

Biotechnologies for sustainable production of bio-based commodities and specialty products in a cardoon-based biorefinery

**«Il ruolo della genetica e delle biotecnologie a supporto dello sviluppo
sostenibile: la produzione di colture cellulari modificate»**

**Teresa Docimo
IBBR-UOS Portici**



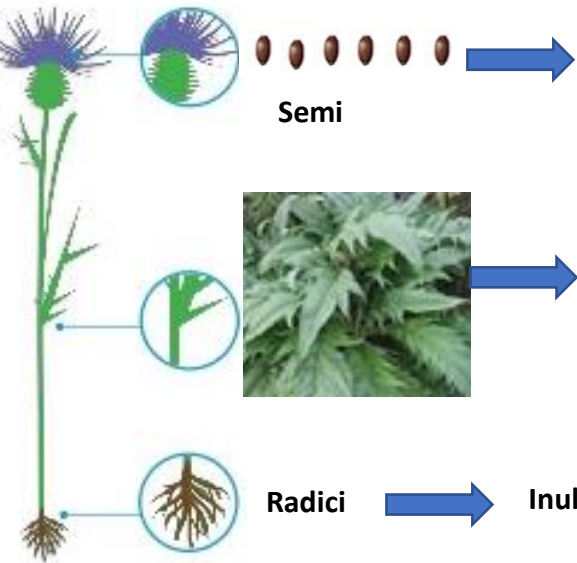
IL CARDO COME COLTURA DAI MOLTEPLICI USI

Valorizzazione coltivazioni su terreni marginali non in competizione con food

Progetto di ricerca Industriale - PON01_01966
ENERBIOCHEM



BioPoliS "Sviluppo di tecnologie verdi per la produzione di BIOchemicals per la sintesi e l'applicazione industriale di materiali POLImerici a partire da biomasse agricole ottenute da sistemi colturali Sostenibili nella Regione Campania" PON03PE_00107_01 (



Semi → Olio
Molecole bioattive
Sfarinato proteico

→ Valorizzazione energetica
Biomassa Lignocellulosica
Molecole bioattive

Radici → Inulina

La coltivazione richiede un low input agronomico

Bianco Avorio

Spagnolo



0mM NaCl



100mM NaCl



Article
Physiological, Biochemical, and Metabolic Responses to Short and Prolonged Saline Stress in Two Cultivated Cardoon Genotypes

Teresa Docimo ^{1,*}, Rosalba De Stefano ¹, Elisa Cappetta ¹, Anna Lisa Piccinelli ², Rita Celano ², Monica De Palma ¹ and Marina Tucci ^{1,*}

La coltivazione è stagionale e la produzione di metaboliti di interesse può essere fortemente influenzata dalle condizioni climatiche

I NOSTRI OBIETTIVI

Favorire in colture cellulari di cardo la produzione di elevate quantità di molecole utili come “building block” per la creazione di biopolimeri

Incremento di acido oleico (IBBR)

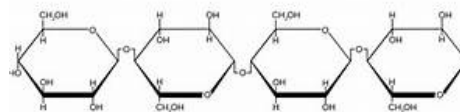
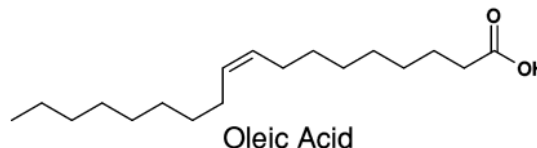


PLA



PHA

Riduzione della lignina per aumentare la biodisponibilità di cellulosa (IBBA)



Cellulosa

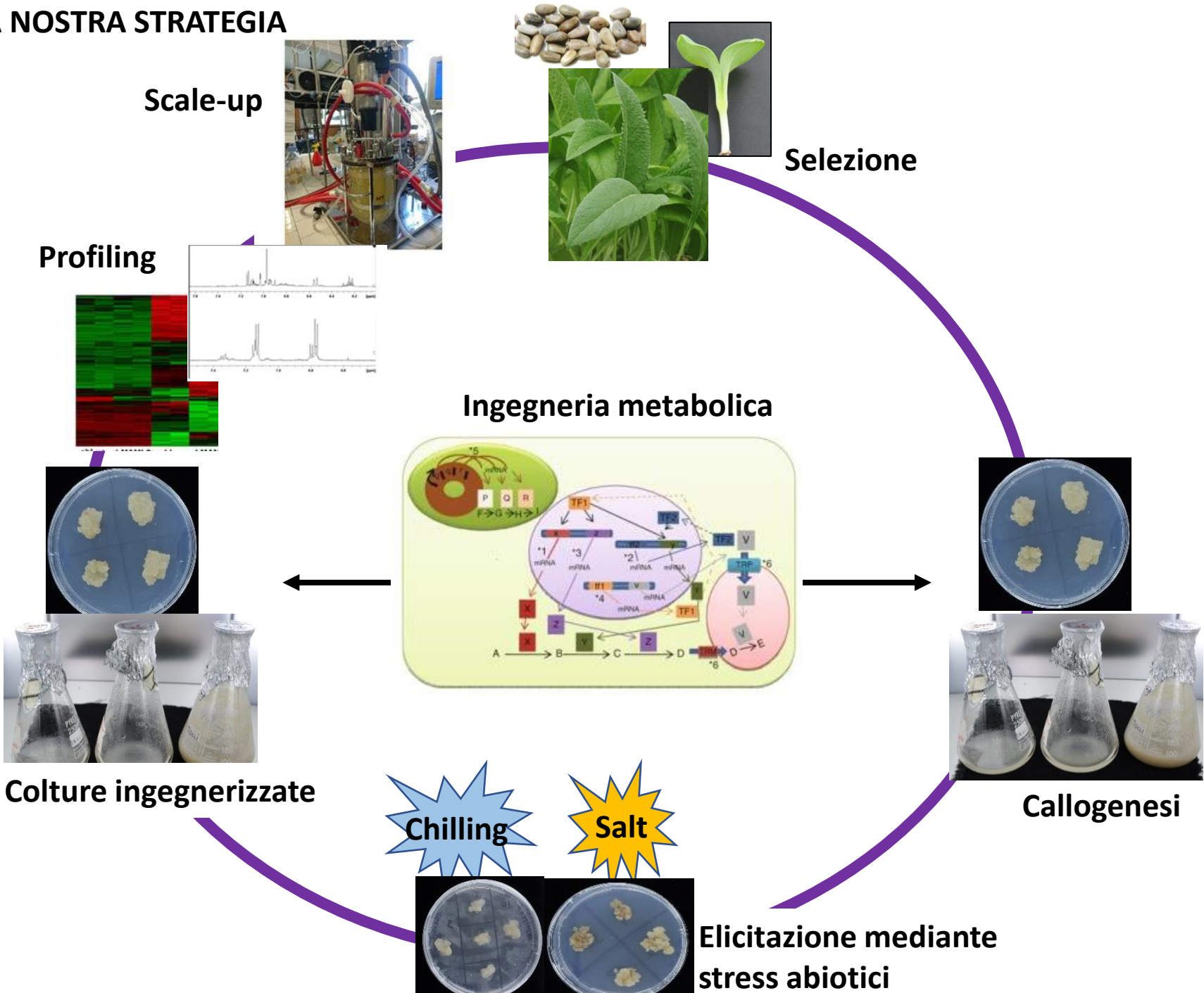
Questi nuovi biopolimeri biodegradabili dovranno sostituire le microplastiche presenti nei detergenti



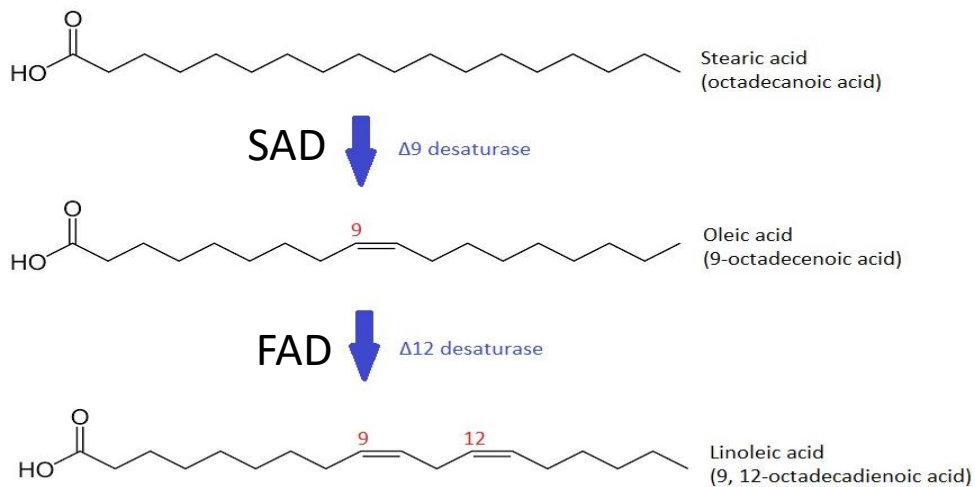
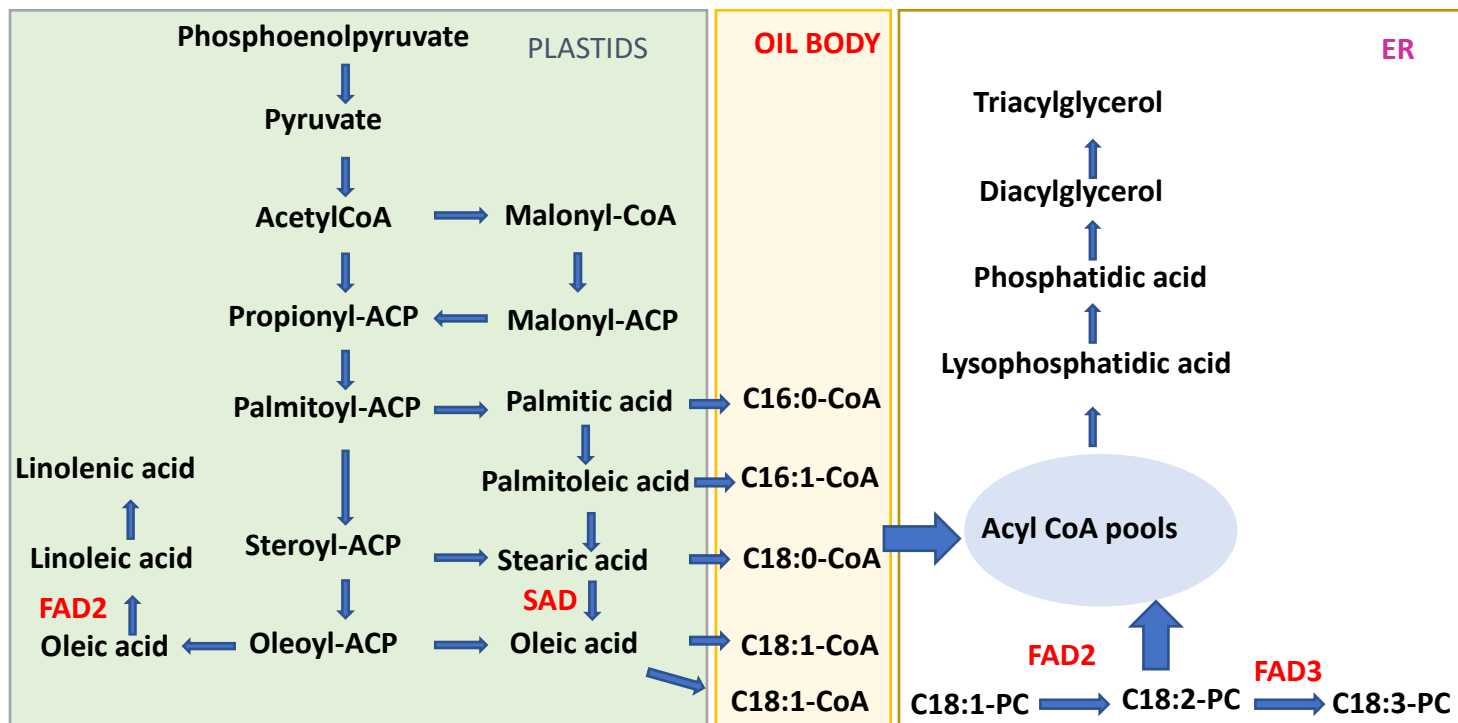
Ambiente sano



LA NOSTRA STRATEGIA



Biosintesi degli acidi grassi



Selezione genica



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI TORINO
ALMA UNIVERSITAS
TAURINENSIS



Globe Artichoke Genome Database
The whole genome SSR markers database of globe artichoke

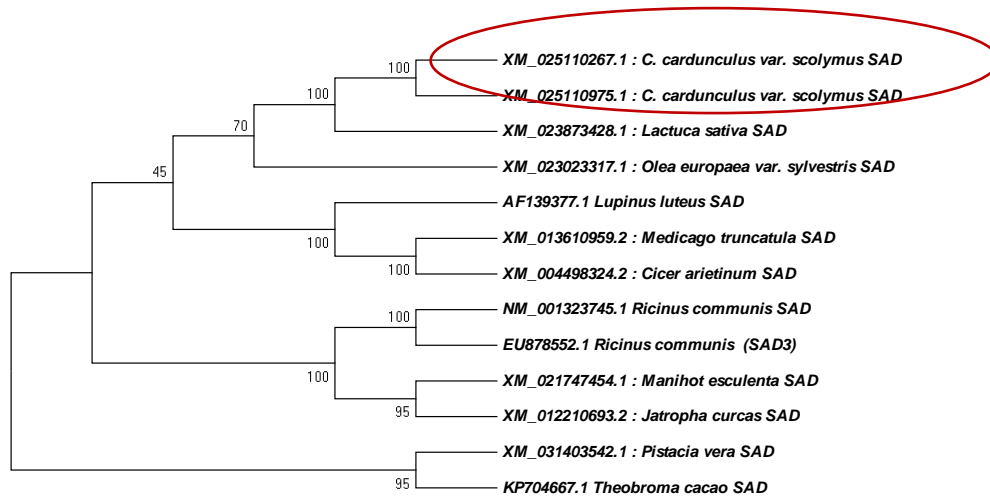


The genome sequence of the outbreeding globe artichoke constructed de novo incorporating a phase-aware low-pass sequencing strategy of F1 progeny.

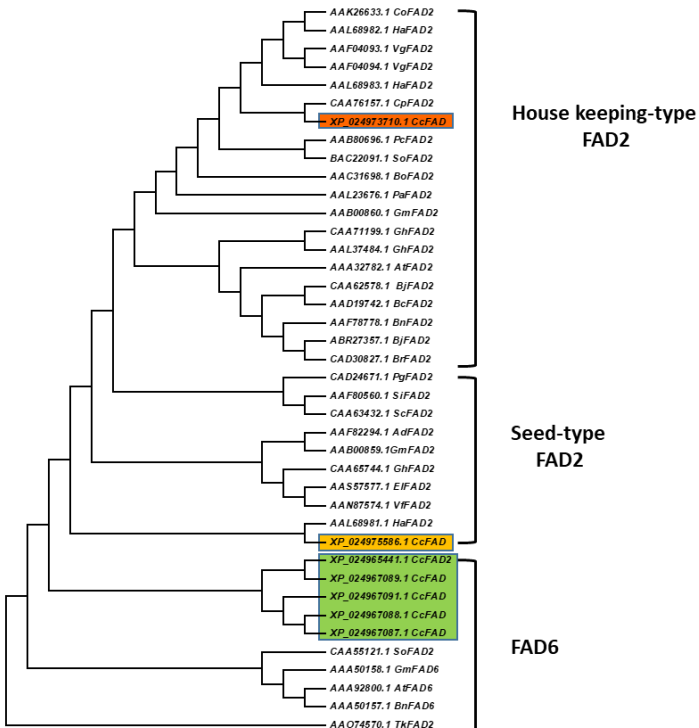
Scaglione D, Reyes-Chin-Wo S, Acquadro A et al. 2016. Scientific Reports. 6:19427.

Data mining per individuare le sequenze dei geni *FAD* e *SAD* in *Cynara cardunculus*

Caratterizzazione geni SAD e FAD



In *Cynara cardunculus* sembrano essere presenti 4 SAD . La sequenza di SAD2 è stata isolata, sequenziata ed usata per valutare l'espressione genica e successivamente per la sovraespressione



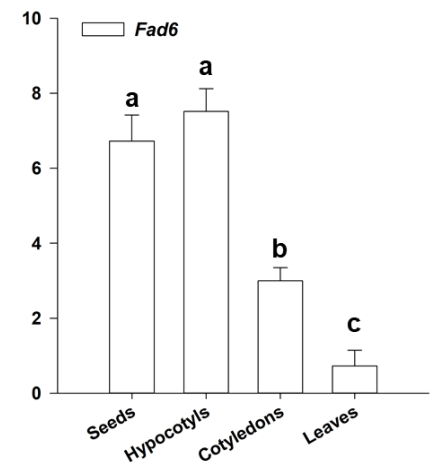
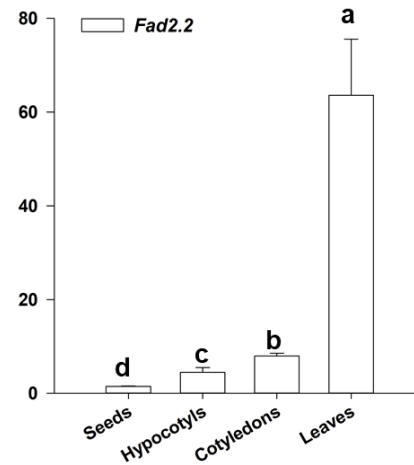
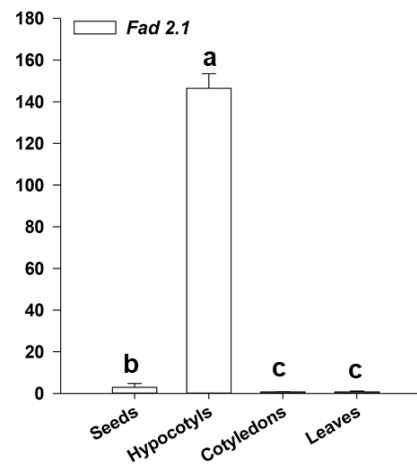
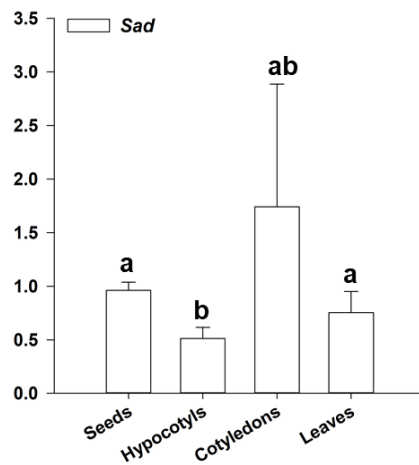
I geni FAD sono presenti in numerose isoforme (circa 30) ma tre risultano essere maggiormente coinvolte nella formazione di acido linoleico *FAD2.1*, *FAD2.2* e *FAD6*

Selezione genotipo e tessuto

Fatty acids	SEEDS			HYPOCOTYLS			COTYLEDONS			LEAVES		
	GIGANTE	SPAGNOLO	B. AVORIO	GIGANTE	SPAGNOLO	B. AVORIO	GIGANTE	SPAGNOLO	B. AVORIO	GIGANTE	SPAGNOLO	B. AVORIO
Oleic (C18:1)	19.271a	18.395b	15.828c	6.54c	7.869b	12.278a	<i>n.d.</i>	9.737a	8.240b	10.524b	15.519a	6.592c
Linoleic (C18:2)	13.684c	27.34a	21.212b	37.892b	38.954b	45.434a	8.935c	12.997b	24.714a	12.806b	37.460a	9.197c

SAD, FAD profilo trascrizionale in Spagnolo

Relative Expression



Article

Changes in Phenolics and Fatty Acids Composition and Related Gene Expression during the Development from Seed to Leaves of Three Cultivated Cardoon Genotypes

Giulia Graziani ^{1,*}, Teresa Docimo ^{2,†}, Monica De Palma ², Francesca Sparvoli ³, Luana Izzo ¹, Marina Tucci ^{2,*} and Alberto Ritieni ^{1,4}



Callogenesi

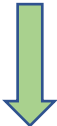
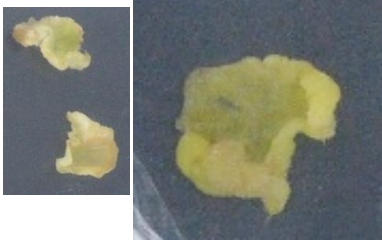
Colture di callo di *C. cardunculus* prodotte da piantine di cardo Spagnolo



cv Spagnolo



Callogenesi su substrato GB5



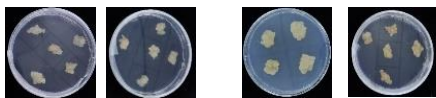
Callo friabile



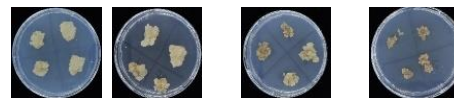
Ottenimento di colture di cellule in sospensione da callo friabile

Elicitazione di colture di callo mediante stress abiotici

Chilling stress

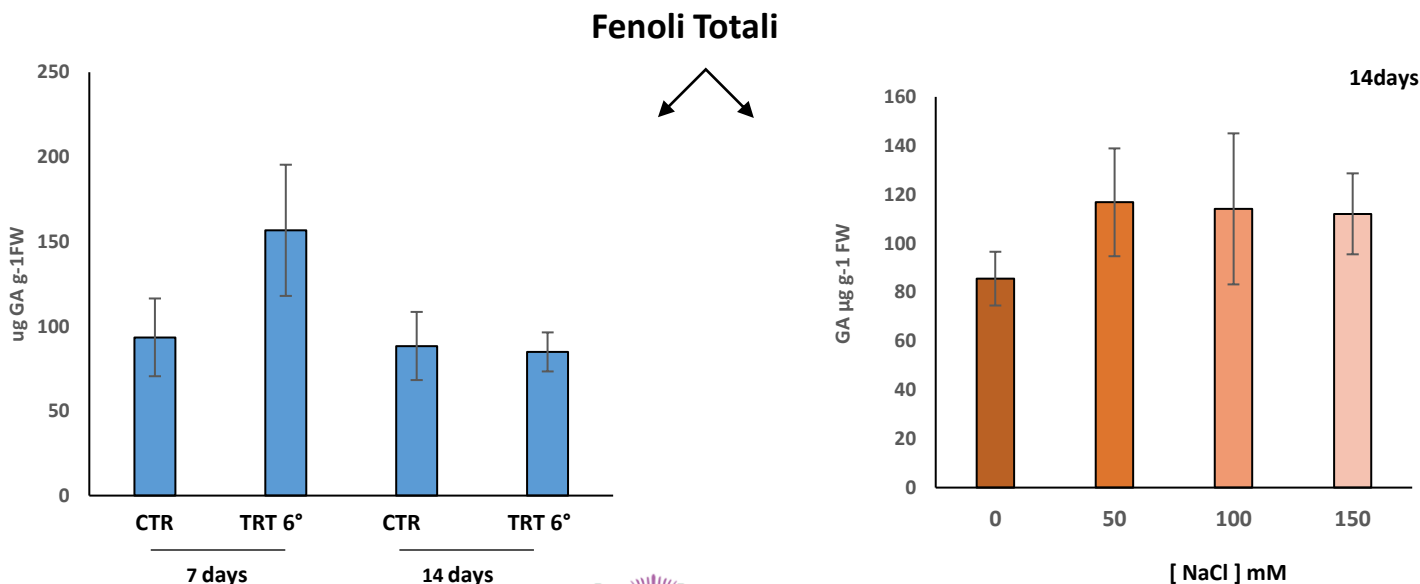


Salt Stress



14days

La crescita dei calli in condizioni di stress risulta ridotta. In condizioni di stress da raffreddamento la crescita si reduce nei primi sette giorni per poi riprendere nei giorni successivi. In condizioni di stress salino la crescita si reduce in maniera proporzionale all'intensità dello stress.

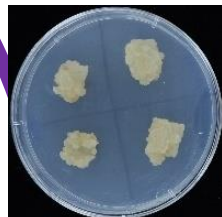
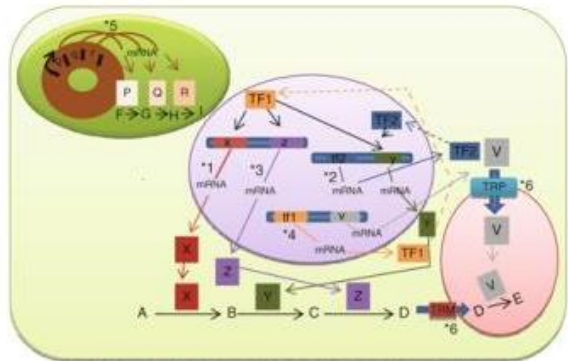


LA NOSTRA STRATEGIA



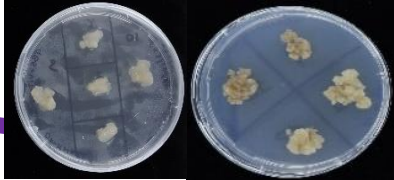
Selezione

Ingegneria metabolica



Callogenesi

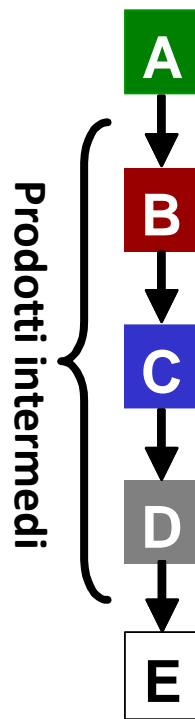
Culture ingegnerizzate



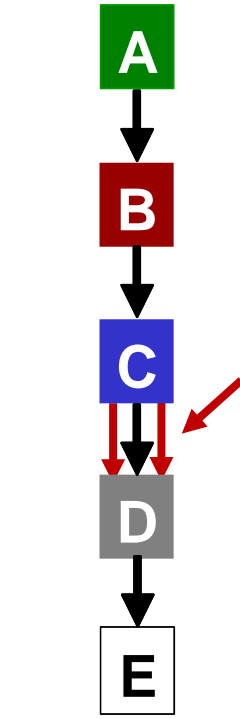
Elicitazione mediante stress abiotici

Modificazione genetica del flusso metabolico mediante geni biosintetici e regolatori

Precursore



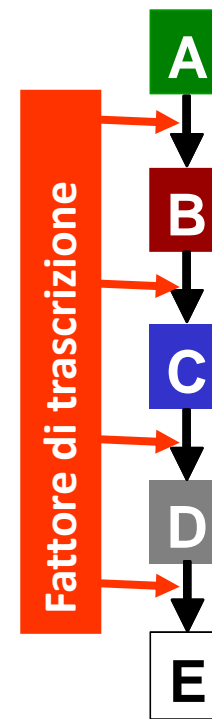
Prodotto finale



Sovra-espressione di un gene



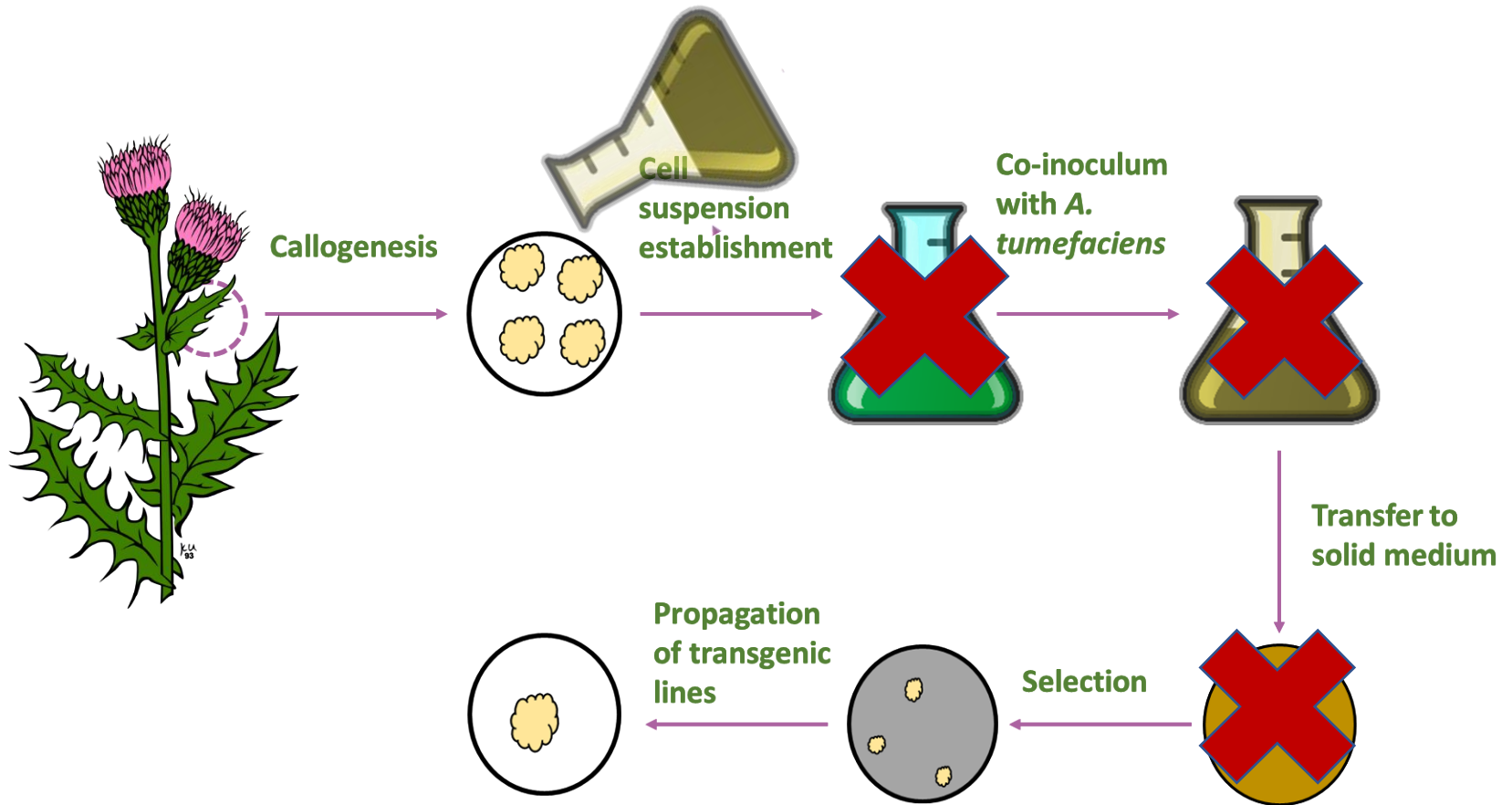
Tecnica dell'anti-senso



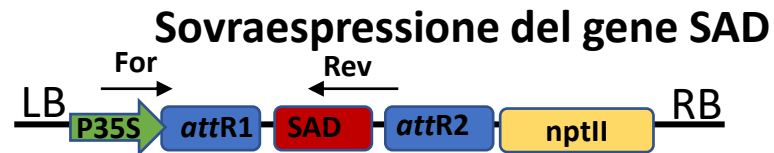
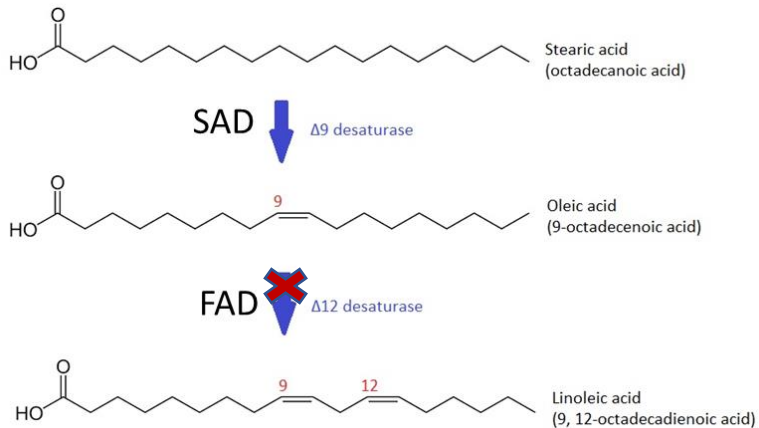
Sovra-espressione di una Proteina di regolazione

↑↑ [E]

Protocollo di trasformazione



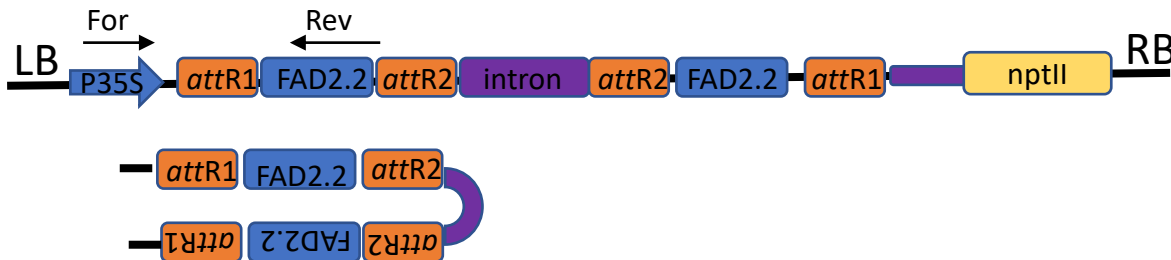
Trasformazione genetica di calli di cardo: Risultati



Inserzione transgene nel DNA

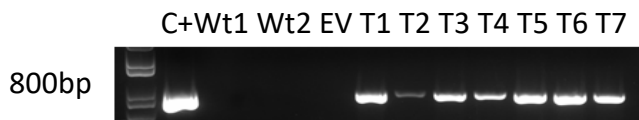


Silencing del gene FAD mediante RNAi



RNAi mediante formazione di una struttura "hairpin"

Inserzione transgene nel DNA

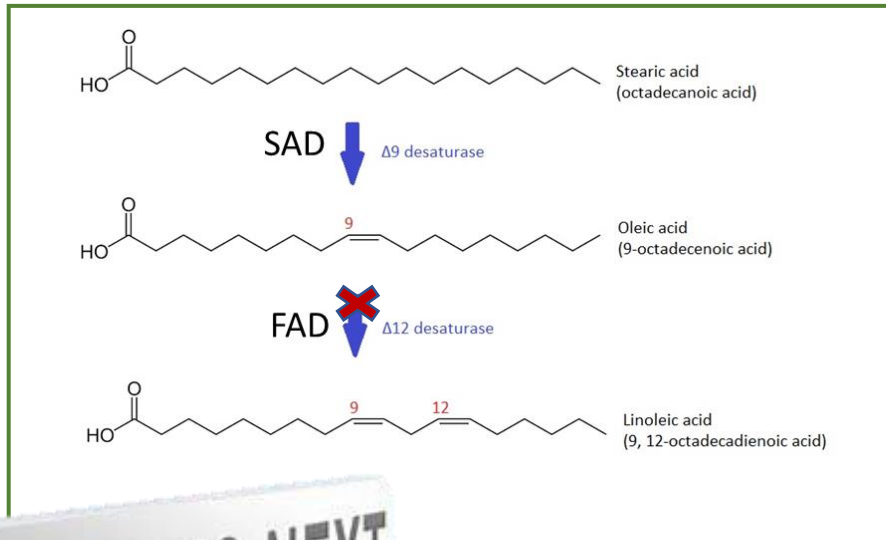


Analisi di espressione

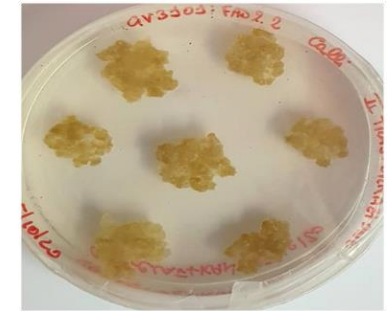


Conclusioni

- ✓ Selezione genotipo e tessuto per callogenesi
- ✓ Ottenimento colture di callo e colture liquide
- ✓ Ottenimento calli transgenici



pGWB411-SAD



pHELLSGATE-FAD2.2

WHAT'S NEXT

- **Analisi biochimiche dei trasformati**
- **Scale up colture liquide**



Research Team IBBR Portici



Valentina Tranchida Lombardo



Monica De Palma



Elisa Cappetta



Marina Tucci



Rosa D'Alessandro