



Dottorato di Ricerca in Scienze delle Produzioni Vegetali e Animali
PhD Programme in Plant and Animal Science
Codice del Corso di Dottorato/PhD code: DOT1335834
Coordinatore/Coordinator: Prof. Roberta BERNINI

Scheda delle attività svolte/Form activities carried out

Informazioni generali/General information

Ciclo/Cycle 38

Dottorando/PhD student D`Attilia Chiara

Posizione/Position

Con borsa di studio/With scholarship

Senza borsa di studio/Without scholarship

Riservata a dipendenti di enti di ricerca/Reserved for research center employees

Dottorato industriale/Industrial PhD

Altra tipologia/Other typology

Tutor/Supervisor

Prof. Sestili Francesco

Affiliazione/Affiliation

Co-tutor

Dott. Palombieri Samuela

Affiliazione/Affiliation

Attività di ricerca/Research activity

Sede prevalente dell'attività di ricerca/Main place of research

Breve descrizione dell'attività di ricerca/Short description of the research activity

(Max 5000 caratteri, inclusi gli spazi/Max 5000 characters, included spaces)

Le prevalenti attività svolte durante il primo anno di dottorato, riguardano due diverse linee di ricerca, entrambe focalizzate sull'incremento di resa nel frumento duro mediante approcci di ingegneria genetica.

L'obiettivo del primo progetto consiste nell'ottenimento di due distinti mutanti capaci di accumulare diverse quantità di BR. Ci si aspetta che: i) il mutante *ibh1* sia potenzialmente in grado di accumulare livelli maggiori di BR portando ad un incremento delle rese; diversamente: ii) il mutante *gata7* accumulerà minori livelli di BR, determinando un fenotipo semi-nano e incrementando la tolleranza all'allettamento.

A tale scopo sono stati innanzitutto clonati costrutti di genome editing per i due geni target.

Nella fase iniziale, sono state svolte analisi bioinformatiche per progettare sgRNA (guide ad RNA) in regioni altamente conservate dei due omeoalleli, per garantire un silenziamento genico completo. Sono stati clonati due costrutti per ciascun gene target, ognuno contenente due sgRNA. La tecnica di clonaggio utilizzata si basa sull'approccio golden gate e include due diverse fasi, il 1 livello, ovvero, l'inserimento delle guide in un costrutto contenente il promotore TaU6 e RNA scaffold, ed il 2 Livello, ovvero, l'assemblaggio di tutti i componenti necessari all'editing (gene di resistenza all'igromicina, Cas9, SgRNAs e proteina GRF). Per il clonaggio di primo livello si utilizzano gli ezimi T4 (ligasi) e Bsal (enzima di restrizione di tipo II) mentre il secondo livello gli enzimi T4 (ligasi) e BbsI (enzima di restrizione di tipo II). Gli assemblaggi del primo e secondo livello sono stati controllati accuratamente mediante: i) digestione enzimatica del DNA plasmidico, rispettivamente utilizzando, Bpl e BglII; ii) sequenziamento, rispettivamente con tecnica sanger e NGS.



Il ceppo di *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 è stato trasformato e cresciuto su terreno di coltura LB con rifampicina e kanamicina. Sono stati ottenuti due inoculi standard per ciascun gene target. I costrutti sono stati utilizzati per trasformare giovani embrioni (14 giorni post antesi). In totale, sono stati trasformati 100 embrioni per ciascun costrutto, in totale 200 per ciascun gene bersaglio.

L'analisi copy number PCR è in corso per valutare l'inserimento del costrutto nel genoma delle piante. Saranno selezionate le linee con basso numero di copie del costrutto, accelerando così l'eliminazione del T-DNA. Saranno impiegate due diverse strategie di sequenziamento per lo screening dell'editing genetico. Per IBH1, si effettuerà lo screening mediante sequenziamento NGS con una singola coppia di primer che copre entrambi gli omeoalleli, mentre per GATA7 si sfrutterà il sequenziamento con tecnica Sanger. Le attività del progetto mirate all'editing delle piante sono state svolte presso il John Innes Centre, a Norwich (Regno Unito), sotto la supervisione della Professoressa Wendy Harwood. Sui due mutanti verranno svolte anche analisi biochimiche e fenotipiche al fine di studiare la funzione dei due geni nel pathway dei brassinosteroidi in frumento duro.

Il secondo progetto ha l'obiettivo di indurre la sovraespressione del gene *Ton1b* al fine di aumentare la resa in granella del frumento duro. *Ton1b* è un gene coinvolto nella dimensione del seme, in particolare nell'allungamento. A tale scopo è stato progettato un costrutto contenente il gene *Ton1b* sotto il controllo di un promotore endosperma specifico del frumento tenero ed basato sul sistema CRE-lox. La nucleasi CRE, se attivata, permette di rimuovere il T-DNA producendo piante intrageniche.

Ottenuto il costrutto sono stati trasformati calli mediante metodi biolistico, le piante rigenerate sono state testate per la presenza del vettore pCreloxpGEMTeasy-ton1b, mediante PCR. Lo screening molecolare è stato eseguito sulla generazione T0, T1, T2 e T3. Le piante positive e non più segreganti, in generazione T3, sono state fenotipizzate per caratteri sia morfologici che di resa. L'analisi statistica ha rivelato un incremento significativo nel peso di 100 semi nelle linee intrageniche rispetto al controllo (nulle segreganti) ma inaspettatamente non è stata riscontrata una diminuzione del numero dei semi. I tratti morfologici delle piante non hanno mostrato differenze significative. Inoltre, la valutazione delle dimensioni dei semi attraverso il software SMARTGRAIN ha determinato una differenza significativa nella lunghezza del seme tra le linee intrageniche ottenute e le linee nulle segreganti, a favore delle prime. Infine, l'analisi dell'espressione genica tramite real time PCR è in corso per valutare: i) il livello di trascrizione di *Ton1b* nelle linee intra-geniche rispetto al Wild Type e alle nulle segreganti; ii) la correlazione del livello di trascrizione tra *Ton1b* e geni correlati. Infine verranno svolte analisi biochimiche per valutare il contenuto di amido e proteine nella granella e valutazioni dell'attività fotosintetica.

Pubblicazioni scientifiche/Scientific publications (Indicare tutte le informazioni bibliografiche dei lavori pubblicati e sottomessi/Indicate all references of published and submitted papers)	
Comunicazioni a congressi/Conferences communications (Specificare se comunicazioni poster o comunicazioni orali/Specify if poster or oral communications)	Comunicazione poster: "Wheat yield increase through overexpression of the Ton1b gene". 66th SIGA annual congress, Bari 5-8 Settembre 2023. Premio per presentazione poster.
Brevetti/Patents (Specificare/Specify)	
Altre tipologie di pubblicazioni/Other publications (Specificare/Specify)	
Attività formative/Training activities (Elencare tutte le principali attività svolte e, per ciascuna di esse, indicare i dati richiesti/List the main activities and for each specify of them the data)	

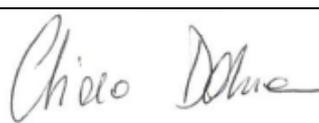


Frekuensi di corsi/Partecipation in courses	Titolo/Title	Località/Location	Data/Date
Partecipazione a seminari/ Partecipation in seminars	Seminar - EUROPEAN GREEN DEAL AND FARM TO FORK STRATEGY. WHAT SHORT-TERM IMPACTS FOR ITALIAN FARMS, AND WHAT STRATEGIES IN THE MEDIUM-LONG TERM? Prof. Raffaele CORTIGNANI/Dott. Davide DELL'UNTO	Viterbo	Marzo 202
	Seminar - »THE ROLE OF ENDOGENOUS ENZYMES IN THE EVOLUTION OF SENSORIAL CHARACTERISTICS OF PLANT-BASED FOODS«. Prof.ssa Katia LIBURDI	Viterbo	17/04/2023
	Seminar - MODELLING PEST AND DISEASES: AN OVERVIEW FROM THEORETICAL TO PRACTICAL ASPECTS. Dott. Luca ROSSINI	Viterbo	19/04/2023
	Seminar - "Point-of-care tools for plant pathogens detection", Dott.ssa Sara FRANCESCONI	Viterbo	21/04/2023
	Seminar "PROTOPLAST TECHNOLOGY FOR DNA-FREE GENOME EDITING". Dott. Cristian SILVESTRI	Viterbo	27/04/2023
	Seminar "ENHANCING THE NUTRITIONAL	Viterbo	28/04/2023.



	<p>QUALITY OF MAJOR FOOD CROPS THROUGH CLASSICAL AND NEW BREEDING TECHNIQUES". Dott.ssa Samuela PALOMBIERI</p> <p>Corso - "Genetics and physiology of field of relevant crop species and climate changes", Prof. Liljana Kuzmanovich.</p> <p>Corso - «Europrogettazione», Dott. Massimo Romanelli.</p> <p>Corso- «Metodologie avanzate applicate ai processi di trasformazione alimentare», Prof. Ilaria Benucci.</p> <p>Corso - «Principi attivi delle piante», Prof. Roberta Bernini.</p>	<p>Viterbo</p> <p>Viterbo.</p> <p>Viterbo.</p> <p>Viterbo.</p>	<p>Giugno 2023.</p> <p>March 2023,</p> <p>June 2023,</p> <p>June 2023,</p>
<p>Partecipazione a convegni, workshop, scuole/Participation in workshop, schools</p>	<p>Congress - Durum Days 2023</p> <p>Congress - 66th annual SIGA congress</p> <p>Annual Science Meeting</p>	<p>Foggia</p> <p>Bari</p> <p>John Innes Centre, Norwich (UK)</p>	<p>17/05/2023</p> <p>5-8/09/2023</p> <p>11-13/10/2023</p>
<p>Stage in Italia e/o all'estero/Internship in Italy and/or abroad (Indicare la località e descrivere brevemente il tipo di attività svolta/Indicate the location and describe briefly the activity carried out)</p>	<p>Manipolazione genetica mediante approccio di genome editing su piante di frumento duro. In particolare; disegno delle guide, clonaggio, trasformazione</p>	<p>John Innes Centre, Norwich (UK)</p>	<p>18 Giugno 2023- 25 Ottobre 2023</p>



	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (ceppo AGL1), genome editing (trasformazione mediata da <i>A. tumefaciens</i>) di embrioni di frumento duro.		
Altre attività formative/Further educational activities (Indicare la località e descrivere brevemente il tipo di attività svolta/Indicate the location and describe briefly the activity carried out)	Partecipazione al corso: "Programmare in Python"	Online	20-21 febbraio 2023
Attività di didattica integrativa/Teaching activity (Elencare tutte le attività svolte e, per ognuna, indicare i dati richiesti/List all activities and specify for each of them the data)			
Attività di tutoraggio e didattico-integrative/Tutorship activities	Titolo/Title	Località/Location	Data/Date
Seminari in corsi di laurea/Seminars in master degrees (Indicare il titolo, la località, la data/Specify the title, the location and the date)			
Data/Date 19/10/2023			
Firma Dottorando/Signature PhD student 			
Firma Tutor/Signature Supervisor			