

## **SCHEDA LABORATORIO SCIENTIFICO n. 25**

### **FISIOLOGIA DELLE PIANTE COLTIVATE – PLANT CROP PHYSIOLOGY**

**Responsabile: PETRONIA CARILLO**

**Settori Scientifico-Disciplinari di riferimento:**

AGR/02

**RADoR: PETRONIA CARILLO**

**Tipologia: BIOCHIMICO, AGRONOMICO**

**Gruppi afferenti: FISIOLOGIA DELLE PIANTE COLTIVATE e GENETICA AGRARIA**

#### **LOCALIZZAZIONE E DESCRIZIONE**

- piano rialzato del corpo A del DiSTABiF (locale);
- dimensioni:
- n. 3 postazioni di lavoro

Nel laboratorio di Fisiologia delle piante coltivate si studiano le risposte metaboliche e fisiologiche di specie di interesse agronomico alla carenza di nutrienti, agli stress abiotici e al tipo di coltivazione (convenzionale, biologica, idroponica, eustress, microgravità, uso di biostimolanti).

#### **ATTIVITÀ SVOLTE NEL LABORATORIO**

1. Polverizzazione di materiale vegetale in azoto liquido.
2. Estrazione ed analisi di ioni mediante HPLC con lettore amperometrico
3. Profilo di amminoacidi e glicina betaina mediante HPLC con lettore DAD/FLD
4. Determinazione di zuccheri, proteine, prolina tramite saggio spettrofotometrico
5. Determinazione dell'attività di enzimi antiossidanti mediante saggio spettrofotometrico.

#### **RELAZIONE SINTETICA DESCRITTIVA DEL CICLO DI LAVORO E DELLE MODALITÀ OPERATIVE**

##### **1. Polverizzazione di materiale vegetale in azoto liquido**

Indossare i DPI necessari (guanti di protezione, occhiali di protezione, camice da laboratorio, visiera per liquidi criogenici).

Il materiale vegetale fresco viene polverizzato in un mortaio con l'utilizzo di azoto liquido. Aliquote di circa 10-50 mg di materiale polverizzato vengono trasferite in provette Eppendorf® da 1.5 o 2.0 mL e conservate a -80 °C.

##### **2. Estrazione ed analisi di ioni mediante HPLC con lettore amperometrico**

Indossare i DPI necessari (guanti di protezione, occhiali di protezione, camice da laboratorio, visiera per liquidi criogenici) e lavorare sotto cappa chimica per la preparazione delle fasi mobili (eluenti).

I campioni da sottoporre ad analisi vengono mescolati ad acqua ultrapura in rapporto 1:10 e sottoposti a tre cicli di congelamento-scongelo in azoto liquido. La sospensione viene centrifugata ed iniettata

all'HPLC mediante un autocampionatore. Gli eluenti utilizzati sono rispettivamente NaOH per gli anioni e  $\text{CH}_4\text{O}_3\text{S}$  per i cationi.

#### PRIMA DELL'UTILIZZO DELL'HPLC (Attività 2 e 3)

- Al primo utilizzo leggere attentamente le istruzioni di sicurezza fornite dal costruttore.
- Indossare i DPI necessari (guanti di protezione, occhiali di protezione, camice da laboratorio).
- Assicurarci che i liquidi di scarto siano convogliati in tanica di raccolta.
- Assicurarci che i contenitori degli eluenti in ingresso all'HPLC siano dotati di tappi di sicurezza, con chiusura ermetica e sistema filtrante.
- Assicurare un adeguato ricambio d'aria nel locale.

#### DURANTE L'UTILIZZO

- Verificare il corretto avvio delle analisi.
- Non intervenire di propria iniziativa sui componenti della strumentazione e non manomettere parti della strumentazione.
- Segnalare tempestivamente eventuali malfunzionamenti o guasti al Responsabile delle Attività (RAdoR).

#### DOPO L'UTILIZZO

- Spegnerne la strumentazione, procedere a pulizia superfici interne e a riordino banco di lavoro.
- Svuotare la tanica di raccolta degli scarti quanto presenti liquidi per una frazione compresa fra  $\frac{1}{2}$  e  $\frac{3}{4}$  dell'intero volume del contenitore.
- Conservare le taniche degli scarti sotto cappa per il solo tempo indispensabile alle esigenze del laboratorio; trasferire poi all'interno del deposito temporaneo per rifiuti pericolosi in attesa dello smaltimento seguendo le procedure indicate dal RAdoR.

### 3. Profilo di amminoacidi e glicina betaina mediante HPLC con lettore DAD/FLD

Indossare i DPI necessari (guanti di protezione, occhiali di protezione, camice da laboratorio, e lavorare sotto cappa chimica per la preparazione delle soluzioni di eluenti.

Per l'analisi degli amminoacidi liberi, i campioni vengono disciolti in etanolo 60% con una diluizione 1:50. Aliquote delle sospensioni vengono derivatizzate con *orto*ftalaldeide (OPA) e iniettate all'HPLC mediante l'utilizzo di un autocampionatore. Gli amminoacidi sono separati su colonna mediante gradiente discontinuo di due solventi. Il solvente 1 è una miscela di acetato di sodio, tetraidrofurano e metanolo, mentre il solvente 2 è metanolo puro.

Per l'analisi della glicina betaina, i campioni sono mescolati ad acqua ultrapura in rapporto 1:20 e sottoposti a tre cicli di congelamento-scongelo in azoto liquido. La sospensione viene centrifugata, filtrata su colonna a scambio anionico (resina AG1 8X), ed iniettata all'HPLC mediante un autocampionatore. L'eluente utilizzato è una miscela di acido 1-eptansolfonico sale sodico, solfato di sodio e acqua deionizzata.

### 4. Determinazione di zuccheri, proteine, prolina tramite saggio spettrofotometrico

Lavorare sotto cappa chimica e indossare i DPI necessari (guanti di protezione, occhiali di protezione, camice da laboratorio).

Aliquote di materiale vegetale polverizzato vengono mescolate in rapporto 1:20 ad un tampone di estrazione solitamente costituito da etanolo 80%/60% (zuccheri), TRIS-HCl e  $\text{MgCl}_2$  (proteine), o etanolo 60% (prolina) ed eventualmente estratti a caldo (80 °C, per zuccheri). Le sospensioni centrifugate vengono sottoposte a saggio enzimatico accoppiato a riduzione di NAD o NADP utilizzando miscele di tamponi ed enzimi (zuccheri), o a saggio colorimetrico utilizzando reagenti come Coomassie brilliant blue G-250 (proteine) o ninidrina (prolina).

### 5. Determinazione dell'attività di enzimi antiossidanti mediante saggio spettrofotometrico.

Lavorare sotto cappa chimica e indossare i DPI necessari (guanti di protezione, occhiali di protezione, camice da laboratorio).

Aliquote di materiale vegetale polverizzato vengono mescolate in rapporto 1:40 ad un tampone di estrazione costituito da tampone fosfato, EDTA e polivinilpirrolidone. Dopo centrifugazione, aliquote della sospensione sono mescolate ai tamponi di saggio contenenti tampone fosfato, EDTA e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> per la determinazione dell'attività della catalasi, o tampone fosfato, ascorbato, EDTA e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> per l'ascorbato perossidasi allo spettrofotometro.

#### **Lista delle attrezzature presenti:**

- Centrifuga per Eppendorf
- pH-metro
- Piastre riscaldanti/agitanti n. 2
- Pompe a membrana da vuoto n. 1
- Sistemi HPLC analitici con rivelatori FLD/DAD o amperometrico
- Vortex
- Spettrofotometro ELISA

#### **Lista dei Dispositivi di Protezione Generale (DPG)**

- Cappa chimica
- Armadio per liquidi infiammabili

#### **Lista dei Dispositivi di Protezione Individuali (DPI) ad uso personale degli operatori**

- Occhiali di protezione
- Guanti in nitrile e in lattice (verie misure)
- Visiera per liquidi criogenici
- Visiera protettiva
- Guanti per liquidi criogenici
- Grembiule per liquidi criogenici
- Guanti per autoclave
- Mascherine a carbone attivo per acidi/solventi
- Mascherine per polveri

#### **Categorie ISI WEB di riferimento**

Biochemistry, Food science, Plant science, Agriculture/Agronomy, Instruments & instrumentations

#### **Categorie ERC di riferimento**

LS1\_2 Biochemistry

LS2\_9 Metabolomics

LS2\_13 Systems biology

LS9\_8 Applied plant sciences, plant breeding, agroecology and soil biology

LS9\_5 Food biotechnology and bioengineering