



Rendiconti
Accademia Nazionale delle Scienze detta dei XL
*Memorie e Rendiconti di Chimica, Fisica,
Matematica e Scienze Naturali*
141° (2023), Vol. IV, fasc. 3, pp. 421-426
ISSN 0392-4130 • ISBN 978-88-98075-58-4

Approcci genetici e molecolari per lo studio e il miglioramento della risposta a stress abiotici in pianta

GIORGIA BATELLI

CNR – Istituto di Bioscienze e Biorisorse (CNR-IBBR) SS Portici
E.mail: giorgia.batelli@ibbr.cnr.it

Abstract – Environmental stresses, especially water scarcity, are major drivers of agricultural production losses. As climate change intensifies, leading to more frequent and severe extreme weather events, there is an urgent need to develop crop varieties that can withstand these adverse conditions. To create plants with improved resilience, it is essential to understand the physiological mechanisms that enable plants to endure stress. Recent advances in genomics and plant biotechnology, particularly through research on the model organism *Arabidopsis*, have greatly expanded our knowledge of stress response mechanisms and the identification of critical genes and processes. By conducting stress experiments on various genotypes and integrating morpho-physiological analyses with transcriptome studies, researchers can identify key genes involved in environmental responses. These candidate genes are then subjected to detailed functional and genetic analyses using *Arabidopsis* mutants, and transformation and genome editing technologies are employed in cultivated species such as tomato. Within this context, the Portici Genetics Group has made significant contributions to advancing our understanding of the genetic basis of stress tolerance in both model and crop species.

Keywords: abiotic stress, drought, climate change, genomics, stress response mechanisms, biotechnologies and genome editing

Riassunto – Gli stress ambientali, prima tra tutti la carenza idrica, costituiscono la più importante causa di perdite di produzione nel settore agrario. I cambiamenti climatici in corso, che si traducono in una maggiore frequenza e intensità di fenomeni estremi, rendono ancora più urgente lo sviluppo di varietà coltivate in grado di adattarsi a condizioni ambientali sfavorevoli.

Una conoscenza dettagliata dei meccanismi alla base delle risposte fisiologiche utilizzate dalle specie vegetali per difendersi dagli stress è dunque essenziale per progettare piante con migliori caratteristiche di resilienza. L'avvento della genomica e delle biotecnologie vegetali, affiancati allo studio della specie modello *Arabidopsis*, con il suo bagaglio di tool a disposizione dei ricercatori, ha consentito negli ultimi decenni un balzo nelle nostre conoscenze e nella identificazione di geni e processi implicati nella risposta agli stress.

Il set-up di esperimenti di stress, anche su genotipi con diversa capacità di adattamento, affiancato da analisi morfo-fisiologiche integrate allo studio dei trascrittomi, consente l'identificazione di geni candidati con ruoli primari nella risposta all'ambiente. Ad una prima selezione dei geni candidati, segue una dettagliata analisi funzionale e genetica, consentita dalla disponibilità di mutanti in *Arabidopsis*, e dalle tecnologie di tra-

sformazione e di editing genomico in specie coltivate quali il pomodoro.

In questo ambito, vengono esposti esempi del contributo del Gruppo di Genetica di Portici allo sviluppo delle conoscenze e alla comprensione delle basi genetiche della tolleranza a stress in specie modello e ortive.

Parole chiave: stress abiotico, siccità, cambiamento climatico, genomica, meccanismi di risposta allo stress, biotecnologie e editing del genoma

In quanto organismi sessili, le piante devono affrontare e adattarsi agli stress abiotici, che costituiscono per esse una sfida enorme. Temperature estreme, deficit idrico, eccesso di salinità nel suolo sono tra gli stress più comuni e più impattanti per le specie agrarie e, a seconda dell'intensità, frequenza e durata possono portare a riduzioni delle rese anche fino al 70% [1]. Inoltre, stress multipli e ricorrenti, affrontati più volte all'interno di un ciclo culturale, costituiscono la regola per la vita di una pianta e per una coltura.

Negli ultimi anni, la questione degli stress ambientali è resa quanto mai urgente dai cambiamenti climatici in corso, che causano un aumento dell'intensità e della frequenza di eventi estremi, come picchi di temperatura, periodi di estrema siccità o al contrario fenomeni di allagamento. Gli stress e i cambiamenti climatici pongono una sfida relativa alla sicurezza alimentare, che, insieme all'aumento della popolazione mondiale, rende necessario assicurare la stabilità delle produzioni, anche in un clima incerto. In parallelo, i sistemi agricoli pongono essi stessi questioni relative alla sostenibilità delle produzioni alimentari. Le attività agricole sono infatti tra le più importanti fonti di emissioni di gas serra e di immissione di nitrati in natura.

L'agricoltura è dunque chiamata ad affrontare i cambiamenti climatici, e allo stesso tempo contribuire a mitigare l'impatto di questi, per migliorare la propria sostenibilità e produrre sempre di più, in maniera più sostenibile, anche in condizioni climatiche sempre più scarsamente predicibili.

In condizioni di stress, le piante attivano diverse risposte fisiologiche e molecolari (Fig. 1A). Una delle risposte più rapide e impattanti sulla crescita e produzione è la riduzione degli scambi gassosi. In condizioni di deficit idrico, infatti, si osserva una riduzione della traspirazione e dell'assorbimento di CO₂, derivanti in maniera preponderante dalla chiusura stomatica, e che riflettono un meccanismo di risparmio idrico. Di conseguenza, si osserva una riduzione dell'attività fotosinteti-

ca che, in condizioni di stress prolungato e intenso, si traduce in una riduzione dell'area fogliare, della biomassa e in una generale riduzione della crescita. Si osservano inoltre modificazioni dell'architettura radicale, del rapporto tra apparato radicale e parte aerea, riflesso della redistribuzione della biomassa vegetale e mirato all'aumento di capacità di estrazione dell'acqua dal suolo. Si osservano inoltre variazioni del tempo di fioritura, ritardato o anticipato in condizioni di stress a seconda della specie e del meccanismo da essa adottato per tollerare lo stress [1]. A livello cellulare, si ha una riduzione del contenuto idrico relativo, che è essenzialmente un risultato del minore apporto idrico e dell'aumento di osmoliti compatibili. Condizioni di stress idrico inducono stress ossidativo, generato da un aumento delle specie reattive dell'ossigeno (ROS), come il perossido di idrogeno. L'aumento dei ROS si traduce in danni alle membrane cellulari, misurati con un aumento di malondialdeide.

A livello biochimico le piante rispondono a stress osmotici con un accumulo di osmoliti compatibili, come la prolina e, a seconda della specie presa in analisi, zuccheri e glicina betaina, e con una induzione delle attività antiossidanti, come l'ascorbato perossidasi. In foglia, si osserva inoltre un accumulo di acido abscissico (ABA), il fitormone maggiormente caratterizzato per il suo ruolo nella risposta a stress e nella attivazione della chiusura stomatica. Per mitigare gli effetti degli stress ambientali sulla pianta e sui sistemi agricoli, è necessario un approccio integrato, che coniughi diverse strategie (Fig. 1B). Una di queste è l'agricoltura di precisione, quindi un utilizzo più intelligente, più mirato delle risorse, anche affiancato ad esempio da nanotecnologie e da chimici di nuova generazione che siano in grado di stimolare le risposte agli stress. Nelle colture abbiamo poi studi ecosistemici che passano attraverso l'identificazione di microrganismi utili che contribuiscano a migliorare la risposta delle piante agli stress. Infine, un ruolo preponderante è assegnato alla genetica e al miglioramento genetico.

Con esperimenti controllati, in ambienti di laboratorio e anche attraverso l'utilizzo di approcci fenomici in campo, in serra o in laboratorio, si arriva all'identificazione di geni, *network* e *pathway* utili per migliorare la tolleranza delle piante agli stress ambientali. Analisi genomiche, come ad esempio *genome wide association studies* (GWAS), permettono l'identificazione di variabilità, alleli utili o superiori da trasferire nelle varietà coltivate. Costituiscono fonti di variabilità ad oggi solo parzialmente esplorate le specie selvatiche e le *landraces*, va-

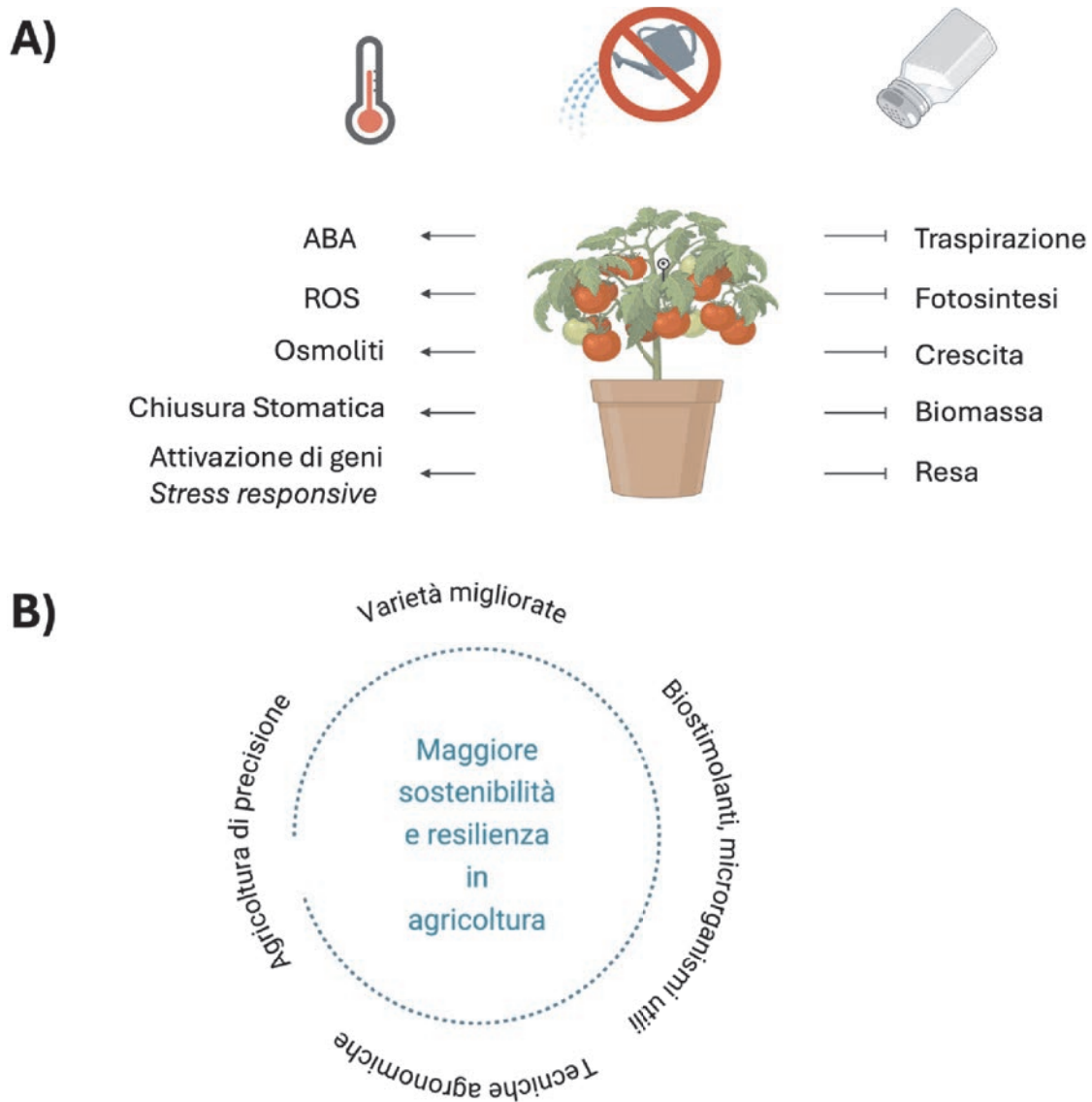


Fig. 1. A) Risposte fisiologiche all'esposizione a stress osmotici (elevate temperature, deficit idrico, salinità); B) Approcci integrati per migliorare la sostenibilità e la resilienza dei sistemi agricoli. Immagini ottenute mediante BioRender.com

rietà locali anche molto distanti da quelle utilizzate per la produzione di massa.

La ricerca genetica ha contribuito negli anni alla elucidazione di meccanismi di risposta agli stress, attraverso l'identificazione di interi *pathway*, come quello mediato da ABA [2]. Sappiamo oggi che cambiamenti osmotici a livello della membrana plasmatica elicitano nella cellula oscillazioni di calcio. Queste a loro volta guidano un accumulo nel citoplasma delle cellule di guardia di ABA. La percezione di ABA è affidata a recettori della famiglia *PYR/PYL/RCAR*, proteine cito-

plasmatiche identificate nel 2009 da due laboratori indipendenti, guidati dai Prof. S. Cutler (UCR, USA) and E. Grill (TUM, Germania). Attraverso il legame con ABA, i recettori diventano capaci di legare proteine fosfatasi del tipo 2C (PP2C) che, in condizioni di assenza di stress, inibiscono la via di trasduzione del segnale da ABA. Una volta percepito il segnale di stress, le proteine fosfatasi vengono inibite e le chinasi della famiglia SnRK₂ sono quindi libere di attivare una cascata di trasduzione del segnale che passa attraverso eventi di fosforilazione di diversi *target* molecolari, come ad esempio

canali anionici localizzati sulla membrana delle cellule di guardia, favorendo la chiusura degli stomi, e di fattori di trascrizione del tipo ABF che attivano l'espressione di geni responsivi a stress [3].

Oltre a questa via di trasduzione del segnale, che ha un ruolo fondamentale nella risposta a stress, esistono molti altri livelli di regolazione, inclusi livelli di regolazione post-trascrizionali che passano per il metabolismo degli RNA. Sappiamo infatti che una volta avviata la trascrizione esistono diversi momenti che possono regolare l'effettiva quantità di proteina funzionale prodotta all'interno di una cellula. Tra questi, annoveriamo fenomeni di regolazione della maturazione dell'RNA, quindi attraverso regolazione dello splicing, anche di splicing alternativo, regolazione dell'aggiunta del 5' cap e della poliadenilazione [2]. Una volta prodotto l'mRNA maturo, è necessario che questo venga esportato dal nucleo verso il citoplasma e, una volta arrivato nel citoplasma, questo può subire diversi destini, di tradotto in proteina oppure di degradazione. Pensiamo all'mRNA *decay*, in presenza di trascritti che non codificano proteine funzionali, oppure può essere stoccato all'interno di granuli di stress. Tutti questi *step* possono essere regolati e vengono regolati in presenza di stress.

Attraverso l'utilizzo di un sistema semplificato per l'identificazione di geni, coinvolti nell'adattamento a stress, messo su negli anni '90 presso il laboratorio Stress di Portici, sono stati identificati e caratterizzati alcuni geni coinvolti nel metabolismo dell'RNA e con un ruolo nella risposta a stress. Cellule di patata vengono esposte a uno shock di tipo osmotico, ottenuto attraverso un'esposizione improvvisa a concentrazioni elevate di polietilene glicole (PEG 20%). In alternativa, la stessa concentrazione di PEG viene raggiunta attraverso un'esposizione graduale in una finestra di due mesi, e definisce la popolazione di cellule adattate. In questo modo sono state ottenute tre popolazioni di cellule, una popolazione controllo, una popolazione shockata e una popolazione adattata, di maggiore interesse per lo studio di fenomeni correlati alla resilienza [4]. Attraverso sistemi che si sono evoluti nel tempo, e attraverso sottrazione dei geni similmente regolati nella popolazione shockata, è stato possibile identificare geni specificamente regolati nelle cellule adattate. L'identificazione degli orologi in *Arabidopsis thaliana* ha permesso il disegno di uno screening di mutanti, di *knockout*, che sono stati fenotipizzati in condizioni di stress e in presenza di ABA. Sono stati così identificati diversi mutanti che presentano alterazioni della sensibilità a stress e/o ABA e quattro di questi, e i relativi geni sono stati al momento caratteriz-

zati, tra cui *RGGA*, codificante una proteina legante l'RNA [5]. In patata, *RGGA* viene specificamente indotto in condizioni di adattamento e non in condizioni di shock osmotico. Similmente, in *Arabidopsis* questo gene viene indotto in condizioni di stress salino, in presenza di ABA e di PEG. Attraverso l'uso di una proteina di fusione con GFP (*Green Fluorescent Protein*) abbiamo verificato la localizzazione di questa proteina nel citoplasma, essenzialmente a ridosso della membrana nucleare. Analisi fenotipiche che hanno previsto l'uso di mutanti *knock-out* (*rgga*) e piante transgeniche sovraesprimenti (OX::*RGGA*) hanno dimostrato un maggiore vigore delle linee *rgga*, più grandi rispetto al genotipo *wild type* (WT) in condizioni controllo. Viceversa, in presenza di ABA o NaCl, le linee *rgga* dimostrano una taglia ridotta rispetto a WT e una maggiore sensibilità in termini di allungamento della radice primaria, e una minore percentuale di sopravvivenza in presenza di stress idrico o di stress salino. In accordo, le linee sovra-esprimenti mostrano un comportamento opposto, presentando una taglia ridotta rispetto a WT in assenza di stress, e una migliore tolleranza a condizioni di stress. Attraverso microarray sono stati confrontati i trascrittomi delle piante *rgga* con WT e OX::*RGGA*, e sono stati identificati geni che vengono differenzialmente regolati nelle due linee. È stato in particolare verificato che *RGGA* regola in maniera diretta o indiretta l'espressione di importanti geni coinvolti nella risposta a stress come geni heat shock, chaperoni e *DREB2A*, un'importante fattore di trascrizione coinvolto nella risposta a stress idrico. È attualmente in corso uno *screening* per la ricerca di interattori proteici di *RGGA* e di RNA *target*. Attraverso il saggio del doppio ibrido di lievito sono stati identificati diversi candidati interattori, come ad esempio RANBP1, coinvolta nel trasporto dell'RNA dal nucleo verso il citoplasma, un regolatore della stabilità dell'mRNA, un fattore di allungamento della trascrizione e diversi altri. Un *subset* di questi candidati è stato validato mediante Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC). Presso l'Università degli studi di Salerno, nei laboratori dei Prof. Ambrosone e Leone, sono in corso analisi proteomiche sulle diverse popolazioni cellulari di patata, che confermano come i meccanismi di biosintesi e processamento dell'RNA rivestono grande importanza nell'adattamento a stress osmotico.

Negli anni, grazie alla disponibilità di nuove tecnologie e strumenti, e anche attraverso l'attivazione dei progetti PON GenoPOM e GenoPOM-Pro, sono stati effettuati diversi esperimenti per la caratterizzazione della risposta a stress ambientali in pomodoro.

Il pomodoro riveste una grande importanza nel mondo e per l'Italia in particolare, sia a livello economico che nutrizionale. La disponibilità di risorse e *tool* genomici, a partire dal sequenziamento del genoma completato nel 2012 [6], e la messa a punto protocolli per la coltivazione *in vitro* e per la trasformazione stabile, rendono il pomodoro una specie modello per lo studio di diversi processi, come lo sviluppo e maturazione di frutti carnosi.

È disponibile, inoltre, un'ampia collezione di varietà tradizionali, anche italiane, che sono caratterizzate anche dalla possibilità di riuscire a crescere e a produrre anche in climi non ottimali o in presenza di input nutrizionali ridotti. È questo il caso di alcune varietà tradizionali campane, che appartengono alla categoria da serbo, e sono caratterizzate da frutti che hanno una elevata conservabilità, per alcune delle quali è stato effettuato il risequenziamento del genoma [7-8].

L'avvento e l'evolversi delle tecnologie di sequenziamento di nuova generazione (*Next Generation Sequencing*, NGS), accoppiato all'utilizzo di varietà commerciali o tradizionali, ha permesso una caratterizzazione con gli anni sempre più approfondita delle variazioni trascrittomiche indotte da stress ambientali, multipli o ricorrenti [9-11].

Nel 2016, un esperimento di stress idrico ricorrente, in cui a periodi di interruzione dell'irrigazione venivano intervallati giorni di ripristino della stessa, ha prodotto una lista di circa 2000 geni differenzialmente espressi in almeno uno dei punti sperimentali presi in analisi [10].

Nel 2022, con un esperimento di stress combinato idrico/bassi input azotati su due genotipi tradizionali, realizzato nell'ambito del progetto H2020 TOMRES, sono stati identificati circa 2500 geni differenzialmente espressi in foglia e 4000 in radice e migliaia di trascritti alternativi [11].

In questo esperimento, sono stati sottoposti a screening circa 30 genotipi, inclusi genotipi tradizionali campani, in presenza di stress idrico, bassi input azotati, e una combinazione di questi due stress. Sono stati così selezionati due genotipi caratterizzati da un apparato radicale molto diverso e anche da una diversa tolleranza alle condizioni di stress applicate. L'analisi trascrittomiche ha permesso di verificare che le risposte nei due genotipi sono molto diverse, in particolare nel genotipo sensibile si attivano *pathway* essenzialmente catabolici, quindi di utilizzo delle risorse esistenti, mentre nel genotipo tollerante sono indotti *pathway* collegati alla fotosintesi e alla efficienza fotosintetica, suggerendo che in questo genotipo la fotosintesi è attiva anche in condizio-

ni di stress. È stata inoltre valutata la presenza di trascritti alternativi differenzialmente regolati nei due genotipi, evidenziando la presenza di trascritti alternativi diversi nei genotipi sensibile e tollerante, anche di importanti mediatori della risposta a stress come proteine del tipo *heat shock factor* e mediatori della crescita come componenti del *pathway* TOR (Target of Rapamycin).

L'identificazione di geni differenzialmente espressi, tuttavia, costituisce solo una prima indicazione, cui deve essere seguita una analisi che definisca l'effettivo contributo dei geni candidati nel determinare la tolleranza a stress. Nei diversi studi di trascrittomiche sopra descritti un gene, che abbiamo denominato *UP1*, è stato identificato come indotto in maniera elevata e consistente in foglia in condizioni di stress idrico e di stress salino. Una analisi della proteina codificata ha evidenziato un'elevata omologia con proteine della famiglia AFP (*ABI5 BINDING PROTEIN*), caratterizzate in *Arabidopsis* come regolatori negativi della via di percezione dell'ABA. Le proteine AFP sono infatti capaci di legare il fattore di trascrizione *ABI5* (*ABA INSENSITIVE 5*), membro della famiglia ABF, e favorirne la degradazione.

Attraverso un'analisi filogenetica sono stati identificati in pomodoro tre membri della famiglia AFP, caratterizzati da una diversa espressione tissutale e organizzazione degli elementi in *cis* presenti nel promotore. Nel promotore di *UP1* sono infatti presenti elementi di risposta stress e a ormoni come ABA. Mediante l'utilizzo di dati di letteratura corrispondenti a esperimenti di trascrittomiche e attraverso un approccio di machine learning, è stato possibile costituire un *network* di regolazione dei tre geni di pomodoro, indicando che, pur appartenendo alla stessa famiglia, fanno parte di *network* sono distinti l'uno dall'altro. Un'analisi delle categorie *Gene Ontology* arricchite nel *network* di *UP1* ha evidenziato la presenza di categorie coinvolte nella risposta a stress, come *heat shock protein*, *unfolded protein*, risposta a caldo e risposta a stimoli di temperatura. Tra i geni specifici facenti parte del *network* di *UP1*, sono presenti ortologhi di pomodoro di fattori di trascrizione del tipo ABF.

Un'analisi di interazione proteica tra *UP1* e una proteina ABF presente nel *network*, condotta mediante il saggio del doppio ibrido di lievito ha confermato l'interazione. È in corso la conferma di questa interazione mediante BiFC e l'analisi di interazione con ulteriori proteine ABF. Sono state inoltre prodotte linee di pomodoro editate nel gene *UP1*. In seguito a trasformazione stabile è stata valutata la presenza, il tipo e lo stato di zigosio degli eventi di editing nelle generazioni T-1 e T-2. Sono state, quindi, selezionate diverse linee che produ-

cono proteine tronche, sperabilmente incapaci di funzionare e al momento una di queste è stata utilizzata per una analisi fenotipica preliminare. Sono state infatti effettuate analisi di germinazione del mutante *up1* e della linea WT in condizioni controllo e in presenza di ABA. Il mutante è caratterizzato da un ritardo nel tempo medio di germinazione anche in condizioni controllo, esacerbato da concentrazioni crescenti di ABA, sia a livello di emergenza della radichetta che di espansione dei cotiledoni.

Ulteriori analisi fenotipiche, allo stadio di plantula e di pianta adulta, in condizioni di stress e di pianta adulta saranno necessarie per verificare il coinvolgimento di *UP1* nella via di trasduzione del segnale mediata da ABA in pomodoro.

In conclusione, i cambiamenti climatici in corso pongono sfide senza precedenti. Negli ultimi quarant'anni, grazie alla ricerca scientifica, la conoscenza dei meccanismi di risposta agli stress ambientali ha fatto enormi pro-

gressi, anche grazie all'utilizzo di specie modello e di *tool* in esse disponibili. Il recente sviluppo di nuovi strumenti genomici e delle tecnologie legate al *genome editing* consente di affrontare questa sfida nelle specie di interesse agrario. È essenziale, però, ricordare che la genetica è solo uno degli strumenti disponibili, da utilizzare per mettere a punto approcci integrati e multidisciplinari, per lo sviluppo di ecosistemi agrari maggiormente resilienti e sostenibili (Fig. 1B).

Ringraziamenti

Si ringraziano tutti i membri presenti e passati del laboratorio stress di Portici, in particolare Stefania Grillo, Alfredo Ambrosone, Antonello Costa, Salvatore Esposito, Antonella Leone, Roberta Nurcato, Paolo Iovieno, Paola Punzo, Alessandra Ruggiero. Si ringrazia il Prof. L.M. Monti, che ha costantemente incentivato la ricerca sugli stress ambientali presso il CNR di Portici.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Zhang, H., Zhao, Y., Zhu, J. K., 2020. Thriving under stress: how plants balance growth and the stress response. *Developmental Cell*, 55, pp. 529-543. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.10.012>.
- [2] Zhang, H., Zhu, J., Gong, Z., Zhu, J.K., 2022. Abiotic stress responses in plants. *Nature Reviews Genetics*, 23, pp. 104-119. <https://doi.org/10.1038/s41576-021-00413-0>.
- [3] Klingler, J.P., Batelli, G., Zhu, J.K., 2010. ABA receptors: the START of a new paradigm in phytohormone signalling. *Journal of Experimental Botany* 61(12), pp. 3199-210. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq151>.
- [4] Leone, A., Costa, A., Tucci, M., Grillo, S., 1994. Comparative analysis of short- and long-term changes in gene expression caused by low water potential in potato (*Solanum tuberosum*) cell-suspension cultures. *Plant Physiology* 106(2), pp. 703-712. <https://doi.org/10.1104/pp.106.2.703>
- [5] Ambrosone, A., Batelli, G., Nurcato, R., Aurilia, V., Punzo, P., Bangarusamy, D.K., Ruberti, I., Sassi, M., Leone, A., Costa, A., Grillo, S., 2015. The Arabidopsis RNA-binding protein AtRGGA regulates tolerance to salt and drought stress. *Plant Physiology*, 168(1), pp. 292-306. <https://doi.org/10.1104/pp.114.255802>
- [6] Tomato Genome Consortium, 2012. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature*, 485(7400), p. 635. <https://doi.org/10.1038/nature11119>.
- [7] Tranchida-Lombardo, V., Aiese Cigliano, R., Anzar, I., Landi, S., Palombieri, S., Colantuono, C., Bostan, H., Termolino, P., Aversano, R., Batelli, G. and Cammareri, M., 2018. Whole-genome re-sequencing of two Italian tomato landraces reveals sequence variations in genes associated with stress tolerance, fruit quality and long shelf-life traits. *DNA Research*, 25(2), pp. 149-160. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsx045>.
- [8] Ercolano, M.R., Sacco, A., Ferriello, F., D'Alessandro, R., Tononi, P., Traini, A., Barone, A., Zago, E., Chiusano, M.L., Buson, G. and Delledonne, M., 2014. Patchwork sequencing of tomato San Marzano and Vesuviano varieties highlights genome-wide variations. *BMC genomics*, 15, pp. 1-13. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-138>.
- [9] Landi, S., Punzo, P., Nurcato, R., Albrizio, R., Sanseverino, W., Aiese Cigliano, R., Giorio, P., Fratianni, F., Batelli, G., Esposito, S., Grillo, S., 2023. Transcriptomic landscape of tomato traditional long shelf-life landraces under low water regimes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 201:107877. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.107877>.
- [10] Iovieno, P., Punzo, P., Guida, G., Mistretta, C., Van Oosten, M.J., Nurcato, R., Bostan, H., Colantuono, C., Costa, A., Bagnaresi, P., Chiusano, M.L., Albrizio, R., Giorio, P., Batelli, G., Grillo, S., 2016. Transcriptomic Changes Drive Physiological Responses to Progressive Drought Stress and Rehydration in Tomato. *Frontiers in Plant Science*, 7:371. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00371>.
- [11] Ruggiero, A., Punzo, P., Van Oosten, M.J., Cirillo, V., Esposito, S., Costa, A., Maggio, A., Grillo, S., Batelli, G., 2022. Transcriptomic and splicing changes underlying tomato responses to combined water and nutrient stress. *Frontiers in Plant Science*, 13:974048. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.974048>.