



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

XXXVI

Dottorando/PhD student

Luca Bonfiglioli

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.ssa Carla Ceoloni

Affiliazione/Affiliation

Università degli Studi della Tuscia

Co-tutor

Prof. Mario A. Pagnotta

Affiliazione/Affiliation

Università degli Studi della Tuscia

Attività di ricerca/Research activity

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

Università degli Studi della Tuscia

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

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

Durante l'anno accademico 2020/2021 È stata effettuata una prova in campo sotto regime biologico presso l'azienda didattica-sperimentale "Nello Lupori" dove 27 genotipi di frumento duro sono stati valutati per tratti morfologici, resa e qualità della granella. Grazie alla collaborazione con tre agricoltori è stato possibile valutare alcuni genotipi in tre areali differenti: in prossimità della costa, in collina, ed in ambiente montano. È stato inoltre effettuato in laboratorio un primo esperimento pilota in idroponica dove alcuni genotipi di frumento duro sono stati sottoposti a stress salino (NaCl) e siccità. Una volta individuate le linee più tolleranti, è stato effettuato un esperimento in serra dove sono stati allestiti tre bancali, rispettivamente per il controllo, per il trattamento con sale (250mM NaCl) e per il trattamento con stress idrico. Una cisterna da 500 litri è stata allestita per il bancale del trattamento con sale, un'altra invece per il bancale del controllo e per quello del trattamento con siccità. Ogni cisterna è stata riempita con una soluzione nutriente nota e munita di pompa, che attivata da un timer digitale, irrigava tramite impianto a goccia ogni vaso del rispettivo bancale. Il disegno sperimentale a blocchi randomizzati ha previsto l'utilizzo di 6 genotipi suddivisi in 3 repliche, seminati con un seme per vaso su substrato di sabbia in quantità nota ed uguale. Sono stati individuati 4 stadi fenologici di interesse: stadio della terza foglia, accostimento, levata e spigatura. Le piante sono state



analizzate per ciascun stadio fenologico con delle analisi distruttive morfologiche epigee ed ipogee (tramite lavaggio delle radici e analisi con software WinRHIZO). Inoltre, per ogni stadio fenologico, sono stati prelevati campioni di RNA.

Durante l'anno accademico 2021/2022 è stata ripetuta la prova in campo di frumento duro in biologico con l'aggiunta di 14 nuovi genotipi. L'esperimento ha seguito le stesse modalità di design e campionamento dell'anno precedente. I semi ottenuti dagli incroci dell'anno precedente sono stati seminati sia in campo (fila-spiga) che in serra. È stata ripetuta la prova in campo in collaborazione con gli agricoltori ed inoltre sono stati organizzati degli eventi in cui gli agricoltori di tutto il territorio invitati a valutare i genotipi.

Nello stesso anno è stato anche ripetuto l'esperimento in serra con le stesse modalità di irrigazione e somministrazione dello stress salino e idrico. Sono state utilizzate 6 repliche per ciascun genotipo; su 3 repliche si sono ripetute le stesse analisi morfologiche distruttive dell'anno precedente, sulle altre 3 repliche a fine ciclo biologico si è valutata la capacità di ripresa post-stress. È stato prelevato RNA per effettuare l'analisi di espressione dei geni target coinvolti nella tolleranza allo stress idrico e salino. Una ulteriore analisi genotipica con SSR associati a tratti di interesse per la produzione in regime biologico è stata effettuata sia sui genotipi valutati in serra che su quelli valutati in campo. Si è rilevata un'associazione tra 13 dei marcatori molecolari utilizzati con 24 QTL correlati ai tratti di interesse.

Dal 1 settembre 2022 al 30 aprile 2023 è stato svolto un periodo di soggiorno all'estero presso l'Istituto di Ricerca IAS-CSIC di Cordova in Spagna con l'obiettivo di apprendere i metodi di applicazione del sistema CRISPR/Cas su geni coinvolti alla tolleranza agli stress abiotici. È stata effettuata una prima attività di ricerca bibliografica, seguita dall'apprendimento dei software utilizzati per il design di marcatori molecolari, sviluppo RNA guida, e analisi plasmidi contenenti il sistema CRISPR/Cas. Identificato il gene di interesse tramite PCR, sono stati sviluppati gli RNA guida che, prima di essere inseriti in vettori plasmidici tramite ligazione, sono stati valutati virtualmente sulle sequenze dei geni in database. Una volta preparati i plasmidi, sono stati isolati gli embrioni immaturi di frumento duro e bombardati con il plasmide tramite Gene Gun. L'analisi dell'efficienza del plasmide costruito è stata effettuata tramite trasformazione dei protoplasti. Terminato il periodo all'estero, sono stati effettuati i campionamenti in campo sull'ultimo anno di prova su frumento duro in biologico con i 14 nuovi genotipi valutati per il secondo anno, e 10 scelti in quanto risultati essere i migliori nelle prove degli anni passati. L'esperimento ha previsto lo stesso design sperimentale e gli stessi campionamenti degli anni passati. Dalle analisi statistiche effettuate sulle prove in campo in più anni è stato selezionato un genotipo e quindi inviato al Ministero dell'Agricoltura per le prove preliminari di registrazione all'albo varietale. Per gli stessi tratti sono stati valutati in parcelle di 2.5 m² 16 incroci effettuati dal team del laboratorio negli anni passati. È stata inoltre effettuata un'analisi genotipica su cDNA delle piante sottoposte in serra a stress idrico e stress salino. Tramite metodo HRM sono stati identificati alcuni dei geni coinvolti nella tolleranza e tramite sequenziamento sono state rilevate delle mutazioni geniche dovute allo stress stesso.

Pubblicazioni scientifiche/Scientific publications
(Indicare tutte le informazioni bibliografiche dei lavori pubblicati e sottomessi/Indicate all references of published and submitted papers)

- Urbanavičiūtė, I.; Bonfiglioli, L.; Pagnotta, M.A. One Hundred Candidate Genes and Their Roles in Drought and Salt Tolerance in Wheat. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 6378. <https://doi.org/10.3390/ijms22126378>
- Urbanavičiūtė, Ieva, Luca Bonfiglioli, and Mario A. Pagnotta. "Phenotypic and genotypic diversity of roots response to salt in durum wheat seedlings." *Plants* 12.2 (2023): 412. <https://doi.org/10.3390/plants12020412>



| | |
|--|--|
| | <ul style="list-style-type: none">Urbanavičiūtė, I.; Bonfiglioli, L.; Pagnotta, M.A. Diversity in Root Architecture of Durum Wheat at Stem Elongation under Drought Stress. <i>Agronomy</i> 2022, 12, 1329. https://doi.org/10.3390/agronomy12061329 |
| <p>Comunicazioni a congressi/Conferences communications (Specificare se comunicazioni poster o comunicazioni orali/Specify if poster or oral communications)</p> | <p>Presentazione orale</p> <ul style="list-style-type: none">Luca Bonfiglioli, Ieva Urbanavičiūtė, Mario A. Pagnotta "Evaluation and selection of durum wheat accessions suitable for organic production". 72nd Plant Breeder's Meeting, SAATGUT Austria, 22 - 24 November 2021Pagnotta M., Bonfiglioli L., Urbanavičiūtė I. "Evaluation and selection of organic durum wheat". 1st Workshop: Innovative approaches in sustainable production and protection of Mediterranean strategic Crops - May 24, 2022Luca Bonfiglioli, Ieva Urbanavičiūtė, Mario A. Pagnotta "Breeding durum wheat for organic farming". EUCARPIA cereals section conference, May 15-20, 2023, Cereal Research Noprofit Ltd, Szeged, Hungary.Luca Bonfiglioli, Ieva Urbanavičiūtė, Mario A. Pagnotta "Breeding durum wheat for organic farming" XIII Workshop of PhD students of the Institute for Sustainable Agriculture <p>Poster</p> <ul style="list-style-type: none">Luca Bonfiglioli, Ieva Urbanavičiūtė, and Mario A. Pagnotta. Response variation to salt and drought stress among Durum wheat genotypes at seedling stage. Poster LXIV Convegno Annuale SIGA. 14-16/09/2021Ieva Urbanavičiūtė, Luca Bonfiglioli, Kerstin A. Nagel, Mario Augusto Pagnotta Digital procedures to select suitable durum wheat varieties for organic and stress environments..Pre-conference AIEAA "Sfide ed opportunità per un settore agroalimentare digitale e climate smart" -Viterbo 16 June 2022 |



| | |
|--|---|
| | <ul style="list-style-type: none">• Mario Augusto Pagnotta, Luca Bonfiglioli, Ieva Urbanavičiūtė. "Root system analysis of durum wheat under drought stress using high-throughput phenotyping method". Conference From Seeds to Pasta IV, Bologna, Italy, 26-29 October 2022• Luca Bonfiglioli, Ieva Urbanavičiūtė, Mario A. Pagnotta Assessing durum wheat for organic farming; 73rd Plant Breeders' Meeting Gumpenstein Conference 2022, Gumpenstein, Austria 21.-23 November 2022• Luca Bonfiglioli, Ieva Urbanavičiūtė, Mario A. Pagnotta. "Durum wheat root system response to abiotic stress". 66° ITALIAN SOCIETY OF AGRICULTURAL GENETICS Annual Congress, Bari 5-8 September 2023. |
| Brevetti/Patents (Specificare/Specify) | Sottomissione al registro varietale un'accessione di frumento duro |
| Altre tipologie di pubblicazioni/Other publications (Specificare/Specify) | Proceedings <ul style="list-style-type: none">• ECOBREED Farmers Participatory Field Trials 2022; Werner Vogt-Kaute et al. Kmetijski Inštitut Slovenije• ASSESSING durum wheat for organic farming Luca Bonfiglioli, Ieva Urbanavičiūtė, Mario Augusto Pagnotta Proceedings of the 73rd Annual Conference, 21-23 November 2022, Raumberg-Gumpenstein, Irdning, Austria. Vereinigung der Pflanzzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs.• Bonfiglioli L, Urbanavičiūtė I, Pagnotta MA (2022) Evaluation and selection of durum wheat accessions suitable for organic production. In: Vereinigung der Pflanzzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs (Ed), 72. Jahrestagung 2021, 22-24 November, Raumberg-Gumpenstein, pp 55-57. University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna, Austria. ISBN-13: 978-3-900932-96-1 (ECOBREED project proceedings)• Urbanavičiūtė I, Bonfiglioli L, Nagel KA, Pagnotta MA (2022) Evaluating salt effects on durum wheat root system using non-invasive phenotyping technique at early plant developmental stages. In: Vereinigung der |



| | |
|--|--|
| | Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs (Ed), 72. Jahrestagung 2021, 22-24 November, Raum-berg-Gumpenstein, pp 59-61. University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna, Austria. ISBN-13: 978-3-900932-96-1 (ECOBREED project proceedings) |
|--|--|

| 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) | | | |
|--|--|-------------------|------------------------------|
| Frequenza di corsi/Partecipation in courses | Titolo/Title | Località/Location | Data/Date |
| Corso | Teoria e pratica della comunicazione della ricerca scientifica (2CFU) | Viterbo | 5-7/07/2021 |
| Corso | Disegni sperimentali (1CFU) | online | 14-16/06/2021 |
| Corso | Meccanismi di difesa delle piante (1CFU) | online | 22-25/06/2021 |
| Corso | Genetica e fisiologia della produzione di rilevanti specie vegetali e cambiamenti climatici (1CFU) | online | 16-18/06/2021 |
| Corso | Metodologie avanzate applicate ai processi di trasformazione alimentare (1CFU) | online | 14-18/06/2021 |
| Corso | Statistica di Base con R (1CFU) | Viterbo | 24-27/05/2021 |
| Corso | Statistica Avanzata con R (1CFU) | Viterbo | 31/05/2021-4/06/2021 |
| Corso teorico-pratico organizzato dalla Società Italiana di Genetica Agraria | Trascrittoma: dal disegno sperimentale all'interpretazione biologica del dato | Online | 29/06/2021-01/07/2021 |
| Corso teorico-pratico organizzato dalla Società Italiana di Genetica Agraria | Tecnologie di Evoluzione Assistita: CRISPR/Cas9 in piante agrarie | Verona | 31/08/2021-3/09/2021 |
| Corso | Tecniche di ingegneria genetica e proteica abbinata alle produzioni animali e vegetali (1CFU) | Online | 23-30/05/2022 |
| Corso | Tecniche molecolari innovative per lo studio del microbioma del latte e del formaggio (1CFU) | Online | 20-29/06/2022 |
| Corso | Caratterizzazione della sequenza amminoacidica con tecnica di spettrometria di massa (1CFU) | Online | 21-29/06/2022 |
| Corso | Approccio metabolomico per la caratterizzazione e la valorizzazione dei prodotti agroalimentari (1CFU) | Online | 23-30/05/2022 |
| Corso | Europrogettazione (1CFU) | Online | 17-24-31/03/2023 |
| Corso organizzato nell'ambito della scuola di dottorato in "Scienze. | Applied statistics: R statistical software (3CFU) | Online | Dal 13/06/2023 al 14/07/2023 |



| | | | |
|--|---|--|---------------|
| Tecnologie e biotecnologie per la sostenibilità" afferente al DIBAF | | | |
| Corso organizzato nell'ambito della scuola di dottorato in "Scienze. Tecnologie e biotecnologie per la sostenibilità" afferente al DIBAF | Introduction to high performance and data intensive computing (4CFU) | Online | 06/2023 |
| Partecipazione a seminari/ Participation in seminars | Parità di Genere nelle Scienze. Il Gender Equality Plan di Ateneo e il progetto Grandi Donne 'donna, immagine città', atlante storico geografico delle studiose e delle scienziate. | Università degli Studi della Tuscia, Viterbo | 07/03/2022 |
| Seminario | European green deal and farm to fork strategy. What short-term impacts for Italian farms, and what strategies in the medium-long term? | Università degli Studi della Tuscia | 14/04/2023 |
| Seminario | The role of endogenous enzymes in the evolution of sensorial characteristics of plant-based foods | Università degli Studi della Tuscia | 17/04/2023 |
| Seminario | Protoplast technology for DNA-free genome editing | Università degli Studi della Tuscia | 27/04/2023 |
| Seminario | Enhancing the nutritional quality of major food crops through classical and new breeding techniques | Università degli Studi della Tuscia | 28/04/2023 |
| Seminario | Plant-based production of veterinary vaccines and diagnostics | Università degli Studi della Tuscia | 22/05/2023 |
| Partecipazione a convegni, workshop, scuole/Participation in workshop, schools | | | |
| Convegno | LXIV Convegno Annuale SIGA | Online | 14-16/09/2021 |
| Convegno | Breeding and seed sector innovations of organic food systems by EUCARPIA | Online | 8-10/03/2021 |
| Workshop | Online Training Course on Advanced Genotyping, ECOBREED Training course | Online | 21-25/06/2021 |
| Convegno | XVIII Convegno AISSA "Il contributo della ricerca italiana all'intensificazione sostenibile in agricoltura" | Online | 18-19/02/2021 |
| Convegno | 72 nd Plant Breeder's Meeting, SAATGUT Austria | Online | 22-24/11/2021 |
| Workshop | Facing abiotic stresses affecting durum wheat across the Mediterranean basin: the contribution of PRIMA project IMPRESA & EXPLOWHEAT | Università degli Studi della Tuscia, Viterbo | 21-22/02/2022 |
| Workshop | Innovative approaches in sustainable production and protection of Mediterranean strategic crops | Università degli Studi della Tuscia, Viterbo | 24-26/05/2022 |



| | | | |
|--|---|--|------------------------|
| Convegno | 73rd Plant Breeders' Meeting Gumpenstein Conference 2022 | Gumpenstein, Austria | 21-23/11/2022 |
| Workshop | Luca Bonfiglioli, Ieva Urbanavičiūtė, Mario A. Pagnotta "Breeding durum wheat for organic farming" XIII Workshop of PhD students of the Institute for Sustainable Agriculture | Online | 20/06/2023 |
| 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) | Apprendimento del sistema CRISP/Cas per il Genome Editing in frumento duro. | Cordoba, Spain. <ul style="list-style-type: none">• Ricerca bibliografica• Primer design e PCR• Sequenziamento e analisi• Progettazione plasmidi con software e assemblaggio del sistema CRISPR/Cas• Isolamento embrioni• Bombardamento | 1/09/2022 – 30/04/2023 |
| 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) | | | |
| Partecipazione a progetti di ricerca | EPPN 2020 Project title: High throughput phenotyping of durum wheat accessions under salt stress | Julich, Germania Valutazione dell'effetto dello stress salino sulle radici di plantule di frumento duro usando il rizotrone (GrowScreen-Rhizo) | 07-08/2021 |
| 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 | Scenario of protected cultivation in India | Università degli Studi della Tuscia | 20/03/2023 |



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI DELLA
TUSCIA

DIPARTIMENTO
DI SCIENZE AGRARIE
E FORESTALI

| | | | |
|---|--|--|--|
| (Indicare il titolo, la località, la data/Specify the title, the location and the date) | | | |
| Data/Date 27/10/2023 | | | |
| Firma Dottorando/Signature PhD student  | | | |
| Firma Tutor / Signature Supervisor  | | | |