



Unione Europea

Fondo europeo agricolo  
per lo sviluppo rurale:  
*l'Europa investe  
nelle zone rurali*



**Misura 16 "Cooperazione" art. 35 del Reg. (UE) n. 1305/2013**  
Sottomisura 16.1 - Tipologia di Intervento 16.1.2 - "Sostegno ai GO  
del PEI per l'attuazione di progetti di diffusione delle innovazioni  
nell'ambito del rafforzamento dell'AKIS campano"



**KASTRACK**  
tracking chestnut fingerprints



## **Gestione dei campioni** *e stabilizzazione del materiale*

Passaro S., Gentile D., De Masi L., Petriccione M., Nunziata A.

## **Gestione dei campioni prima dell'estrazione del DNA**

---

Nei laboratori specializzati per indagini genetiche mediante tecniche di biologia molecolare sono disponibili strumenti per lo stoccaggio e la manipolazione di gas criogenici (azoto liquido  $-196^{\circ}\text{C}$ ) e super congelatori con temperature di esercizio di  $-80^{\circ}\text{C}$  e oltre. In tale contesto, la maggior parte dei protocolli di estrazione del DNA da pianta prevede di partire da campioni congelati e, spesso, di macinarli mantenendoli congelati mediante l'uso di azoto liquido. Questo garantisce certamente una buona conservazione del campione fino al momento dell'estrazione e un elevato livello di integrità del DNA estratto.

Tuttavia, con lo scopo di poter effettuare l'estrazione del DNA senza l'utilizzo di temperature sotto lo zero, bisogna tenere nella dovuta considerazione due aspetti particolari:

1. Un rametto di castagno che peschi in un bicchiere d'acqua può sopravvivere senza stress fino a sei-otto settimane, soprattutto se prelevato in dormienza e conservato a basse temperature ( $4/8^{\circ}\text{C}$ ). Una buona gestione del laboratorio può rendere sufficiente questo tempo alla lavorazione di tutti i campioni in ingresso prima che compaiano segnali di stress che possano ripercuotersi in maniera significativa sulla qualità e integrità del DNA estratto.
2. Il riscaldamento dei campioni in fase di macinazione può determinare l'estrazione di DNA frammentato, con i filamenti di DNA che non restano perfettamente integri ma si spezzettano casualmente in tanti frammenti. Questo può essere certamente un problema per alcuni tipi di marcatori, ma certo non per i marcatori KASP suggeriti dal progetto KASTRACK che, lavorando su sequenze bersaglio di poche decine di basi, saranno in grado di amplificare anche frammenti molto corti.

Per questo è possibile adottare sistemi per la conservazione dei campioni in ingresso e successivamente macinarli senza ricorrere al super-freddo.

Durante la stagione vegetativa è possibile conservare i rami di castagno che peschino in acqua; tuttavia, la vitalità dei tessuti sarà più breve. Consigliamo di eliminare gran parte delle foglie per prolungarla e di lavorare sempre con le gemme, se presenti.

In caso di assenza di gemme, si consiglia di ricorrere a fissazione dei tessuti fogliari per schiacciamento meccanico su carta speciale del tipo QIAcard FTA PlantSaver. Una volta asciutte, le carte tratterranno il DNA adeso e stabile per molti mesi.