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-scongelamento. La sospensione viene centrifugata ed iniettata all'HPLC mediante un autocampionatore.

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).
- Assicurarsi che i contenitori degli eluenti in ingresso all'HPLC siano dotati di tappi di sicurezza, con chiusura ermetica e sistema filtrante.
- Assicurarsi che gli eluati siano convogliati in tanica di raccolta.
- 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

- Spegnere la strumentazione, procedere a pulizia superfici interne e a riordino banco di lavoro.
- Svuotare la tanica di raccolta degli eluati quanto presenti liquidi per una frazione compresa fra ½ e ¾ dell'intero volume del contenitore.

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 sopensioni vengono iniettate all'HPLC mediante l'utilizzo di un autocampionatore. Gli amminoacidi sono separati su colonna mediante gradiente discontinuo .

Per l'analisi della glicina betaina, i campioni sono mescolati ad acqua ultrapura in rapporto 1:20 e sottoposti a tre cicli di congelamento-scongelamento. La sospensione viene centrifugata, filtrata su colonna a scambio anionico, ed iniettata all'HPLC mediante un autocampionatore, e determinata in gradiente continuo.

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 ed estratti (a 80 °C per zuccheri, a freddo per gli altri campioni). Le sospensioni centrifugate vengono sottoposte a saggio enzimatico accoppiato utilizzando miscele di tamponi ed enzimi (zuccheri), o a saggio colorimetrico (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. Dopo centrifugazione, aliquote della sospensione sono mescolate ai tamponi di saggio per la determinazione dell'attività degli enzimi 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

SCHEDE DI SICUREZZA