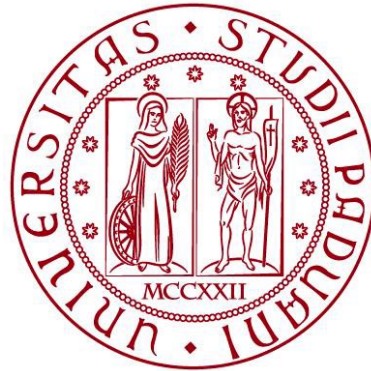


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biotecnologie



ELABORATO DI LAUREA

**Definizione di un protocollo per l'estrazione di DNA
genomico ed RNA totale da tessuti vegetali di *Spartina***

**Tutor: Prof. Cristiano De Pittà
Dipartimento di Biologia**

**Co-tutor: Dott.ssa Chiara Stefanelli
Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione**

Laureando: Vuk Balković

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

SOMMARIO

1. ABSTRACT.....	2
2. STATO DELL' ARTE.....	3
2.1. La Laguna di Venezia.....	3
2.2. Le piante del genere <i>Spartina</i>	4
2.3. Metodi di estrazione del DNA genomico e dell'RNA totale	5
2.3.1. Estrazione del DNA genomico – Protocolli basati sul CTAB.....	5
2.3.2. Estrazione dell'RNA totale – Protocollo TRIzol	6
2.3.3. Estrazioni basate su matrici silicee.....	6
3. APPROCCIO SPERIMENTALE	6
3.1. Conservazione dei campioni	6
3.1.1. Conservazione dei campioni in silica gel.....	6
3.1.2. Conservazione dei campioni in <i>RNAlater</i>	6
3.1.3. Soluzioni per <i>RNAlater homemade</i>	7
3.2. Prove di estrazione del DNA genomico.....	7
3.3. Prove di estrazione dell'RNA totale	9
3.4. Analisi quantitativa e qualitativa degli acidi nucleici	11
3.4.1. Analisi al NanoDrop.....	11
3.4.2. Elettroforesi su gel di agarosio	11
3.4.3. Analisi tramite TapeStation	11
4. RISULTATI.....	12
4.1. Estrazione del DNA genomico	12
4.2. Estrazione dell'RNA totale.....	16
5. DISCUSSIONE.....	21

1. ABSTRACT

Spartina è un genere di piante alofile abbondanti nelle paludi costiere del Mar Mediterraneo e dell'Oceano Atlantico. Spesso fungono da ingegneri ecosistemici negli ambienti che colonizzano, modificandoli fisicamente e contribuendo alla catena trofica. Data la loro rilevanza, è importante avere un protocollo per estrarre acidi nucleici per studi sia di genomica che di trascrittomica. In questa tesi ci si è posti l'obiettivo di definire un protocollo ottimale per estrarre DNA genomico ed RNA totale da foglie di *Spartina* sp. in termini di quantità, purezza e qualità dell'acido nucleico. Sono state dunque valutate procedure di estrazione sia tradizionali (CTAB per DNA e TRIzol per RNA) che con kit commerciali. Inoltre, essendo i campioni raccolti sul campo, ci si è posti il problema della conservazione di questi sul lungo periodo, in modo da poter estrarre gli acidi nucleici in un secondo momento senza incorrere nella degradazione da parte di nucleasi. Combinando i diversi processi di omogeneizzazione ed estrazione, si è giunti alla conclusione che per il DNA è ottimale una frammentazione del tessuto con biglie e azoto liquido seguita da una estrazione con DNeasy® Plant Pro Kit; mentre per l'RNA totale si è deciso di optare per una omogeneizzazione ed estrazione in TRIzol.

2. STATO DELL' ARTE

2.1. La Laguna di Venezia

La Laguna di Venezia è la più vasta zona umida del Bacino Mediterraneo, estendendosi per 550 Km² della costa veneta. Di questi, circa 150 Km² sono usati per l'acquacoltura e sono isolati rispetto agli scambi d'acqua naturali. Le terre emerse coprono circa 45 Km² della superficie della Laguna, mentre la superficie rimanente è costituita da un sistema acquatico di canali, fondali, velme e barene (Solidoro *et al.*, 2010). Le barene sono considerate parte del sistema acquatico per via della loro funzione di regolare l'idrodinamica lagunare senza opporsi al movimento delle maree. Infatti, l'ingressione e la regressione delle maree governano gli spostamenti d'acqua all'interno della Laguna perché essa comunica con il mare Adriatico attraverso le bocche di porto (Figura 1). Questa comunicazione con il mare determina il carattere salmastro delle acque lagunari, caratteristica cardinale per la stabilità del suo peculiare ecosistema, del quale le barene, le velme e i bassifondali rappresentano gli ambienti più dinamici e fragili, essendo soggetti a variazioni della loro configurazione fisica a seconda della quantità di materiali che perdono o acquistano con le maree, come limo, sabbia e altri sedimenti (D'Alpaos and D'Alpaos, 2021). Se viene meno l'equilibrio tra i processi di consolidamento ed erosione, le barene rischiano di scomparire: dall'inizio del XIX secolo ad oggi si è osservata una diminuzione della loro superficie da 180 Km² a 43 Km² (D'Alpaos and D'Alpaos, 2021). Le specie vegetali che popolano le barene sono fondamentali per il mantenimento di questo equilibrio, e tra le più cospicue vi sono quelle appartenenti al genere *Spartina*.



Figura 1. Immagine adattata da Google Earth della Laguna di Venezia. Sono indicate le tre bocche di porto (Lido, Malamocco e Chioggia).

2.2. Le piante del genere *Spartina*

Spartina è un genere di piante monocotiledoni alofile appartenenti alla famiglia Poaceae, native delle paludi salmastre delle coste dell'Oceano Atlantico dell'Europa occidentale e meridionale, dell'Africa settentrionale e occidentale e delle Americhe. Nel territorio italiano sono diffuse nella Laguna di Venezia, dove formano chiazze vegetazionali ai margini delle barene e nelle zone più basse, venendo esposte all'aria nei momenti di bassa marea. Alcune piante del genere *Spartina* possono diventare specie fortemente invasive, diffondendosi rapidamente su terreni limosi e dando luogo a larghi spartineti: eclatante l'esempio della propagazione di *Spartina anglica* e *Spartina alterniflora* in California e soprattutto in Cina (Strong and Ayres, 2013). Nonostante ciò, le piante del genere *Spartina* sono spesso considerate importanti ingegneri dell'ecosistema che colonizzano, influenzandone gli aspetti fisici e biologici. Il ruolo ecosistemico più rilevante del genere *Spartina*, però, è quello di proteggere i terreni colonizzati dall'erosione da parte dei movimenti dell'acqua e permettere la sedimentazione di nutrienti e detriti, mantenendo quindi stabili le nicchie ecologiche di animali abitanti quell'ecosistema (Strong and Ayres, 2009). Questo accade nel caso delle barene della Laguna di Venezia dove, tra le specie di maggiore interesse, si ha la presenza di *Spartina anglica* (Figura 2A) e *Spartina maritima* (Figura 2B).

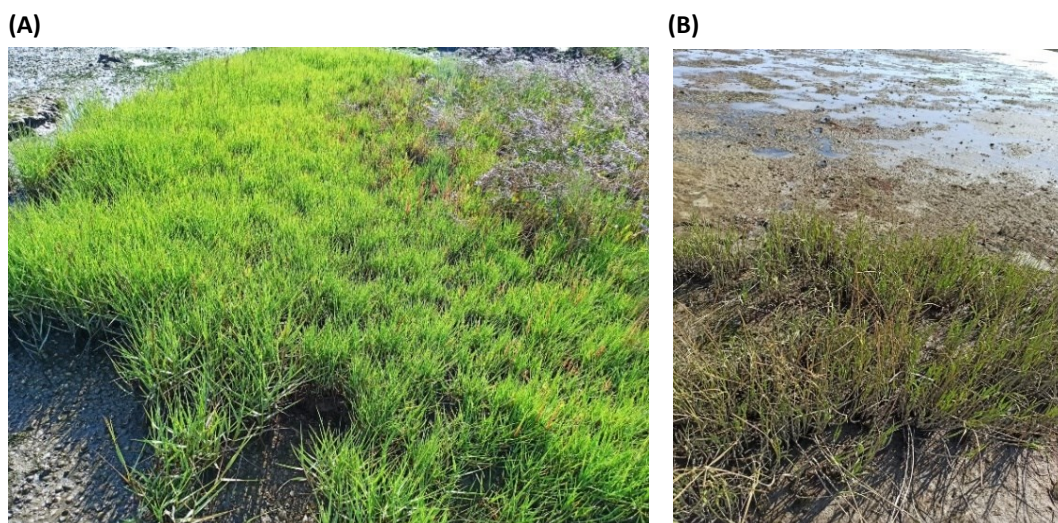


Figura 2. A) patch di *Spartina anglica*. B) patch di *Spartina maritima*. Fotografie scattate alla Spiaggia della Boschettona.

2.3. Metodi di estrazione del DNA genomico e dell'RNA totale

Per gli organismi vegetali, sono disponibili diversi metodi di estrazione di DNA genomico ed RNA totale che si basano sia su procedure tradizionali che kit commerciali. Di seguito vengono riportate le descrizioni dei metodi di estrazione più utilizzati e i loro rispettivi funzionamenti a livello molecolare.

2.3.1. Estrazione del DNA genomico – Protocolli basati sul CTAB

Le specie vegetali possono essere tra di loro molto eterogenee strutturalmente e biochimicamente, per cui non vi è attualmente un protocollo di riferimento di isolamento del DNA genomico (gDNA). La maggior parte dei protocolli di estrazione del gDNA da piante, ad oggi, si basa su versioni modificate della procedura di estrazione con CTAB (bromuro di cetil-trimetilammonio). Il *buffer* CTAB è principalmente composto da CTAB, cloruro di sodio (NaCl), EDTA (acido etilendiamminotetraacetico), TRIS (tris 2-ammino-2-idrossimetil-1,3-propandiolo) e β -mercaptoetanololo, con concentrazioni variabili e dipendenti a seconda dei tessuti vegetali da analizzare (Heikrujam *et al.*, 2020). Il CTAB è un detergente cationico utilizzato per lisare le cellule vegetali. In acqua forma micelle per via della sua natura anfipatica e provoca la lisi cellulare catturando i lipidi delle membrane, rilasciando così il contenuto intracellulare in soluzione. Questo composto ha una diversa azione a seconda della forza ionica della soluzione. Quando questa è bassa, fa precipitare acidi nucleici e polisaccaridi acidi lasciando in soluzione i polisaccaridi neutri e le proteine; quando è alta, invece, si lega ai polisaccaridi e forma complessi che sono rimossi nel passaggio in cloroformio, oltre ad avere un'azione denaturante sulle proteine (Heikrujam *et al.*, 2020). Il cloruro di sodio aiuta a rimuovere le proteine legate al DNA e a mantenerle in soluzione in modo che non precipitino, in presenza di etanolo o isopropanolo, insieme al DNA. Inoltre, una concentrazione di NaCl 0.5 M conferisce alla soluzione una forza ionica sufficiente per permettere al CTAB di precipitare i polisaccaridi (Heikrujam *et al.*, 2020). L'EDTA è un chelante di cationi bivalenti che cattura ioni come il Mg^{2+} e Ca^{2+} . Il Mg^{2+} è presente come cofattore nelle nucleasi e in generale è necessario per la formazione di legami tra acidi nucleici e proteine, mentre gli ioni Ca^{2+} contribuiscono alla stabilità della parete e della membrana plasmatica delle cellule vegetali. Quindi l'EDTA gioca un ruolo sia nell'inibizione delle DNasi ed RNasi che nella lisi cellulare (Heikrujam *et al.*, 2020). Il TRIS è un tampone che mantiene stabile il pH della soluzione dopo la lisi delle cellule, il quale tende a variare a causa del rilascio del materiale citoplasmatico in soluzione (Heikrujam *et al.*, 2020). Infine, il β -mercaptoetanololo è un agente riducente che rimuove tannini e polifenoli dalla soluzione, oltre a ridurre i ponti disolfuro delle proteine, denaturandole e rendendole insolubili in acqua (Heikrujam *et al.*, 2020).

2.3.2. Estrazione dell'RNA totale – Protocollo TRIzol

Il TRIzol (o *TRI Reagent*) è una soluzione monofasica di guanidinio tiocianato e fenolo che a pH acido permette di estrarre l'RNA, mentre a pH basico il DNA. Questo composto è un forte agente caotropico in grado di lisare le cellule e separare gli acidi nucleici dalle proteine, oltre a inibire le RNasi, proteggendo l'RNA dalla loro azione. Con l'aggiunta di cloroformio, la soluzione si separa in due fasi: una fase organica contenente DNA e proteine e una fase acquosa contenente RNA (Simms *et al.*, 1993).

2.3.3. Estrazioni basate su matrici silicee

Una parte dei kit commerciali si basa su resine silicee cariche positivamente poste all'interno di una colonnina. Quando la soluzione contenente gli acidi nucleici attraversa la matrice, questi, in presenza di sali caotropici, vi si legano a causa della loro carica negativa, mentre il resto dei soluti viene lavato via. Gli acidi nucleici presentano una maggiore affinità per la matrice silicea rispetto alle altre molecole in soluzione, per cui, aumentando la concentrazione di sali del *wash buffer*, e di conseguenza la forza ionica della soluzione, gli ultimi legami che verranno destabilizzati saranno quelli tra questi e la matrice. A seconda della forza ionica e del pH delle soluzioni viene favorito il legame alla matrice del DNA o dell'RNA (Bag *et al.*, 2021). Per eliminare efficacemente una delle due molecole si possono utilizzare appositi enzimi, come la DNasi I o l'RNasi A. È possibile infine eluire l'acido nucleico purificato con acqua *RNase-free* o una soluzione a bassa forza ionica, ottenendo in alcuni casi un grado di purezza superiore rispetto ai metodi tradizionali, ma con rese solitamente minori. Questo è dovuto al fatto che le matrici trattengono solo in parte l'acido nucleico contenuto nel campione, mentre con i metodi tradizionali lo si mantiene in soluzione nella sua totalità fino alla fase finale di precipitazione.

3. APPROCCIO SPERIMENTALE

3.1. Conservazione dei campioni

3.1.1. Conservazione dei campioni in silica gel

Per conservare il DNA dei campioni di *Spartina* sp. È stato utilizzato il silica gel, un polimero del diossido di silicio con proprietà disidratanti. Le foglie di *Spartina* sp. sono state poste in buste con zip contenenti per metà silica gel e lasciate essiccare per qualche giorno prima dell'estrazione.

3.1.2. Conservazione dei campioni in RNAlater

Per conservare l'RNA delle foglie di *Spartina* sp. è stato utilizzato l'RNAlater™ Stabilization Solution (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) o l'analogo RNA Stand-by Solution (GRISP, Porto, PT), soluzioni che permeano rapidamente nei

tessuti per stabilizzare e proteggere l'integrità dell'RNA in campioni freschi inattivando le RNasi. I campioni sono stati tagliati con l'ausilio di un bisturi sterile e 50 mg sono stati posti in 10 volumi di soluzione (1.5 mL) in provette da 1.7 mL.

3.1.3. Soluzioni per RNAlater homemade

Per preparare 1 L di RNAlater homemade è stato fatto uso di acqua Milli-Q®, di materiale sterile e delle soluzioni indicate nella Tabella 1.

Tabella 1. Reagenti utilizzati nella preparazione di un litro di RNAlater homemade.

Reagente	Quantità utilizzata	Concentrazione finale
H ₂ O Milli-Q®	693.4 mL	/
EDTA (0.5 M)	26 mL	13 mM
Sodio citrato (1 M)	17 mL	16.6 mM
Ammonio solfato	466.6 g	466.6 g/L

I reagenti sono stati aggiunti nell'ordine riportato in Tabella 1 in un becker posto su un agitatore magnetico riscaldato. Dopo aver atteso il completo scioglimento dell'ammonio solfato, la soluzione è stata portata a pH 5.2 con l'aggiunta di acido solforico (H₂SO₄) goccia a goccia, monitorando il cambiamento di pH con un pHmetro.

3.2. Prove di estrazione del DNA genomico

Di seguito vengono descritte nel dettaglio le prove di estrazione del DNA genomico da foglie di *Spartina* sp. svolte ai fini di questo studio.

PROVA 1 - Protocollo CTAB con variazione dell'omogeneizzazione

In questa prima prova sono stati processati tre campioni da 100 mg, rispettivamente frammentati con mortaio e pestello, biglie di vetro e T 10 basic ULTRA-TURRAX® (IKA, Staufen, DE), pertanto sono state esaminate le differenze nei risultati date dal metodo di omogeneizzazione oltre che dal protocollo.

Omogeneizzazione con mortaio e pestello in azoto liquido

Il mortaio e il pestello, precedentemente sterilizzati in autoclave, sono stati raffreddati versandovi direttamente l'azoto liquido. Al mortaio freddo è stato aggiunto il campione, precedentemente congelato in azoto liquido, e si è proceduto all'omogeneizzazione manuale con il pestello. Infine, si è recuperata la polvere in una nuova provetta.

Omogeneizzazione con biglie

Il campione è stato congelato dentro una provetta immersa in azoto liquido, nella quale sono state poste anche le biglie che, in questa prova, erano di vetro. Successivamente la provetta è stata caricata nel TissueLyser II (Qiagen, Hilden, DE), i cui bracci muovono ad alte frequenze il materiale caricato (in questa prova: 7 minuti a 24 Hz). In tal modo le biglie hanno frantumato il campione congelato.

Omogeneizzazione con T 10 basic ULTRA-TURRAX®

La punta dello strumento, pulita tramite immersione in una soluzione di idrossido di sodio (NaOH), permette di frantumare il campione posto nel *buffer* di lisi. In questa prova il campione è stato congelato prima di essere posto nel *buffer*.

Protocollo di estrazione con CTAB (Allen *et al.*, 2006)

Per ciascun campione di questa prova il protocollo di estrazione è stato analogo. Inizialmente sono stati posti in una provetta il campione lisato, ancora congelato, e 1.2 mL di CTAB *buffer* preriscaldato a 65 °C, mescolando brevemente con un vortex. La soluzione è poi stata incubata in bagnetto termico a 65 °C per 30 minuti, invertendo la provetta ogni 5-10 minuti. Una centrifugazione di 10 minuti ha permesso di rimuovere i detriti cellulari e recuperare il surnatante che è stato posto in una provetta contenente 800 µL di miscela cloroformio:alcol isoamilico (rapporto 24:1). Dopo una centrifuga a massima velocità si è ottenuta una separazione di fase e la fase acquosa è stata trasferita in una nuova provetta contenente 800 µL di isopropanolo freddo. Si è mescolata per inversione la soluzione ed è stata incubata per 10 minuti a -20 °C per permettere al DNA di aggregarsi. Con una ulteriore centrifuga di 10 minuti il DNA è stato fatto precipitare e il *pellet* è stato risospeso in 250 µL di TE. Il DNA estratto è stato trattato con 2.5 µL di *RNase solution* (Merck, Darmstadt, DE) per 30 minuti a 37 °C. Una seconda precipitazione è stata effettuata con l'aggiunta di 600 µL di etanolo assoluto freddo e 25 µL di sodio acetato (NaAc) 3 M, incubando la soluzione per 20 minuti a -20 °C. Dopo aver centrifugato per 10 minuti è stato rimosso il surnatante e il *pellet* è stato staccato dalla parete in 500 µL di etanolo 70% freddo in modo da lavare via gli eventuali sali rimasti tra il *pellet* e la parete della provetta con un'ultima centrifuga. A questo punto è stato scartato l'etanolo e quello residuo è stato fatto evaporare per poi risospesione il *pellet* in acqua.

PROVA 2 - Protocollo CTAB con variazione dell'omogeneizzazione e delle quantità

La seconda prova ha visto l'estrazione del DNA da cinque campioni, rispettivamente da 20 mg, 40 mg e 60 mg omogeneizzati con mortaio e pestello, come nella prova 1, e da 20 mg e 40 mg omogeneizzati con T 10 basic ULTRA-TURRAX®. Questi ultimi due campioni sono stati omogeneizzati in CTAB *buffer* caldo (65 °C) senza essere precedentemente congelati.

PROVA 3 - Protocollo CTAB con variazione delle quantità

In questa prova sono stati analizzati cinque campioni, rispettivamente da 20 mg, 40 mg e 60 mg omogeneizzati con biglie di acciaio dopo congelamento in azoto liquido, come nella prova 1, e da 40 mg e 60 mg omogeneizzati con biglie di acciaio in CTAB *buffer*.

PROVA 4 - Kit commerciali

In questa prova sono stati analizzati cinque campioni utilizzando tre diversi kit commerciali di estrazione di DNA: uno da 60 mg con *Quick-DNA™ Plant/Seed Miniprep Kit* (Zymo, Irvine, CA, USA), due da 25 mg con *GRS Genomic DNA Kit (GRiSP, Porto, PT)* e due da 10 mg con *DNeasy® Plant Pro Kit* (Qiagen, Hilden, DE). Per i kit Qiagen e Zymo sono stati testati, su un campione ciascuno, anche *buffer* specifici per campioni ricchi in composti fenolici o polisaccaridi, rispettivamente PS per un campione da 10 mg e PL1B per uno da 25 mg.

L'omogeneizzazione è avvenuta tramite biglie utilizzando il *TissueLyser II*. Per il kit Zymo sono state adoperate le biglie fornite dal kit e l'omogeneizzazione è avvenuta nel *buffer* indicato per 5 minuti a 25 Hz e 7 minuti a 30 Hz, come anche per il kit Qiagen, per 4 minuti a 24 Hz. Mentre, per il kit GRiSP che non dispone di biglie, l'omogeneizzazione è avvenuta con biglie di acciaio rotonde e azoto liquido per 2 minuti a 24 Hz.

PROVA 5 - Kit Qiagen ed omogeneizzazione con biglie e azoto liquido

Nella quinta prova è stato estratto il DNA da due campioni, uno da 10 mg e uno da 20 mg, utilizzando il kit *DNeasy® Plant Pro Kit*. L'omogeneizzazione è avvenuta tramite *TissueLyser II*, per 2 minuti a 25 Hz, dopo il congelamento dei campioni in azoto liquido. A differenza della prova 4, il *buffer* di lisi indicato dal kit è stato aggiunto dopo l'omogeneizzazione.

3.3. Prove di estrazione dell'RNA totale

Di seguito vengono descritte nel dettaglio le prove di estrazione dell'RNA totale da foglie di *Spartina sp.* svolte ai fini di questo studio.

PROVA 1 – Protocollo TRIzol e kit Qiagen con tessuto fresco

In questa prova sono stati processati tre campioni da 50 mg di *Spartina sp.* fresca, due omogeneizzati con biglie di acciaio precedentemente trattate con NaOH 1 M e uno con mortaio e pestello in azoto liquido. Da uno dei campioni omogeneizzati con biglie l'RNA è stato estratto con il kit *RNeasy PowerPlant Kit* (Qiagen, Hilden, DE), mentre per gli altri due campioni è stato seguito il protocollo di estrazione con il *TripleXtractor* (GRiSP, Porto, PT). L'omogeneizzazione in *TissueLyser II* è avvenuta per 2 minuti a 25 Hz, in *buffer* di lisi o in *TripleXtractor*, in base ai rispettivi metodi di estrazione usati per tali campioni. Inoltre, per l'estrazione di RNA con kit, è stato effettuato il passaggio opzionale di trattamento con *DNasi da ReliaPrep™ RNA Tissue Miniprep System* (Promega, Madison, WI, USA).

Protocollo di estrazione con TRIzol

Per ogni campione processato in *TripleXtractor* il protocollo è stato il medesimo. Inizialmente si è posto 1 mL di *TripleXtractor* in provetta insieme al campione e alle biglie di acciaio per l'omogeneizzazione. Alla omogeneizzazione è seguita una incubazione di 5 minuti a temperatura ambiente e una breve centrifuga per

permettere la rimozione dei detriti cellulari. Al surnatante recuperato sono stati aggiunti 200 μ L di cloroformio mescolando per inversione e, dopo un'incubazione di 3 minuti, una centrifugazione a 4 °C alla massima velocità per 15 minuti ha permesso la separazione delle fasi. La fase acquosa è stata prelevata e trasferita in una nuova provetta, con l'aggiunta di 500 μ L di isopropanolo. Dopo aver mescolato per inversione è avvenuta un'incubazione a -20 °C per 2 ore. Si è in seguito centrifugato a 4 °C alla massima velocità per 10 minuti per far precipitare l'RNA, scartando l'isopropanolo per poi lavare il *pellet* di RNA con 1 mL di etanolo 75%. Dopo una centrifuga a 4 °C per 5 minuti è stato scartato l'etanolo e si è lasciato evaporare quello residuo, per poi risospendere il *pellet* in acqua *RNase-free*.

PROVA 2 – Kit Qiagen con variazione della conservazione (RNAlater commerciale o homemade)

La prova 2 ha visto processati quattro campioni da 50 mg di foglia di *Spartina* sp.: due conservati in RNAlater commerciale e due in RNAlater homemade. Per ciascun tipo di soluzione, uno dei campioni è stato tagliato in pezzi di massimo 0.5 cm per lato, mentre l'altro è stato mantenuto come un unico pezzo di foglia. La conservazione si è protratta per quasi 48 ore a 4 °C. L'omogeneizzazione è avvenuta come nella prova 1 utilizzando il *buffer* di lisi del kit RNeasy PowerPlant Kit con cui poi è stata svolta la successiva estrazione dell'RNA totale.

PROVA 3 - Kit Qiagen con variazione dei tempi di conservazione (RNAlater homemade)

In questa prova sono stati processati due campioni da 50 mg di foglia di *Spartina* sp., rispettivamente intera e tagliata in pezzi come nella prova 2, conservata in RNAlater homemade a 4 °C *overnight* e poi a -20 °C per 4 giorni. L'omogeneizzazione e la successiva estrazione è avvenuta come nella prova 1 per il campione estratto tramite kit.

PROVA 4 - Protocollo TRIzol con variazione dei tempi di conservazione (RNAlater homemade)

Nella prova 4 è stato estratto RNA da un campione da 50 mg di foglia intera, conservato in RNAlater homemade a 4 °C *overnight* e per 8 giorni a -20° C. L'omogeneizzazione è avvenuta, per 4 minuti a 30 Hz, come nella prova 1 per il campione estratto tramite TripleXtractor.

PROVA 5 - Protocollo TRIzol con variazione della conservazione (RNAlater commerciale)

In questa prova sono stati processati due campioni da 50 mg di foglia intera posti in RNAlater (GRiSP o Thermo Scientific) a 4 °C per 2 giorni. L'omogeneizzazione è stata analoga a quella della prova 4.

PROVA 6 - Protocollo TRIzol con variazione dei tempi di conservazione (RNAlater commerciale)

Nella prova 6 è stato estratto RNA da due campioni da 50 mg di foglia intera posti in RNAlater (GRiSP o Thermo Scientific) a 4 °C *overnight* e per 4 giorni a -20 °C. L'omogeneizzazione è avvenuta, per 4 minuti a 25 Hz, come nella prova 1 per il campione estratto tramite TripleXtractor.

PROVA 7 - Protocollo TRIzol con variazione dei tempi e della conservazione (RNAlater commerciale)

In quest'ultima prova è stato estratto RNA da un campione da 50 mg di foglia in pezzi, come nella prova 2, posta in RNA Stand-by Solution a 4 °C *overnight* e per 6 giorni a -20° C. L'omogeneizzazione è stata analoga a quella della prova 6.

3.4. Analisi quantitativa e qualitativa degli acidi nucleici

3.4.1. Analisi al NanoDrop

Per misurare la concentrazione e il grado di purezza degli acidi nucleici estratti è stato utilizzato il NanoDrop ND-1000 UV-Vis (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Partendo da 1 µL di campione lo strumento restituisce la concentrazione dell'acido nucleico che viene stimata tramite la legge di Lambert-Beer, mentre la presenza di molecole contaminanti è indicata dai rapporti di assorbanza 260/230 e 260/280. A 260 nm si ha il picco di assorbanza degli acidi nucleici, per cui il primo rapporto indica la contaminazione da polisaccaridi e fenoli (massimo di assorbanza a 230 nm) e il secondo indica la contaminazione da proteine (assorbanza maggiore a 280 nm). Il rapporto 260/280 è considerato ottimale se compreso tra 1.8 e 2, mentre il rapporto 260/230 se maggiore di 2.

3.4.2. Elettroforesi su gel di agarosio

Per verificare il livello di degradazione del gDNA estratto sono state allestite corse elettroforetiche su gel di agarosio allo 0.7% utilizzando etidio bromuro come intercalante. In ogni pozzetto sono stati caricati 10 µL di campione a una concentrazione di 50 ng/µL e 2.5 µL di tampone di corsa 5X Green GoTaq® Reaction Buffer (Promega, Madison, WI, USA). Nel primo pozzetto di ciascun gel sono stati caricati 6 µL di marcatore di peso molecolare SHARPMASSTM 1Kb Ready-to-load (EuroClone, Milano, IT). La corsa è avvenuta applicando una differenza di potenziale di 100 V e il gel è stato successivamente osservato al transilluminatore UV Molecular Imager Gel Doc XR+ System with Image Lab Software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

3.4.3. Analisi tramite TapeStation

Per verificare il livello di degradazione dell'RNA totale estratto è stato utilizzato il TapeStation System 4150 (Agilent, Santa Clara, CA, USA) (Figura 3). Questo strumento fa uso dello ScreenTape System (Agilent, Santa Clara, CA, USA), basato

sull'elettroforesi su gel, per analizzare campioni di acidi nucleici in concentrazioni da 25 ng/ μ L a 500 ng/ μ L, restituendo elettroferogrammi in cui è possibile visualizzare il grado di degradazione dell'acido nucleico. Lo strumento restituisce anche un valore numerico, denominato *RNA Integrity Number equivalent* (RIN^e), che indica il livello di degradazione dell'RNA analizzato su una scala da 1 (fortemente degradato) a 10 (pressoché intatto). Il sistema TapeStation è simile all'analogo e più conosciuto Agilent Bioanalyzer 2100, ma presenta il vantaggio di poter analizzare anche solo un campione alla volta, anziché far uso di chip.



Figura 3. TapeStation System 4150. Immagine presa dal sito ufficiale di Agilent.

4. RISULTATI

4.1. Estrazione del DNA genomico

PROVA 1 - Protocollo CTAB con variazione dell'omogeneizzazione

Tabella 2. Valori ottenuti al NanoDrop per la prova 1.

ID campione	Conc. acido nucleico (ng/ μ l)	260/280	260/230	Volume di eluzione (μ L)	DNA totale (μ g)
CTAB mortaio 100 mg	577	1,80	1,10	50	28,9
CTAB biglie 100 mg	73,3	1,51	0,44	50	3,67
CTAB Ika 100 mg	977,2	1,77	1,03	50	48,9

Dalla Tabella 2 si evince che il DNA estratto dai campioni omogeneizzati con mortaio e T 10 basic ULTRA-TURRAX[®] presentano una buona resa quantitativa e buona purificazione da proteine, a differenza del campione omogeneizzato con

biglie di vetro, che si presenta a bassa resa, fortemente contaminato da zuccheri e fenoli e lievemente contaminato da proteine. Inoltre, una corsa elettroforetica (Figura 4) mostra come l'omogeneizzazione con T 10 basic ULTRA-TURRAX® abbia degradato fortemente il DNA, al contrario degli altri due campioni.

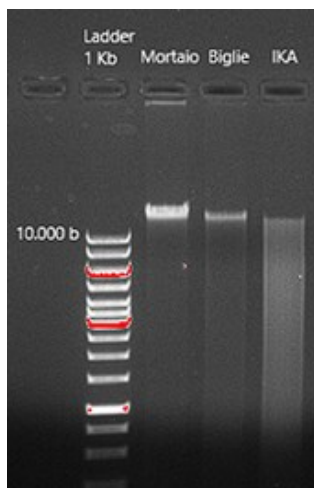


Figura 4. Elettroforesi in gel d'agarosio allo 0.7% della prova 1. La degradazione del campione omogeneizzato con T 10 basic ULTRA-TURRAX® si deduce dallo *smear* chiaramente visibile.

PROVA 2 - Protocollo CTAB con variazione dell'omogeneizzazione e delle quantità

Tabella 3. Valori ottenuti al NanoDrop per la prova 2.

ID campione	Conc. acido nucleico (ng/μl)	260/280	260/230	Volume di eluizione (μL)	DNA totale (μg)
CTAB mortaio 20 mg	56,5	1,66	0,63	30	1,70
CTAB mortaio 40 mg	305,8	1,69	0,92	30	5,49
CTAB mortaio 60 mg	696,3	1,82	1,58	30	20,9
CTAB Ika 20 mg	269,1	1,72	0,96	30	8,07
CTAB Ika 40 mg	371,6	1,70	0,91	30	11,1

Dai risultati al NanoDrop (Tabella 3) si nota che l'unico campione il cui DNA ha presentato sia buoni rapporti di assorbanza che una buona resa è quello da 60 mg omogeneizzato con mortaio.

L'elettroforesi (Figura 5) conferma l'eccessiva degradazione del DNA nell'omogeneizzazione con T 10 basic ULTRA-TURRAX®. Il campione da 60 mg omogeneizzato con mortaio è stato il migliore anche qualitativamente.

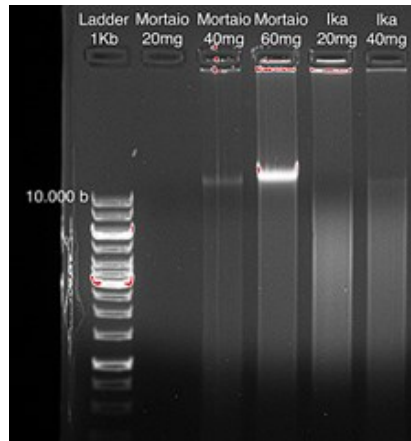


Figura 5. Elettroforesi in gel d'agarosio della prova 2. Visibili gli *smear* nelle ultime due corse a destra e la banda unica nella corsa del campione da 60 mg.

PROVA 3 - Protocollo CTAB con variazione delle quantità

Tabella 4. Valori ottenuti al NanoDrop per la prova 3.

ID campione	Conc. acido nucleico (ng/ μ l)	260/280	260/230	Volume di eluizione (μ L)	DNA totale (μ g)
CTAB (Biglie + N ₂) 20 mg	267,9	1,69	0,93	30	8,04
CTAB (Biglie + N ₂) 40 mg	218,1	1,51	0,60	30	6,54
CTAB (Biglie + N ₂) 60 mg	622,6	1,75	1,25	30	18,7
CTAB (Biglie e <i>buffer</i>) 40 mg	76,5	1,38	0,40	30	2,30
CTAB (Biglie e <i>buffer</i>) 60 mg	59,5	1,35	0,36	30	1,79

Si evince dalla Tabella 4 che l'omogeneizzazione con biglie in *buffer* CTAB non è efficace, in quanto il DNA è risultato contaminato sia da proteine che da zuccheri e fenoli e la resa è stata bassa. Il campione coi risultati quantitativi migliori è stato quello da 60 mg omogeneizzato in azoto liquido. Alla fine della corsa elettroforetica (Figura 6) si può osservare che l'omogeneizzazione tramite biglie, sia di campioni congelati in azoto liquido che immersi in *buffer* CTAB, restituisce DNA per lo più integro.

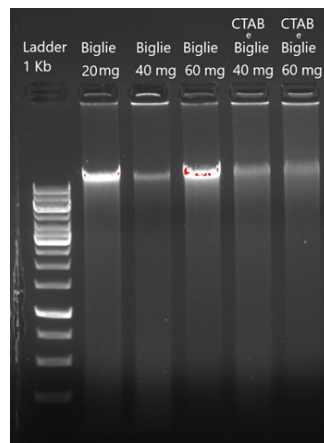


Figura 6. Elettroforesi in gel d'agarosio della prova 3. I campioni omogeneizzati dopo congelamento in azoto liquido mostrano bande più nette.

PROVA 4 - Kit commerciali

Tabella 5. Valori ottenuti al NanoDrop per la prova 4.

ID campione	Conc. acido nucleico (ng/ μ l)	260/280	260/230	Volume di eluizione (μ L)	DNA totale (μ g)
Zymo 60 mg	83,3	1,91	1,76	50	4,17
GRiSP PL1A 25 mg	95,1	1,89	2,13	50	4,76
GRiSP PL1B 25 mg	19,1	2,10	1,64	50	0,955
Qiagen PS 10 mg	10,8	2,02	1,02	50	0,540
Qiagen 10 mg	77,1	1,89	1,85	50	3,86

Analizzando i risultati al NanoDrop (Tabella 5) tutti e tre i kit utilizzati permettono di estrarre gDNA con una buona purezza. Inoltre, per questa specie non sembra essere necessario l'utilizzo di *buffer* specifici per campioni ricchi in fenoli o polisaccaridi (PS e PL1B rispettivamente) con i quali si ottiene una resa e purezza dei campioni inferiore. Il campione estratto con kit Zymo, tuttavia, risulta molto degradato dopo l'elettroforesi (Figura 7), come anche i campioni estratti con kit Qiagen. Tale degradazione potrebbe essere attribuita all'omogeneizzazione in *buffer* anziché in azoto liquido, come avvenuto per i campioni estratti con kit GRiSP che presentano una buona qualità.

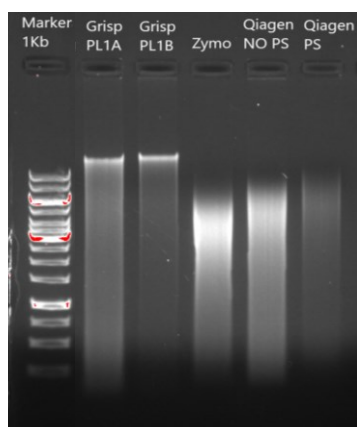


Figura 7. Elettroforesi in gel d'agarosio della prova 4. Si notino gli *smear* indicanti la forte degradazione nelle corse dei campioni estratti con kit Zymo e Qiagen.

PROVA 5 - Kit Qiagen ed omogeneizzazione con biglie e azoto liquido

Tabella 6. Valori ottenuti al NanoDrop per la prova 5.

ID campione	Conc. acido nucleico (ng/ μ l)	260/280	260/230	Volume di eluizione (μ L)	DNA totale (μ g)
Qiagen 10 mg N ₂	56,3	1,95	0,13	50	2,82
Qiagen 20 mg	71,8	1,89	2,19	50	3,59

Il campione da 20 mg ha dato ottimi risultati a livello di purezza del DNA, mentre quello da 10 mg risulta contaminato da polisaccaridi e fenoli (Tabella 6). Entrambi i campioni di DNA risultano integri dalla corsa elettroforetica (Figura 8).

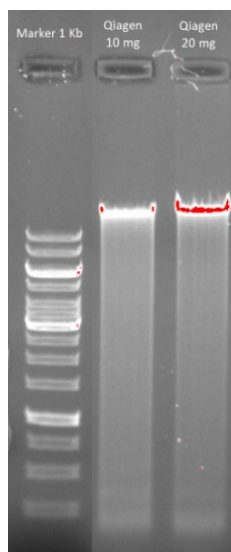


Figura 8. Elettroforesi in gel d'agarosio della prova 5.

4.2. Estrazione dell'RNA totale

PROVA 1 - Protocollo TRIzol e kit Qiagen con tessuto fresco

Tabella 7. Valori ottenuti al NanoDrop per la prova 1.

ID campione	Conc. acido nucleico (ng/μl)	260/280	260/230	Volume di eluizione (μL)	RNA totale (μg)
Kit biglia	270,9	2,12	2,29	50	13,6
TRIzol biglia	1687	2,06	1,62	20	33,7
TRIzol mortaio	589,7	1,99	1,57	11	6,49

Dall'analisi al NanoDrop (Tabella 7) si osservano buoni valori di purezza dell'RNA totale estratto da tutti e tre i campioni. La resa è massima nel campione estratto con TRIzol e omogeneizzato con biglie.

L'analisi alla TapeStation (Figura 9) ha mostrato che da tessuto fresco si ottiene RNA integro sia tramite l'estrazione con kit sia con TRIzol, con RIN^e maggiore o uguale a 7 per tutti e tre i campioni.

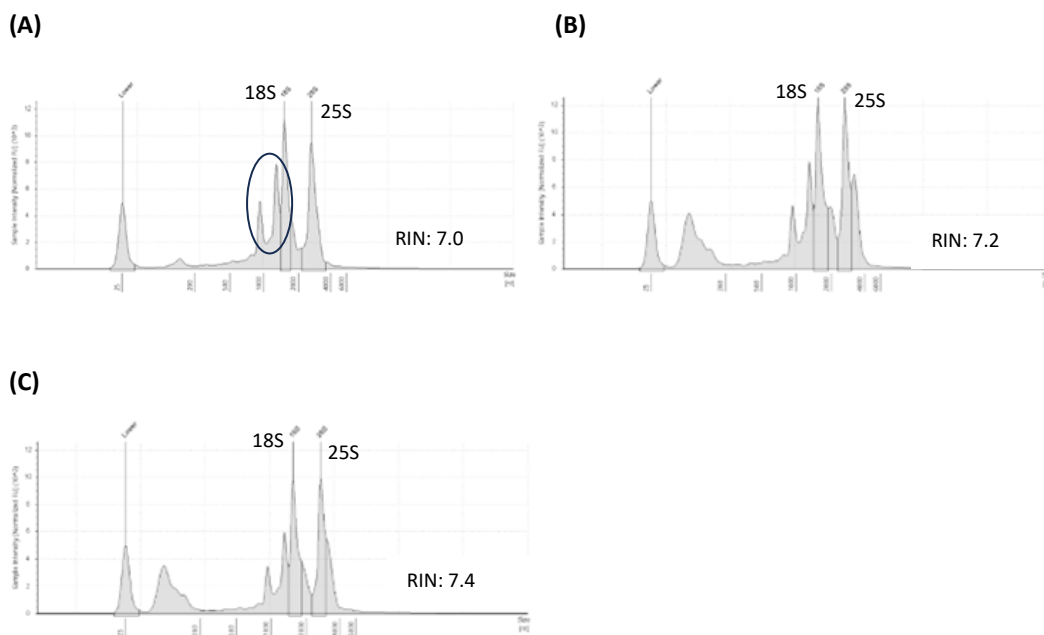


Figura 9. Risultati dell'analisi alla TapeStation per la prova 1. **A)** *Spartina* processata con kit (RIN: 7.0). Sono stati cerchiati a titolo esemplificativo i due picchi degli rRNA 23S e 16S dei cloroplasti. **B)** *Spartina* processata con TRIzol ed omogeneizzata con biglie (RIN: 7.2). **C)** *Spartina* processata con TRIzol ed omogeneizzata con mortaio (RIN: 7.4). Sono indicati i picchi di rRNA 18S e 25S.

Negli elettroferogrammi sono presenti due picchi in più oltre al 25S e 18S. Questi, tuttavia, non sono segno di degradazione, ma sono da imputare alla presenza dell'rRNA dei cloroplasti (23S e 16S) (Figura 9A), abbondanti nelle foglie. Considerando questo aspetto, i valori di RIN^e restituiti dallo strumento sono da considerarsi sottostimati.

PROVA 2 - Kit Qiagen con variazione della conservazione (*RNAlater* commerciale o *homemade*)

Tabella 8. Valori ottenuti al NanoDrop per la prova 2.

ID campione	Conc. acido nucleico (ng/μl)	260/280	260/230	Volume di eluizione (μL)	RNA totale (μg)
<i>Homemade</i> foglia intera	262.2	2.09	2.29	50	13.1
<i>Homemade</i> foglia a pezzi	165.4	2.09	2.25	50	8.27
<i>RNAlater</i> foglia a pezzi	118.7	2.05	2.06	50	5.94
<i>RNAlater</i> foglia intera	199.0	2.08	2.23	50	9.95

I risultati restituiti dal NanoDrop sono ottimi per tutti e quattro i campioni (Tabella 8).

Gli elettroferogrammi e i valori restituiti dalla TapeStation (Figura 10) evidenziano che sia l'*RNAlater* commerciale che *homemade* permettono di recuperare dell'RNA integro dopo una conservazione a 4 °C per 48 ore. Il valore di RIN^e calcolato è circa 6 per ogni campione per via dei due picchi di rRNA dei cloroplasti, dunque l'integrità dell'RNA estratto è, in realtà, maggiore di quella stimata come commentato precedentemente.

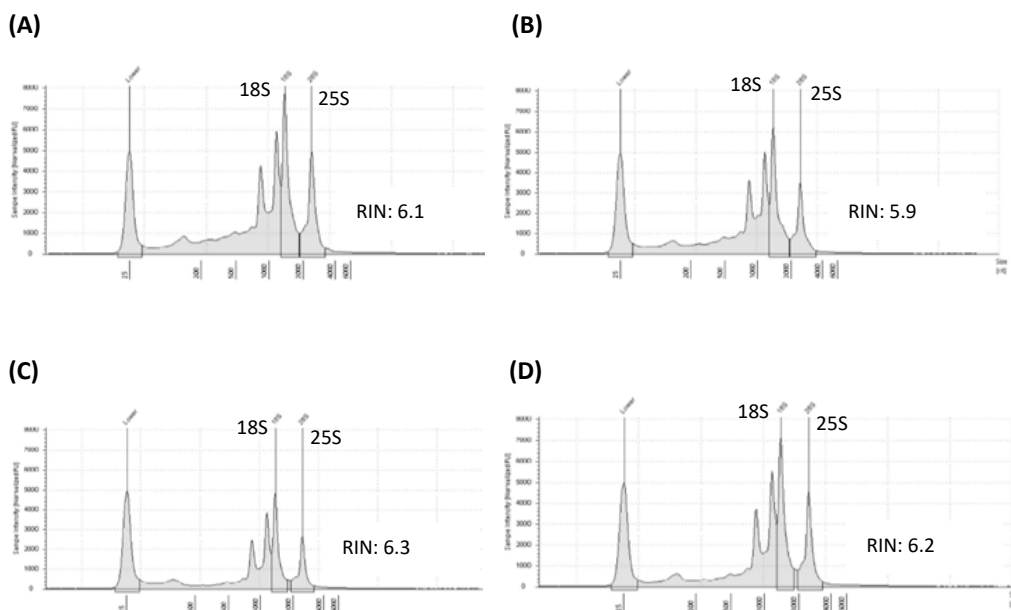


Figura 10. Risultati dell'analisi alla TapeStation per la prova 2. **A)** Foglia intera conservata in *RNAlater homemade* (RIN^o: 6.1). **B)** Foglia in pezzi conservata in *RNAlater homemade* (RIN^o: 5.9). **C)** Foglia in pezzi conservata in *RNAlater commerciale* (RIN^o: 6.3). **D)** Foglia intera conservata in *RNAlater commerciale* (RIN^o: 6.2). Sono indicati i picchi di rRNA 18S e 25S.

PROVA 3 - Kit Qiagen con variazione dei tempi di conservazione (*RNAlater homemade*)

Tabella 9. Valori ottenuti al NanoDrop per la prova 3.

ID campione	Conc. acido nucleico (ng/ μ l)	260/280	260/230	Volume di eluizione (μ L)	RNA totale (μ g)
Foglia in pezzi	106,1	2,07	2,15	50	5,31
Foglia intera	78,80	2,10	2,08	50	3,94

Dall'analisi al NanoDrop (Tabella 9) si ottengono ottimi rapporti di assorbanza, indici di un buon grado di purezza dell'RNA estratto.

Nell'analisi qualitativa alla TapeStation (Figura 11) si possono osservare picchi corrispondenti a rRNA 18S e 25S più bassi rispetto alle prove precedenti, della stessa intensità dei picchi cloroplastidiali. Nonostante questa degradazione, i campioni sono stati considerati di qualità sufficiente. Da questa prova, l'*RNAlater homemade* sembra conservare bene i campioni anche per 4 giorni a -20 °C.

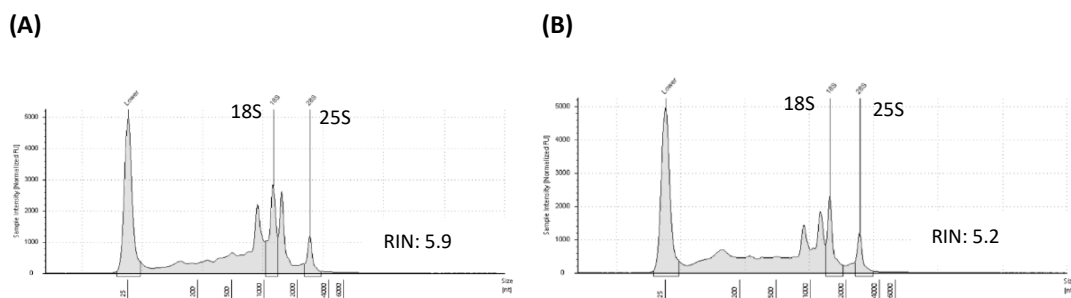


Figura 11. Risultati dell'analisi alla TapeStation per la prova 3. **A)** Foglia in pezzi (RIN^e: 5.9). **B)** Foglia intera (RIN^e: 5.2). Sono indicati i picchi di rRNA 18S e 25S.

PROVA 4 - Protocollo TRIzol con variazione dei tempi di conservazione (*RNAlater homemade*)

Tabella 10. Valori ottenuti al NanoDrop per la prova 4.

ID campione	Conc. acido nucleico (ng/μl)	260/280	260/230	Volume di eluizione (μL)	RNA totale (μg)
Foglia intera TRIzol	479	2,20	2,04	40	19.16

Anche in questa prova i valori restituiti dal NanoDrop (Tabella 10) indicano RNA estratto puro. Tuttavia, l'analisi alla TapeStation (Figura 12) evidenzia una notevole degradazione dei campioni (RIN^e: 5.3) data probabilmente dal fatto che l'*RNAlater homemade* non conserva bene i campioni o perde la sua efficacia nel tempo.

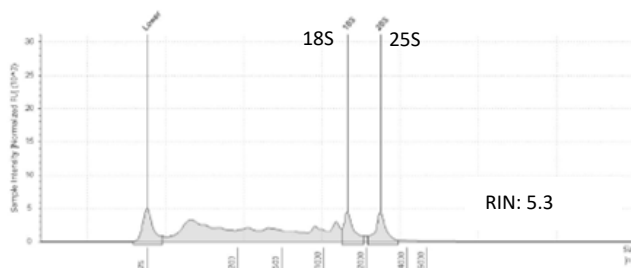


Figura 12. Risultati dell'analisi alla TapeStation per la prova 4. Si noti la dimensione notevolmente ridotta dei picchi. Sono indicati i picchi di rRNA 18S e 25S.

PROVA 5 - Protocollo TRIzol con variazione della conservazione (*RNAlater commerciale*)

Tabella 11. Valori ottenuti al NanoDrop per la prova 5.

ID campione	Conc. acido nucleico (ng/μl)	260/280	260/230	Volume di eluizione (μL)	RNA totale (μg)
Foglia GRiSP	1365,9	2,09	2,03	25	34.15
Foglia Thermo	1518,9	2,06	2,12	35	53.16

L'RNA estratto presenta un elevato grado di purezza (Tabella 11), e la qualità misurata alla TapeStation (Figura 13) è comparabile a quella dei campioni della prova 2. Se ne deduce che, nella conservazione dei campioni a 4 °C per 2 giorni, non vi è una grande differenza tra l'estrazione con kit e con TRIzol.

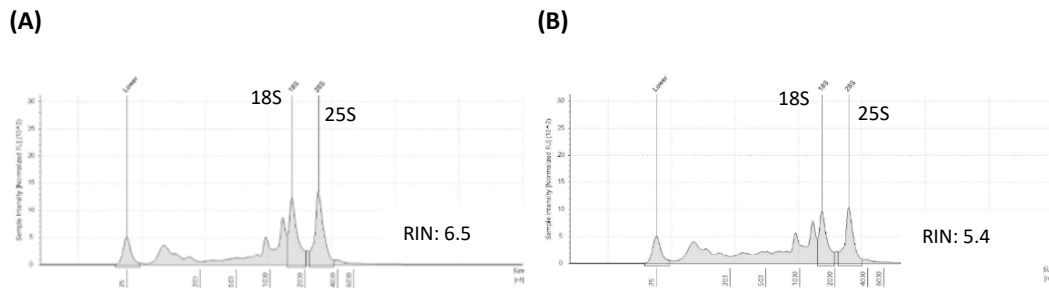


Figura 13. Risultati dell'analisi alla TapeStation per la prova 5. **A)** Foglia intera conservata in RNAlater GRiSP (RIN^e: 6.5). **B)** Foglia intera conservata in RNAlater Thermo Scientific (RIN^e: 5.4). Sono indicati i picchi di rRNA 18S e 25S.

PROVA 6 - Protocollo TRIzol con variazione dei tempi di conservazione (RNAlater commerciale)

Tabella 12. Valori ottenuti al NanoDrop per la prova 6.

ID campione	Conc. acido nucleico (ng/μl)	260/280	260/230	Volume di eluzione (μL)	RNA totale (μg)
Foglia GRiSP -20° C	1031.7	2.08	2.06	40	41.27
Foglia Thermo -20° C	544.40	2.03	1.78	80	43.55

La resa e i rapporti di assorbanza misurati al NanoDrop (Tabella 12) sono buoni, ma l'RNA estratto risulta fortemente degradato (Figura 14). Si è supposto che l'RNAlater non sia penetrato a sufficienza il tessuto intero.

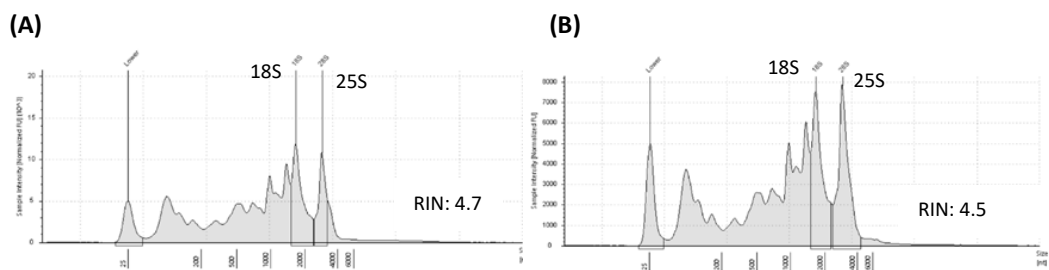


Figura 14. Risultati dell'analisi alla TapeStation per la prova 6. **A)** Foglia intera conservata in RNAlater Thermo Scientific (RIN^e: 4.7). **B)** Foglia intera conservata in RNAlater GRiSP (RIN^e: 4.5). Sono indicati i picchi di rRNA 18S e 25S.

PROVA 7 - Protocollo TRIzol con variazione dei tempi e della conservazione (RNA^{later} commerciale)

Tabella 13. Valori ottenuti al NanoDrop per la prova 7.

ID campione	Conc. acido nucleico (ng/ μ l)	260/280	260/230	Volume di eluzione (μ L)	RNA totale (μ g)
Foglia in pezzi TRIzol	519	2.09	1.38	60	31.14

Nonostante si sia misurata al NanoDrop (Tabella 13) una leggera contaminazione da zuccheri, l'analisi alla TapeStation (Figura 15) ha evidenziato una buona conservazione dell'RNA (RIN^e: 6.7) da parte dell'RNA^{later} GRiSP, dovuta al fatto che la probabilmente soluzione permea efficacemente all'interno del tessuto quando questo è ridotto in pezzi.

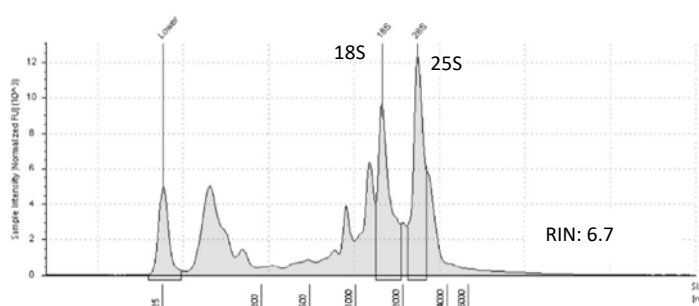


Figura 15. Risultati dell'analisi alla TapeStation per la prova 7. È possibile apprezzare la qualità dell'RNA estratto osservando i due picchi corrispondenti agli rRNA 18S e 25S.

5. DISCUSSIONE

Che siano autoctone come nella Laguna di Venezia (*S. maritima*), o colonizzatori alloctoni come in Cina (*S. anglica*, *S. alterniflora*), le piante del genere *Spartina* coprono un importante ruolo nel plasmare gli ecosistemi in cui prosperano. La tendenza evolutiva della Laguna di Venezia sembra essere quella di diventare un braccio di mare, per via dell'erosione dei ghebi, delle velme e delle barene che supera il tasso di sedimentazione di materiale. Per cui, monitorare e mantenere cospicua la popolazione autoctona di *Spartina* sp. può rivelarsi un elemento importante nell'evitare gravi conseguenze sull'ecosistema lagunare e, in generale, mantenere l'equilibrio degli ecosistemi colonizzati da queste piante.

L'estrazione di acidi nucleici è l'imprescindibile punto di partenza per il sequenziamento di genomi e trascrittomi degli organismi presi in esame. Tuttavia, nel caso di *Spartina* sp., non esistono ancora protocolli di riferimento di estrazione di DNA ed RNA dai loro tessuti.

Per identificare metodi efficaci per l'estrazione di gDNA e RNA da tessuto fogliare di *Spartina* sp., si è ricorso alla combinazione di diversi fattori quali il metodo di omogeneizzazione, la quantità di tessuto di partenza e il metodo di estrazione.

Tabella 14. Risultati delle prove di estrazione di gDNA.

ID campione	Quantità (mg)	Conservazione	Tipo omogeneizzazione	Metodo estrazione	Q.tà estratta (µg)	Contaminaz. carboidrati	Contaminaz. Proteine	Qualità gDNA	Valutazione
CTAB mortaio 100 mg	100	seccato	Mortaio	CTAB	28.9	Si	No	Integro	X
CTAB biglie 100 mg	100	seccato	Biglie di vetro	CTAB	3.67	Si	Parziale	Integro	X
CTAB lka 100 mg	100	seccato	lka	CTAB	48.9	Si	No	Degradato	X
CTAB mortaio 20 mg	20	seccato	Mortaio	CTAB	1.70	Si	Parziale	Non definita	X
CTAB mortaio 40 mg	40	seccato	Mortaio	CTAB	5.49	Si	Parziale	Integro	X
CTAB mortaio 60 mg	60	seccato	Mortaio	CTAB	20.9	Parziale	No	Integro	V
CTAB lka 20 mg	20	seccato	lka	CTAB	8.07	Si	Parziale	Degradato	X
CTAB lka 40 mg	40	seccato	lka	CTAB	11.1	Si	Parziale	Degradato	X
CTAB (Biglie + N ₂) 20 mg	20	seccato	Biglie + N ₂	CTAB	8.04	Si	Parziale	Integro	X
CTAB (Biglie + N ₂) 40 mg	40	seccato	Biglie + N ₂	CTAB	6.54	Si	Parziale	Integro	X
CTAB (Biglie + N ₂) 60 mg	60	seccato	Biglie + N ₂	CTAB	18.7	Parziale	No	Integro	V
CTAB (Biglie e buffer) 40 mg	40	seccato	Biglie e buffer	CTAB	2.30	Si	Parziale	Integro	X
CTAB (Biglie e buffer) 60 mg	60	seccato	Biglie e buffer	CTAB	1.79	Si	Parziale	Integro	X
Zymo 60 mg	60	seccato	Biglie e buffer	Quick-DNA™ Plant/Seed Miniprep Kit	4.17	No	No	Degradato	X
GRISP PL1A 25 mg	25	seccato	Biglie + N ₂	GRS Genomic DNA Kit	4.76	No	No	Integro	V
GRISP PL1B 25 mg	25	seccato	Biglie + N ₂	GRS Genomic DNA Kit	0.955	Parziale	No	Integro	V
Qiagen PS 10 mg	10	seccato	Biglie e buffer	DNeasy® Plant Pro Kit	0.540	Parziale	No	Degradato	X
Qiagen 10 mg	10	seccato	Biglie e buffer	DNeasy® Plant Pro Kit	3.86	No	No	Degradato	X
Qiagen 10 mg N ₂	10	seccato	Biglie + N ₂	DNeasy® Plant Pro Kit	2.82	Si	No	Integro	X
Qiagen 20 mg	20	Seccato	Biglie + N ₂	DNeasy® Plant Pro Kit	3.59	No	No	Integro	V

In totale sono stati saggiati tre metodi di omogeneizzazione delle foglie di *Spartina* sp.: mortaio e pestello in azoto liquido, TissueLyser II con biglie di acciaio o di vetro (nei diversi *buffer* di estrazione o a secco dopo congelamento in azoto liquido) e T 10 basic ULTRA-TURRAX®. Si è deciso di scartare quest'ultimo dopo aver osservato una forte degradazione del gDNA nelle prime due prove di estrazione, dovuta probabilmente a un surriscaldamento dei campioni da parte dello strumento dato dalla grande quantità di tempo necessaria per la frammentazione. Gli altri due metodi, invece, nel corso dello studio hanno dimostrato di restituire campioni pressoché sempre integri con alcune eccezioni nel caso dell'utilizzo di biglie. Infatti, nel caso in cui i campioni siano stati omogeneizzati direttamente in *buffer* CTAB o nel *buffer* dei kit di estrazione del gDNA (prove 3 e 4) si è riscontrata una notevole degradazione dell'acido nucleico. Inoltre, sono state scartate le biglie di vetro a causa della ridotta efficacia di rottura del tessuto. Mentre, nelle prove di estrazione dell'RNA totale l'omogeneizzazione con le biglie di acciaio nei diversi *buffer* ha restituito buoni risultati sia a livello di rottura dei tessuti che di integrità dell'RNA estratto, analogamente all'utilizzo del mortaio. Per l'estrazione del DNA genomico (Tabella 14), sono stati messi alla prova sia il tradizionale metodo con CTAB (seguendo il protocollo definito da Allen *et al.*, 2006), che kit specifici per l'estrazione del DNA, basati su colonnine di silice (Zymo, GRiSP e Qiagen). Dalle prime tre prove si è visto che con l'estrazione con CTAB si ottengono ottimi risultati in termini di resa e qualità se l'omogeneizzazione avviene con mortaio o biglie ed azoto liquido, ma il DNA risulta troppo contaminato da polisaccaridi e fenoli. Si ha tuttavia un buon risultato in termini di rapporto di assorbanza 260/230 nella prova 2, pari a 1.58, con l'estrazione a partire da 60 mg di foglia omogeneizzati con mortaio. Le prove 5 e 6 hanno mostrato che l'estrazione con kit commerciali

restituisce DNA in minori quantità, ma con rapporti di assorbanza migliori. In particolare, il kit Qiagen e il kit GRiSP si sono dimostrati essere i più efficaci usando una quantità iniziale di tessuto pari a 20 mg e 25 mg rispettivamente. Data quindi la qualità migliore e il minor tempo necessario per eseguire il protocollo, si è concluso che il protocollo ottimale per l'estrazione di DNA genomico consiste nell'utilizzo di 20-25 mg di foglia omogeneizzata in TissueLyser II dopo congelamento in azoto liquido e processata con DNeasy® Plant Pro Kit o con GRS Genomic DNA Kit (utilizzando il *buffer* PL1A).

Tabella 15. Risultati delle prove di estrazione di RNA totale.

ID campione	Quantità (mg)	Conservazione	Durata conservazione	Tipo omogeneizzazione	Metodo estrazione	Q.tà estratta (µg)	Contaminaz. carboidrati	Contaminaz. Proteine	Qualità RNA (RIN)	Valutazione
Kit biglia	50	fresco	/	Biglie e <i>buffer</i>	RNeasy PowerPlant Kit	13.6	No	No	7.0	V
TRizol biglia	50	fresco	/	Biglie e <i>buffer</i>	TRizol	33.7	Parziale	No	7.2	V
TRizol mortaio	50	fresco	/	Mortaio	TRizol	6.49	Parziale	No	7.4	V
<i>Homemade</i> foglia intera	50	<i>RNAlater homemade</i>	4 °C (48 ore)	Biglie e <i>buffer</i>	RNeasy PowerPlant Kit	13.1	No	No	6.1	V
<i>Homemade</i> foglia a pezzi	50	<i>RNAlater homemade</i>	4 °C (48 ore)	Biglie e <i>buffer</i>	RNeasy PowerPlant Kit	8.27	No	No	5.9	V
<i>RNAlater</i> foglia a pezzi	50	<i>RNAlater commerciale</i>	4 °C (48 ore)	Biglie e <i>buffer</i>	RNeasy PowerPlant Kit	5.94	No	No	6.3	V
<i>RNAlater</i> foglia intera	50	<i>RNAlater commerciale</i>	4 °C (48 ore)	Biglie e <i>buffer</i>	RNeasy PowerPlant Kit	9.95	No	No	6.2	V
Foglia in pezzi	50	<i>RNAlater homemade</i>	4 °C O.N. + -20 °C (4 giorni)	Biglie e <i>buffer</i>	RNeasy PowerPlant Kit	5.31	No	No	5.9	V
Foglia intera	50	<i>RNAlater homemade</i>	4 °C O.N. + -20 °C (4 giorni)	Biglie e <i>buffer</i>	RNeasy PowerPlant Kit	3.94	No	No	5.2	V
Foglia intera TRizol	50	<i>RNAlater homemade</i>	4 °C O.N. + -20 °C (8 giorni)	Biglie e <i>buffer</i>	TRizol	19.2	No	No	5.3	X
Foglia GRiSP	50	<i>RNAlater commerciale</i>	4 °C (48 ore)	Biglie e <i>buffer</i>	RNeasy PowerPlant Kit	34.2	No	No	6.5	V
Foglia Thermo	50	<i>RNAlater commerciale</i>	4 °C (48 ore)	Biglie e <i>buffer</i>	RNeasy PowerPlant Kit	53.2	No	No	5.4	V
Foglia GRiSP -20° C	50	<i>RNAlater commerciale</i>	4 °C O.N. + -20 °C (4 giorni)	Biglie e <i>buffer</i>	RNeasy PowerPlant Kit	41.3	No	No	4.5	X
Foglia Thermo -20° C	50	<i>RNAlater commerciale</i>	4 °C O.N. + -20 °C (4 giorni)	Biglie e <i>buffer</i>	RNeasy PowerPlant Kit	43.6	No	No	4.7	X
Foglia in pezzi TRizol	50	<i>RNAlater commerciale</i>	4 °C O.N. + -20 °C (6 giorni)	Biglie e <i>buffer</i>	TRizol	31.1	Parziale	No	6.7	V

Per l'RNA totale (Tabella 15) i metodi di estrazione candidati sono stati sia il protocollo tradizionale con TripleXtractor, sia un kit specifico per l'estrazione di RNA, anche questo con colonnine di silice, l'RNeasy PowerPlant Kit. Dalla prima prova si è osservato che da foglia fresca si ottiene RNA integro e sufficientemente puro, indipendentemente dal protocollo seguito. Si sono, quindi, effettuate prove di estrazione dopo tempi e temperature diverse di conservazione in *RNAlater*, sia commerciale (GRiSP e Thermo Scientific) che *homemade*, per valutare l'efficacia dei due metodi di conservazione sul lungo periodo. La seconda prova ha mostrato che sia l'*RNAlater homemade* che quello commerciale (Thermo Fisher Scientific) mantengono integro l'RNA dopo una conservazione di 48 ore a 4 °C del tessuto, sia intero che in pezzi. Nella prova 3 si è voluto stabilire se vi fosse una differenza tra il conservare foglie in pezzi o intere in *RNAlater homemade* a -20 °C per 4 giorni. Dai risultati si è dedotto che, nonostante una lieve differenza di integrità, maggiore nel caso della foglia intera, la conservazione avviene in modo analogo alla prova 2. Dalla prova 4, invece, si è osservato che l'*RNAlater homemade* non ha permesso di conservare campioni a -20 °C per un periodo di 8 giorni, data la forte degradazione

del campione. Nelle due prove successive si sono confrontati gli RNA^{later} Thermo e GRiSP, per 2 giorni a 4 °C (prova 5) e per 4 giorni a -20 °C (prova 6), con estrazione in TRIzol, determinando che una conservazione a -20 °C di foglia intera non avviene correttamente, probabilmente a causa del fatto che l'RNA^{later} non penetra sufficientemente nei tessuti. L'ultima prova ha visto l'estrazione di foglia di *Spartina* sp. in pezzi conservata a -20 °C per 6 giorni in RNA^{later} commerciale, in questo caso GRiSP. L'RNA^{later} commerciale è riuscito a penetrare nel tessuto e a conservare efficacemente l'RNA, per cui si è stabilito che, se si desidera conservare foglie di *Spartina* sp. per una futura estrazione, è più indicato ridurre in pezzi il campione ed utilizzare un RNA^{later} commerciale. Il campione può poi essere processato sia tramite TripleXtractor che utilizzando l'RNeasy PowerPlant Kit.

Con questa tesi si è voluto identificare i protocolli migliori per l'estrazione del DNA genomico e dell'RNA totale da tessuti vegetali di piante del genere *Spartina* da utilizzare in progetti di genomica e trascrittomica.

6. BIBLIOGRAFIA

Allen, G. C., Flores-Vergara, M. A., Krasnyanski, S., Kumar, S., and Thompson, W. F. (2006). A Modified Protocol for Rapid DNA Isolation from Plant Tissues Using Cetyltrimethylammonium Bromide. *Nature Protocols*, 1(5), 2320–25.

Bag, S., Rauwolf, S., Schwaminger, S. P., Wenzel, W., and Berensmeier, S. (2021). DNA Binding to the Silica: Cooperative Adsorption in Action. *Langmuir*, 37(19), 5902–8.

D'Alpaos, C., and D'Alpaos, A. (2021). The Valuation of Ecosystem Services in the Venice Lagoon: A Multicriteria Approach. *Sustainability*, 13(17), 9485.

Heikrujam, J., Kishor, R., and Mazumder, P. B. (2020). The Chemistry Behind Plant DNA Isolation Protocols. In *Biochemical Analysis Tools—Methods for Bio-Molecules Studies*. IntechOpen.

Simms, D., Cizdziel, P. E., and Chomczynski, P. (1993). TRIzol: A new reagent for optimal single-step isolation of RNA. *Focus*, 15(4), 532-535.

Solidoro, C., Bandelj, V., Bernardi, F., Camatti, E., Ciavatta, S., et al. (2010). Response of the Venice Lagoon Ecosystem to Natural and Anthropogenic Pressures over the Last 50 Years. In *Coastal Lagoons*. CRC Press.

Strong, D. R., and Ayres, D. R. (2009). *Spartina* Introductions and Consequences in Salt Marshes: Arrive, Survive, Thrive, and sometimes Hybridize. In *Human Impacts on Salt Marshes*. University of California Press.

Strong, D. R., and Ayres, D. R. (2013). Ecological and Evolutionary Misadventures of *Spartina*. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 44(1), 389–410.