

IDENTIFICAÇÃO ATRAVÉS DE GENÔMICA FUNCIONAL DE TRÊS GENES HOMEBOX ENVOLVIDOS COM A RESPOSTA AO ESTRESSE HÍDRICO EM CAFÉ A PARTIR DE DADOS DO BANCO GENOMA CAFÉ

Fernanda P. da CRUZ¹, E-mail: nandacruz@hotmail.com; Adriana ARONGAUS¹; Eduardo ROMANO³; Maíté VASLIN²; Alan de CARVALHO³; Márcio ALVES-FERREIRA¹, E-mail: alvesfer@biologia.ufrj.br

¹Departamento de Genética, Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ); ²Departamento de Virologia, Instituto de Microbiologia, UFRJ; ³CENARGEN, EMBRAPA.

Resumo:

Os fatores de transcrição do tipo homeobox em plantas se encontram frequentemente envolvidos em processos do desenvolvimento. Eles estão divididos em 8 sub-famílias: Zinc-finger homeobox, Bell, Knox, Wuschel-like, HD-Zip-I, -II, -III, e -IV, de acordo com a conservação de seqüência e estrutura, dentro e fora do homeodomínio. Estudos recentes demonstraram que esses fatores estão também relacionados com a regulação da resposta ao estresse em plantas. Análises de expressão dos genes *Athb* -5, -6, -7, -12 (sub-família HD-ZipI) em *Arabidopsis thaliana*, e do putativo ortólogo em girassol Hahb-4, sugerem que esses genes podem regular o crescimento em resposta ao hormônio ácido abscísico (ABA) em condições de déficit hídrico, e aumentar a tolerância à seca. Neste trabalho, procuramos identificar dentro do banco de dados gerado pelo Programa “Genoma Café” potenciais genes homeobox utilizado métodos filogenéticos para classificá-los dentro dos grupos já bem estabelecidos. Para eleger os genes mais interessantes, diferencialmente expressos em condições de estresse hídrico, foi realizada uma análise *in silico* de expressão (*Northern* digital). A partir destas análises, três contigs foram escolhidos para estudos posteriores, sendo renomeados de acordo com o mais similar em *A. thaliana*: *Cahat22*, *Cahb12* e *Cahb1*. Os níveis de expressão desses três genes homeobox foram analisados por PCR em tempo real (qPCR) em plantas de *Coffea arabica* submetidas às condições de déficit hídrico. Os resultados obtidos confirmaram o observado nas análises de *Northern* digital, e todos os genes homeobox de café apresentaram seu padrão de expressão modulado pela condição de déficit hídrico em folhas, caules e raízes, sendo este padrão diferente para cada gene. Análises de qPCR em distintas regiões da raiz, e experimentos de hibridização *in situ*, nos permitiram observar o padrão de expressão em diferentes estágios de desenvolvimento, assim como a expressão espacial dos genes *Cahb1* e *Cahb12*: *Cahb12* é preferencialmente expresso em raízes laterais e no início da raiz principal, enquanto *Cahb1* possui uma expressão mais uniforme ao longo desse órgão. Os dois genes foram reprimidos na porção mais próxima ao meristema apical da raiz. Os resultados dos experimentos de hibridização *in situ* revelaram que *Cahb1* e *Cahb12* são expressos exclusivamente no floema das raízes.

Palavras-chave: Genes homeobox, estresse hídrico, melhoramento biotecnológico, café.

FUNCTIONAL GENOMIC STUDIES IN “GENOMA CAFÉ” IDENTIFIED THREE COFFEE HOMEBOX GENES INVOLVED IN DROUGHT STRESS RESPONSES

Abstract:

Plant transcriptional factors containing homeodomain are frequently involved in developmental processes. They are divided into eight sub-families according to sequence conservation and structure in and outside the homeodomain: Zinc-finger homeobox, Bell, Knox, Wuschel-like, HD-ZipI, -II, -III, e -IV. Recent studies have shown that homeobox genes are also involved in transcriptional regulation of stress response in plants. Expression analysis of *Arabidopsis thaliana* genes *Athb5*, -6, -7, -12 (HD-ZipI sub-family) and the sunflower putative orthologue Hahb-4, suggest that these genes may regulate growth in response to the hormone abscisic acid (ABA) in water deficit conditions and also enhance tolerance to drought. In this work, we searched for potential homeobox genes in the “Genoma Café” Sequencing Project Consortium database, and used phylogenetic methods to classify those among the well-established groups found in *A. thaliana*. To identify genes differentially expressed and also tissue-specific, we conducted a digital expression analysis. Three contigs with expression patterns apparently influenced by water stress were chosen for further analysis. We renamed these genes based on similarities with *A. thaliana* genes: *Cahat22*, *Cahb12* and *Cahb1*. Expression levels of these three homeobox genes were analyzed by real-time PCR (qPCR) in *Coffea arabica* plants submitted to water deficit. Our results were in agreement with the digital northern data, and all coffee homeobox genes had expression modulated under water deficit conditions in leaves, stems and roots, showing different patterns of expression for each one. The qPCR expression analysis of distinct roots regions and *in situ* hybridization allowed us to reveal the expression pattern in distinct developmental stages as well spatial localization of *Cahb12* and *Cahb1* mRNAs: *Cahb12* is preferentially expressed in lateral roots, and in the beginning of primary root, while *Cahb1* shows conspicuous expression along this organ. Both genes were repressed in the portion of primary root closer to the root apical meristem. The results of *in situ* hybridization experiments revealed that *Cahb12* and *Cahb1* are expressed exclusively in root phloem.

Keywords: Homeobox genes, water stress, biotechnological improvement, coffee.

Introdução

Dentre os problemas que afligem o cultivo do café, estima-se que o estresse hídrico seja um dos mais graves. A limitação hídrica é capaz de elevar em 45% o índice de grãos malformados quando a deficiência coincide com a fase de

granação, reduzindo significativamente o crescimento vegetativo e a produção seguinte (Camargo, 1985; Drinnan & Menzel, 1995). Está prevista uma redução de produção entre 26,9% e 23,9% na safra de 2007/08, em relação à safra de 2006/07, causada pelas condições climáticas adversas no período da floração (principalmente pela falta de precipitação em níveis adequados), e pela bianualidade negativa (CONAB, 2006). A utilização de práticas de conservação da umidade do solo ou de irrigação podem ser formas de amenizar e contornar a problemática do déficit hídrico, porém esbarram na elevação dos custos do cultivo, assim como limitam a expansão da fronteira agrícola do cultivo do café.

Quando submetidas a condições de estresse hídrico, as plantas disparam uma complexa cascata de sinalização (dependente ou não do ácido abscísico – ABA) que culmina com a ativação de uma série de mecanismos de resposta responsáveis por conferir tolerância ao estresse. A expressão de muitos genes é induzida nessa situação, e alguns fatores de transcrição já foram identificados como reguladores de diversas etapas relacionadas com a resposta ao estresse hídrico, como por exemplo, CBF/DREB e ABF (Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 2006). Recentemente, estudos com fatores de transcrição da família homeobox revelaram que esses fatores também podem estar envolvidos na resposta da planta à seca (Henriksson et al., 2005). Os genes homeobox apresentam um domínio conservado de 60 aminoácidos (homeodomínio), e são encontrados em diversos organismos eucarióticos. Geralmente estes fatores de transcrição estão envolvidos com processos de diferenciação e desenvolvimento celular. Em plantas existem 8 sub-famílias de genes homeobox: Zinc-finger homeobox, Bell, Knox, Wuschel-like, HD-Zip-I, -II, -III, e -IV (Rocha et al., 2005).

Todos os genes homeobox relacionados até o momento com a resposta ao estresse hídrico fazem parte da sub-família HD-Zip-I, uma classe encontrada exclusivamente em plantas. Análises de expressão dos genes Athb -5, -6, -7, -12, e -16 em *Arabidopsis thaliana*, e do provável ortólogo em *Helianthus annuus* Hahb-4, sugerem que esses genes podem regular o crescimento em resposta ao hormônio ABA em condições de déficit hídrico. Plantas transgênicas da espécie *A. thaliana* superexpressando os genes Athb-7 e Athb-12 possuem uma maior sensibilidade ao ABA, porém não apresentam um fenótipo de maior tolerância à seca (Olsson et al., 2004). Já leveduras expressando o gene Athb-12 são mais resistentes ao estresse salino (Shina et al., 2004). Por outro lado, plantas *A. thaliana* superexpressando o gene Hahb-4 de girassol, mais similar ao Athb-12, são bastante resistentes ao estresse hídrico tanto em meios de cultura quanto em solo (Dezar et al., 2005). Recentemente esse gene foi descrito também como um inibidor da síntese do etileno, uma vez que essas plantas mais tolerantes senescem mais lentamente do que plantas selvagens controle (Manavella et al., 2006).

Com o objetivo de minimizar a lacuna existente no conhecimento científico acerca dos fatores genéticos e moleculares determinantes das características agrônômicas importantes no cafeeiro, como a tolerância a estresses bióticos e abióticos, foi realizado o Projeto Genoma Café. Este projeto teve a iniciativa do Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café, e consistiu no seqüenciamento de um grande número de genes expressos (ESTs) em café. O Projeto Genoma Café identificou e anotou cerca de 20.000 genes de *Coffea* spp. a partir do seqüenciamento de 200.000 clones de ESTs obtidos de diversas bibliotecas de cDNA.

Apesar do melhoramento clássico em plantas ter sido responsável pelo desenvolvimento de todas as variedades com maior tolerância ao estresse hídrico, estratégias envolvendo plantas transgênicas tem obtido um sucesso surpreendente no desenvolvimento de plantas resistentes à seca (Oberschall et al., 2000; Kang et al., 2002). Esse trabalho visa identificar e isolar, através de técnicas de genômica funcional, genes homeobox presentes em café que possam ser utilizados na obtenção de plantas transgênicas resistentes ao estresse hídrico, utilizando para tanto, a informação obtida pelo banco Genoma Café. Os resultados desta pesquisa poderão gerar informações de extrema valia para obtenção de produtos, além do retorno econômico esperado, com a diminuição das perdas em uma cultura de grande importância econômica.

Material e Métodos

Data-mining do banco Genoma Café para identificação e caracterização das seqüências de genes homeobox relacionados ao estresse hídrico

Para a obtenção das seqüências referentes aos genes homeobox em café, foi realizada uma pesquisa no banco de dados Genoma Café utilizando como “iscas” seqüências consenso COBBLER correspondentes às 8 sub-famílias de homeobox: Zinc-finger homeobox, Bell, Knox, Wuschel-like, HD-ZipI, HD-ZipII, HD-ZipIII, e HD-ZipIV. As seqüências com o *e-value* menor que 10^{-5} foram selecionadas, e a presença do homeodomínio foi confirmada utilizando-se o programa PRODOM (Bru et al., 2005) e PFAM (Bateman et al., 2004).

Para a análise de expressão digital, os números de leituras de seqüenciamento computados para cada gene encontrado nas diversas bibliotecas utilizadas para construção do banco de dados, foram normalizados pelo número total de leituras em cada biblioteca. Os valores obtidos foram analisados pelo programa *Cluster*, que agrupou os genes de acordo com o padrão de expressão mais similar, e os resultados foram visualizados utilizando o programa *TreeView* (Page, 2006). Foram escolhidos três contigs com expressão diferencial em condições de estresse hídrico para análises posteriores, e esses genes foram renomeados de acordo com o gene mais similar encontrado em *A. thaliana*: *CaHat22*; *Cahb1*, e *Cahb12*.

Posteriormente, foi realizada uma análise filogenética, através do alinhamento das seqüências referentes apenas ao homeodomínio dos genes em café, e seqüências do domínio homeobox presente nas diferentes sub-famílias em *A. thaliana*. Estas análises foram realizadas utilizando-se o programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* – MEGA, através do método de análises de distância de *neighbor-joining*. Para a construção das árvores foram utilizadas 1000 repetições, utilizando o teste *Interior Branch Test*.

Validação *in vivo* dos resultados obtidos no *data-mining*

Para a validação *in vivo* dos resultados, foram utilizadas amostras de RNA de *Coffea arabica*, variedade Catuaí Vermelho, cedidas pela Dra. Juliana Almeida e Dr. Eduardo Romano (CENARGEN, EMBRAPA), obtidas a partir de folhas de plantas com 7 anos de idade, submetidas a períodos de 2, 7 e 10 dias sem rega. A modulação da expressão em condições de estresse hídrico foi confirmada primeiramente por RT-PCR, e posteriormente por PCR em tempo real (qPCR).

Os testes *in vivo* foram repetidos em nossa casa de vegetação com plantas de 7 meses de idade, da espécie *Coffea arabica*, variedades Catuaí Vermelho e Amarelo. A rega normal das plantas foi suspensa até a observação do sintoma de murcha. Medias de troca gasosa foram realizadas nessas plantas com o auxílio do aparelho de infra-vermelho *Infrared Gas Analyser* (IRGA), a fim de melhor caracterizar o estresse sofrido por essas plantas. Foi coletado material para análises de expressão dos genes *CaHat22*, *Cahb1*, e *Cahb12* em folha, caule e raiz de plantas controle e estressadas. Foram também realizadas análises mais detalhadas em diferentes regiões da raiz dessas plantas (raízes laterais, secundárias, e primária em seções a 5, 10 e 20 cm a partir do final do caule) para os genes *Cahb1* e *Cahb12*.

A determinação da expressão espacial dos genes *Cahb1* e *Cahb12* também foi obtida através de experimentos de hibridização *in situ*. Seções de 8 µm de raízes laterais de café foram hibridizadas com sondas de RNA marcadas com digoxigenina-11-rUTP transcritas *in vitro* a partir de clones contendo o cDNA completo dos genes *Cahb1* e *Cahb12*.

Resultados e Discussão

Através da análise dos padrões de expressão digital, foram escolhidos três contigs que apresentaram expressão aparentemente induzida nas bibliotecas de estresse hídrico. Esses contigs foram renomeados de acordo com a similaridade a genes previamente caracterizados em *A. thaliana* como *CaHat22*, *Cahb1*, e *Cahb12*. Para uma melhor localização desses genes dentro dos grupos já bem estabelecidos em plantas, foi realizado um alinhamento levando em conta somente as seqüências de aminoácidos referentes ao homeodomínio dos homeobox de café, e *A.thaliana* (Figura 1). Os genes *Cahb1* e *Cahb12* alinham dentro da sub-família de homeobox HD-ZipI conforme esperado, de acordo com o descrito anteriormente na literatura para todos os homeobox envolvidos com a resposta ao estresse hídrico descritos até o momento (Henriksson et al., 2005). O gene *CaHat22* não agrupou dentro de nenhuma família conhecida por não haver informação disponível suficiente sobre esse homeodomínio que permitisse seu alinhamento. Experimentos de RACE-PCR estão sendo realizados no intuito de clonar o cDNA completo desse gene.

Em seguida, para a validação da expressão dos homeobox de café em condições de estresse hídrico, foram realizadas análises de RT-PCR, e qPCR em plantas de *C. arabica*, variedade Catuaí Vermelho, com 7 anos de idade submetidos a 2, 7 e 10 dias sem rega. Todos os três genes apresentaram resposta modulada ao déficit hídrico em momentos iniciais da indução, 2 dias após a suspensão da rega, indicando que esses genes podem atuar no controle da expressão gênica inicial de resposta ao déficit hídrico. Com base nesses resultados, iniciamos experimentos em nossa casa de vegetação, em que a rega de plantas de *C. arabica*, variedades Catuaí Amarelo e Vermelho (7 meses de idade) foi suspensa até a observação dos sintomas de murcha. Foi realizada análise de expressão por qPCR em folhas, caule e raiz das plantas estressadas (Figura 2). A expressão dos genes *Cahb1* e *Cahb12* foi induzida em todos os tecidos analisados, enquanto o gene *CaHat22* foi induzido em folhas e raízes estressadas, sendo entretanto, reprimida no caule. O padrão de expressão do *CaHat22* sugere que eles possam ter funções diferentes ou adicionais quando comparado aos genes *Cahb1* e *Cahb12* no controle da expressão gênica em resposta ao estresse hídrico.

Para os genes *Cahb1* e *Cahb12* foi realizada uma análise de expressão mais detalhada, em diferentes regiões da raiz. Foram coletados material de raiz lateral, raiz secundária, e raiz principal a 5, 10 e 20 cm a partir do final do caule. O padrão de expressão para cada gene foi acessado a partir de análises de qPCR (Figura 3). Tanto *Cahb1*, quanto *Cahb12*, foram induzidos em quase todas as porções das raízes submetidas ao estresse hídrico, menos na região mais próxima ao meristema apical da raiz, onde ambos os genes foram reprimidos. Aparentemente a inibição da expressão gênica na região do meristema pode indicar que outros fatores, possivelmente relacionados com o estágio de desenvolvimento da raiz, podem modular a expressão dos genes *Cahb1* e *Cahb12* sobrepondo o estímulo por déficit hídrico.

As análises de hibridização *in situ* em raízes laterais revelaram que a expressão dos genes *Cahb1* e *Cahb12* é restrita ao floema dessas estruturas (Figura 4). O sinal da marcação apresentou-se sutil, o que já era esperado para fatores de transcrição, porém consistente, presente em diversos cortes seriados. Esses resultados são similares aos observados em *Phaseolus* submetidos ao estresse hídrico para outro fator de transcrição (b-Zip), induzido na condição de estresse hídrico e expresso especificamente em raízes (Rodriguez-Uribe & O'Connell, 2006).

Conclusões

Foram identificados e isolados em café, três fatores de transcrição da família homeobox, aparentemente envolvidos com a resposta à seca: *CaHat22*, *Cahb1*, e *Cahb12*. A expressão de *Cahb1* e *Cahb12* foi induzida em plantas de café submetidas a condições de estresse hídrico em todos os tecidos analisados (folha, caule e raiz). *CaHAT22*, porém, teve sua expressão induzida em folhas e raízes, mas foi reprimido em caules submetidos a condições de déficit hídrico.

Um estudo mais detalhado em diferentes regiões das raízes revelou que tanto *Cahb1* quanto *Cahb12* são induzidos em condições de estresse hídrico nas raízes laterais, secundárias e primárias a 5 e 10 cm a partir do caule, sendo reprimidos somente na porção mais próxima ao meristema apical da raiz primária.

As análises de hibridização *in situ* em raízes laterais do café revelaram que a expressão desses fatores de transcrição ocorre, de forma restrita, no floema dessas estruturas.

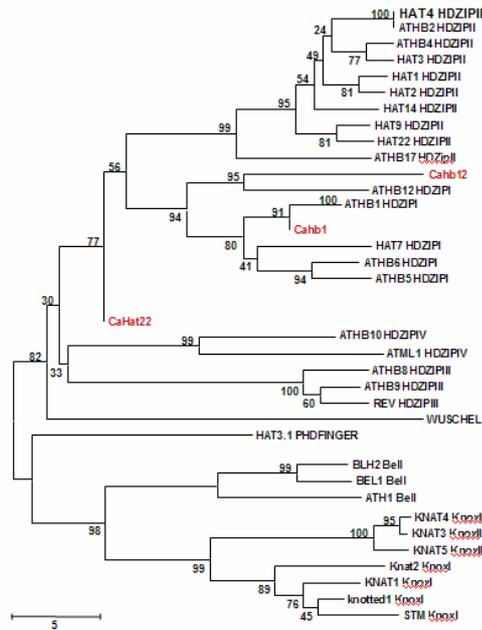


Figura 1 – Análise filogenética dos genes homeobox selecionados em café. Em vermelho estão representadas as posições dos genes selecionados em café, e em preto estão representadas as seqüências homeobox presentes nas 8 diferentes sub-famílias em *A. thaliana* que foram utilizadas para este estudo. O valor de *bootstrap* está representado ao lado de cada braço da árvore.

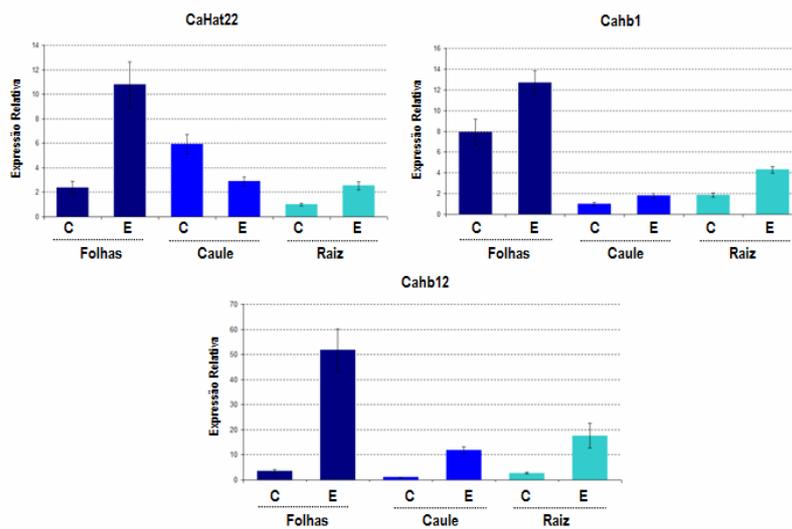


Figura 2 – Padrão de expressão, através de análises de qPCR, dos genes *CaHat22*, *Cahb1* e *Cahb12* em folhas, caule e raiz de café em condições de estresse hídrico. O valor relativo para a expressão gênica está representada no eixo Y. No eixo X estão representados os tratamentos utilizados: C = Plantas controle com rega normalizada, e E = plantas em que o regime normal de rega foi interrompido. O padrão de expressão do gene ubiquitina foi utilizado como controle para a normalização do padrão de expressão dos outros genes. Barras de erro = 1 desvio padrão.

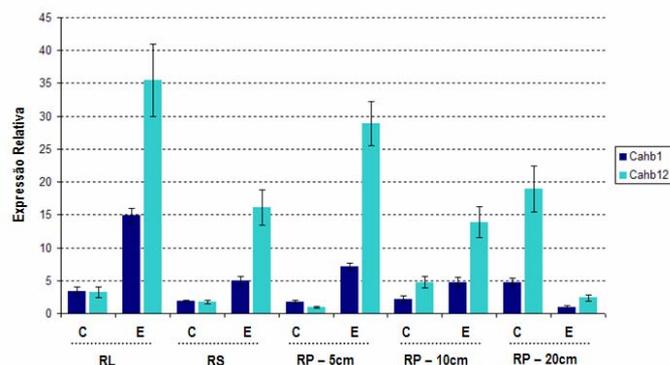


Figura 3 – Resultados de qPCR para a expressão dos genes *Cahb1*, e *Cahb12* em diferentes regiões da raiz. Raízes de *C.arabica* (Catuaí Vermelho) foram coletadas em diferentes regiões: Raiz lateral (RL), raiz secundária (RS), e raiz principal (RP) a 5, 10 e 20cm, a partir do final do caule. C= Plantas controle submetidas ao regime normal de rega, E = Plantas em que a rega foi suspensa. Barras de erro = 1 desvio padrão.

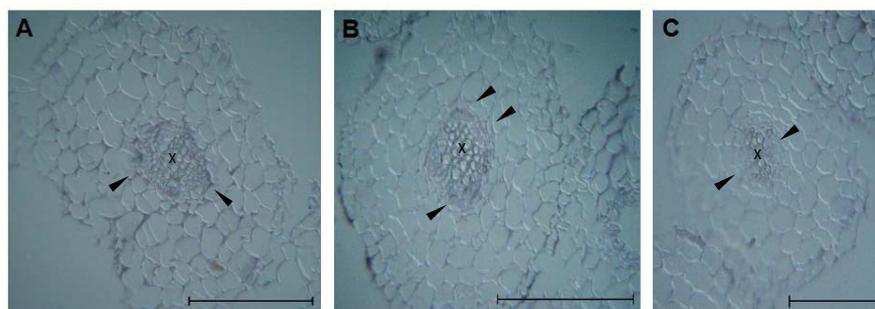


Figura 4 – Hibridização *in situ*. A localização *in situ* dos transcritos para os genes *Cahb1* e *Cahb12* foi realizada em raízes de *C.arabica* submetidas ao estresse hídrico, com sondas específicas para cada gene HD-Zip. As cabeças de seta indicam a região do floema onde foi observado sinal de marcação (azul-violeta) para os genes *Cahb1* e *Cahb12* nos painéis (A) e (B), respectivamente. No painel (C) observamos uma seção controle hibridizada com sonda sense. O X central indica a região do xilema. Todas as imagens foram obtidas em uma objetiva com aumento de 20X. Barras de escala = 200µm.

Referências Bibliográficas

- Bateman, A.; Coin, L.; Durbin, R.; Finn, R.D.; Hollich, V.; Griffiths-Jones, S.; Khanna, A.; Marshall, M.; Moxon, S.; Sonnhammer, E.L.L.; Studholme, D.J.; Yeats, C.; & Eddy, S.R.(2004) The Pfam Protein Families Database. *Nucleic Acids Research* 32: D138-D141.
- Bru, C.; Courcelle, E.; Carrère, S.; Beausse, Y.; Dalmar, S.; & Kahn, D. (2005) The ProDom database of protein domain families: more emphasis on 3D. *Nucleic Acids Research* 33: D212-D215.
- Camargo, F. (1985) Florescimento e frutificação de café arábica nas diferentes regiões (cafeiras) do Brasil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 20: 831-839.
- Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) (2006) Boletim: 1^o Levantamento de Café 2007/08. <http://www.conab.gov.br/conabweb/>.
- Dezar, C.A.; Gago, G.M.; González, D.H.; & Chan, R.L. (2005) Hahb-4, a sunflower homeobox-leucine zipper gene, is a developmental regulator and confers drought tolerance to Arabidopsis thaliana plants. *Transgenic Research* 14(4): 429-440.
- Drinnan, J.E. & Menzel C.M. (1995) Temperature affects vegetative growth and flowering of coffee (*Coffea arabica* L.). *Journal of Horticultural Science* 70: 25-34
- Henriksson, E.; Olsson, A.S.B.; Johannesson, H.; Johansson, H.; Hanson, J.; Engström, P., & Söderman, E. (2005) Homeodomain Leucine Zipper Class I Genes in Arabidopsis. Expression Patterns and Phylogenetic Relationships. *Plant Physiology* 139: 509–518.
- 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: 343-357.
- Manavella, P.A.; Arce, A.L.; Dezar, C.A.; Bitton, F.; Renou, J.; Crespi, M.; & Chan, R.L. (2006) Cross-talk between ethylene and drought signalling pathways is mediated by the sunflower Hahb-4 transcription factor. *The Plant Journal* 48 (1): 125–137.
- Oberschall, A.; Deak, M.; Torok, K.; Sass, L.; Vass, I.; Kovacs, I.; Feher, A.; Dudits, D.; & Horvath, G.V. (2000) A novel aldose/aldehyde reductase protects transgenic plants against lipid peroxidation under chemical and drought stresses. *Plant Journal* 24: 437-446.
- Olsson, A.S.B.; Engström, P.; & Söderman, E. (2004) The homeobox genes ATHB12 and ATHB7 encode potential regulators of growth in response to water deficit in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology* 55: 663–677.
- Page, R. D. M. (1996) TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 357-358.
- Rocha, G.; Corrêa, R.L.; Borges, A.C.N.; de Sá, C.B.P. & Alves-Ferreira, M. (2005) Identification and characterization of homeobox genes in eucalyptus. *Genetics and Molecular Biology* 28, 3 (suppl): 511-519.
- Rodríguez-Uribe, L.; & O'Connell, M.A. (2006) A root-specific bZIP transcription factor is responsive to water deficit stress in tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) and common bean (*P. vulgaris*). *Journal of Experimental Botany* 57(6): 1391–1398.
- Shina, D.; Kooa, Y.D.; Leea, J.; Leea, H.; Baeka, D.; Leeb, S.; Cheonc, C.; Kwakd, S.; Leea, S.Y.; & Yuna, D. (2004) Athb-12, a homeobox-leucine zipper domain protein from Arabidopsis thaliana, increases salt tolerance in yeast by regulating sodium exclusion. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 323: 534–540.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. & Shinozaki, K. (2006) Transcriptional Regulatory Networks in Cellular Responses and Tolerance to Dehydration and Cold Stresses. *Annual Review of Plant Biology* 57:781–803.