

Risposte genetico-molecolari delle piante a carenza idrica

Stefania Grillo^{1*}, Antonio Blanco², Luigi Cattivelli³, Immacolata Coraggio⁴,
Antonella Leone⁵, Silvio Salvi⁶

¹CNR- IGV, Istituto di Genetica Vegetale, Via Università 133, 80055 Portici (Na)

²Dipartimento di Biologia e Chimica Agro-Forestale ed Ambientale, Università di Bari, Via Orabona 4, 70125 Bari

³CRA-Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura, Via San Protaso 302, 29017 Fiorenzuola d'Arda (Pc)

⁴CNR-IBBA, Istituto di Biologia e Biotecnologie Agrarie, Via Bassini 15, 20133 Milano

⁵Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Salerno

Via Ponte Don Melillo, 84084 Fisciano (Sa)

⁶ Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroalimentari, Università di Bologna

Via Fanin 44, 40127 Bologna

Società Italiana di Genetica Agraria

Riassunto

La produttività potenziale delle piante coltivate è fortemente limitata da condizioni ambientali limitanti (stress biotici e abiotici). Tra queste, la carenza idrica è uno dei fattori che maggiormente influenza la produttività sia in termini quantitativi che qualitativi. La tolleranza alla siccità, così come ad altre condizioni avverse, è un carattere poligenico: essa dipende, infatti, dall'espressione coordinata di interi set di geni comprendenti geni codificanti per proteine direttamente coinvolte nella protezione-riparo dai danni da stress (geni agenti a valle: deidrine, chaperonine, enzimi per la sintesi di osmoprotettivi e detossificanti, ecc.) e geni implicati nella regolazione dell'espressione (geni agenti a monte: fattori trascrizionali, chinasi, fosfatasi, ecc.). Al fine di comprendere le basi genetico-molecolari della tolleranza a tale condizione, negli ultimi anni, l'attenzione si è spostata dallo studio dei singoli geni a valle, a quello dei geni a monte nel tentativo di identificare i determinati genetici responsabili della percezione e trasmissione del segnale di stress e capaci quindi di attivare una risposta complessa e più efficace. Lo sviluppo di nuove tecniche ha permesso, inoltre, di spostare l'attenzione ad una visione d'insieme: è stato quindi possibile analizzare i cambiamenti globali determinati in una pianta da carenza idrica, a livello di trascrittoma, proteoma e metaboloma. Inoltre, gli approcci di genetica mirata, permettendo la variazione di espressione di singoli geni permette di determinarne la funzione. Infine, lo sviluppo di sistemi informatici sempre più sofisticati permette di integrare l'enorme mole di informazioni continuamente generata: l'insieme di questi nuovi approcci sta dando grande impulso all'identificazione dei geni maggiormente responsabili della tolleranza a stress, all'identificazione importanti QTL, allo sviluppo di valide strategie di ingegneria genetica o di MAS per ottenere piante con migliorata tolleranza. In questa *review*, sono riportati i più recenti risultati in campo internazionale sui succitati temi, riguardanti sia piante modello che piante di interesse agronomico. È stata rivolta particolare attenzione agli studi sui network geni coinvolti nella risposta a stress idrico (*pathway* ABA-dipendenti ed ABA-indipendenti), sugli approcci innovativi per identificare funzioni geniche importanti nel fenotipo di tolleranza (*forward* e *reverse genetics*), sulle strategie genetiche avanzate per ottenimento di genotipi con aumentata tolleranza (ingegneria genetica, MAS basati su QTL).

Parole chiave: tolleranza a stress idrico, geni indotti da carenza idrica, regolazione dell'espressione genica, marker assisted breeding, QTL.

Summary

PLANT GENETIC AND MOLECULAR RESPONSES TO WATER DEFICIT

Plant productivity is severely affected by unfavourable environmental conditions (biotic and abiotic stresses). Among others, water deficit is the plant stress condition which mostly limits the quality and the quantity of plant products. Tolerance to water deficit is a polygenic trait strictly dependent on the coordinated expression of a large set of genes coding for proteins directly involved in stress-induced protection/repair mechanisms (dehydrins, chaperonins, enzymes for the synthesis of osmoprotectants and detoxifying compounds, and others) as well as genes involved in

* Autore corrispondente: tel.: +39 081 2539026; fax: +39 081 7753579. Indirizzo e-mail: grillo@unina.it

transducing the stress signal and regulating gene expression (transcription factors, kinases, phosphatases). Recently, research activities in the field evolved from the study of single genes directly involved in cellular stress tolerance (functional genes) to the identification and characterization of key regulatory genes involved in stress perception and transduction and able to rapidly and efficiently activate the complex gene network involved in the response to stress. The complexity of the events occurring in response to stress have been recently approached by genomics tools; in fact the analysis of transcriptome, proteome and metabolome of a plant tissue/cell in response to stress already allowed to have a global view of the cellular and molecular events occurring in response to water deficit, by the identification of genes activated and co-regulated by the stress conditions and the characterization of new signalling pathways. Moreover the recent application of forward and reverse genetic approaches, through mutant collection development, screening and characterization, is giving a tremendous impulse to the identification of gene functions with key role in stress tolerance. The integration of data obtained by high-throughput genomic approaches, by means of powerful informatic tools, is allowing nowadays to rapidly identify of major genes/QTLs involved in stress tolerance, and to develop appropriate strategies to obtain, through genetic engineering or Marker Assisted Breeding (MAS) water stress tolerant plants. In the present review we reported the most recent results obtained, in both model and crop species, in the field of the plant genetics of water stress tolerance with special attention to new insights into the complex gene networks activated in response to water deficit (ABA-dependent and -independent pathways), the innovative genetic approaches to determine key gene functions (forward-reverse genetics), and the application of new genetic strategies to obtain tolerant genotypes (genetic engineering, QTL-based MAS).

Key-words: tolerance to drought stress, drought-induced genes, regulation of gene expression, marker assisted breeding, QTS.

1. Introduzione

Il potenziale produttivo delle piante coltivate dipende dall'interazione genotipo-ambiente. In condizioni ambientali non ottimali e/o di stress, l'omeostasi cellulare è disturbata e cambiamenti fisiologici e biochimici sono attivati in modo da ridurre al minimo danni cellulari irreversibili e ripristinare un nuovo equilibrio cellulare. La carenza idrica è la condizione di stress che maggiormente influenza negativamente le produzioni agricole, riducendo anche la qualità dei prodotti agricoli (Boyer, 1982; Bray, 2000).

La capacità di adattamento delle piante a carenza idrica, intesa come capacità a mantenere un tasso di crescita e, quindi, di produzione in condizioni idriche sub-ottimali, è strettamente associata a cambiamenti dell'espressione di interi set di geni che codificano per proteine coinvolte in meccanismi di riparazione di strutture cellulari (deidrine, chaperoni), enzimi per la sintesi di molecole osmoregolatrici e per la detossificazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS), che sono tra i fattori principali di innesco del fenomeno di morte cellulare in condizioni estreme di carenza idrica, ma anche di altri insulti ambientali (congelamento, eccesso di sali) che causano stress osmotico (Grillo e Leone, 1996). Ne consegue che la tolleranza a carenza idrica è un carattere poligenico, come documentato dai numerosi risultati ottenuti dal-

l'analisi globale del trascrittoma in risposta a stress in piante modello come *Arabidopsis thaliana* (Kreps et al., 2002; Seki et al., 2004), e in diverse specie di interesse agrario, quali, riso (Rabbani et al., 2003), patata (Costa et al., 2005) orzo (Oztur et al., 2002) e altre (Buchanan et al., 2005). Nonostante la diversità delle risposte di adattamento innescate, il ripristino di una nuova omeostasi cellulare in condizioni di carenza idrica dipende da eventi di percezione, segnalazione ed amplificazione intracellulare, e porta all'attivazione della trascrizione di geni a valle i cui prodotti genici sono implicati nella risposta fisiologica cellulare. Negli ultimi anni l'attenzione si è, quindi, spostata dallo studio del contributo di singoli geni nell'acquisizione della tolleranza, a ricerche volte a comprendere quali siano i determinati genetici della percezione e trasmissione intracellulare del segnale di carenza idrica. Anche se a tutt'oggi non si conoscono il sensore/sensori primari di condizioni di stress, è stato dimostrato che la cascata di MAP-chinasi (Jonak et al., 2002) è un elemento fondamentale della trasmissione intracellulare del segnale di carenza idrica, che porta all'induzione della trascrizione di geni che codificano fattori di trascrizione capaci, a loro volta, di attivare a valle la trascrizione di geni coinvolti nei meccanismi di tolleranza (Boudsocq e Lauriere, 2005). Il controllo trascrizionale non è, tuttavia, l'unico punto di controllo dell'e-

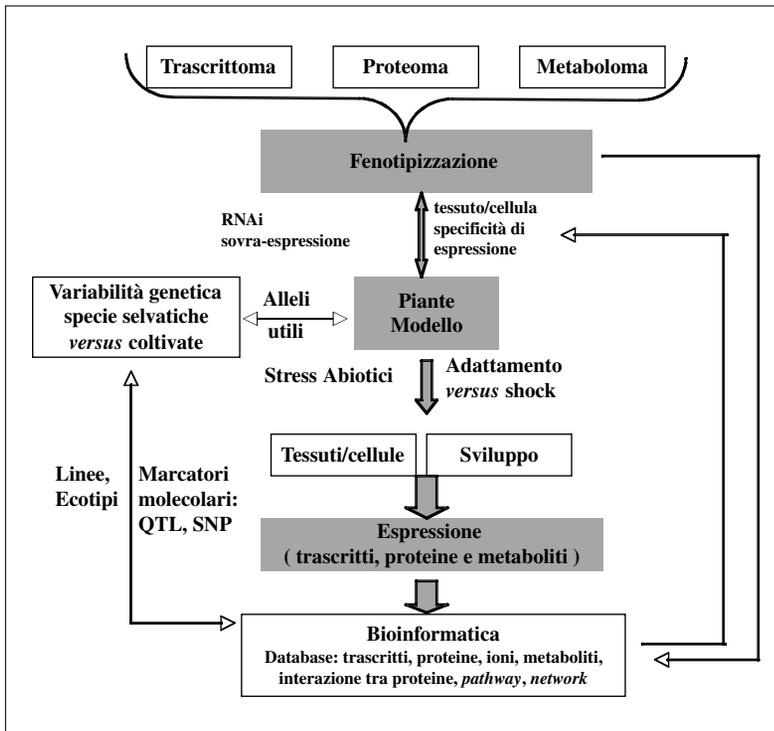


Figura 1. Flusso di informazioni e tecnologie disponibili per lo studio della risposta allo stress. Lo schema mette in relazione le tecniche di studio dei *pathway* della risposta delle piante agli stress con l'isolamento di geni utili ed il trasferimento delle conoscenze dalle specie modello alle specie coltivate di importanza economica (adattata da Bonhert et al., 2006).

Figure 1. Flow chart of information and technologies available to study plant stress response. The chart connects the approaches used to analyze plant stress response pathways with the isolation and mining of key genes and the transfer of knowledge from model to crop species (adapted from Bonhert et al., 2006).

spressione di proteine e/o enzimi responsabili dei cambiamenti fisiologici che si verificano in risposta a stress idrico. Modificazioni post-traduzionali, quali fosforilazione/de-fosforilazione, dalle quali dipende l'attivazione/disattivazione di proteine con ruolo chiave nel metabolismo cellulare, miristoilazione o palmitolazione, che controllano la corretta localizzazione intramembrana, glicosilazione ed altre modificazioni sono cambiamenti molecolari determinanti per la corretta trasmissione del segnale di stress idrico, così come di altri tipi di stress (Chinnusamy et al., 2006; Kwon et al., 2006). Negli ultimi anni l'analisi globale dei cambiamenti del trascrittoma è stata affiancata dall'analisi dei cambiamenti del proteoma, che sta fornendo ulteriori informazioni per la comprensione a livello globale dei meccanismi di segnalazione di carenza idrica (Newton et al., 2004; Rose et al., 2004). Tuttavia l'attivazione trascrizionale di uno o più geni, e/o post-traduzionale delle proteine da essi codificate, non necessariamente indicano che quel gene/i sono cruciali per la tolleranza a stress idrico. Questo può essere stabilito analizzando la risposta a stress idrico con approcci funzionali che si basano sull'uso di mutanti *knock-out* (per *T-DNA tagging* o *RNAi*) per quel determinato gene, o sullo studio dell'e-

spressione di un gene in linee ed ecotipi con livelli contrastanti di tolleranza (confronto suscettibili *versus* tolleranti). Inoltre, l'ultima arrivata delle discipline *omics*, la metabolomica, mediante analisi globale dei cambiamenti metabolici in risposta a stress osmotici sta confermando la rapida attivazione in risposta a carenza idrica della biosintesi di metaboliti osmo-compatibili o di metaboliti secondari con funzione antiossidante (Tohge et al., 2005).

L'integrazione mediante metodi informatici dell'enorme mole di dati generati dalle analisi del trascrittoma, del proteoma e del metaboloma, dell'analisi funzionale, insieme alle informazioni continuamente aggiornate provenienti dalle banche di dati di sequenze del genoma di piante modello e di piante di interesse agrario (Hirai et al., 2004; Tuberosa e Salvi, 2006), sono lo strumento straordinario che i ricercatori hanno oggi a disposizione per stabilire quali siano i geni principali alla base della tolleranza a carenza idrica, identificare importanti QTL (*Quantitative Trait Loci*) e disegnare strategie efficaci di ingegneria genetica e di selezione assistita (MAS) per l'ottenimento di genotipi di specie coltivate capaci di assicurare standard produttivi accettabili anche in condizioni di stress (figura 1).

Di seguito saranno approfonditi gli argomenti su citati con particolare riferimento ai più recenti risultati ottenuti: i) nell'identificazione di geni e network genici coinvolti nella risposta delle piante alla carenza idrica; ii) nell'utilizzazione di approcci innovativi per definire le funzioni geniche importanti per l'acquisizione della tolleranza; iii) nelle applicazioni di strategie genetiche avanzate per lo sviluppo di genotipi tolleranti.

2. Basi molecolari della risposta delle piante a stress da carenza idrica

2.1 Geni e funzioni geniche coinvolte nella risposta a carenza idrica

Le piante, in quanto organismi sessili, incapaci di sfuggire alle condizioni ambientali avverse, hanno sviluppato un'ampia varietà di strategie per adattarsi alle mutevoli condizioni ambientali. Le cellule vegetali hanno, di conseguenza, evoluto *pathway* di segnalazione per percepire ed integrare differenti segnali dall'ambiente e rispondere modulando l'espressione di set di geni (Knight e Knight, 2001). La tolleranza allo stress idrico è, quindi, il risultato del coordinamento di alterazioni biochimiche e fisiologiche a livello cellulare e molecolare, come ad esempio la sintesi di ABA, l'accumulo di vari osmoliti e di proteine con un ruolo di riparazione e protezione accoppiati con un efficiente sistema antiossidante (Cushman e Bonhert, 2000). I meccanismi di risposta attivati dipendono strettamente dalla durata e intensità dello stress e dalla capacità di elicitare risposte cellulari a breve e a lungo termine tali da limitare i danni e preservare le strutture cellulari (risposta a condizioni shock) e di ripristinare un nuovo equilibrio omeostatico (risposta adattativa) (Leone et al., 1999).

Negli ultimi anni, diversi approcci sperimentali hanno portato all'identificazione e descrizione di un enorme numero di geni e funzioni geniche coinvolti nei meccanismi di risposta delle piante a stress idrico e allo stress osmotico ad esso associato (per recenti review consultare Bohnert et al. (2006), Yamaguchi-Shinozaki e Shinozaki (2006)). L'analisi su larga scala del trascrittoma ha, infatti, evidenziato che centinaia di geni sono attivati o repressi in risposta a stress idrico ed osmotico (Bray, 2004; Seki et

al., 2004). I diversi geni individuati, oltre ad avere un ruolo diretto nella protezione delle cellule dai danni causati da stress osmotico, sono coinvolti nell'attivazione di circuiti di regolazione che controllano l'intero *network* della risposta a carenza idrica. I geni coinvolti sono, quindi, generalmente divisi in due categorie: i) geni funzionali, che includono geni implicati nella sintesi di molecole e proteine con ruolo protettivo di processi cellulari cruciali (proteine protettive, enzimi detossificanti, osmoliti compatibili ed altri), isolati da piante e organismi procariotici, e ii) *geni regolatori*, codificanti proteine regolatrici coinvolte nella percezione e trasduzione del segnale di stress (putativi recettori, calmoduline, *calcium-binding proteins*, fosfolipasi, chinasi e fosfatasi, fattori di trascrizione), che modulano l'espressione dei geni appartenenti alla prima categoria (Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 1997; Leone et al., 1999).

2.1.1 Geni funzionali. Geni coinvolti nella osmoregolazione cellulare. In condizioni di carenza idrica, le cellule accumulano soluti per aumentare la pressione osmotica intracellulare, evitare la perdita di acqua e mantenere il turgore cellulare. Tali soluti includono ioni come K^+ , Na^+ , Cl^- , e soluti organici, quali composti dell'ammonio quaternario (glicinbetaina), amminoacidi (prolina), polioli (inositolo, mannitolo) e zuccheri (saccarosio, trealosio), chiamati anche osmoliti compatibili perché si accumulano in quantità elevate nel citoplasma non interferendo con le normali funzioni cellulari. Geni codificanti per enzimi coinvolti nella biosintesi degli osmoliti sono stati isolati da diverse specie vegetali e micro-organismi, che condividono con le piante alcuni meccanismi osmoprotettivi. Negli ultimi anni la manipolazione dei livelli di osmoliti mediante approcci di ingegneria genetica è stata oggetto di numerose ricerche, i cui risultati principali sono riportati nel paragrafo 3.1 e in recenti articoli (Wang et al., 2003; Vinocur e Altman, 2005; Umezawa et al., 2006; Valliyodan e Nguyen, 2006). Il meccanismo di protezione cellulare fornito dagli osmoliti è ancora dibattuto. Oltre al ruolo nell'aggiustamento osmotico, gli osmoliti (prolina e mannitolo) sembrano svolgere anche altre funzioni, come l'inattivazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Hong et al., 2000) o la stabilizzazione strutturale delle proteine (Carpenter et al., 1990).

Un'altra classe di proteine con ruolo cruciale per ridurre le perdite di acqua mediante osmoregolazione cellulare sono i trasportatori; proteine che facilitano il movimento dell'acqua attraverso le membrane, come le acquaporine e diverse pompe ioniche, quali ATPasi, proteine antiporto Na^+/H^+ e trasportatori del K^+ .

Le acquaporine (*water channel proteins*) sono proteine canale che facilitano il passaggio dell'acqua attraverso le membrane, regolando la conduttività idraulica delle membrane (Maurel e Chrispeels, 2001). Molti geni codificanti per acquaporine sono sovra-espressi in risposta a stress idrico, tra questi *rd28* in *A. thaliana* (Yamaguchi-Shinozaki et al., 1992) e TRAMP (*tomato-ripening-associated membrane protein*) (Fray et al., 1994).

Inoltre il mantenimento dell'omeostasi ionica cellulare, mediante regolazione dell'assorbimento, del sequestro, della esclusione e del trasporto ionico in condizioni di stress è garantito dall'attività di trasportatori, che si accumulano in risposta a stress osmotico associato a carenza idrica. Grazie a questa regolazione, nella cellula è prontamente ristabilito un rapporto equilibrato K^+/Na^+ e mantenuta una bassa concentrazione citosolica di Na^+ (Zhu, 2003).

Geni coinvolti nella protezione delle strutture cellulari e riparo dei danni. Durante lo stress idrico differenti prodotti genici si accumulano per proteggere le strutture cellulari e importanti funzioni metaboliche dall'eccessiva disidratazione. La classe di geni più studiata è quella dei geni codificanti proteine LEA (*Late Embryogenesis Abundant*). Questo gruppo di proteine, inizialmente caratterizzate per il loro accumulo nelle ultime fasi dell'embriogenesi, sono indotte anche in altri tessuti vegetali in risposta a carenza idrica, basse temperature, eccesso di sali o trattamenti esogeni di ABA (Close et al., 1989; Almoguera e Jordano, 1992; Gilmour et al., 1992). Le proteine LEA sono altamente idrofiliche per la loro composizione amminoacidica ricca in glicina e sembra agiscano da chaperonine, per prevenire ripiegamenti proteici errati e impedire la denaturazione proteica (Xiong e Zhu, 2002).

La carenza idrica, come altri tipi di stress ambientali, favorisce la generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), responsabili della produzione di diverse forme di danni cellulari

(Smirnoff, 1993). Le cellule prevengono gli effetti negativi dello stress ossidativo sintetizzando composti antiossidanti ed enzimi detossificanti, quali la superossido-dismutasi, la glutatione S-transferasi, la ascorbato-ossidasi e la catalasi (Scandalios, 1997).

Geni coinvolti nella sintesi, processamento e degradazione delle proteine. Molti geni codificanti per proteine coinvolte nella prevenzione e riparo dei danni cellulari e nella rimozione di composti tossici sono indotti da stress idrico ed osmotico. La sintesi proteica è uno dei processi cellulari più sensibili ai danni da stress idrico. Una componente essenziale della sintesi proteica, il fattore di elongazione 1-alfa si accumula velocemente in cellule vegetali adattate a stress salino (Zhu et al., 1994) e idrico (Costa et al., 1999), e ciò sembra indicare l'esistenza di un meccanismo adattativo di protezione della sintesi proteica.

In risposta a stress osmotico si accumulano, inoltre, anche enzimi coinvolti nella degradazione di proteine danneggiate irreparabilmente dagli effetti dello stress osmotico, come l'ubiquitina e di alcune proteasi (Guerrero et al., 1990), mentre attività opposta hanno gli inibitori di proteasi e le chaperonine, anch'esse indotte in risposta a questo tipo di stress. Mentre la produzione di inibitori di proteasi sembra avere il ruolo di proteggere le proteine dalle proteasi rilasciate a causa di danni nelle membrane intracellulari, le chaperonine sono direttamente coinvolte nel favorire il corretto ripiegamento ed assemblaggio di proteine, processo disturbato da condizioni di stress idrico ed osmotico. Una classe ubiquitaria di chaperonine sono le *heat shock proteins* (HSP), tipiche della risposta a stress da elevate temperature (Vierling, 1991). Da recenti studi è emerso che alcune HSP con una simile funzione sono indotte da stress idrico ed osmotico in tabacco e patata (Zhu et al., 1993; Costa et al., 2005).

2.1.2 Geni regolatori. Negli ultimi anni gli sforzi dei ricercatori si sono concentrati sull'individuazione e caratterizzazione di geni regolatori dell'espressione dei geni che agiscono nella cascata di trasduzione del segnale di stress. Gli studi sono stati volti a definire in che modo il segnale di stress è percepito e quali eventi cellulari e molecolari sono indotti per la trasmissione del segnale e l'attivazione di funzioni geni-

che a valle (consultare *review* di Verslues e Zhu, 2005; Nakashima e Yamaguchi-Shinozaki, 2006; Valliyodan e Nguyen, 2006). A tutt'oggi sono disponibili pochi dati riguardo l'identificazione di putativi recettori del segnale capaci di monitorare i cambiamenti dell'ambiente. L'ipotesi comune è, comunque, che le piante abbiano meccanismi di percezione del segnale di stress ambientali simili a quelli di organismi eucariotici semplici, come il lievito, dove alcuni sensori sono stati isolati e caratterizzati (Maeda et al., 1994). Ad esempio, in *Arabidopsis* è stato identificata un nuovo tipo di istidina chinasi (*AtHK1*) con similarità strutturali con l'osmosensore di lievito *SLN1* e capace di complementare mutanti di lievito *sln1* difettivi, indicando che *ATHK1* potrebbe funzionare da osmosensore anche in pianta (Urao et al., 1999).

Numerosi geni regolatori identificati sono, invece, coinvolti nelle fasi successive di trasduzione del segnale di stress. Un ruolo di importanza primaria nella trasduzione del segnale è svolto da una serie di chinasi e fosfatasi, attraverso reazioni di fosfo-defosforilazione di fattori trascrizionali (Mizoguchi et al., 1997). Sono stati descritti nelle piante sistemi di MAP-chinasi specificamente attivi in condizioni di stress osmotici (Mizoguchi et al., 2000). Un altro evento noto nel *pathway* di segnalazione di carenza idrica è l'aumento della concentrazione di calcio intracellulare. Questo aumento porta all'attivazione di altri effettori, come le calmoduline, proteine chinasi dipendenti da calcio (CDPKs) e fosfatasi regolate da calcio (Knight et al., 1997). I complessi eventi di trasduzione del segnale di stress mediati da cascate chinasi di tipo MAP o CDP sono stati recentemente descritti in dettaglio da Shinozaki et al. (2003).

Di estrema importanza è il ruolo di mediatore della risposta a stress svolto dall'acido abscissico (ABA), fitormone coinvolto nella regolazione dell'espressione di molti geni indotti da stress (Bray, 2002; Verslues e Zhu, 2005). È ormai chiaro che la complessa risposta delle piante allo stress idrico coinvolge l'attivazione di almeno quattro *pathway* di risposta, di cui due "ABA-dipendenti" e due "ABA-indipendenti". Le quattro vie sono tra loro interconnesse e l'espressione di singoli geni a valle è regolata da una o più vie (Zhu, 2002; Shinozaki et al., 2003). Recentemente molti dei fattori coinvolti nei *pathway* di segnalazione di stress idrico e osmo-

tico sono stati identificati e descritti in dettaglio (Yamaguchi-Shinozaki e Shinozaki, 2006). Come già accennato in precedenza, i risultati di tali studi indicano chiaramente che la risposta delle piante a stress idrico è in larga misura sovrapposta alla risposta cellulare a stress da eccesso di sali e da basse temperature (Nakashima e Yamaguchi-Shinozaki, 2006; Yamaguchi-Shinozaki e Shinozaki, 2006). Di seguito sono riportati i più recenti risultati sulla identificazione di geni regolatori della trasmissione intracellulare del segnale di stress idrico e sulle interconnessioni con altri tipi di stress.

Regoloni ABA-dipendenti. Il più importante *pathway* di segnalazione dello stress idrico ed osmotico ABA-dipendente coinvolge geni che presentano nel loro promotore la sequenza consenso ABRE (ABA Responsive Element). Tali geni sono attivati grazie all'interazione di questi elementi in *cis* con fattori trascrizionali ABF (ABRE Binding Factor, anche detti AREB). Tali fattori, appartenenti alla classe *Basic domain leucine zipper*, costitutivamente espressi, sono attivati da modificazioni post-traduzionali dipendenti da ABA (Choi et al., 2000; Uno et al., 2000). La loro sovra-espressione (ABF3 o AREB2) induce ipersensibilità all'ABA, aumentata traspirazione e migliore tolleranza a stress idrico (Kang et al., 2002).

Un altro *pathway* di segnalazione ABA-dipendente coinvolge fattori trascrizionali di tipo Myb (*AtMYB2*) e Myc (*AtMYC2*), la cui sintesi dipende dall'accumulo di ABA e la cui azione è quindi più tardiva rispetto ai fattori ABF. Similmente ai fattori ABF, la loro sovra-espressione costitutiva in piante transgeniche induce ipersensibilità all'ABA e migliorata tolleranza a stress (Abe et al., 2003). Geni attivati da tali fattori trascrizionali sono *Rd22* ed altri geni coinvolti nello stress idrico, ABA-dipendenti, ma anche l'alcol deidrogenasi e geni regolati dall'acido jasmonico (Abe et al., 2003).

Regoloni ABA-indipendenti. Il *pathway* di regolazione che coinvolge i fattori DREB/CBF costituisce il più importante regulone ABA-indipendente identificato in *A. thaliana*, sia per il numero di geni a valle coinvolti, sia per gli effetti della sua sovra-espressione in piante transgeniche in termini di tolleranza agli stress (Yamaguchi-Shinozaki e Shinozaki, 2006). Nei promotori di diversi geni la cui espressione è in-

dotta da carenza idrica, ma anche da temperature al di sotto di 0 °C, è presente un elemento DRE/CRT (*Drought Responsive Element/C Repeat*) con sequenza consenso A/GCCGAC responsabile della risposta a stress ABA-indipendente (Yamaguchi-Shinozaki e Shinozaki, 1994). Sono stati identificati diversi fattori trascrizionali (TF), appartenenti alla classe AP2 (*Apetala2*) in grado di legare elementi *cis*, raggruppabili nelle due classi DREB1 (*DRE Binding protein 1*) o CBF (*C-repeat Binding Factor*) e DREB2 (*DRE Binding protein 2*). In particolare, le proteine DREB2A e DREB2B sono coinvolte nell'espressione di geni indotti da carenza idrica (Yamaguchi-Shinozaki e Shinozaki, 2006).

Recentemente sono stati isolati e caratterizzati altri tre membri della classe *DREB1*, la cui espressione è regolata positivamente da stress osmotico (*DREB1D/CBF4*) e stress salino (*DREB1E/DDF1* e *DREB1F/DDF2*). È stato dimostrato che l'espressione di *DREB1D* dipende dall'accumulo di ABA (Haake et al., 2002; Magome et al., 2004).

Tra gli otto TF della classe *DREB2*, *DREB2A* e *DREB2B* sono i due maggiormente coinvolti nella risposta a carenza idrica ed eccesso di sali (Nakashima et al., 2000; Sakuma et al., 2002). Tuttavia la sovra-espressione in piante transgeniche di tali TF non risulta in una migliorata tolleranza a tali stress, suggerendo la presenza di meccanismi di regolazione post-trascrizionale (Liu et al., 1998). In accordo con tale ipotesi, l'uso di una forma deleta di *DREB2A-CA*, mancante di un dominio di repressione, induce sia l'espressione di molti geni implicati nella risposta a siccità, che una migliorata tolleranza a tale stress. È interessante notare che nonostante le proteine di tipo *DREB1* e *DREB2* legano lo stesso dominio consenso presente su geni indotti sia da freddo che da siccità (ad esempio *RD29A*), analisi *microarray* indicano una non completa sovrapposizione dei profili di espressione di piante costitutivamente sovra-esprimenti *DREB1* e *DREB2-CA*. Inoltre, mentre piante sovra-esprimenti *DREB1* mostrano aumentata tolleranza a siccità oltre che a freddo, non è vero il contrario per piante sovra-esprimenti *DREB2* (Yamaguchi-Shinozaki e Shinozaki, 2006).

Recentemente è stato identificato un TF, ICE1, *Inducer of CBF Expression*, appartenen-

te alla classe *Myc basic domain* in grado di transattivare il promotore del gene *DREB1A/CBF3*, ma non quello di altri due membri della stessa classe (Chinnusamy et al., 2003). Un diverso TF, sempre della classe *Myc basic domain* è in grado di transattivare invece il gene *DREB1C/* (Yamaguchi-Shinozaki e Shinozaki, 2006). La scoperta che nel mutante *cbf2*, in cui il gene *DREB1C* è silenziato, l'espressione dei geni *DREB1A* e *B*, come pure la tolleranza a stress abiotici, è aumentata, suggeriscono che *DREB1C/CBF2* possa avere un ruolo di regolatore negativo, il che sarebbe anche in accordo con la presenza di TF diversi deputati all'attivazione dei singoli geni CBF (Novillo et al., 2004). Tuttavia, l'induzione costitutiva di geni coinvolti nella risposta a freddo e la migliorata tolleranza a stress in piante sovra-esprimenti tale gene, indicano che l'interazione tra i diversi ruoli di detti geni è molto più complessa (Vogel et al., 2005).

Sono stati descritti altri TF del tipo *Myc* (*ANAC019, 055* e *072*) e TF del tipo *Zinc-Finger Homeodomain*, uno dei quali (*ZFHD1*) agisce in risposta a stress idrico in maniera ABA-indipendente (Tran et al., 2004).

2.2 Analisi genomica della risposta a stress: assegnazione di funzioni geniche mediante forward e reverse genetics

Nell'ultimo decennio le ricerche e gli studi sulla complessità dei meccanismi di risposta delle piante a stress ambientali ed in ultima istanza, della tolleranza, sono stati affrontati con strumenti di analisi e di studio integrati, capaci di fornire una visione globale della complessa regolazione dell'intero set di geni coinvolti. L'impiego di nuove tecnologie per il clonaggio dei geni e per il sequenziamento su larga scala ha portato allo sviluppo di nuove metodologie che sono capaci di sfruttare pienamente l'aumentata disponibilità di dati ottenuti dal sequenziamento di genomi vegetali.

Il sequenziamento di interi genomi o di *Expressed Sequence Tags* (EST) e il numero crescente di informazioni sui profili di espressione genica derivanti dall'uso esteso di tecniche di array, hanno consentito, infatti, di identificare centinaia di geni la cui espressione è indotta o variamente modulata in risposta a stress idrico (*drought-related genes*) (Bray, 2004; Bonhert et al., 2006). Tuttavia, questo tipo di informazioni

non consente di conoscere l'effettivo ruolo ed, in ultima analisi, il significato adattativo di geni indotti da carenza idrica. Sono state sviluppate quindi, negli ultimi anni, strategie genetiche funzionali, per definire, da una parte, la funzione dei geni isolati e dall'altra per isolare nuovi geni sulla base della loro specifica funzione nei meccanismi di tolleranza. Gli studi di genomica funzionale mirano alla comprensione della funzione delle proteine codificate dai singoli geni ovvero a stabilire il rapporto tra un gene ed il suo fenotipo. Uno dei principali strumenti per studiare tale relazione è rappresentato dallo studio di mutanti. L'analisi di mutanti può essere effettuata seguendo principalmente due vie: la prima, la strategia di forward genetics, prevede lo studio di mutanti selezionati sulla base di un fenotipo di interesse (es. la suscettibilità e/o tolleranza ad un evento di stress) per poi risalire al gene mutato responsabile di quel fenotipo. L'altra strada, nota come approccio di *reverse genetics*, sviluppata in tempi più recenti in concomitanza dell'aumento di conoscenze sui genomi vegetali, prevede la selezione di mutanti per una data sequenza genica alla ricerca di un fenotipo dipendente dal gene in esame.

Le aumentate conoscenze del genoma della specie modello *A. thaliana* e di tecniche efficienti di trasformazione genetica hanno permesso lo sviluppo di sofisticati strumenti genetici con la creazione di numerose popolazioni mutanti utili sia in approcci di *forward* che di *reverse genetics* (Bonhert et al., 2006; Koiwa et al. 2006). Nell'ultimo decennio sono state sviluppate numerose popolazioni dette *loss-of-function* o *knock out*, ottenute tramite mutagenesi inserzionale casuale mediante l'inserzione di DNA esogeno, quali l'elemento T-DNA (*T-DNA tagging*) o un elemento trasponibile (*transposon tagging*) all'interno di una pianta ospite per inattivare sequenze geniche (Ramachandran e Sundaresan, 2001; Alonso et al., 2003). Molti centri di ricerca si sono specializzati nella creazione e *screening* di mutanti di *Arabidopsis* e mettono oggi a disposizione ampie collezioni di mutanti relativi a quasi tutti i geni presenti nel genoma di questa specie (Krysan et al., 1999; Alonso et al., 2003; Koiwa et al., 2006). La mutagenesi inserzionale è utile nel caso in cui il silenziamento di un gene produce un fenotipo evidente; tuttavia nei sistemi eucariotici, il *knock out* genico non sempre porta a questo ri-

sultato, a causa della presenza di copie multiple del gene di interesse, oppure, al contrario la mutazione può risultare letale. Una strada alternativa per evidenziare fenotipi associati a questi geni consiste nel cercare di aumentare il loro livello di espressione producendo mutazioni dominanti dette *gain-of-function*.

L'acquisizione di una nuova funzione genica può essere ottenuta direttamente mediante sovra-espressione/sotto-espressione di un gene *target* in piante transgeniche (tecnologia senso/antiseno) oppure con tecniche ad approccio casuale note come *activation tagging*. Quest'ultima si basa sulla trasformazione casuale con costrutti portanti *enhancer* o promotori forti capaci di indurre la sovra-espressione dei geni a valle del punto di inserzione (Walden et al., 1994; An et al., 2005). Inoltre sono stati sviluppati altri strumenti genetici per produrre ed identificare mutanti anche in specie per le quali non sono disponibili collezioni di mutanti inserzionali. Tra di essi la tecnica nota come TILLING (*Target Induced Local Lesion In Genome*), capace di combinare la classica mutagenesi casuale per mezzo di agenti chimici (EMS) con una selezione basata sull'amplificazione delle sequenze target mediante PCR, è probabilmente quella più nota (McCallum et al., 2000).

Lo studio di mutanti ha contribuito enormemente alla comprensione dei meccanismi di resistenza alla siccità, e agli stress osmotici in generale, permettendo l'identificazione di importanti componenti del *pathway* di trasduzione del segnale di stress (Bonhert et al., 2006; Koiwa et al., 2006; Yamaguchi-Shinozaki e Shinozaki, 2006) Ad esempio, il ruolo svolto dall'ABA come mediatore della risposta molecolare a stress idrico è stato chiarito a partire dagli anni Ottanta attraverso l'uso dei mutanti *flacca* di pomodoro (Neil e Horgan, 1985; Grillo et al., 1995). Negli anni Novanta, approcci di *forward genetics* hanno consentito di descrivere i *pathway* regolativi dipendenti da ABA e coinvolti in diversi meccanismi di resistenza mediante l'uso di mutanti insensibili all'ABA (*ABA insensitive*) e mutanti incapaci di sintetizzare ABA (*ABA deficient*) isolati in diverse specie (*arabidopsis*, girasole, pomodoro e patata). Lo studio di questi mutanti ha consentito di identificare geni indotti da siccità la cui espressione è mediata dall'accumulo di ABA e di comprenderne il ruolo nell'ambito dei meccanismi

di resistenza (Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 1997; Bonetta e McCourt, 1998; Versleus e Bray, 2006). Ad esempio, i mutanti *ABA insensitive abi1* e *abi2* di *Arabidopsis* hanno permesso di identificare due geni che codificano per proteine fosfatasi 2C coinvolte nella risposta molecolare all'accumulo di ABA, i corrispondenti mutanti sono di conseguenza incapaci di indurre alcuni geni normalmente espressi in risposta a siccità (Chak et al., 2000).

Recentemente, un originale approccio per selezionare mutanti coinvolti nella regolazione della risposta a stress, è consistito nella ricerca di genotipi caratterizzati da un alterato profilo di espressione del gene *drought-related RD29A*, il cui promotore è stato associato al gene *reporter* Luciferasi. Piante trasformate con il gene chimerico promotore *RD29A-gene reporter* sono state mutagenizzate e dalla popolazione sono stati isolati mutanti che esprimono il gene reporter più intensamente del gene endogeno *RD29A* (mutanti *hos* – *high expression of osmotically responsive genes*), meno intensamente (mutanti *los* – *low expression of osmotically responsive genes*) o costitutivamente (mutanti *cos* – *constitutive expression of osmotically responsive genes*) (Ishitani et al., 1997). Tale sistema ha consentito di identificare numerosi geni che controllano positivamente/negativamente i *pathway* di segnalazione in risposta a stress (Zhu, 2002; Yamaguchi-Shinozaki e Shinozaki, 2006). Molti dei mutanti *hos*, *los* e *cos* mostrano, inoltre, un fenotipo di maggiore o minore tolleranza a stress dimostrando l'effettiva connessione tra espressione dei geni *drought-related* e la resistenza alla siccità (Ishitani et al., 1997; Chinnusamy et al., 2003; Zhu et al., 2004). Interessanti sono risultati i mutanti *hos10*, incapaci di acclimatare a freddo ed ipersensibili alla salinità e alla siccità, nonostante il livello di espressione più alto di geni regolati dal TF DREB. *Hos10* codifica per un TF di tipo MYB che sembra implicato nel controllo della biosintesi dell'ABA in seguito a stress. La maggior sensibilità agli stress di questi mutanti deriva probabilmente proprio dal ridotto accumulo di tale ormone (Zhu et al., 2005). Anche i mutanti nel gene *fly1*, che codifica una inositolo fosfato 1-fosfatasi, implicato nella sintesi di inositolo 3 fosfato, presentano livelli di espressione aumentati (in condizione di stress idrico o trattamento con ABA) dei geni indotti da stress, ma

maggior sensibilità agli stress stessi (Xiong et al., 2001).

Un mutante con ridotta espressione dei geni a valle nel *pathway* DREB e minore tolleranza è *sfr6*. Poiché i livelli di mRNA codificante per i fattori trascrizionali DREB non sono invece modificati da tale mutazione, si suppone che SFR6 agisca a livello post-trascrizionale o intervenga nell'interazione tra i fattori DREB ed i motivi CRT/DRE presenti nei promotori (Boyce et al., 2003). Altro fenotipo interessante è quello del mutante *osm/syp61* che mostra, a causa del silenziamento di un gene codificante una syntaxina, una modificata sensibilità all'ABA, ipersensibilità a stress idrico e salino per la perdita d'acqua conseguente a un alterato controllo della chiusura/apertura degli stomi in condizioni di stress (Zhu et al., 2002). Fenotipo interessante ha mostrato inoltre il mutante nel gene *Atmyb60-1*, un repressore della trascrizione del tipo R2-R3 MYB, che mostra riduzione della apertura stomatica e della perdita d'acqua e maggiore tolleranza allo stress idrico (Cominelli et al., 2005).

3. Nuove strategie per il miglioramento della tolleranza a carenza idrica

3.1 Ingegneria genetica e sviluppo di genotipi tolleranti

La modificazione dell'espressione, in piante transgeniche, di molti dei geni identificati e descritti nei precedenti paragrafi è stato l'approccio più utilizzato per verificare il reale coinvolgimento dei diversi geni nei meccanismi di tolleranza e per poter definire la funzione biologica del prodotto genico, quando questa non era nota. Inoltre, strategie di ingegneria genetica sono state disegnate e sviluppate per ottenere in modo mirato piante tolleranti con alterati livelli di osmoliti, attività di enzimi anti-ossidanti e/o con modificata espressione di fattori di trascrizione (tabella 1). In questo paragrafo, sono descritti i risultati più promettenti, le potenzialità e limiti degli approcci utilizzati. Per un maggiore dettaglio possono essere consultate alcune recenti *review* pubblicate sull'argomento da Wang et al. (2003), Vinocur e Altman (2005), Umezawa et al. (2006), Valliyodan e Nguyen (2006).

Nell'ultimo decennio piante transgeniche parzialmente tolleranti a stress osmotici sono

Tabella 1. Esempi di piante transgeniche tolleranti stress da carenza idrica ottenute mediante sovra-espressione di geni appartenenti a diverse categorie funzionali.

Table 1. Transgenic plants tolerant to water stress obtained by over-expressing plant and microbial genes belonging to different functional categories.

Prodotto	Gene	Origine	Ospite	Referenza
METABOLISMO OSMOLITI				
Fruttano	<i>SacB</i>	<i>B. subtilis</i>	Tabacco, barbabetola	Pilon-Smits et al., 1995, 1999
Trealosio	<i>Tps1</i>	Lievito	Tabacco	Romero et al., 1997
Poliammine	<i>ADC</i>	<i>D. stramonium</i>	Riso	Capell et al., 2004
Prolina	<i>P5CS</i>	Arabidopsis	Petunia	Yamada et al., 2005
PROTEINE PROTETTIVE				
LEA	<i>HVA1</i>	Orzo	Riso	Xu et al., 1996
Chaperone	<i>Bip</i>	Soia	Tabacco	Alvim et al., 2001
LEA	<i>LLA23</i>	<i>Lilium</i>	Arabidopsis	Yang et al., 2005
ENZIMI DETOSSIFICANTI				
Perossidasi	<i>APX3</i>	Arabidopsis	Tabacco	Yan et al., 2003
Superossido dismutasi	<i>Mn-SOD</i>	Tabacco	Alfalfa	McKersie et al., 1996
FATTORI TRASCRIZIONALI				
DREB1/CBF	<i>ZmBREB1A</i>	Mais	Arabidopsis	Qin et al., 2004
DREB1/CBF	<i>DREB1A</i> <i>/CBF3</i>	Arabidopsis	Arabidopsis	Kasuga et al., 1999
AP2/ERF	<i>SHN1/WIN1</i>	Arabidopsis	Arabidopsis	Aharoni et al., 2004
bZip	<i>ABF3</i>	Arabidopsis	Riso	Oh et al., 2005
MYB	<i>CpMYB10</i>	<i>C. plantagineum</i>	Arabidopsis	Villalobos et al., 2004
FATTORI DI SEGNALE DI STRESS				
MAPKKK chinasi	<i>NKPI</i>	Tabacco	Mais	Shou et al., 2004
Farnesyl transferasi	<i>ERA1</i>	Arabidopsis	Colza	Wang et al., 2005
ALTRO				
Pompa ionica H ⁺	<i>AVP1</i>	Arabidopsis	Arabidopsis	Gaxiola et al., 2001
Enzima malico (apertura stomatica)	<i>Chi-NADP</i> <i>-Me</i>	Tabacco	Tabacco	Laporte et al., 2002
Exoxi-dioxygenasi (Biosintesi ABA)	<i>AINCED3</i>	Arabidopsis	Arabidopsis	Iuchi et al., 2001

state ottenute sia in sistemi modello (tabacco e *Arabidopsis*) sia in piante di interesse agrario, utilizzando geni di origine batterica o vegetale codificanti per enzimi della catena biosintetica di molecole a funzione protettiva o osmoregolativa quali mannitolo, trealosio, prolina, glicinbetaina (Tarczynski et al., 1993; Kavi Kishor et al., 1995; Lilius et al., 1996; Romero et al., 1997). I più recenti risultati in questo settore includono la recente descrizione di un nuovo *pathway* a partire dalla glicina per la sintesi della glicinbetaina, uno dei più importanti osmoprotettori dei microorganismi alofiti (Nuccio et al., 1999). Piante transgeniche di *Arabidopsis* sovra-esprimenti i geni glicina-sarcosina metiltransferasi e dimetilglicina-metiltransferasi, coinvolti nella sintesi delle betaine utilizzando il *pathway* a partire dalla glicina, accumulano elevati livelli

di glicinbetaina e sono maggiormente tolleranti condizioni di carenza idrica rispetto a piante in cui la glicinbetaina è prodotta attraverso il *pathway* mediato dalla colina (Waditee et al., 2005). Il meccanismo attraverso il quale gli osmoliti inducono protezione non è completamente chiaro, infatti, le piante ingegnerizzate accumulano livelli bassi di osmoliti e tali da non poter avere un ruolo primario nei meccanismi di aggiustamento osmotico, ma probabilmente possono cooperare con altre componenti per ridurre i radicali liberi che si accumulano in risposta a stress ossidativi indotti da eccessi di disidratazione cellulare (Shen et al., 1997).

In tale contesto, una strategia già percorsa per ottenere piante tolleranti si è basata sulla manipolazione dei livelli di enzimi anti-ossidanti in piante transgeniche. Diversi gruppi di ri-

cerca hanno ingegnerizzato piante con geni codificanti per enzimi anti ossidanti (superossido-dismutasi, glutatione-S-transferasi, catalasi) la cui espressione è indotta da carenza idrica e la cui attività conferisce alle piante protezione parziale dai danni di tipo ossidativo (Mittler, 2002). Risultati positivi, confermati anche in esperimenti in pieno campo, sono stati ottenuti sovra-esprimendo un gene codificante una Mn superossido-dismutasi in erba medica (Oberschall et al., 2000). Nonostante nuovi e approfonditi studi sono ancora necessari per comprendere i meccanismi di azione e le interazioni tra i diversi sistemi anti-ossidanti attivi nella cellula, è ormai chiaro che la riduzione degli effetti dell'accumulo dei radicali ROS e del conseguente stress ossidativo, mediante manipolazione dei sistemi di detossificazione, rappresenta la via più promettente per ottenere piante resistenti ai molteplici stress, che si verificano contemporaneamente durante l'allevamento di piante in pieno campo (Bartels, 2001).

Altri geni *target* per approcci di ingegneria genetica sono stati i geni codificanti proteine che si accumulano notevolmente in risposta a disidratazione come la classe di proteine LEA che, come riportato nel paragrafo 2.1, hanno una funzione di riduzione dei danni da stress e di protezione delle strutture cellulari. La sovra-espressione in tabacco di alcuni membri della famiglia LEA di *Craterostigma plantagineum* non ha prodotto fenotipi tolleranti (Iturriaga et al., 1992), mentre l'accumulo in riso e grano del gene LEA *hva1* di orzo ha indotto tolleranza a stress idrico (Xu et al., 1996; Sivamani et al., 2000).

I risultati sin qui ottenuti, mediante sovra-espressione di singoli geni, indicano chiaramente che questa strategia può permettere solo limitati miglioramenti della tolleranza agli stress, molto spesso limitata alle condizioni sperimentali (durata e intensità dello stress) utilizzate, che sono molto differenti dalle condizioni reali di coltivazione in pieno campo. Appare chiaro, infatti, che la risposta della pianta agli stress è un fenomeno molto complesso, che richiede l'azione concertata di numerose funzioni geniche e che quindi la sovra-espressione di un singolo gene può solo marginalmente migliorare le *performance* produttive in condizioni di carenza idrica. Inoltre, la parziale tolleranza acquisita è risultata spesso associata a effetti pleiotro-

pici negativi del prodotto del transgene il cui accumulo costitutivo può interferire con il normale metabolismo cellulare (Leone et al., 1999; Umezawa et al., 2006).

Una strategia recentemente utilizzata, anche in base alle recenti acquisizioni sui meccanismi di trasduzione del segnale di stress a livello intracellulare, è stata quella di sovra-esprimere in piante transgeniche geni che sono a monte della complessa catena di eventi che va dalla percezione del segnale di stress alla sua trasmissione all'interno della cellula. Geni che codificano per chinasi, fosfatasi, sensori del calcio sono stati identificati e utilizzati in approcci di ingegneria genetica; i risultati più promettenti, sintetizzati da Boudsocq e Lauriere (2005), Umezawa et al. (2006), Yamaguchi-Shinozaki e Shinozaki (2006), chiaramente indicano che la induzione/repressione in risposta a stress di componenti dei diversi *pathway* di trasduzione del segnale può essere utilizzata con successo per la manipolazione biotecnologica della risposta delle piante a stress multipli. Infatti, la sovra-espressione costitutiva della MAP-chinasi chinasi chinasi (MAP-KKK) di tabacco, NPK1, induce una cascata di eventi tipica della risposta a stress ossidativo con induzione della tolleranza a stress idrico, basse temperature e eccesso di sali (Shou et al., 2004). Inoltre, anche la soppressione di *pathway* di segnalazione può indurre meccanismi di tolleranza. Infatti, la riduzione mediante tecnologia antisense dell'espressione di un regolatore negativo del *pathway* di segnalazione dell'ABA coinvolto nella chiusura degli stomi, la farnesiltrasferasi ERA1, rapidamente induce il *pathway* di risposta all'ABA e un aumento della tolleranza a carenza idrica in piante di colza (Wang et al., 2005).

La recente identificazione di numerosi fattori di trascrizione (TF) che regolano la risposta della pianta a carenza idrica, ha permesso lo sviluppo di nuove strategie per l'ottenimento di piante tolleranti mediante sovra-espressione di singoli TF. La sovra-espressione, ad esempio, di geni DREB1 in *Arabidopsis* risulta in piante con aumentata tolleranza a freddo, temperatura al di sotto di 0 °C, elevati livelli di sale e stress idrico (Jaglo-Ottosen et al., 1998; Liu et al., 1998; Kasuga et al., 1999; Gilmour et al., 2004). L'operone DREB sembra estremamente conservato tra le specie, come suggerito sia dal-

l'isolamento di geni DREB simili in diverse specie, sia dal fatto che la sovra-espressione di DREB di *Arabidopsis* in altre specie e viceversa, ne migliora la tolleranza a stress (Jaglo-Ottosen et al., 2001; Hsieh et al., 2002; Dubouzet et al., 2003; Qin et al., 2004; Zhang J. et al., 2004; Zhang X. et al., 2004). L'effetto pleiotropico negativo della sovra-espressione costitutiva dei geni *target* è stato, inoltre, superato ottenendo piante transgeniche con il fattore di trascrizione DREB1A a valle di un promotore inducibile da stress idrico (Kasuga et al., 1999); in tal modo l'espressione genica e la cascata di eventi di risposta della pianta allo stress sono attivate solo in condizioni di stress.

Analoghi risultati sono stati ottenuti sovra-esprimendo in *Arabidopsis* e in altre specie di interesse agrario un fattore trascrizionale di tipo *Myb* (*Osmyb4*) isolato in riso (Vannini et al., 2004). La capacità di *Osmyb4* e di CBF di aumentare la tolleranza agli stress in un ampio spettro di specie indica che i meccanismi molecolari di risposta agli stress sono altamente conservati. Tuttavia gli specifici effetti a valle (grado di tolleranza ai singoli stress, tipo di metaboliti accumulati) variano nelle singole specie, in conseguenza degli specifici geni a valle attivati in risposta a stress specie-specifici.

Una recente review di Zhang (2003) fornisce ulteriori dettagli sui risultati e sugli approcci innovativi per una più efficace manipolazione dell'espressione dei TF in piante transgeniche per l'ottenimento di piante tolleranti condizioni di stress ambientali, incluso lo stress da carenza idrica.

3.2 Uso dell'analisi QTL per tolleranza alla siccità

La base genetica della tolleranza allo stress idrico è di tipo quantitativo (Blum, 1988; Passioura, 2002; Tuberosa e Salvi, 2006), cioè è sotto il controllo di un elevato numero di funzioni geniche la cui espressione è fortemente influenzata da fattori ambientali. A causa della sua complessità, la tolleranza allo stress idrico è spesso considerata il più difficile carattere da sottoporre a miglioramento genetico, anche per la tipica imprevedibilità dell'evento climatico, variabile nell'intensità e nella ricorrenza nel tempo. L'utilizzo dell'insieme di tecniche note nel complesso come analisi QTL (*Quantitative Trait Loci*: loci per i caratteri quantitativi) consente

l'identificazione delle regioni cromosomiche sede dei geni che controllano tali caratteri e lo studio dei loro effetti.

3.2.1 Basi e obiettivi dell'analisi QTL. L'analisi QTL è stata introdotta alla fine degli anni Ottanta ed è ora una tecnica standard nella genetica dei caratteri quantitativi (Lynch e Walsh, 1998). L'analisi si basa sulla caratterizzazione fenotipica, e con marcatori molecolari, di popolazioni sperimentali ottenute dall'incrocio di genotipi a fenotipi contrastanti per il carattere in esame. Lo stato allelico a ciascuna regione cromosomica è poi correlato con il valore fenotipico del carattere in esame. La presenza di un QTL nelle vicinanze di un locus marcatore comporterà una cosegregazione tra uno specifico allele al marcatore ed uno specifico al QTL, e questo si rifletterà sui valori fenotipici medi delle classi genotipiche, producendo delle differenze rilevabili statisticamente.

Di più recente introduzione è un approccio all'analisi QTL che non richiede la necessità di produrre popolazioni sperimentali appositamente predisposte, ma utilizza una o più collezioni di germoplasma (es. varietà coltivate, razze locali, accessioni selvatiche, ecc.), su cui svolgere le analisi molecolari e le prove per il rilievo dei fenotipi. Tale approccio prende il nome di mappaggio per associazione o basato su disequilibrio di linkage (LD) (Gupta et al., 2005). Per l'applicazione di tale approccio è necessario conoscere preventivamente il livello di disequilibrio di linkage, dato che questo influenza il numero di marcatori molecolari necessari per svolgere l'analisi. Elevati livelli di LD (> 5-10 cM) consentono di utilizzare un basso numero di marcatori molecolari al fine di svolgere una ricerca di QTL sull'intero genoma di una comune specie coltivata. La stessa indagine in condizioni di bassi valori di LD (> 1 cM) richiede invece la valutazione di un numero troppo elevato di marcatori, almeno sulla base delle tecnologie e dei costi accessibili al momento. Popolazioni a basso LD sono comunque utili per valutare il ruolo, sul controllo del carattere quantitativo, della variazione allelica di geni candidati preventivamente identificati.

È noto che alleli utili al miglioramento genetico possono essere rintracciati in genotipi non coltivati quali accessioni selvatiche, altre sottospecie e specie filogeneticamente vicine

sessualmente compatibili (Tanksley e McCouch, 1997). L'utilizzo di tali risorse genetiche è particolarmente efficiente attraverso la produzione di due tipologie di popolazioni, note come collezioni di linee di introgressione (IL) e popolazioni per *Advanced Backcross QTL analysis* (AB-QTL). Le linee di introgressione IL sono linee prodotte tramite reincrocio assistito da marcatori, in cui ciascuna è quasi-isogenica con il genitore ricorrente (il genitore elite), dal quale si differenziano solo per una breve regione cromosomica (ca. 20-30 cM), introgressa dal genitore donatore (il genitore selvatico) (Zamir, 2001). Analisi QTL svolte su materiale IL sono particolarmente informative in quanto si svolgono nel background genetico di un genotipo adattato alla coltivazione. Nell'approccio AB-QTL (Tanksley e Nelson, 1996), la popolazione sperimentale ottenuta tramite reincrocio è sottoposta, nella primissime fasi, ad una selezione contro eventuali caratteristiche negative apportate dal genitore selvatico (quali habitus di crescita, risposta al fotoperiodo, ecc) che ostacolerebbero la valutazione dei caratteri di interesse agronomico.

I risultati dell'analisi QTL trovano una diretta applicazione nelle procedure di selezione assistita da marcatori (MAS: Marker-Assisted Selection). In tale approccio, i marcatori molecolari strettamente concatenati a QTL d'interesse sono utilizzati per selezionare le piante con alleli ad effetto favorevole all'interno di popolazioni predisposte per il miglioramento varietale. L'applicazione della MAS è particolarmente interessante in caratteri ad ereditabilità medio-bassa quale appunto la tolleranza allo stress idrico, ed ogni volta che la valutazione fenotipica ai fini di selezione è particolarmente costosa o difficoltosa (Varshney et al., 2005). Inoltre, l'analisi QTL, identificando le regioni sede di geni rilevanti, pone le basi per il loro clonaggio sulla base di procedure di clonaggio posizionale (Salvi e Tuberosa, 2005). Il clonaggio di geni coinvolti nella variabilità naturale della risposta allo stress idrico consentirà una migliore comprensione dei meccanismi della risposta allo stress idrico e fornirà informazioni potenzialmente utilizzabili in approcci di miglioramento genetico basati su ingegneria genetica.

3.2.2 Esempi di analisi QTL per tolleranza alla siccità nelle principali specie erbacee

Frumento. La resistenza alla siccità è un ca-

rattere estremamente complesso nei frumenti e coinvolge numerosi fattori morfo-fisiologici e biochimici quali sviluppo e profondità dell'apparato radicale, presenza di reste, potenziale idrico fogliare, contenuto idrico relativo, efficienza di utilizzazione dell'acqua (WUE), aggiustamento osmotico (OA), cerosità, accumulo di osmoliti e ABA, senescenza, ecc. In condizioni di carenza idriche severe il frumento duro ha una resa in granella inferiore a quella dell'orzo, ma superiore a quella del frumento tenero. Tale comportamento è il risultato di differenze nel ciclo vitale: specie a maturità precoce sono più adatte ad ambienti con piovosità ridotta o nulla a partire dalla tarda primavera e riserve idriche del suolo esaurite alla fine del ciclo vitale. Pertanto, geni per caratteristiche adattative alle variazioni ambientali possono assumere un ruolo più importante rispetto a loci per la tolleranza alla siccità. Accanto ai geni per la risposta alla vernalizzazione (*vrn*) localizzati sui cromosomi omeologhi del gruppo 5 e ai geni per la risposta al fotoperiodismo (*Ppd*) localizzati sui cromosomi del gruppo 2, sono stati mappati diversi QTL sui cromosomi 2B, 5AL, 3AS, 3AL (Snape et al., 2001).

Una misura integrata della capacità delle piante di sintetizzare sostanza organica in condizioni idriche limitanti può essere ottenuta dal rilievo della WUE. Gorny (2000) ha riscontrato che il cromosoma 7D influenza positivamente la WUE in linee di sostituzioni cromosomica del genoma D. L'aggiustamento osmotico (OA) è ritenuto uno dei fattori più importanti della tolleranza alla siccità; a bassi livelli di umidità del suolo, l'OA è responsabile del turgore cellulare. QTL per OA sono stati mappati sul braccio corto del cromosoma 7A (Zhang et al., 1999) e sui cromosomi 5A e 5D (Galiba et al., 1992). Un QTL maggiore responsabile dell'accumulo di ABA indotto da stress è stato mappato sul braccio lungo del cromosoma 5A, prossimo a un locus che controlla la resistenza al freddo e strettamente associato al locus *Dhn1/Dhn2*; ciò ha suggerito un'associazione genetica tra l'accumulo di ABA e la tolleranza allo stress (Quarrie et al., 1994).

Per quanto riguarda l'approccio di mappaggio basato su *linkage disequilibrium*, è stata costituita ed è in via di utilizzo una collezione di 189 accessioni di frumento duro, provenienti principalmente dalle regioni Mediterranee, e va-

riamente tolleranti allo stress idrico (Maccaferri et al., 2006). In questa collezione il valore di LD si riduce a valori non significativi a distanze superiori a 10 cM, suggerendo che possa essere usata per studi di mappaggio per associazione senza la necessità di un numero elevatissimo di marcatori.

Poiché i frumenti coltivati presentano una ridotta variabilità intraspecifica, alcune specie selvatiche sessualmente compatibili, quali il diploide *Triticum urartu* e il tetraploide *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*, sono state proposte come fonte di geni utili (Valkoun, 2001). Incroci tra frumenti duri coltivati e la spp. *dicoccoides* hanno già consentito il mappaggio di un elevato numero di QTL per componenti della produttività in ambienti con limitate risorse idriche (Blanco et al., 2001).

Un sommario dei principali loci e QTL coinvolti nella tolleranza a stress abiotici nelle *Triticeae* è stato compilato da Cattivelli et al. (2002). Il gruppo 5 presenta la più alta concentrazione di QTL per caratteri adattativi alle variazioni ambientali, in particolare quelli che controllano l'epoca di spigatura, la resistenza al freddo e alla salinità. Una regione cromosomica del gruppo 7 appare cruciale per la tolleranza alla siccità. Sebbene l'analisi QTL e il clonaggio genico siano stati utilizzati come due approcci differenti per lo studio delle risposte allo stesso stress, nei frumenti le relazioni tra QTL e sequenze correlate a stress sono ancora da definire. Diverse sequenze geniche correlate allo stress sono state mappate e alcune di esse sembrano in realtà cosegregare con QTL per la tolleranza a stress. Due loci *Dhn* sono stati localizzati nella stessa regione dove sono stati mappati QTL maggiori per la tolleranza a stress salino e da freddo e un altro cluster *Dhn* è risultato associato con un QTL per la tolleranza alla siccità (Cattivelli et al., 2002). È stato ipotizzato che le basi molecolari di alcuni QTL per la tolleranza a stress siano spiegabili attraverso l'attività di un gene regolatore in grado di controllare l'espressione di molti loci correlati con lo stress.

Riso. L'identificazione di QTL per l'apparato radicale con un impatto sulla tolleranza allo stress idrico è uno degli obiettivi del miglioramento genetico del riso coltivato in asciutta. In uno studio pionieristico, Champoux et al. (1995) hanno investigato la coincidenza, in termini di posizione sulla mappa genetica, di QTL per

morfologia radicale e QTL associati alla tolleranza allo stress idrico utilizzando una cultivar della sottospecie *indica*, adattata alla coltivazione tradizionale, con una cultivar della sottospecie *japonica*, adattata alla coltivazione in asciutta e con un ampio apparato radicale. In totale, sono state identificate quattordici regioni cromosomiche che influenzano la risposta allo stress idrico, dodici delle quali influenzavano anche la morfologia radicale. Successivamente, la stessa popolazione di mappa è stata utilizzata per svolgere analisi QTL per aggiustamento osmotico e tolleranza alla disidratazione (Lilley et al., 1996). Un QTL ad effetto primario per aggiustamento osmotico e due dei cinque QTL per tolleranza alla disidratazione sono risultati coincidere, almeno parzialmente, con QTL per morfologia radicale, suggerendo una possibile associazione di tipo genetico e non di tipo pleiotropico tra i caratteri. È tuttavia da segnalare che, in altri studi, la coincidenza tra QTL per caratteri radicali con QTL per tolleranza allo stress idrico non è stata rilevante (Yue et al., 2006, ed opere citate). Parallelamente, Price et al. (2002) hanno osservato che la mancanza di coincidenza, osservata in alcuni studi, tra QTL per la resa in assenza di stress e QTL per lo sviluppo radicale in condizioni di stress idrico rendono questi ultimi potenzialmente utilizzabili in programmi di MAS senza precludere la produzione in condizioni non limitanti.

Il processo di MAS per QTL per caratteri radicali in riso è stato già applicato. A partire dall'incrocio IR64 x Azucena, l'analisi delle linee prodotte attraverso MAS ha mostrato che il processo ha avuto successo per 3 dei 4 QTL e che, quando allevate in condizioni di stress idrico in condizioni aerobiche, le linee con apparato radicale profondo superavano in resa le linee di controllo (Courtois et al., 2003).

Mais e sorgo. È ben noto che in mais la fase dello sviluppo più critica per la produzione, rispetto ad episodi siccitosi, è quella della fioritura (Saini e Westgate, 2000). La carenza idrica in questa fase si ripercuote in un ritardo della estrusione degli stili e quindi di conseguenza in un aumento dell'intervallo tra la produzione di polline e la fase di ricettività dello stilo/stigma. Alcuni esempi di analisi QTL per caratteri collegati allo stress idrico svolte in mais sono: intervallo antesi maschile-femminile (Ribaut et al., 1997; Sanguineti et al., 1999), concentrazio-

ne di acido abscissico (ABA) nella foglia (Lebreton et al., 1995; Tuberosa et al., 1998), morfologia della radice (Lebreton et al., 1995; Tuberosa et al., 2002a). In alcune ricerche gli autori hanno analizzato diversi caratteri contemporaneamente, compreso la resa, consentendo quindi di verificare l'eventuale coincidenza di QTL per i diversi caratteri e valutare l'importanza di tali regioni a fini di MAS e per tentare una decodificazione tra possibili effetti pleiotropici o di linkage. Sulla base di questi studi, particolare importanza sembra rivestire la regione del cromosoma 1, bin 1.06 (Tuberosa et al., 2002b). Inoltre, un QTL ad effetto principale sulla concentrazione di ABA della foglia è stato ripetutamente identificato da diversi autori sul cromosoma 2 (bin 04) (Lebreton et al., 1995; Tuberosa et al., 1998). L'effetto di tale QTL è stato confermato attraverso lo sviluppo di linee quasi-isogeniche tramite MAS in due background genetici (Landi et al., 2005). Si è inoltre dimostrato che la variazione allelica a tale regione ha effetto sull'allettamento della pianta, lasciando quindi ipotizzare che la modifica del contenuto in ABA della foglia sia un riflesso di una diversa architettura radicale (Giuliani et al., 2005; Landi et al., 2005).

A differenza del mais, il sorgo è particolarmente suscettibile a episodi siccitosi dopo la fioritura, nella fase di riempimento della granella. Un indicatore di tolleranza alla siccità in questa fase è l'indice di 'stay-green' della foglia, oggetto di numero analisi QTL (Hausmann et al., 2002; Sanchez et al., 2002). Da notare che, almeno in alcuni casi, QTL per stay-green in condizioni siccitose mostravano un effetto positivo sulla resa anche quando saggiati in condizioni irrigue (Tuinstra et al., 1998).

Orzo. In orzo, utilizzando una popolazione di linee RIL, B. Teulat, D. This e collaboratori (Teulat et al., 2002 e opere citate) hanno svolto analisi QTL per una serie di caratteri collegati allo stress idrico, tra i quali discriminazione dell'isotopo ^{13}C ($d_{13}\text{C}$), aggiustamento osmotico, contenuto idrico relativo della foglia (RWC) e resa in granella, in ambienti con e senza stress idrico.

Nella popolazione di linee RIL derivate da un incrocio tra orzo coltivato con *H. spontaneum*, Baum et al. (2003) hanno svolto analisi QTL per una serie di caratteri agronomici ed in

particolare per altezza della pianta, considerato un importante indicatore dell'adattamento a condizioni siccitose. Un QTL ad effetto principale per tale carattere è stato identificato sul cromosoma 3H. Sempre a partire da un incrocio con *H. spontaneum*, Talamè et al. (2004) hanno utilizzato l'approccio di analisi AB-QTL per identificare alleli utili in condizioni di stress idrico. Tra gli 81 QTL identificati per vari caratteri agronomici, *H. spontaneum* ha contribuito alleli positivi in 43 casi.

Pomodoro. È stata sviluppata ed analizzata una collezione IL prodotta a partire dall'incrocio tra *S. lycopersicum* (Var. M82) con la specie selvatica, tollerante allo stress idrico, *S. pennellii* (Eshed e Zamir, 1995). Su tale materiale sono stati mappati almeno tre diversi QTL a cui gli alleli di *S. pennellii* contribuiva con gli alleli di tolleranza (Gur e Zamir, 2004). A seguito di MAS, tali alleli sono stati concentrati in un'unica linea che, quando utilizzata come genitore nella produzione di varietà ibride, ha prodotto incrementi di resa maggiori del 50% rispetto a ibridi di riferimento, in condizioni di elevato stress idrico (Gur e Zamir, 2004). In un diverso esperimento, a partire dall'incrocio *S. lycopersicum* x *S. pimpinellifolium* (La722), sono stati individuati QTL per tolleranza alla germinazione in condizioni di stress idrico a cui *S. pimpinellifolium* aveva contribuito gli alleli favorevoli (Foolad et al., 2003).

Ringraziamenti

Si ringraziano tutti i componenti dei laboratori dei gruppi SIGA di Bari, Bologna, Fiorenzuola D'Arda, Milano e Portici, che hanno contribuito in questi anni allo sviluppo delle conoscenze nel settore della genetica della risposta a carenza idrica.

Pubblicazione n. 73 dell'Istituto di Genetica Vegetale (CNR-IGV), Portici.

Bibliografia

- Abe H., Urao T., Seki M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. 2003. Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell*, 15:63-78.
- Aharoni A., Dixit S., Jetter R., Thoenes E., Van Arkel G., Pereira A. 2004. The shine clade of *ap2* domain transcription factors activates wax biosynthesis, alters

- cuticle properties, and confers drought tolerance when overexpressed in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 16:2463-2480.
- Almoguera C., Jordano J. 1992. Developmental and environmental concurrent expression of sunflower dry-seed-stored low-molecular-weight heat-shock protein and *Lea* mRNAs. *Plant Mol. Biol.*, 19:781-92.
- Alonso J.M., Stepanova A., Leisse T.J. 2003. Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*, 301:653-657.
- Alvim F.C., Carolino S.M., Cascardo J.C., Nunes C.C., Martinez C.A., Otoni W.C., Fontes E.P. 2001. Enhanced accumulation of BiP in transgenic plants confers tolerance to water stress. *Plant Physiol.*, 126:1042-1054.
- An G., Jeong D.H., Jung K.H., Lee S. 2005. Reverse genetic approaches for functional genomics of rice. *Plant Mol. Biol.*, 59:111-122.
- Bartels D. 2001. Targeting detoxification pathways: an efficient approach to obtain plant with multiple stress tolerance. *Trends Plant Sci.*, 6:284-286.
- Baum M., Grando S., Backes G., Jahoor A., Sabbagh A., Ceccarelli S. 2003. QTLs for agronomic traits in the Mediterranean environment identified in recombinant inbred lines of the cross 'Arta' x *H. spontaneum* 41-1. *Theor. Appl. Genet.*, 107:1215-1225.
- Blanco A., Lotti C., Simeone R., Signorile A., De Santis V., Pasqualone A., Troccoli A., Di Fonzo N. 2001. Detection of quantitative trait loci for grain yield and yield components across environments in durum wheat. *Cereal Res. Comm.*, 29:237-244.
- Blum A. 1988. *Breeding for Stress Environments*, CRC Press.
- Bohnert H.J., Qingqiu G., Li P., Ma S. 2006. Unraveling abiotic stress tolerance mechanisms – getting genomics going. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 9:180-188.
- Bonetta D., McCourt P. 1998. Genetic analysis of ABA signal transduction pathways. *Trends Plant Sci.*, 6:231-235.
- Boudsocq M., Lauriere C. 2005. Osmotic signaling in plants: multiple pathways mediated by emerging kinase families. *Plant Physiol.*, 138:1185-1194.
- Boyce J.M., Knight H., Deyholos M., Openshaw M.R., Galbraith D.W., Warren G., Knight M.R. 2003. The *sfr6* mutant of *Arabidopsis* is defective in transcriptional activation via CBF/DREB1 and DREB2 and shows sensitivity to osmotic stress. *Plant J.*, 34:395-406.
- Boyer J.S. 1982. Plant productivity and environment. *Science*, 218:443-448.
- Bray E. 2000. Response to abiotic stress. In: Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (eds.): *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists, 1158-1203.
- Bray E.A. 2002. Abscisic acid regulation of gene expression during water-deficit stress in the era of the *Arabidopsis* genome. *Plant Cell Env.*, 25:153-161.
- Bray E.A. 2004. Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.*, 55:2331-2341.
- Buchanan C.D., Lim S., Salzman R.A., Kagiampakis I., Morishige D.T., Weers B.D., Klein R.R., Pratt L.H., Cordonnier-Pratt M.M., Klein P.E., Mullet J.E. 2005. Sorghum bicolor's transcriptome response to dehydration, high salinity and ABA. *Plant Mol. Biol.*, 58:699-720.
- Capell T., Bassie L., Christou P. 2004. Modulation of the polyamine biosynthetic pathway in transgenic rice confers tolerance to drought stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101:9909-9914.
- Carpenter J.F., Crowe J.H., Arakawa T. 1990. Comparison of solute-induced protein stabilization in aqueous solution and in frozen and dried state. *J. Dairy Sci.*, 73:3627-3636.
- Cattivelli L., Baldi P., Crosatti C., Di Fonzo N., Faccioli P., Grossi M., Mastrangelo A.M., Pecchioni N., Stanca A.M. 2002. Chromosome regions and stress-related sequences involved in resistance to abiotic stress in *Triticeae*. *Plant Mol. Biol.*, 48:649-665.
- Chak R.K., Thomas T.L., Quatrano R.S., Rock C.D. 2000. The genes *ABI1* and *ABI2* are involved in abscisic acid- and drought-inducible expression of the *Daucus carota* L. *De3* promoter in guard cells of transgenic *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta*, 210:875-883.
- Champoux M.C., Wang G., Sarkarung S., Mackill D.J., O'Toole J.C., Huang N., McCouch S.R. 1995. Locating genes associated with root morphology and drought avoidance in rice via linkage to molecular markers. *Theo. Appl. Genet.*, 90:969-981.
- Chinnusamy V., Lee B, Hong X., Agarwal M., Zhu J.K. 2003. *ICE1*: a regulator of cold induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Genes Dev.*, 17:1043-1054.
- Chinnusamy V., Zhu J., Zhu J.K. 2006. Salt stress signaling and mechanisms of plant salt tolerance. *Genet. Eng. (NY)*, 27:141-177.
- Choi H., Hong J., Ha J., Kang J., Kim S.Y. 2000. ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *J. Biol. Chem.*, 275:1723-1730.
- Close T.J., Kortt A.A., Chandler P.M. 1989. A cDNA-based comparison of dehydration-induced protein (dehydrins) in barley and corn. *Plant Mol. Biol.*, 13:95-108.
- Cominelli E., Galbiati M., Vavasseur A., Conti L., Sala T., Vuylsteke M., Leonhardt N., Dellaporta S.L., Tonelli C. 2005. A guard-cell-specific MYB transcription factor regulates stomatal movements and plant drought tolerance. *Curr. Biol.*, 15:1196-1200.
- Costa A., Massarelli I., Dragonetti E., Leone A., Grillo S. 1999. Isolation of genes involved in response to osmotic stress. *Proceedings of 14th Triennial Conference of the Europ. Assoc. for Potato Res.*, 2-7 May 1999, Sorrento, Italy, 44-45.

- Costa A., Perrota G., Ambrosone A., Leone A., Grillo S. 2005. Microarray analysis for transcriptional profiling of potato cells under abrupt or gradual-adaptive exposure to water stress. Proceeding of Interdrought II, 24-28 September 2005, Roma, abstract 6.09.
- Courtois B., Shen L., Petalcorin W., Carandang S., Mautle R., Li Z. 2003. Locating QTLs controlling constitutive root traits in the rice population IAC 165 x Co39. *Euphytica*, 134:335-345.
- Cushman J.C., Bohnert H.J. 2000. Genomic approaches to plant stress tolerance. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 3:117-124.
- Dubouzet J.G., Sakuma Y., Ito Y., Kasuga M., Dubouzet E.G., Miura S., Seki M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. 2003. *OsDREB* genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high salt- and cold- responsive gene expression. *Plant J.*, 33:751-763.
- Eshed Y., Zamir D. 1995. An introgression line population of *Lycopersicon pennellii* in the cultivated tomato enables the identification and fine mapping of yield-associated QTL. *Genetics*, 141:1147-1162.
- Foolad M.R., Zhang L.P., Subbiah P. 2003. Genetics of drought tolerance during seed germination in tomato: inheritance and QTL mapping. *Genome*, 46:536-545.
- Fray R.G., Wallace A., Grierson D., Lycett G.W. 1994. Nucleotide sequence and expression of a ripening and water stress-related cDNA from tomato with homology to the MIP class of membrane channel proteins. *Plant Mol. Biol.*, 24:539-543.
- Galiba G., Simon-Sarkady L., Kocsy G., Salgo A., Sutka J. 1992. Possible chromosomal location of genes determining the osmoregulation of wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 85:415-418.
- Gaxiola R.A., Li J., Undurraga S., Dang L.M., Allen G.J., Alper S.L., Fink G.R. 2001. Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H⁺-pump. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98:11444-11449.
- Gilmour S.J., Artus N.N., Thomashow M.J. 1992. cDNA sequence analysis and expression of 2 cold regulated genes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.*, 18:13-21.
- Gilmour S.J., Fowler S.G., Thomashow M.F. 2004. Arabidopsis transcriptional activators CBF1, CBF2, and CBF3 have matching functional activities. *Plant Mol. Biol.*, 54: 767-781.
- Giuliani S., Sanguineti M.C., Tuberosa R., Bellotti M., Salvi S., Landi P. 2005. Root-ABA1, a major constitutive QTL, affects maize root architecture and leaf ABA concentration at different water regimes. *J. Exp. Bot.*, 56:3061-70.
- Gorny A.G. 2000. Effects of the substituted A and B chromosomes of *Triticum dicoccoides* on the nitrogen, phosphorus and water use efficiency in the Langdon durum wheat (*T. turgidum* var. *durum*). *Cereal Res. Comm.*, 28:293-298.
- Grillo S., Leone A., Xu Y., Tucci M., Francione R., Hasegawa P.M., Monti L., Bressan R.A. 1995. Control of osmotic gene expression by ABA and osmotic stress in vegetative tissues of wild type and ABA-deficient mutants of tomato. *Physiol. Plant.*, 93: 498-504.
- Grillo S., Leone A. 1996. Physical stresses in plants: genes and their products for tolerance. Springer Verlag, Heidelberg.
- Guerrero F.D., Jones J.T., Mullet J.E. 1990. Turgor-responsive gene transcription and RNA levels increase rapidly when pea shoots are wilted. Sequence and expression of three inducible genes. *Plant Mol. Biol.*, 15:11-26.
- Gupta P.K., Rustgi S., Kulwal P.L. 2005. Linkage disequilibrium and association studies in higher plants: present status and future prospects. *Plant Mol. Biol.*, 57:461-485.
- Gur A., Zamir D. 2004. Unused natural variation can lift yield barriers in plant breeding. *PLoS Biol.*, 2:e245.
- Haake V., Cook D., Riechmann J.L., Pineta O., Thomas M.F., Zhang J.Z. 2002. Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, 130:639-648.
- Hausmann B.I., Mahalakshmi V., Reddy B.V., Seetharama N., Hash C.T., Geiger H.H. 2002. QTL mapping of stay-green in two sorghum recombinant inbred populations. *Theor. Appl. Genet.*, 106:133-142.
- Hirai M.Y., Yano M., Goodenow D.B., Kanaya S., Kimura T., Awazuhara M., Arita M., Fujiwara T., Saito K. 2004. Integration of transcriptomics and metabolomics for understanding of global responses to nutritional stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101:10205-10210.
- Hong Z., Lakkineni K., Zhang Z., Verma D.P.S. 2000. Removal of feedback inhibition of gamma-pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection from osmotic stress. *Plant Physiol.*, 122:1129-1136.
- Hsieh T.H., Lee J.T., Charng Y.Y., Chan M.T. 2002. Tomato plants ectopically expressing Arabidopsis CBF1 show enhanced resistance to water deficit stress. *Plant Physiol.*, 130:618-626.
- Ishitani M., Xiong L., Stevenson B., Zhu J.K. 1997. Genetic analysis of osmotic and cold stress signal transduction in Arabidopsis: interactions and convergence of abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent pathway. *Plant Cell*, 9:1935-1949.
- Iturriaga G., Schneider K., Salamini F., Bartels D. 1992. Expression of desiccation-related proteins from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* in transgenic tobacco. *Plant Mol. Biol.*, 20:555-558.
- Iuchi S., Kobayashi M., Taji T., Naramoto M., Seki M., Kato T., Tabata S., Kakubari Y., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. 2001. Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in Arabidopsis. *Plant J.*, 27:325-333.

- Jaglo-Ottosen K.R., Kleff S., Amundsen K.L., Zhang X., Haake V., Zhang J.Z., T. Deits, Thomashow M.F. 1998. Arabidopsis CBF1 overexpression induces *COR* genes and enhances freezing tolerance. *Science*, 280: 104-106.
- Jaglo-Ottosen K.R., Kleff S., Amundsen K.L., Zhang X., Haake V., Zhang J.Z., Deits T., Thomashow M.F. 2001. Components of the Arabidopsis C-repeat/dehydration-responsive element binding factor cold-response pathway are conserved in *Brassica napus* and other plant species. *Plant Physiol.*, 12:910-917.
- Jonak C., Okresz L., Bogre L., Hirt H. 2002. Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signalling. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 5:415-424.
- Kang J.Y., Choi H.I., Im M.Y., Kim S.Y. 2002. Arabidopsis basic leucine zipper proteins that mediate stress-responsive abscisic acid signaling. *Plant Cell*, 14:30-57.
- Kasuga M., Liu Q., Miura S., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. 1999. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nat. Biotechnol.*, 17:287-291.
- Kavi Kishor P.B., Hong Z., Miao G.H., Hu C.A.A., Verma D.P.S. 1995. Over-expression of D1-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiol.*, 108:1387-1394.
- Knight H., Knight M.R. 2001. Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends Plant Sci.*, 6: 262-267.
- Knight H., Trewavas A.J., Knight M. 1997. Calcium signalling in Arabidopsis thaliana responding to drought and salinity. *Plant J.*, 12:1067-1078.
- Koiwa H., Bressan R.A., Hasegawa P.M. 2006. Identification of plant stress-responsive determinants in Arabidopsis by large scale forward genetics screens. *J. Exp. Bot.*, 57:1119-1128.
- Kreps J.A., Wu Y., Chang H.S., Zhu T., Wang X., Harper J.F. 2002. Transcriptome changes for Arabidopsis in response to salt, osmols and cold stress. *Plant Physiol.*, 130:2129-2141.
- Krysan P.J., Young J.C., Sussman M.R. 1999. T-DNA as an insertional mutagen in Arabidopsis. *Plant Cell*, 11:2283-2290.
- Kwon S.J., Choi E.Y., Choi Y.J., Ahn J.H., Park O.K. 2006. Proteomics studies of post-translational modifications in plants. *J. Exp. Bot.*, 57:1547-1551.
- Landi P., Sanguineti M.C., Salvi S., Giuliani S., Bellotti M., Maccaferri M., Conti S., Tuberosa R. 2005. Validation and characterization of a major QTL affecting leaf ABA concentration in maize. *Mol. Breed.*, 15:291-303.
- Laporte M.M., Shen B., Tarczynski M.C. 2002. Engineering for drought avoidance: expression of maize NADP-malic enzyme in tobacco results in altered stomatal function. *J. Exp. Bot.*, 53:699-705.
- Lebreton C., Lazić-Jancić V., Steed A., Pekić S., Quarrie S.A. 1995. Identification of QTL for drought responses in maize and their use in testing causal relationships between traits. *J. Exp. Bot.*, 46:853-865.
- Leone A., Costa A., Consiglio F., Massarelli I., Dragonetti E., De Palma M., Grillo S. 1999. Tolerance to abiotic stresses in potato plants: a molecular approach. *Potato Research*, 42:333-350.
- Lilius G., Holmberg N., Bulow L. 1996. Enhanced NaCl stress tolerance in transgenic tobacco expressing bacterial choline dehydrogenase. *Biotechnology*, 14:177-180.
- Lilley J.M., Ludlow M.M., McCouch S.R., O'Toole J.C. 1996. Locating QTL for osmotic adjustment and dehydration tolerance in rice. *J. Exp. Bot.*, 47:1427-1436.
- Liu Q., Kasuga M., Sakuma Y., Abe H., Miura S., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. 1998. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis. *Plant Cell*, 10:1391-1406.
- Lynch M., Wals B. (eds.) 1998. Genetics and analysis of quantitative traits. Sinauer Associates.
- Maccaferri M., Sanguineti M.C., Natoli V., Salem M.B., Bort J., Chenenaoui C., De Ambrogio E., del Moral L.G., De Montis A., El-Ahmed A., Maalouf F., Machlab H., Moragues M., Motawaj J., Nachit M., Nse-rallah N., Ouabbou H., Royo C., Tuberosa R. 2006. A panel of elite accessions of durum wheat (*Triticum durum* Desf.) suitable for association mapping studies. *Plant Genetic Resources*, 4:79-85.
- Maeda T., Wurgler-Murphy S.M., Saito H. 1994. A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature*, 369:242-245.
- Magome H., Yamaguchi S., Hanada A., Kamiya Y., Oda K. 2004. Dwarf and delayed-flowering 1, a novel Arabidopsis mutant deficient in gibberellin biosynthesis because of overexpression of a putative AP2 transcription factor. *Plant J.*, 37:720-729.
- Maurel C., Chrispeels M.J. 2001. Aquaporins: a molecular entry into plant water relations. *Plant Physiol.*, 125:135-138.
- McCallum C.M., Comai L., Greene E.A., Henikoff S. 2000. Targeting Induced Local Lesions IN Genomes (TILLING) for plant functional genomics. *Plant Physiol.*, 123:439-442.
- McKersie B.D., Bowley S.R., Harjanto E., Leprince O. 1996. Water-deficit tolerance and field performance of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase. *Plant Physiol.*, 111:1177-1181.
- Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.*, 7:405-410.
- Mizoguchi T., Ichimura K., Shinozaki K., Mizoguchi T., Ichimura K., Shinozaki K. 1997. Environmental stress response in plants: the role of mitogen-activated protein kinases. *Trends Biotech.*, 15:15-19.
- Mizoguchi T., Ichimura K., Yoshida R., Shinozaki K.

- A., Narusaka M., Fujita M. 2000. A MAP Kinase cascade in Arabidopsis: their roles in stress and hormone response. *Results Probl. Cell Differ.*, 27:29-28.
- Nakashima K., Shinwari Z.K., Sakuma Y., Seki M., Miura S., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. 2000. Organization and expression of two Arabidopsis *DREB2* genes encoding DRE-binding proteins involved in dehydration- and high-salinity-responsive gene expression. *Plant Mol. Biol.*, 42:657-665.
- Nakashima K., Yamaguchi-Shinozaki K. 2006. Regulons involved in osmotic stress-responsive and cold stress responsive gene expression in plants. *Physiol. Plantar.*, 126:62-71.
- Neil S.J., Horgan R. 1985. Abscisic acid production and water relations in wilty tomato mutants subjected to water efficiency. *J. of Exp. Bot.*, 36:1222-1231.
- Newton R.P., Brenton A.G., Smith C.J., Dudley E. 2004. Plant proteome analysis by mass spectrometry: principles, problems, pitfalls and recent developments. *Phytochem.*, 65:1449-85.
- Novillo F., Alonso J.M., Ecker J.R., Salinas J. 2004. *CBF2/DREB1C* is a negative regulator of *CBF1/DREB1B* and *CBF3/DREB1A* expression and plays a central role in stress tolerance in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101:3985-3990.
- Nuccio M.L., Rhodes D., McNeil S.D., Hanson A.D. 1999. Metabolic engineering of plants for osmotic stress resistance. *Curr. Opin. Plant Bio.*, 2:128-134.
- Oberschall A., Deak M., Torok K., Sass L., Vass D., Horvath G.V. 2000. A novel aldose/aldehyde reductase protects transgenic plants against lipid peroxidation under chemical and drought stresses. *Plant J.*, 24:437-446.
- Oh S.-J., Song S.I., Kim Y.S., Jang H.-J., Kim S.Y., Kim M., Kim Y.-K., Nahm B.H., Kim J.-K. 2005. Arabidopsis *CBF3/DREB1A* and *ABF3* in transgenic rice increased tolerance to abiotic stress without stunting growth. *Plant Physiol.*, 138:341-351.
- Oztur Z.N., Talame V., Deyholos M., Michalowski C.B., Galbraith D.W., Gozukirmizi N., Tuberosa R., Bohnert H.J. 2002. Monitoring large-scale changes in transcript abundance in drought- and salt-stressed barley. *Plant Mol. Biol.*, 48:551-573.
- Passioura J.B. 2002. Environmental biology and crop improvement. *Funct. Plant Biol.*, 29:537-546.
- Pilon-Smits E.A.H., Ebskamp M.J.M., Paul M.J., Jenken M.J.W., Weisbeek P.J., Smeekens S.C.M. 1995. Improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drought stress. *Plant Physiol.*, 107:125-130.
- Pilon-Smits E.A.H., Terry N., Sears Tobin K.H., Van Dun K. 1999. Enhanced drought resistance in fructan-producing sugar beet. *Plant Physiol. Biochem.*, 37:313-317.
- Price A.H., Cairns J.E., Horton P., Jones H.G., Griffiths H. 2002. Linking drought-resistance mechanisms to drought avoidance in upland rice using a QTL approach: progress and new opportunities to integrate stomatal and mesophyll responses. *J. Exp. Bot.*, 53:989-1004.
- Qin F., Sakuma Y., Li J., Liu Q., Li Y.-Q. 2004. Cloning and functional analysis of a novel *DREB1/CBF* transcription factor involved in cold-responsive gene expression in *Zea mays*. *Plant Cell Physiol.*, 45:1042-1052.
- Quarrie S.A., Gulli M., Calestani C., Steed A., Marmiroli N. 1994. Location of a gene regulation drought-induced abscisic acid production on the long arm of chromosome 5A of wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 89:794-800.
- Rabbani M.A., Maruyama K., Abe H., Khan M.A., Katsura K., Ito Y., Yoshiwara K., Seki M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. 2003. Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA gel-blot analyses. *Plant Physiol.*, 133:1755-1767.
- Ramachandran S., Sundaresan V. 2001. Transposons as a tools for functional genomics. *Plant Physiol. Biochem.*, 39:243-252.
- Ribaut J.M., Jiang C., Gonzalez-de-Leon D., Edmeades G., Hoisington D.A. 1997. Identification of quantitative trait loci under drought conditions in tropical maize. 2. Yield components and marker-assisted selection strategies. *Theor. Appl. Genet.*, 94:887-896.
- Romero C., Belles J.L., Vaja J.L., Serrano R., Culianez-Marcia F.A. 1997. Expression of the yeast trehalose-6-phosphate synthase gene in transgenic tobacco plants: pleiotropic phenotypes include drought tolerance. *Planta*, 201:293-297.
- Rose J.K., Bashir S., Giovannoni J.J., Jahn M.M., Saravanan R.S. 2004. Tackling the plant proteome: practical approaches, hurdles and experimental tools. *Plant J.*, 39:715-733.
- Saini H.S., Westgate M.E. 2000. Reproductive development in grain crops during drought. *Adv. in Agronomy*, 68:59-96.
- Sakuma Y., Liu Q., Dubouzet J.G., Abe H., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. 2002. DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 290:998-1009.
- Salvi S., Tuberosa R. 2005. To clone or not to clone plant QTLs: present and future challenges. *Trends Plant Sci.*, 10:297-304.
- Sanchez A.C., Subudhi P.K., Rosenow D.T., Nguyen H.T. 2002. Mapping QTLs associated with drought resistance in sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). *Plant Mol. Biol.*, 48:713-726.
- Sanguineti M.C., Tuberosa R., Landi P., Salvi S., Maccaferri M., Casarini E., Conti S. 1999. QTL analysis of drought-related traits and grain yield in relation to genetic variation for leaf abscisic acid concentration in field-grown maize. *J. Exp. Bot.*, 50:1289-1297.

- Scandalios J.G. 1997. Oxidative stress and defense mechanisms in plants: introduction. *Free Radic Biol. Med.*, 23:471-472.
- Seki M., Satou M., Sakurai T., Akiyama K., Iida K., Ishida J., Nakajima M., Enju A., Narusaka M., Fujita M., Oono Y., Kamei A., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. 2004. RIKEN Arabidopsis full-length (RAFL) cDNA and its applications for expression profiling under abiotic stress conditions. *J. Exp. Bot.*, 55:213-223.
- Shen B., Jensen R.G., Bohnert H.J. 1997. Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants by targeting mannitol biosynthesis to chloroplasts. *Plant Physiol.*, 113:1177-1183.
- Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. 1997. Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol.*, 115:327-334.
- Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K., Seki M. 2003. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 6:410-417.
- Shou H., Bardallo P., Wang K. 2004. Expression of Nicotiana protein kinase (NPK1) enhanced drought tolerance in transgenic maize. *J. Exp. Bot.*, 55:1013-1019.
- Sivamani E., Bahieldin A., Wraith J.M., Al-Niemi, T., Dyer, W.E., Ho T.H.D., Qu R.D. 2000. Improved biomass productivity and water use efficiency under water deficit conditions in transgenic wheat constitutively expressing the barley HVA1 gene. *Plant Sci.*, 155:1-2.
- Smirnoff N. 1993. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist*, 125:27-58.
- Snape J.W., Butterworth K., Whitechurch E., Worland A.J. 2001. Waiting for fine time: genetics of flowering time in wheat. *Euphytica*, 119:185-190.
- Talamè V., Sanguineti M.C., Chiapparino E., Bahri H., Salem B.M., Forster B.P., Ellis R.P., Rhouma S., Zoumarou W., Waugh R., Tuberosa R. 2004. Identification of *Hordeum spontaneum* QTL alleles improving field performance of barley grown under rainfed conditions. *Ann. Appl. Biol.*, 144:309-319.
- Tanksley S., Nelson J. 1996. Advanced backcross QTL analysis: a method for the simultaneous discovery and transfer of valuable QTLs from unadapted germplasm into elite breeding lines. *Theor. Appl. Genet.*, 92: 191-203.
- Tanksley S.D., McCouch S.R. 1997. Seed banks and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild. *Science*, 277:1063-1066.
- Tarczynski M., Jenssen R., Bohnert H.J. 1993. Stress protection in transgenic tobacco by production of the osmolyte mannitol. *Science*, 259:508-510.
- Teulat B., Merah O., Sirault X., Borries C., Waugh R., This D. 2002. QTLs for grain carbon isotope discrimination in field-grown barley. *Theor. Appl. Genet.*, 106:118-126.
- Tohge T., Nishiyama Y., Hirai M.Y., Yano M., Nakajima J., Awazuahara M., Inoue E., Takahashi H., Goodenow D.B., Kitayama M., Noji M., Yamazaki M., Saito K. 2005. Functional genomics by integrated analysis of metabolome and transcriptome of Arabidopsis plants over-expressing an MYB transcription factor. *Plant J.*, 42:218-235.
- Tran L.S.P., Nakashima K., Sakuma Y., Simpson S.D., Fujita Y., Maruyama K., Fujita M., Seki M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. 2004. Isolation and functional analysis of Arabidopsis stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive *cis*-element in the *early responsive to dehydration stress 1* promoter. *Plant Cell*, 16:2481-2498.
- Tuberosa R., Sanguineti M.C., Landi P., Salvi S., Casarini E., Conti S. 1998. RFLP mapping of quantitative trait loci controlling abscisic acid concentration in leaves of drought-stressed maize (*Zea mays* L.). *Theor. and Appl. Genet.*, 97:744-755.
- Tuberosa R., Salvi S., Sanguineti M.C., Landi P., Maccaferri M., Conti S. 2002a. Mapping QTLs regulating morpho-physiological traits and yield: case studies, shortcomings and perspectives in drought-stressed maize. *Ann. of Bot.*, 89: 941-963.
- Tuberosa R., Sanguineti M.C., Landi P., Giuliani M.M., Salvi S., Conti S. 2002b. Identification of QTLs for root characteristics in maize grown in hydroponics and analysis of their overlap with QTLs for grain yield in the field at two water regimes. *Plant Mol. Biol.*, 48:697-712.
- Tuberosa R., Salvi S. 2006. Genomics approaches to improve drought tolerance. *Trends Plant Sci.*, 11:405-412.
- Tuinstra M.R., Ejeta G., Goldbrough P. 1998. Evaluation of near-isogenic sorghum lines contrasting for QTL markers associated with drought tolerance. *Crop Sci.*, 38:835-842.
- Umezawa T., Fujita M., Fujita Y., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. 2006. Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future. *Curr. Opin. Biotech.*, 17:113-122.
- Uno Y., Furihata T., Abe H., Yoshida R., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. 2000. Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:11632-11637.
- Urao T., Yakubov B., Satoh R., Yamaguchi-Shinozaki K., Seki M., Hirayama T., Shinozaki K. 1999. A transmembrane hybrid-type histidine kinase in Arabidopsis functions as an osmosensor. *Plant Cell*, 11:1743-1754.
- Valkoun A.J. 2001. Wheat pre-breeding using wild progenitors. *Euphytica*, 119:17-23.
- Valliyodan B., Nguyen H. 2006. Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 9:189-195.
- Vannini C., Locatelli F., Bracale M., Magnani E., Mar-

- soni M., Osnato M., Mattana M., Baldoni E., Coraggio I. 2004. Overexpression of the rice *Osmyb4* gene increases chilling and freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana* plants. *Plant J.*, 37:115-127.
- Varshney R.K., Graner A., Sorrells M.E. 2005. Genomics-assisted breeding for crop improvement. *Trends Plant Sci.*, 10:621-630.
- Verslues P.E., Zhu J.K. 2005. Before and beyond ABA: upstream sensing and internal signals that determine ABA accumulation and response under abiotic stress. *Biochem. Soc. Trans.*, 33:375-379.
- Verslues P.E., Bray E.A. 2006. Role of abscisic acid (ABA) and *Arabidopsis thaliana* ABA-insensitive loci in low water potential-induced ABA and proline accumulation. *J. Exp. Bot.*, 57:201-212.
- Vierling E. 1991. The role of heat shock proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biol.*, 42:579-620.
- Villalobos M.A., Bartels D., Iturriaga G. 2004. Stress tolerance and glucose insensitive phenotypes in *Arabidopsis* overexpressing the CpMYB10 transcription factor gene. *Plant Physiol.*, 135:309-324.
- Vinocur B., Altman A. 2005. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Curr. Opin. Biotech.*, 16:123-132.
- Vogel J.T., Zarka D.G., Van Buskirk H.A., Fowler S.G., Thomashow M.F. 2005. Roles of the CBF2 and Zat12 transcription factors in configuring the low temperature transcriptome of *Arabidopsis*. *Plant J.*, 41:195-211.
- Waditee R., Bhuiyan M.N., Rai V., Aoki K., Tanaka Y., Hibino T., Suzuki S., Takano J., Jagendorf A.T., Takabe T., Takabe T. 2005. Genes for direct methylation of glycine provide high levels of glycinebetaine and abiotic-stress tolerance in *Synechococcus* and *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102:1318-23.
- Walden R., Fritze K., Hayashi H., Mikalashchich E., Harling H., Schell J. 1994. Activation tagging: a means of isolating genes implicated as playing a role in plant growth and development. *Plant Mol. Biol.*, 26:1521-1528.
- Wang W., Vinocur B., Altman A. 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218:1-14.
- Wang Y., Ying J., Kuzma M., Chalifoux M., Sample A., McArthur C., Uchacz T., Sarvas C., Wan J., Dennis D.T., McCourt P, Huang Y. 2005. Molecular tailoring of farnesylation for plant drought tolerance and yield protection. *Plant J.*, 43:413-424.
- Xiong L., Lee B., Ishitani M., Lee H., Zang C., Zhu J.K. 2001. *FIERY1* encoding an inositol polyphosphate 1-phosphatase is a negative regulator of abscisic acid and stress signaling in *Arabidopsis*. *Genes Dev.*, 15:1971-1984.
- Xiong L., Zhu J.K. 2002. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant Cell Environ.*, 25:131-139.
- Xu D., Duan X., Wang B., Hong B., Ho T.H.D., Wu R. 1996. Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, HVA1, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiol.*, 110:249-257.
- Yamada M., Morishita H., Urano K., Shiozaki N., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K., Yoshida Y. 2005. Effects of free proline accumulation in petunias under drought stress. *J. Exp. Bot.*, 56:975-981.
- Yamaguchi-Shinozaki K., Koizumi M., Urao S., Shinozaki K. 1992. Molecular cloning and characterization of 9 cDNAs for genes that are responsive to desiccation in *Arabidopsis thaliana*: sequence analysis of one clone that encodes a putative transmembrane channel protein. *Plant Cell Physiol.*, 33:217-224.
- Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. 1994. A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high salt stress. *Plant Cell*, 6:251-264.
- Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. 2006. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57:781-803.
- Yan J., Wang J., Tissue D., Holaday A.S., Allen R., Zhang H. 2003. Photosynthesis and seed production under water-deficit conditions in transgenic tobacco plants that overexpress an *Arabidopsis* ascorbate peroxidase gene. *Crop Sci.*, 43:1477-1483.
- Yang C.-Y., Chen Y.-C., Jauh G.Y., Wang C.-S. 2005. A Lily ASR protein involves abscisic acid signaling and confers drought and salt resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 139:836-846.
- Yue B., Xue W., Xiong L., Yu X., Luo L., Cui K., Jin D., Xing Y., Zhang Q. 2006. Genetic basis of drought resistance at reproductive stage in rice: separation of drought tolerance from drought avoidance. *Genetics*, 172:1213-1228.
- Zamir D. 2001. Improving plant breeding with exotic genetic libraries. *Nat. Rev. Genet.*, 2:983-989.
- Zhang J.X., Nguyen H.T., Blum A. 1999. Genetic analysis of osmotic adjustment in crop plants. *J. Exp. Bot.*, 50:291-302.
- Zhang J.Z. 2003. Overexpression analysis of plant transcription factors. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 6:430-440.
- Zhang J.Z., Creelman R.A., Zhu J.K. 2004. From laboratory to field. Using information from *Arabidopsis* to engineer salt, cold, and drought tolerance in crops. *Plant Physiol.*, 135:615-621.
- Zhang X., Fowler S.G., Cheng H., Lou Y., Rhee S.Y., Stockinger E.J., Thomashow M.F. 2004. Freezing-sensitive tomato has a functional CBF cold response pathway, but a CBF regulon that differs from that of freezing-tolerant *Arabidopsis*. *Plant J.*, 39:905-919.
- Zhu J., Gong Z., Zhang C., Song C-P, Damsz B., Inan G., Koiwa H., Zhu J.K., Hasegawa P.M., Bressan R.A.

2002. OSM1/SYP61: a syntaxin protein in Arabidopsis controls abscisic acid-mediated and non-abscisic acid-mediated responses to abiotic stress. *Plant Cell*, 14:3009-3028.
- Zhu J., Shi H., Lee B.H., Damsz B., Cheng S., Stirm V., Zhu J.K., Hasegawa P.M., Bressan R.A. 2004. An Arabidopsis homeodomain transcription factor gene, HOS9, mediates cold tolerance through a CBF-independent pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101:9873-9878.
- Zhu J., Verslues P.E., Zheng X., Lee B.H., Zhan X., Manabe Y., Sokolchik I., Zhu Y., Dong C.H., Zhu J.K., Hasegawa P.M., Bressan R.A. 2005. HOS10 encodes an R2R3-type MYB transcription factor essential for cold acclimation in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102:9966-9971.
- Zhu J.K., Shi S., Bressan R.A., Hasegawa P.M. 1993. Expression of an *Atriplex nummularia* gene encoding a protein homologous to the bacterial molecular chaperon Dna. *J. Plant Cell*, 5: 341-49.
- Zhu J.K., Damsz B., Kononowicz A.A., Bressan R.A., Hasegawa P.M. 1994. A plant vitronectin like extracellular adhesion protein is related to the translational elongation factor-1 alpha. *Plant Cell*, 6:393-404.
- Zhu J.K. 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants *Annu. Rev. Plant Biol.*, 53:247-73.
- Zhu J.K. 2003. Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 6:441-445.