



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
XXXVIII

Dottorando/PhD student
Eleonora Fabene

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. Luca Santi
Affiliazione/Affiliation
DAFNE - Università degli Studi della Tuscia

Co-tutor
Dott.ssa Olivia Demurtas, Dott. Gianfranco Diretto
Affiliazione/Affiliation
Centro di ricerca ENEA - Casaccia

Attività di ricerca/Research activity

Sede prevalente dell'attività di ricerca/Main place of research
Laboratorio BIOTEC, centro di ricerca ENEA - Casaccia

Breve descrizione dell'attività di ricerca/Short description of the research activity
(Max 5000 caratteri, inclusi gli spazi/Max 5000 characters, included spaces)

L'attività di ricerca proposta nel presente progetto di Dottorato prevede lo studio di nuovi geni coinvolti nelle vie biosintetiche di carotenoidi ed apocarotenoidi in piante di interesse agrario ed in altre specie di interesse per lo sviluppo di nuovi nutraceutici e cosmetici.

In una prima fase, le attività hanno previsto analisi bioinformatiche e di tipo genetico volte a definire le specie modello e i geni *target* su cui focalizzare le attività sperimentali. Quest'ultime si focalizzeranno sullo studio dell'attività enzimatica delle proteine di interesse, che sarà condotto mediante esperimenti di genetica diretta e di genetica inversa.

Gli esperimenti di genetica diretta consistono nello svolgimento di saggi enzimatici *in vitro* ed *in vivo*. Nel primo caso, la trasformazione di selezionati ceppi di *E. coli*, come il ceppo BL21(DE3) pGro7, permette di ottenere proteine ricombinanti con il corretto *fold* che possono essere utilizzate in reazioni enzimatiche *in vitro*, dove l'enzima prodotto dal batterio ed ottenuto nell'estratto proteico grezzo è unito con il substrato metabolico dal quale si ipotizza venga prodotto il metabolita di interesse. I saggi enzimatici *in vivo* prevedono, invece, di sfruttare ceppi microbici ingegnerizzati in grado di produrre carotenoidi (come licopene, β -carotene o



zeaxantina). In questo caso, in batterio, oltre la produzione dell'ipotetico substrato, si ha anche quella della proteina ricombinante candidata allo svolgimento della specifica reazione enzimatica. Durante il primo anno di Dottorato, sono stati identificati i primi geni candidati di interesse, coinvolti nella biosintesi e regolazione di carotenoidi e apocarotenoidi nelle specie considerate. Si è proceduto, quindi, con il loro isolamento e clonaggio in vettori plasmidici, che permetteranno la loro espressione nei sistemi batterici precedentemente descritti. Le attività future prevederanno, inoltre, di effettuare saggi enzimatici di tipo combinatoriale, in cui i ceppi microbici sono trasformati con diversi costrutti, ognuno che permette l'espressione di un gene potenzialmente coinvolto nella via biosintetica di interesse, così da fornire primi risultati sul loro possibile ruolo in essa ed investigare a più ampio spettro sui *pathway* di biosintesi considerati. Le analisi metaboliche sui prodotti ottenuti verranno condotte mediante HPLC accoppiato a spettrometria di massa ad alta risoluzione (HPLC-HRMS).

Gli esperimenti di genetica inversa si basano sull'impiego della tecnica del *genome editing* (mediante sistema CRISPR/Cas-9) per ottenere dei *knock-out* dei geni candidati di interesse che consentono di indagare sulla rispettiva funzione enzimatica. I costrutti genetici necessari per promuovere l'*editing* dei geni candidati potenzialmente coinvolti nella via di biosintesi di nuovi apocarotenoidi in pomodoro (specie vegetale di maggiore interesse nel presente progetto di Dottorato) sono stati ottenuti mediante la tecnica del *Golden Braid cloning* (Sarrion-Perdigones A. et al., 2011; Sarrion-Perdigones A. et al., 2014). Le linee di pomodoro mutanti prodotte dalla trasformazione con i costrutti genetici ottenuti saranno oggetto di una caratterizzazione a livello fenotipico, molecolare e biochimico. Le analisi di genotipizzazione sono state effettuate con PCR di *screening* ed analisi di sequenziamento del sito *target* del materiale genetico estratto dalle linee editate, mentre la caratterizzazione di tipo biochimico sarà condotta mediante analisi metabolomiche "*targeted*" su carotenoidi e apocarotenoidi oggetto di studio, ed "*untargeted*" con lo scopo di valutare i cambiamenti nel profilo metabolico globale. Le analisi fenotipiche saranno effettuate mediante valutazioni microscopiche e macroscopiche delle piante cresciute in serre e camere di crescita usando varie condizioni di coltivazione, illuminazione, temperatura e umidità.

Le attività sperimentali principali del presente Dottorato di ricerca si focalizzano, quindi, sullo studio di vie biosintetiche non ancora caratterizzate in specie vegetali che accumulano alti livelli di carotenoidi e apocarotenoidi come il pomodoro, sono anche materiali vegetali di interesse gli stigmi di zafferano (*Crocus sativus*) e i semi della pianta selvatica *Ditaxis heterantha*. In seguito, verranno valutate altre specie vegetali di interesse agronomico, nutraceutico e cosmetico.

Pubblicazioni scientifiche/Scientific publications (Indicare tutte le informazioni bibliografiche dei lavori pubblicati e sottomessi/Indicate all references of published and submitted papers)	1-"Pigment-Related Mutations Greatly Affect Berry Metabolome in San Marzano Tomatoes" <i>Dono G., Rambla J.L., Frusciante S., Fabene E., Gómez-Cadenas A., Granell A., Diretto G. and Mazzucato A. - Horticulturae</i> 8.2 (2022): 120. (doi.org/10.3390/horticulturae8020120) 2-"Re-discovering <i>Prunus</i> fruit varieties as antiangiogenic agents by metabolomic and bioinformatic approach." <i>Cioni E., De Leo M., Cacciola A., D'Angelo V., Germano M.P., Camangi F., Ricci D., Fabene E., Diretto G., De Tommasi N., Braca A. - Food Chemistry</i> (2023):137574. (doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137574)
Comunicazioni a congressi/Conferences communications (Specificare se comunicazioni poster o comunicazioni orali/Specify if poster or oral communications)	1-"Promotion of Mediterranean lifestyle and healthy diet: the PRIMA project PROMEDLIFE" <i>Fabene E., Sandri C., Ricci D., Sulli M., Nardi L., Bennici E., Demurtas</i>



	O.C., <i>Diretto G.</i> (Poster a convegno SIGA – Bari, 5-8 settembre 2023).		
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)			
	Titolo/Title	Località/Location	Data/Date
Frequenza di corsi/Partecipation in courses	1-“Europrogettazione” <i>Dott. Massimo Romanelli</i>	1-DAFNE (Unitus)	1-17-24-31/03 e 21/94/2023
	2-“Genetics and physiology of field of relevant crop species and climate changes” <i>Prof.ssa Ljiljana Kuzmanović</i>	2-DAFNE (Unitus)	2-13-15-16/06/2023
	3-“Metodologie avanzate applicate ai processi di trasformazione alimentare” <i>Prof.ssa Ilaria Benucci</i>	3-DAFNE (Unitus)	3-19-20-21-22/06/2023
	4-“Principi attivi delle piante” <i>Prof.ssa Roberta Bernini</i>	4-DAFNE (Unitus)	4-21-22-23/06/2023
Partecipazione a seminari/ Partecipation in seminars	1-“Engineering antioxidants in fruits and tubers” <i>Prof. Antonio Granell Richart</i>	1-CR ENEA (Divisione SSPT-BIOAG)	1-17/02/2023
	2-“Serbian Entomofauna: what we find and what we eat?” <i>Prof. Miloš Petrović</i>	2- DAFNE (Unitus)	2-27/02/2023
	3-“European green deal and farm to fork strategy. what short- term impacts for italian farms, and what strategies in the medium-long term?” <i>Prof. Raffaele Cortignani, Dott. Davide Dell’Unto</i>	3- Online	3-14/04/2023
	4-“Modelling pest and diseases: an overview	4- Online	4-19/04/2023



	from theoretical to practical aspects" <i>Dott. Luca Rossini</i>		
	5-"Point-of-care tools for plant pathogens detection" <i>Dott.ssa Sara Francesconi</i>	5- Online	5-21/04/2023
	6-"Protoplast technology for DNA-free genome editing" <i>Dott. Cristian Silvestri</i>	6- Online	6-27/04/2023
	7-"Enhancing the nutritional quality of major food crops through classical and new breeding techniques" <i>Dott.ssa Samuela Palombieri</i>	7- Online	7-28/04/2023
	8-"Microbiome-based approaches for a sustainable agriculture" <i>Dott.ssa Annamaria Bevivino</i>	8- Online	8-8/05/2023
	9-"Plant cell cultures: back to the future" <i>Dott.ssa Silvia Massa</i>	9- Online	9-10/05/2023
	10-"The two-faced plant viruses: from plant pathogen to smart nanoparticles" <i>Dott.ssa Chiara Lico</i>	10- Online	10-15/05/2023
	11-"Plant-based production of veterinary vaccines and diagnostics" <i>Dott.ssa Selene Baschieri</i>	11- Online	11-22/05/2023
	12-"Preclinical research models and their applications in drug discovery" <i>Dott.ssa Francesca Palone</i>	12- Online	12-24/05/2023
Partecipazione a convegni, workshop, scuole/Partecipation in workshop, schools	1-"Tomato plant and fruit phenotyping: training course"	1-Online	1-03/07/2023



	organizzato da Harnesstom e RoxyCOST		
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)	1-Tirocinio svolto presso il CREA di Pontecagnano per la genotipizzazione di mutanti di pomodoro editati con sistema CRISPR/Cas9; 2-Periodo all'estero presso IBMCP di Valencia per la costruzione di vettori plasmidici per ottenere l'editing di geni potenzialmente coinvolti nella biosintesi di nuovi apocarotenoidi di interesse in pomodoro.	1-CREA – Centro di ricerca orticoltura e florovivaismo di Pontecagnano (SA); 2-IBMCP - <i>Instituto de Biologia Molecular y Celular de Plantas</i> , UPV-CSIC (Valencia, Spagna)	1-Dal 26/06/2023 al 30/06/2023 2-Dal 04/09/202 al 08/10/2023
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)			
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)			
	Titolo/Title	Località/Location	Data/Date
Attività di tutoraggio e didattico-integrative/Tutorship activities			
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 17/10/2023			
Firma Dottorando/Signature PhD student <i>Eleonora Fabene</i>			
Firma Tutor/Signature Supervisor <i>[Signature]</i>			