno strato di argilla espansa ricoperta di acqua (inizio germinazione)

Successivamente i semi vengono posti in un armadio termostato e umidificato, possibilmente ventilato, alla temperatura di $+20 (\pm 1^\circ\text{C})$, per un intervallo di tempo sufficiente allo sviluppo della radice primaria, fino a raggiungere una lunghezza di 1-2 cm (Figura 10); il tempo necessario per questa fase può variare tra 4 e 7 giorni. Durante la germinazione è necessario mantenere costante la quantità di acqua nelle vaschette, per evitare l’essiccamento dei semi e delle radichette. In alternativa all’argilla espansa possono essere utilizzati altri materiali, come cotone idrofilo, carta bibula, sabbia, purché privi di sostanze quali metalli pesanti o altre che possano indurre effetti tossici o genotossici.



Figura 10. *Vicia faba*: lunghezza ottimale delle radici primarie su cui praticare il taglio (il punto è indicato dalla lancetta)

Sviluppo delle radici secondarie

Allo scopo di favorire lo sviluppo delle radici secondarie, quando le radici primarie hanno raggiunto una lunghezza di almeno 1 cm, si procede ad eliminarne la parte apicale, rimuovendone gli ultimi 4-5 mm; allo stesso tempo vengono rimossi i tegumenti dei semi e, se presente, anche la parte aerea della piantina (Figura 11).



Figura 11. *Vicia faba*: radici primarie su cui praticare il taglio (il punto è indicato dalla lancetta) (oltre a taglio della radice primaria viene rimosso anche il tegumento del seme)

A questo punto i monconi delle radici primarie vengono immersi in acqua, adagiando i semi sopra un supporto rigido (ad esempio una reticella di plastica, una griglia d'acciaio inox, o altro materiale non ossidabile e che non rilasci sostanze nell'acqua) in modo che i cotiledoni siano sopra il livello dell'acqua e risultino immersi solo i monconi delle radici (Figura 12a e 12b).



a



b

Figura 12. *Vicia faba*: germinazione delle radici secondarie: piantine poste su un supporto rigido, con le radici immerse in acqua (a); monconi delle radici primarie immersi nell'acqua, con i semi (cotiledoni) mantenuti al di sopra (b)

Le piantine così preparate vanno nuovamente poste in armadio termostato per ulteriori 4-7 giorni, nelle stesse condizioni di temperatura, umidità e ventilazione, fino al raggiungimento di una lunghezza delle radici secondarie di circa 2 cm (Figura 13).

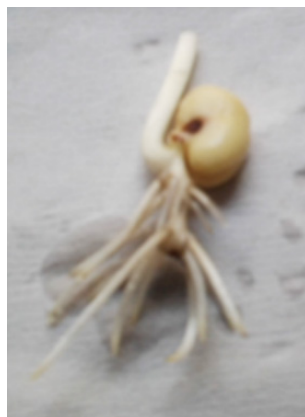


Figura 13. *Vicia faba*: radici secondarie pronte per l'esposizione (la loro lunghezza media è di circa 1 cm)

È importante evitare un allungamento eccessivo delle radici secondarie, affinché sia mantenuto il normale tasso di proliferazione del tessuto durante l'esposizione: se troppo lunghe, gli apici radicali rallentano la loro crescita, compromettendo seriamente l'esito del test.

In assenza di particolari esigenze sperimentali, per lo sviluppo delle radici secondarie si utilizza acqua di fonte (rubinetto). In alternativa, in casi in cui la presenza di disinfettanti nell'acqua potabile di rubinetto costituisca un possibile fattore di disturbo nella sperimentazione, si possono utilizzare soluzioni standard per colture idroponiche, tra cui la soluzione di Hoagland*, oppure acque minerali commerciali in bottiglia.

Esposizione delle radici alla matrice ambientale

In questo passaggio è necessario immergere nella matrice da saggiare l'intero apparato radicale sviluppato da ogni piantina; per fare questo si può trasferire direttamente il supporto rigido contenente i semi con le radichette secondarie in una nuova vaschetta contenente la matrice, in modo che i semi risultino adagiati sulla superficie della matrice mentre le radici secondarie siano ben immerse in essa (Figura 14).

Questa operazione può richiedere molta cautela in caso di esposizione a sedimenti, a causa del rischio di spezzare le radichette durante l'operazione. Se le matrici erano state congelate dopo il prelievo, queste devono essere precedentemente scongelate e portate alla temperatura di circa 20°C prima di immergervi le radichette. Le vaschette così preparate vengono poste alla temperatura di 20°C, nelle stesse condizioni utilizzate per la germinazione. Terminato il periodo di esposizione si procede al fissaggio degli apici.

* Sono attualmente disponibili diverse formulazioni di tale soluzione, che variano soprattutto per contenuto in microelementi in relazione a specificità e richieste fisiologiche delle diverse piante. Per questo si rimanda alla consultazione della letteratura specifica.



Figura 14. *Vicia faba*: piantine durante l'esposizione delle radici secondarie a matrici ambientali di un corso d'acqua: matrice acquosa (a); sedimento (b)

Fissaggio delle radici secondarie

Trascorsi i tempi di esposizione, le piantine vengono estratte dalle vaschette e sciacquate; le radici secondarie vengono recise e messe in fissativo (una soluzione di etanolo ed acido acetico in rapporto di 3:1) per almeno 30 minuti. Passato questo tempo la soluzione di fissativo deve essere sostituita con una nuova. A questo punto le radici possono essere conservate a +4°C fino al momento della colorazione, dopo aver ricoperto con del parafilm ciascun contenitore (Figura 15).

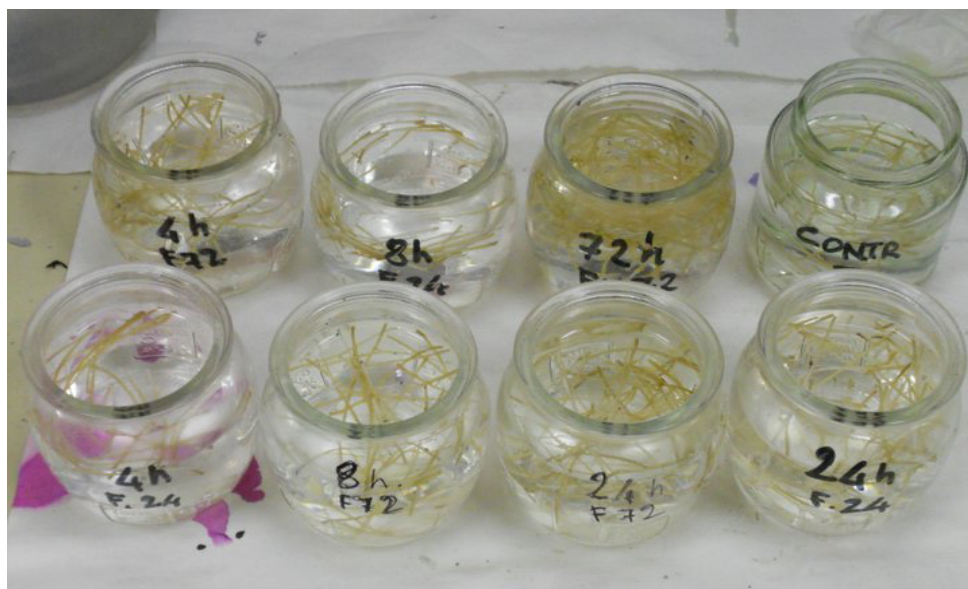


Figura 15. *Vicia faba*: radici secondarie tagliate e immerse in fissativo

Colorazione delle radici secondarie

Tra le diverse metodologie il metodo Feulgen è di gran lunga preferibile, data la sua specificità per il DNA ed il rapporto quantitativo diretto tra l'intensità della colorazione e la cromatina, mentre è sconsigliabile utilizzare la comune colorazione Giemsa che, a causa dell'aspecificità del colorante, può causare errori di valutazione dei micronuclei (falsi positivi).

Le radichette fissate devono essere reidratate, trasferendole dal fissativo in acqua di rubinetto e immerse in una soluzione di HCl 1N per una idrolisi acida. Le radici vengono poi immerse nel reattivo di Schiff, mantenendole per almeno 45 minuti al buio.

Preparazione dei vetrini

Allestimento

Le radici vengono prelevate dal reattivo di Schiff e adagiate su un vetrino portaoggetti precedentemente pulito e sgrassato; ad ognuna viene recisa la parte apicale, contenente le cellule proliferanti e ben distinguibile per la sua colorazione molto intensa di un rosso fucsia, eliminando la parte rimanente. Per evitare l'essiccamento dell'apice durante la deposizione di altri apici sullo stesso vetrino, su ciascuno di essi viene posta una goccia di acido acetico al 45%. Si possono mettere 6-8 apici su un vetrino, ben distanziati tra loro. Dopo aver appoggiato un vetrino copri oggetto, è necessario eliminare l'eccesso di acido acetico, premendo delicatamente con le dita un lembo di carta bibula sul preparato e facendo attenzione a non spostare il vetrino copri oggetto. Si procede, quindi, con lo schiacciamento degli apici, che viene eseguito esercitando una leggera pressione con le dita sul vetrino copri oggetto in corrispondenza di ciascun apice e successivamente picchiettando delicatamente, al fine di ottenere un unico strato di cellule, necessario per una buona osservazione al microscopio. Completati gli schiacciamenti, i vetrini possono essere conservati a -20°C fino al montaggio permanente dei vetrini (Figura 16).

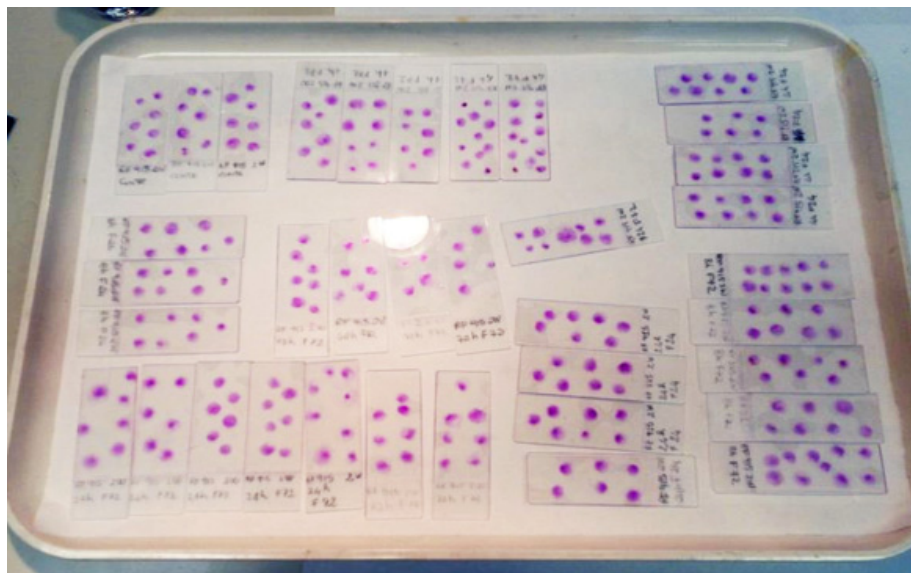


Figura 16. Vetrini di preparati permanenti di apici radicali secondari di *Vicia faba* colorati con metodo Feulgen

Montaggio permanente

In questa fase i vetrini sono ancora montati temporaneamente con il coprioggetto usato per lo schiacciamento, e il preparato cellulare si trova ancora in mezzo acquoso. È necessario ora rimuoverlo, senza perdere le cellule che comunque aderiscono sulle superfici di entrambi i vetrini, per poi sostituirlo con un nuovo vetrino, che sarà montato in modo permanente, con montante per preparati istologici. Per questo si portano i vetrini ad una temperatura $\leq -20^{\circ}\text{C}$ e, raggiunta la temperatura, viene eliminato il vetrino copri oggetto utilizzando la lama di un bisturi per farlo saltare via in modo rapido (Figura 17). Per questa fase finale è comodo utilizzare l'azoto liquido, altrimenti si può usare il ghiaccio secco (CO_2).

Una volta asciugato all'aria, si procede al montaggio permanente del vetrino, utilizzando un montante per preparati istologici e un copri oggetto nuovo.

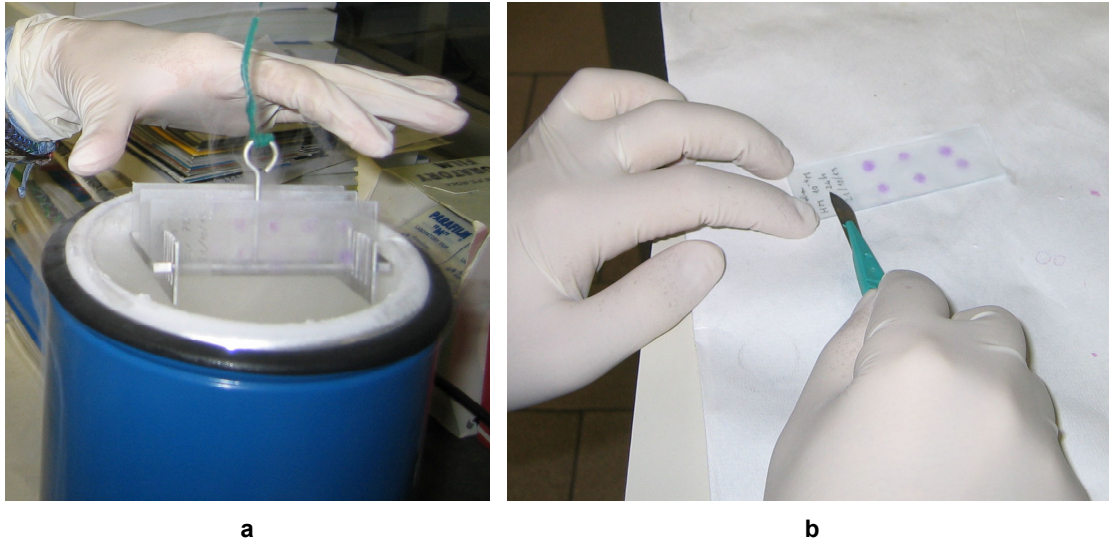


Figura 17. Immersione del preparato in azoto liquido (a) e salto del vetrino coprioggetto (b)

Codifica

Per una corretta esecuzione del test è buona norma rendere 'neutra' la lettura dei vetrini da parte dell'operatore, in modo che non sia influenzato dalla conoscenza del tipo di trattamento durante l'osservazione al microscopio. Per questo si procede alla siglatura dei vetrini scegliendo un codice arbitrario, diverso da quello utilizzato per l'identificazione dei diversi punti sperimentali. Questa operazione deve essere svolta da una persona non coinvolta nell'esperimento.

ANALISI AL MICROSCOPIO

Osservazione dei preparati

Prima di iniziare l'analisi della frequenza dei micronuclei è necessaria una valutazione della qualità dei preparati per poi procedere con una verifica sullo stato proliferativo degli apici in esame. In questa fase si utilizza l'obiettivo ad ingrandimento più basso, che permette anche di ridurre la possibilità di operare una involontaria selezione – dovuta all'eventuale presenza di micronuclei – nella scelta dei campi da esaminare per la successiva analisi dei micronuclei; questa parte preliminare dell'osservazione è mirata a verificare:

- 1) la buona colorazione delle cellule, in cui devono risultare colorati con un intenso rosso fucsia solo i nuclei e la cromatina;
- 2) la buona dispersione delle cellule del tessuto ottenuta mediante lo schiacciamento degli apici: le cellule non devono risultare sovrapposte, almeno nei campi che verranno utilizzati per l'analisi dell'indice mitotico e dei micronuclei;
- 3) la presenza di un abbondante numero di mitosi in ogni campo che verranno esaminati per il conteggio dei micronuclei (Figura 18).

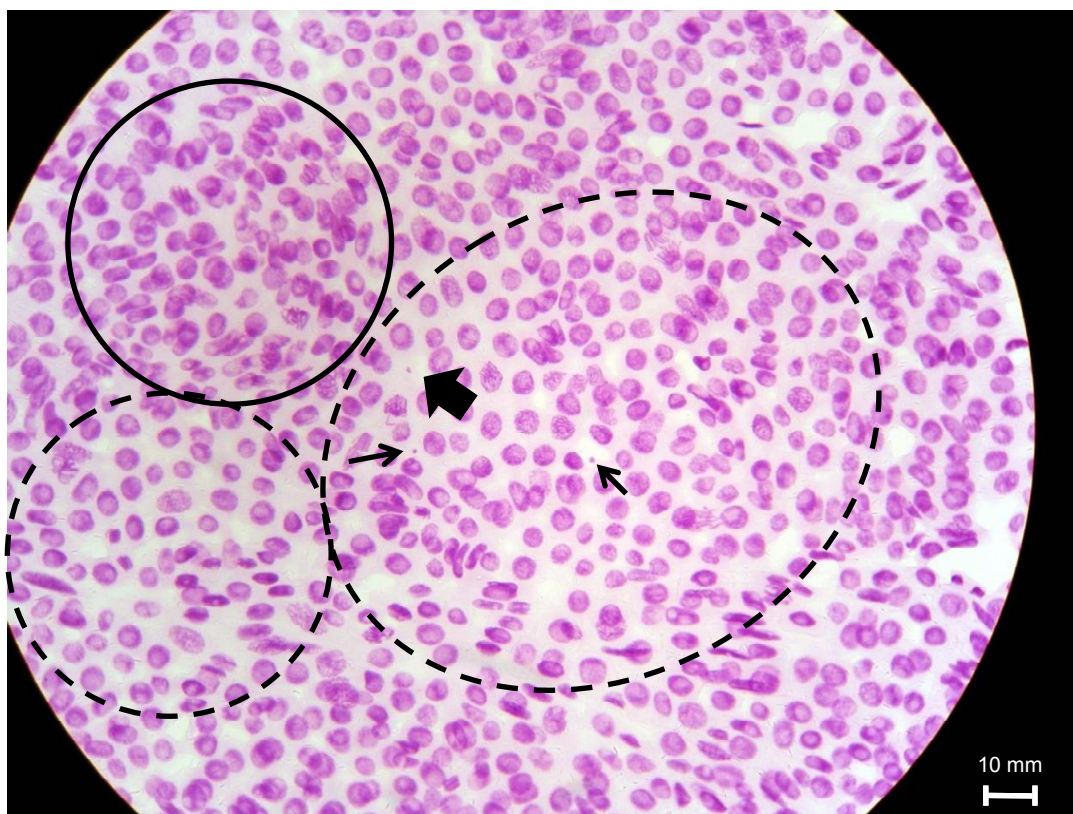


Figura 18. *Vicia faba*: Aree adatte per l'analisi (linea tratteggiata), e un'area meno adatta a causa dell'elevato grado di sovrapposizione tra le cellule (linea continua); sono presenti anche alcune cellule micronucleate (freccie piccole) e un micronucleo che non risulta associato ad alcuna cellula (freccia grande)

Tenendo conto di questi requisiti, per ciascun apice si identifica l'area dello schiacciamento in cui si procederà per l'analisi microscopica dell'indice mitotico e della frequenza dei micronuclei, per la quale si utilizza un obiettivo ad ingrandimento maggiore, generalmente 400 X.

Poiché per una corretta esecuzione del test l'osservazione deve essere eseguita nella parte maggiormente proliferante del tessuto, è necessario ottenere una stima preliminare dell'indice mitotico, utile a documentare lo stato proliferativo delle cellule esaminate.

Analisi dell'indice mitotico

La stima di questo parametro risulta essere di fondamentale importanza nell'MN-test in quanto lo stato proliferativo delle cellule esaminate influenza la frequenza dei micronuclei presenti: infatti, se l'analisi venisse effettuata in popolazioni di cellule non proliferanti, il risultato ottenuto sarebbe negativo poiché, anche nel caso in cui il trattamento fosse altamente mutageno, non si osserverebbe la comparsa di micronuclei a causa della mancanza di divisioni cellulari.

Questo test quindi – oltre a fornire la necessaria informazione sull'idoneità del tessuto riguardo al mantenimento dell'attività proliferativa (o la sua inibizione, eventualmente indotta dal trattamento) necessaria per l'analisi della frequenza dei micronuclei – può permettere di valutare, anche se in modo indicativo, eventuali effetti sulla fase mitotica (allungamento o riduzione), a causa di possibili alterazioni della progressione della mitosi indotte dall'esposizione alla matrice, come nel caso di un effetto di tipo c-mitotico in cui risulterebbe anche alterato il rapporto tra il numero di anafasi e il numero totale di mitosi.

La stima dell'indice mitotico viene eseguita sulle stesse popolazioni cellulari di ciascun apice su cui si eseguirà anche l'analisi della frequenza dei micronuclei.

Il valore dell'indice mitotico va stimato su un campione di almeno 1000 cellule per apice ed è dato dal rapporto numerico tra cellule in fase mitotica e il totale delle cellule esaminate (numero di mitosi/numero totale di cellule, cioè di interfasi + mitosi).

Poiché per alcune fasi della mitosi non è sempre facile distinguere un confine netto tra la fase precedente e quella successiva (in particolare per la profasi i cui confini con l'interfase e la pro-metafase sono molto sfumati), è utile adottare un criterio per rendere il più agevole ed uniforme possibile il limite per 'accettare' come mitosi le diverse figure mitotiche. Per questo spesso si sceglie di considerare come figure mitotiche solo metafasi e anafasi (precoci e tardive), eventualmente includendo anche le pro-metafasi.

Questa restrizione permette infatti di evitare all'osservatore l'interpretazione delle figure mitotiche più 'ambigue' (profasi precoci e tardive, telofasi e precoci tardive), minimizzando così la variabilità tra valori ottenuti da più osservatori eventualmente coinvolti nell'analisi al microscopio.

L'esclusione delle figure mitotiche suddette (profasi e telofasi) per l'analisi di questo parametro non limita la possibilità di ricavare le informazioni sopra citate riguardo la progressione della fase mitotica.

Un esempio pratico è mostrato in Figura 19, che riporta un piccolo campo di cellule proliferanti di un apice radicale di *Vicia faba*, in cui si possono contare 34 cellule totali (comprese quelle nei cerchi tratteggiati): tra queste si distinguono 6 profasi, 1 metafase e 2 anafasi. Il valore dell'indice mitotico sarà pari a 3/34, se le profasi vengono escluse, oppure pari a 9/34 se esse vengono escluse.

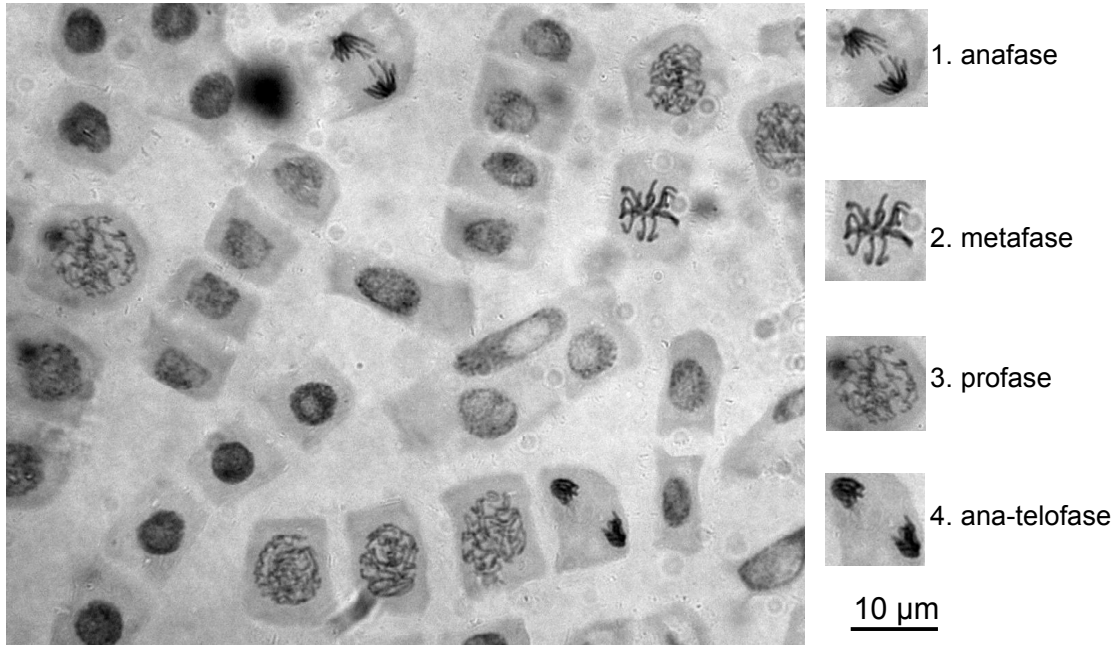


Figura 19. *Vicia faba*: particolare di un campo di cellule proliferanti di un apice di radice secondaria al microscopio ottico (ingrandimento 400X): sono indicati esempi delle diverse figure per la stima dell'indice mitotico (colorazione Feulgen)

Analisi della frequenza dei micronuclei

Al microscopio, i micronuclei appaiono come dei piccoli nuclei presenti nel compartimento citoplasmatico accanto al nucleo principale, di dimensione variabile, il cui diametro non sia superiore a circa 1/3 di quello del nucleo principale (Figura 20).

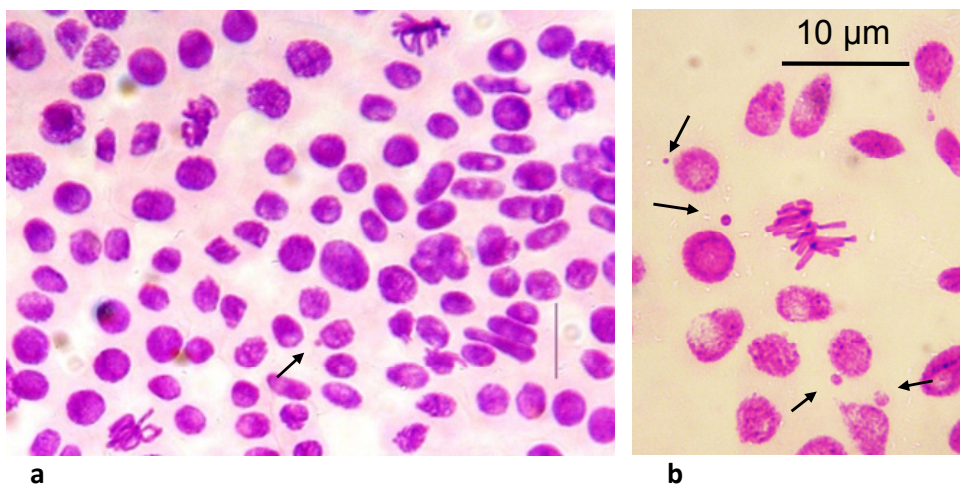


Figura 20. *Vicia faba*: cellule di apici radicali con esempi per l'identificazione dei micronuclei (freccie) al microscopio ottico (a, b) (colorazione Feulgen)

Per una loro inequivocabile identificazione, soprattutto per non confonderli con materiale di altro tipo o provenienza, è importante attenersi al rispetto dei seguenti requisiti:

1. Presentare una colorazione uguale a quella del nucleo principale (rosso fucsia);
2. Avere una forma rotondeggiante o ovale ed un contorno regolare;
3. Essere separato dal nucleo (non sovrapposto e/o adiacente ad esso);
4. Risultare chiaramente incluso all'interno di una cellula (non isolato: *vedi* Figura 18).

La frequenza dei micronuclei viene studiata analizzando un totale di almeno 10.000 cellule per ogni apice radicale, e per ciascun punto sperimentale vengono generalmente analizzati non meno di 10 apici radicali, per un totale di almeno 100.000 cellule per punto sperimentale. Nell'analisi al microscopio possono essere coinvolti più osservatori, sulla base di una accertata omogeneità dei criteri nell'osservazione, e assicurando che la dimensione del campione (numero di cellule e di apici/punto sperimentale) sia equamente distribuita, per tutti i punti sperimentali.

ANALISI STATISTICA

Per l'elaborazione statistica dei dati ottenuti sulle frequenze dei micronuclei vengono generalmente utilizzati test non parametrici; per una valutazione d'insieme su tutti i punti sperimentali può essere condotta un'analisi della varianza (*ANalysis Of VAriance*, ANOVA) ad esempio attraverso il test di Kruskal-Wallis; la risposta sull'eventuale effetto mutageno rilevato dalla frequenza dei micronuclei è data dai confronti binari (ad esempio attraverso il test di Mann-Whitney o il t di Student) che, in particolare, devono essere eseguiti tra i seguenti punti sperimentali:

- il controllo positivo rispetto al controllo negativo, per verificare e documentare l'effettiva sensibilità del sistema biologico agli effetti di agenti mutageni;
- ognuno dei punti sperimentali rispetto al corrispondente controllo negativo, a parità di esposizione e tempi di fissaggio. Nel caso in cui venisse utilizzata una ulteriore soluzione per diluire la matrice, deve essere valutato anche l'effetto di quest'ultima;
- eventuali altri confronti su altre variabili, come ad esempio tra campioni studiati a diversi tempi di fissaggio.

A questo scopo sono disponibili diversi programmi statistici per PC, facilmente reperibili, la cui applicazione risulta molto semplice.

PROTOCOLLO PER IL TEST DEI MICRONUCLEI

Scopo

L'MN-test in apici radicali di *Vicia faba* viene proposto come test di mutagenesi per valutare il potenziale mutageno di contaminanti presenti in corpi d'acqua inquinati.

Questo metodo è applicabile a:

- acque dolci superficiali
- sedimenti (tal quale e acqua interstiziale)

Principio

L'MN-test è considerato uno dei metodi più idonei per identificare la risposta integrata all'esposizione ad una miscela complessa di contaminanti perché rappresenta un indice del danno genetico accumulato complessivamente durante la vita di un organismo esposto. Esso è in grado di misurare gli effetti mutageni che risultano dall'interazione degli inquinanti presenti in un ambiente a cui gli organismi sono esposti, rilevandone sia gli effetti clastogeni, cioè che producono rotture alla doppia elica di DNA, sia quelli aneugeni, che inducono mal distribuzione cromosomica ed aneuploidia. Questo test è largamente impiegato sia come test a breve termine nell'uomo, sia per il rilevamento del potenziale mutageno di inquinanti presenti nell'aria, nell'acqua e nel suolo, in programmi di monitoraggio ambientale; grazie alla sua elevata sensibilità e affidabilità esso viene eseguito in cellule e tessuti di un gran numero di specie, selvatiche e non, sia acquatiche che terrestri, sia animali che vegetali. La sua applicazione in sistemi vegetali, particolarmente indicata per la rilevazione di mutageni presenti nelle acque e nel suolo permette l'analisi di matrici ambientali grezze, evitando processi di purificazione e concentrazione.

In mutagenesi ambientale, ed in particolare per l'esecuzione del MN-test, *Vicia faba* è una delle specie vegetali più utilizzate, soprattutto per la sua elevata sensibilità agli effetti mutageni.

Reagenti, materiali e apparecchiature

Si raccomanda l'utilizzo di prodotti chimici di riconosciuta qualità. A seconda delle esigenze sperimentali è possibile scegliere di usare acqua di fonte, acqua minerale in bottiglia o una soluzione standard di acqua ricostruita, come la soluzione di Hoagland.

Per l'esecuzione di questo test viene utilizzata la specie *Vicia faba*, varietà minor. Le piantine vengono preparate per l'esposizione alla matrice da saggiare partendo dalla fase di germinazione dei semi secchi, precedentemente conservati al riparo dalla luce in un ambiente fresco e asciutto per tempi non molto lunghi, generalmente non oltre 2 anni, per una resa di germinazione ottimale. L'intera fase di preparazione può avere una durata variabile, compresa tra 10 e 14 giorni, principalmente in funzione del tempo di conservazione dei semi utilizzati.

Reagenti

I reagenti da usare sono:

- *Alcol etilico assoluto (99%)*
 C_2H_6O
- *Acido cloridrico 37%*
Da una soluzione iniziale di HCl al 37%, preparare una soluzione operativa di HCl al 3,7% (1:10) aggiungendo H_2O (distillata o di rubinetto).
- *Acido Acetico glaciale*
Preparare una soluzione di acido acetico (CH_3COOH) al 45% aggiungendo H_2O .
- *Reattivo di SCHIFF* (per microscopia ed elettroforesi)
 Na_2SO_3
- *Idrazide Maleica*
Nome chimico:
6-hydroxy-2H-pyridazin-3-one (IUPAC)
1,2-dihydropyridazine-3,6-dione (C.A.)
Formula bruta
 $C_4 H_4 N_2 O_2$
- *Histovitrex* (o altro montante per preparati istologici)
Formula molecolare: $C_8 H_{10}$
- *Soluzione di Hoagland*
- *Ipoclorito di sodio*
 $NaClO$
- *Ghiaccio secco* (CO_2)
- *Azoto liquido* (N_2).

Materiali e apparecchiature

I materiali da usare sono:

- Semi secchi di *Vicia faba* (chiamato anche “favino”) conservati in luogo fresco e asciutto, al buio.
- Terriccio artificiale (vermiculite, argilla espansa o altro materiale poroso come ovatta, carta assorbente o bibula), se necessario precedentemente lavato e sterilizzato per evitare contaminazioni da muffe.
- Cilindri graduati.
- Pipette di vario volume.
- Vaschette di plastica (per la germinazione dei semi su terriccio artificiale).
- Vasetti in vetro, resistenti alla temperatura di $60^\circ C$ (per contenere le radichette dal fissaggio fino alla colorazione).
- Vetrini porta-oggetto e copri-oggetto (24x60 mm) per l’allestimento dei preparati.
- Contenitori in vetro per i campioni da saggiare.
- Pinzette.
- Bisturi o lamette.
- Forbici.
- Bottiglie in pyrex (resistenti alla temperatura di $60^\circ C$).

- Parafilm.
- Supporti a griglia (per mantenere i semi di *Vicia faba* sopra la superficie dell'acqua e/o del materiale in esame).
- Filtrino da tè (per trattenere gli apici durante i cambi delle soluzioni).

Le apparecchiature necessarie sono:

- Dewar per l'azoto liquido.
- Termostato ventilato (per temperature di +20°C).
- Frigorifero,
- Bagnetto termostato (bagnomaria).
- Congelatore -20°C.

Metodologia

Il test dei micronuclei può essere condotto sugli apici sia di radici primarie che secondarie: i dati presenti nella letteratura scientifica dimostrano la stessa sensibilità ed affidabilità del test in entrambi i casi.

Allestimento della coltura idroponica

Per l'esecuzione di questo test utilizzare la specie *Vicia faba*, varietà minor. I semi secchi, conservati in ambiente fresco e asciutto, al riparo dalla luce, possono essere direttamente impiegati per la reidratazione, immergendoli in acqua di rubinetto per circa 24 ore e mantenuti a temperatura ambiente.

In situazioni nelle quali si sospetta la presenza di spore e muffe sul tegumento, può rendersi cautelativo un trattamento disinfettante, che può essere realizzato mantenendo i semi immersi in una soluzione commerciale di ipoclorito di sodio (4,5% NaClO) diluita al 50% in acqua di rubinetto per 5-10 minuti. Al termine del trattamento i semi vanno lavati abbondantemente prima della reidratazione.

Sviluppo delle radici primarie

Dopo la reidratazione sciacquare i semi abbondantemente e adagiarli sopra un supporto di materiale poroso e assorbente (es. uno strato di argilla espansa) precedentemente imbibito di acqua corrente e ricoperto fino alla superficie, avendo cura di mantenere i semi sulla superficie e non immersi nell'acqua, per evitare che marciscano, e distanziati tra loro (circa 1 cm). Successivamente porre i semi in un armadio termostato e umidificato, possibilmente ventilato, alla temperatura di +20°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), per un intervallo di tempo sufficiente allo sviluppo della radice primaria, fino a raggiungere una lunghezza di 1-2 cm; il tempo necessario per questa fase può variare tra 4 e 7 giorni, in relazione al tempo di conservazione dei semi. Durante la germinazione è necessario mantenere costante la quantità di acqua nelle vaschette, per evitare l'essiccamento dei semi e delle radichette.

Sviluppo delle radici secondarie

Quando le radici primarie hanno raggiunto una lunghezza di almeno 1 cm, eliminarne la parte apicale, rimuovendo gli ultimi 4-5 mm delle radichette. Allo stesso tempo rimuovere i

tegumenti dei semi e i germogli, quando presenti. Le radici primarie vengono immerse in acqua, adagiando i semi sopra un supporto rigido in modo che i cotiledoni siano sopra il livello dell'acqua e risultino immersi solo i monconi delle radici. Porre le piantine così preparate in un armadio termostato per ulteriori 4-7 giorni, nelle stesse condizioni di temperatura, umidità e ventilazione, fino al raggiungimento di una lunghezza delle radici secondarie di circa 2 cm.

In assenza di particolari esigenze sperimentali, per lo sviluppo delle radici secondarie si utilizza acqua di fonte (rubinetto). In alternativa si possono utilizzare soluzioni standard per colture idroponiche, tra cui la soluzione di Hoagland, oppure acque minerali commerciali in bottiglia.

Esposizione alla matrice

Se le matrici erano state congelate dopo il prelievo queste devono essere precedentemente scongelate, fino alla temperatura di circa +20°C.

Immergere nella soluzione da saggiare l'intero apparato radicale sviluppato da ogni piantina, trasferendo direttamente il supporto rigido contenente i semi con le radichette in una nuova vaschetta contenente la matrice, in modo che i semi risultino adagiati sulla superficie della matrice mentre le radici siano ben immerse in essa.

Porre le vaschette così preparate alla temperatura di +20°C.

Tempi di esposizione

Secondo il protocollo sperimentale per le diverse esposizioni, è consigliabile allestire, per ogni matrice, 4 vaschette (A, B, C, D):

- A e B sono utilizzate per l'esposizione breve (4 ore);
- C e D per l'esposizione terminale (24-72 ore).

Riempire con la matrice le vaschette contenenti le piantine di *Vicia faba* e porle nell'incubatore a +20°C, nelle stesse condizioni (assenza di illuminazione, umidità e ventilazione) utilizzate per la germinazione.

Dopo 4 ore prelevare dall'incubatore le vaschette A e B: estrarre tutte le piantine contenute in esse e risciacquare bene le radichette.

Collocarle in vaschette contenenti solo acqua (o soluzione di Hoagland) e porle nuovamente nell'incubatore a +20°C fino ai tempi di fissaggio.

Dopo 24 ore prelevare le vaschette A e C per eseguire il primo fissaggio

Dopo 72 ore prelevare le vaschette B e D per eseguire il secondo fissaggio.

Fissaggio

Per entrambi gli intervalli di tempo di 24 e di 72 ore dall'inizio dell'esposizione, lavare le radici secondarie, reciderle e metterle in fissativo (metanolo o etanolo/ acido acetico: 3/1). Dopo 30' cambiare la soluzione di fissativo e sostituirla con altra nuova.

Conservare le radici a +4°C. fino al momento della colorazione, dopo aver ricoperto ciascun contenitore con del parafilm. A questo punto la preparazione può essere interrotta e ripresa in un successivo momento.

Controllo negativo

Per il controllo negativo, esporre le radici secondarie alla sola soluzione usata per la coltura idroponica (acqua di fonte, soluzione di Hoagland) fino ai tempi di fissaggio stabiliti dal protocollo.

Controllo positivo

Come controllo positivo, utilizzare un noto agente mutageno di riferimento, ad esempio raggi X o altri agenti mutageni forti. In particolare, come agente mutageno di riferimento per il test dei micronuclei nelle piante, viene spesso utilizzata l'idrazide maleica.

Per il trattamento con questo agente, esporre le radici ad una concentrazione di 10^{-4} – 10^{-5} M, per 4 ore, seguito da un tempo di recupero di 44 e/o 68 ore, in acqua di fonte.

Colorazione

Tra le diverse metodologie il metodo Feulgen è di gran lunga preferibile, data la sua specificità per il DNA ed il rapporto quantitativo diretto tra l'intensità della colorazione e il contenuto di cromatina.

Fase preliminare

Prima di iniziare la colorazione:

- accendere un bagnomaria termostato e portare la temperatura a $+60^{\circ}\text{C}$;
- preparare una soluzione di HCl 1N (acido cloridrico: soluzione commerciale) (es. per 100 mL totali, aggiungere a 10 mL di HCl al 37%, 90 mL di H_2O (questa operazione deve essere svolta sotto cappa chimica));
- mettere la soluzione così preparata nel bagnomaria a $+60^{\circ}\text{C}$;
- preparare una soluzione di acido acetico al 45%, sotto cappa chimica.

Reidratazione

Per la reidratazione seguire queste fasi:

1. Trasferire le radici dalla soluzione di fissativo in acqua (di fonte) e tenerle in acqua per almeno 10 minuti (finché non cominciano a scendere dalla superficie verso il fondo), a temperatura ambiente. È consigliabile utilizzare un abbondante volume d'acqua, altrimenti cambiare l'acqua una o più volte (per la reidratazione gli apici dovrebbero impiegare non più di 15-20 minuti).
2. Trasferire le radici dall'acqua alla soluzione di HCl 1N preriscaldata ($+60^{\circ}\text{C}$), coprire i vasetti e mantenere alla temperatura di $+60^{\circ}\text{C}$ per 10 minuti, in bagnomaria. Con questo passaggio si esegue una idrolisi acida della parete cellulare e una blanda denaturazione del DNA. Questa fase e la successiva devono essere eseguite con estrema precisione, rispettando i tempi e la temperatura, per evitare una denaturazione eccessiva o disomogenea tra le radici dei diversi campioni.
3. Al termine dell'idrolisi acida eliminare completamente la soluzione di acido cloridrico e immergere le radici nel reattivo di Schiff (fucsina basica solforata), mantenendole coperte (con parafilm) e al buio per almeno 45 minuti, a temperatura ambiente.

Preparazione dei vetrini

Per la preparazione dei vetrini seguire queste fasi:

1. Prelevare le radici dalla soluzione del colorante con delle pinzette, e porle una alla volta su un vetrino portaoggetti, precedentemente pulito e sgrassato.
2. Tagliare le radici in prossimità della zona intensamente colorata (apici radicali, contenenti le cellule proliferanti) trattenendo sul vetrino gli apici ed eliminando la parte non colorata della radichetta. Si possono mettere fino ad 8 apici su un solo vetrino, purché siano ben distanziati fra loro.
3. Mettere una goccia di acido acetico al 45% su ciascun apice (è necessario per evitare che gli apici si asciughino durante l'operazione) e adagiare un vetrino copri-oggetto sopra gli apici; porre sopra il vetrino della carta bibula ed esercitare una leggera pressione sopra gli apici effettuandone lo schiacciamento, eliminando così anche l'eccesso di soluzione, facendo attenzione a non spostare il copri-oggetto mentre si preme con le dita. Poi, toglia la carta bibula, picchiettare delicatamente con il dorso di una matita sul copri-oggetto, in corrispondenza di ciascun apice per separarne bene le cellule (squashing) e formare un monostrato. Il procedimento richiede particolare attenzione per evitare di rompere il vetrino copri-oggetto o semplicemente di spostarlo.

Dopo questa fase si può decidere se proseguire oppure fermarsi per poi riprendere il lavoro in un momento successivo. In quest'ultimo caso i vetrini devono essere conservati a -20°C (freezer).

Montaggio dei vetrini (preparato permanente)

Per questa fase finale è comodo utilizzare l'azoto liquido e quindi procedere come segue:

- immergere il vetrino nell'azoto liquido molto lentamente affinché non si spacchi, tenendolo immerso fino a quando non smette di "friggere";
- facendo leva con la lama di un bisturi tra il copri-oggetto e il porta-oggetto, far saltare il primo con un movimento rapido e deciso; bisogna fare attenzione ad eseguire questa operazione molto rapidamente, prima che la temperatura del vetrino si alzi, (cioè finché questo rimane appannato: altrimenti è preferibile re-immorderlo in azoto liquido). In alternativa si può usare il ghiaccio secco (CO₂) su cui il vetrino va adagiato fino a quando non raggiunga la stessa temperatura del ghiaccio secco (quando tutta la superficie del vetrino risulterà appannata molto intensamente);
- lasciare asciugare il vetrino all'aria per 8-10 ore o fino al giorno dopo;
- montare permanentemente con un nuovo copri-oggetto utilizzando un montante per preparati istologici permanenti (es. Histovitrex, DPX, Eukitt o altro).

Codifica dei vetrini

Per una corretta esecuzione del test dei micronuclei, è buona norma rispettare la neutralità nel corso dell'osservazione da parte degli operatori, in modo che la conoscenza del tipo di trattamento non influenzi il risultato del test. Per questo i vetrini di ciascun punto sperimentale devono essere codificati da una persona non coinvolta nell'esperimento utilizzando un codice arbitrario.

Analisi microscopica

Dopo l'operazione di codifica dei vetrini si procede alla loro osservazione al microscopio per l'analisi dell'indice mitotico e della frequenza del micronuclei (*vedi* "Analisi al microscopio").

BIBLIOGRAFIA

- Beraud E, Cotelle S, Leroy P, Ferard JF. Genotoxic effects and induction of phytochelatins in the presence of cadmium in *Vicia faba* roots. *Mutat Res* 2007;633:112-16.
- Bolognesi C, Hayashi M. Micronucleus assay in aquatic animals. *Mutagenesis* 2011;26:205-13.
- Brusick D. *Principles of genetic toxicology*. Second edition. Plenum Press, New York. 1987.
- De Marco A, Owczarek M, Raglione M, Lanza B. Reduced clastogenic activity of maleic hydrazide in *Vicia faba* seedlings grown in a situation of overcrowding stress. *Mutat Res* 2005;581:133-39.
- Demarini DM. Declaring the existence of human germ-cell mutagens. *Environ Mol Mutagen* 2012;53:166-72.
- El Hajjouji H, Pinelli E, Guiresse M, Merlina G, Revel JC, Hafidi M. Assessment of the genotoxicity of olive mill waste water (OMWW) with the *Vicia faba* micronucleus test. *Mutat Res* 2007;634:25-31.
- Feretti D, Ceretti E, Gustavino B, Zerbini I, Zani C, Monarca S, Rizzoni M. Ground and surface water for drinking: a laboratory study on genotoxicity using plant tests. *Journal of Public Health Research* 2012;1:31-37.
- Foltête AS, Dhyèvre A, Férard JF, Cotelle S. Improvement of *Vicia*-micronucleus test for assessment of soil quality: a proposal for international standardization. *Chemosphere* 2011;85:1624-29.
- Foltête AS, Masfarauud JF, Férard JF, Cotelle S. Is there a relationship between early genotoxicity and life-history traits in *Vicia faba* exposed to cadmium-spiked soils? *Mutat Res* 2012;747:159-63.
- Gustavino B. Applicazione dei test di mutagenesi al monitoraggio ambientale. In: Cassoni F, Bocchi C (Ed.). *Atti del corso di formazione nazionale*. Quaderno ARPA. Bologna: IGTM; 2006. p. 50-9.
- Ma TH, Xu Z, Xu C, McConnell H, Rabago EV, Arreola GA, Zhang H. The improved Allium/*Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. *Mutat Res* 1995;334:185-95.
- Monarca S, Feretti D, Zani C, Rizzoni M, Casarella S, Gustavino. Genotoxicity of drinking water disinfectants in plant bioassays. *Environ Mol Mutagen* 2005;46: 96-103.
- Ohe T, Watanabe T, Wakabayashi K. Mutagens in surface waters: a review. *Mutat Res* 2004;567:109-49.
- Rizzoni M, Tanzarella C, Gustavino B, Degrassi F, Guarino A, Vitagliano E. Indirect mitotic nondisjunction in *Vicia faba* and Chinese hamster cells. *Chromosoma* 1989;97:339-46.
- Rizzoni M, Gustavino B, Ferrari C, Gatti LG, Fano EA. An integrated approach to the assesment of the environmental quality of the Tiber river in the urban area of Rome: a mutagenesis assay (micronucleus test) and an analysis of macrobenthic community structure. *Sci Total Environ* 1995;162:127-37.
- Somers CM. Ambient air pollution exposure and damage to male gametes: human studies and in situ 'sentinel' animal experiments. *Syst Biol Reprod Med* 2011;57:63-71.
- Song YF, Gong P, Wilke BM, Zhang W, Song XY, Sun TH, Ackland ML. Genotoxicity assessment of soils from wastewater irrigation areas and bioremediation sites using the *Vicia faba* root tip micronucleus assay. *J Environ Monit* 2007;9:182-86.
- White PA, Claxton LD. Mutagens in contaminated soil: a review. *Mutat Res* 2004;567:227-345.

- Yauk C, Polyzos A, Rowan-Carroll A, Somers CM, Godschalk RW, Van Schooten FJ, Berndt ML, Pogribny IP, Koturbash I, Williams A, Douglas GR, Kovalchuk O. Germ-line mutations, DNA damage, and global hypermethylation in mice exposed to particulate air pollution in an urban/industrial location. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:605-10.
- Yi M, Yi H, Li H, Wu L. Aluminum induces chromosome aberrations, micronuclei, and cell cycle dysfunction in root cells of *Vicia faba*. *Environ Toxicol* 2010;25:124-29.

*Stampato da Ugo Quintily SpA
Viale Enrico Ortolani 149/151, 00125 Roma*

Roma, ottobre-dicembre 2013 (n. 4) 11° Suppl.