

付 属 資 料

1. 要望書（ポルトガル語）
2. 要望書（英訳）
3. M/M 署名版（英語）
4. R/D 署名版（英語）

1. 要望書（ポルトガル語）

Projeto de Cooperação Científica

Brasil – Japão

Desenvolvimento de Plantas de Soja Tolerantes

à Seca e ao Calor

Cooperação Científica - Brasil e Japão

Seção 1 - Identificação do projeto

1.1 Título

Desenvolvimento e caracterização de plantas de soja geneticamente modificadas tolerantes à seca e ao calor através de estratégias de engenharia genética.

1.2. Duração prevista

60 meses

1.3. Fonte externa

JST – *Japan Science and Technology Agency.*

JICA – *Japan International Cooperation Agency.*

Contraparte no Japão: JIRCAS - *Japan International Research Center for Agricultural Sciences*, sob coordenação da pesquisadora Dra. Kazuko Yamaguchi – Shinozaki.

1.4. Custo estimado (Em U\$; Cotação utilizada U\$1,00=R\$2,00)

Recursos Externos Solicitados:

Brasil - US\$ 3,000,000.00 (~R\$ 6.000.000,00)/ 5 anos

US\$ 600,000.00/ano (R\$1.200.000,00/ano)

Japão – US\$ 1,500,000.00 (~R\$ 3.000.000,00)/ 5 anos

US\$ 300,000.00/ano (R\$ 600.000,00/ano)

Contrapartida Estimada do Brasil:

- Salários de Pesquisadores envolvidos: ~US\$ 3,000.00/pesquisador/mês
Total de 14 pesquisadores da Embrapa (60 meses): US\$ 2,520,000.00
- Salário de Técnicos de Laboratório: Analistas (10): US\$ 2,000.00/técnico/mês
Total de Técnicos da Embrapa (60 meses): US\$ 1,200.000.00
- Bolsas do CNPq já obtidas: DTI (1) – US\$ 1.000.00/mês
Mestrado (1) – US\$600.00/mês
Pós-Doutorado (1) – US\$1 500 00/mês
Total Bolsistas (60 meses): US\$186.000.00

Total Estimado Contrapartida (60 meses): US\$ 3,906,000.00

OBS.: Foram considerados somente salários médios de pesquisadores e técnicos (da Embrapa) e bolsistas envolvidos no projeto. Custos de infra-estrutura e

Cooperação Científica - Brasil e Japão

manutenção (equipamentos, laboratórios, serviços) não foram considerados no cálculo.

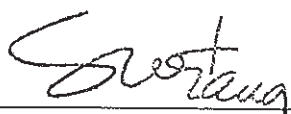
1.5. Entidade proponente

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Coordenador do projeto no BRASIL: Alexandre Lima Nepomuceno
Instituição de origem: Embrapa Soja
Titularidade máxima: *Ph.D.*
CPF: 442.002.000-82
email: nepo@cnpso.embrapa.br
Endereço: Rod. Carlos João Strass - Distrito de Warta
Telefone: (43) 3371 - 6218 Fax (43) 3371 6100
Caixa Postal 231 - CEP 86001-970 Londrina- Paraná- Brasil

1.6. Entidades co-participantes

- JIRCAS - *Japan International Research Center for Agriculture Science.*
- FALM – Faculdades Luiz Meneghel, em Bandeirantes.
- UniFil - Centro Universitário Filadélfia, Londrina – PR.
- Universidade Estadual de Londrina-PR.
- Universidade Estadual de Londrina-PR
- Instituto Agronômico do Paraná-PR

1.7. Local, data e assinatura do titular



Silvio Crestana
Presidente da Embrapa

Resumo do projeto

A frequência da ocorrência de eventos de seca tem aumentado significativamente na última década, provavelmente associados às mudanças climáticas ocorridas devido ao aquecimento do planeta. Os estados do Sul do Brasil, responsáveis por mais de 40% da produção nacional de soja perderam mais de 25% de sua produção nas safras. Se consideradas também perdas indiretas relacionadas a todo agronegócio envolvido na cultura e, a economia das regiões produtoras de grãos, essas perdas certamente têm grande impacto na sociedade. Várias estratégias podem ser utilizadas para reduzir as perdas causadas pela seca desde o manejo adequado do solo e da lavoura até o uso de irrigação. Outra possibilidade é o desenvolvimento de cultivares mais adaptadas às condições de déficit hídrico e, neste aspecto, a biotecnologia tornou-se uma importante ferramenta no desenvolvimento de variedades adaptadas a diferentes condições de estresses bióticos e abióticos. Há alguns anos, o Brasil assumiu a posição de terceiro maior produtor mundial de plantas Geneticamente Modificadas (GM), com a soja sendo o principal componente

desta produção. O equilíbrio dos preços da semente no mercado nas próximas décadas e, a manutenção da competitividade da soja brasileira, dependerá da capacidade de empresas brasileiras públicas e privadas, em desenvolver individualmente ou em parceria com outras instituições, estratégias que viabilizem o desenvolvimento de variedades comerciais de soja GM ou não, e, que, atendam as necessidades dos produtores brasileiros e do mercado. Desde 2004, a Embrapa vem desenvolvendo, em parceria, plantas geneticamente modificadas contendo construções gênicas com a tecnologia DREB. Várias linhagens GM foram geradas e atualmente, estes eventos estão sendo caracterizados (molecular, fisiológica e agronomicamente) em regime de contenção (em casa de vegetação) com resultados bastante promissores. Os próximos passos da caracterização necessitam ser desenvolvidos em condições reais de campo. Durante o período de trabalho com a tecnologia DREB no Brasil, novos avanços foram alcançados junto a equipe da Dra Yamaguchi – Shinozaki, do laboratório de estresses abióticos do *Japan International Reserach Center for Agricultural Sciences* (JIRCAS), que permitiram o aperfeiçoamento das construções gênicas que conferem tolerância à seca, e entre estas, destacou-se com resultados superiores, a construção contendo o gene sintético *DREB2A* (Patente nº 3178672 PCT/JP2004/01003), que também promove tolerância ao calor. E as construções gênicas contendo genes da família AREB (em processo de Patenteamento). Assim, em novembro de 2007, a EMBRAPA e o JIRCAS firmaram acordo para o desenvolvimento de soja GM, contendo estas construções. Esta parceria EMBRAPA e JIRCAS por mais de 10 anos tem sido aplaudida e incentivada, especialmente dentro do propósito de desenvolvimento de Plantas Geneticamente Modificadas Tolerantes à seca. Isto pode ser observado pelas correspondências trocadas entre os Ministros da Agricultura do Brasil e do Japão que seguem em anexo. Os genes DREB/AREB codificam fatores de transcrição que ativam vários outros genes, responsáveis pela proteção de estruturas celulares durante a desidratação celular. Utilizando estas construções gênicas, a equipe da Dra Yamaguchi - Shinozaki, já desenvolveu plantas de arroz, trigo, tabaco e *Arabidopsis thaliana*, com altos níveis de tolerância à seca. A Embrapa é a unica instituição a desenvolver soja GM contendo a construção DREB, criadas e patenteadas pelo Jircas. E, os novos eventos a serem gerados contendo construções DREB2 e AREB que forem considerados como promissores, serão testados pela equipe de ecofisiologia da Embrapa, em regime de contenção, quanto às suas respostas fisiológicas e agrônômicas, em condições de seca. Em nível de campo, os mesmos estudos serão realizados, mas, os eventos somente serão avaliados, após obtenção de autorização para liberação planejada no meio ambiente, junto a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. O objetivo final é o desenvolvimento de linhagens de soja GM tolerantes à seca que serão utilizadas pelos programas de melhoramento da Embrapa para criação de novas cultivares comerciais.

Palavras-Chave *DREB2A* Soja. Seca. Calor. Transformação Genética. OGMs. PCR em Tempo Real. Fisiologia Vegetal

Seção 2 – Justificativa

2.1. Diagnóstico de situação

Importância da Cultura da Soja no Brasil e no Mundo.

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja, exportando cerca de 75% de sua produção para mercados europeus (Anbio, 2006). Na safra 2006/07, a cultura ocupou uma área de 20,687 milhões de hectares, totalizando uma produção de 58,4 milhões de toneladas. Os Estados Unidos, maior produtor mundial do grão, responderam pela produção de 86,77 milhões de toneladas de soja. A produtividade média da soja brasileira é de 2.823 kg por hectares, chegando a alcançar cerca de 3.000 kg/ha no estado de Mato Grosso, o maior estado produtor. No Paraná, segundo estado em produção, a produtividade alcançou 2.995 kg/ha (Embrapa, 2008).

Os números da safra 2006/07 mostraram um aumento de 1,3 milhão/t (2,4%) superior à da safra passada (2005/06), de 53,4 milhões/t. O incremento ocorreu por causa da recuperação da produtividade que, na safra anterior, sofreu queda devido à estiagem (Conab, 2007).

No período de 2000 a 2007, as exportações de produtos do agronegócio brasileiro saltaram de US\$ 20,6 bilhões para US\$ 58,4 bilhões, um crescimento de 183,4%. O saldo comercial da balança do agronegócio neste período cresceu 235,8%, passando de US\$ 14,8 bilhões, em 2000, para a marca histórica de US\$ 49,7 bilhões no ano passado. O principal destino das vendas externas dos setores agropecuários, em igual período, foi a União Européia que, no ano passado, comprou 35,8% das exportações do agronegócio, totalizando a cifra de US\$ 20,9 bilhões.

O complexo soja contribuiu para o bom desempenho da balança do agronegócio. Em 2000, o Brasil exportou US\$ 4,2 bilhões de soja e seus subprodutos e, em 2007, esse número pulou para US\$ 11,4 bilhões, incremento de 171,3% (Cultivar, 2008). Dados do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior mostram que a soja tem uma importante participação nas exportações brasileiras. Em 2006, foram US\$ 9,3 bilhões, o que representou 6,77% do total exportado (Embrapa, 2008).

Muitas vezes passa despercebida a importância da soja em outros produtos de exportação brasileiros. Hoje o Brasil é o terceiro maior exportador de carne suína, e o primeiro em exportação de frangos. O Japão, por exemplo, importa 75% do frango consumido naquele país do Brasil. E a base das rações utilizadas na criação de suínos e aves no Brasil, tem a soja como seu principal componente.

Mudanças Climáticas e o Impacto na Produção Brasileira de Soja

Entretanto a primeira causa de diminuição da produção mundial de soja são os estresses abióticos que podem diminuir os rendimentos médios da maioria das culturas em mais de 50% (Boyer, 1982; Bray et al., 2000) enquanto

que, prejuízos causados por estresses bióticos reduzem em média de 10 a 20% da produtividade das culturas (Bray, 2004). Em relatório sobre seguridade agrícola elaborado pelo Ministério do Planejamento consta a ocorrência de secas como principal evento sinistrante na agricultura brasileira (71% dos casos), seguida por chuva excessiva (22% dos casos), granizo e geada. Assim, estresses abióticos como as secas podem reduzir rendimentos em lavouras e, restringir as latitudes e solos onde espécies comercialmente importantes podem ser cultivadas, afetando toda a sociedade e não somente aos produtores. Especialmente durante a fase reprodutiva, as perdas em rendimentos podem ser altamente significativas para a cultura da soja, pois as plantas abortam flores e legumes. Seria importante o desenvolvimento de plantas mais tolerantes que teriam o período entre o início do déficit e o sinal para abortamento de flores e legumes, maior, mais prolongado, e muito provavelmente as perdas em produtividade seriam menores, uma vez que, com mais tempo, aumentam as chances de ocorrência de chuvas.

De modo geral, a frequência da ocorrência de eventos de seca tem aumentado nas últimas décadas, provavelmente associadas às mudanças climáticas decorrentes do aquecimento do planeta (Stokstad, 2004; Schiermeier, 2006). O que aconteceria com a produção agrícola se as projeções de elevação de temperatura – fruto do aquecimento global, se confirmarem ao longo dos próximos anos? Em um estudo recém concluído, pesquisadores da Embrapa Informática Agropecuária (CNPTIA), unidade da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, do Ministério da Agricultura, e da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) mostraram que o café, o arroz, o feijão, o milho e a soja terão suas áreas aptas ao cultivo reduzidas praticamente pela metade, assim que a temperatura média da Terra estiver 5,8°C acima da atual. Esse aumento da temperatura deve ocorrer em um prazo de 50 a 100 anos, conforme previsão do Painel Intergovernamental sobre Mudanças do Clima (IPCC, na sigla em inglês). Segundo os pesquisadores, o aumento da temperatura altera o regime de chuvas, de evaporação da água e da transpiração das plantas. Assim, áreas que eram próprias para a plantação de determinada cultura deixam de sê-lo e outras que não eram adequadas passam a ser. Para a cultura da soja, aumentos de temperatura de 1°C e 3°C reduziram a área plantada para 2,7 e 2,1 milhões de km², respectivamente. No pior cenário, com aquecimento de 5,8°C, a área apta para o cultivo da soja passaria a ser de 1,2 milhões de km² (Agência CT, 2005). Situações de secas muito provavelmente acompanharão este evento de aquecimento global, sinalizado nas previsões ambientais (Nepomuceno et al., 2001b).

Para a sojicultura, os dados mostram que as perdas em razão da seca são constantes. Na safra brasileira 2003/04 foram produzidas 120,1 milhões de toneladas de grãos, uma redução de 2,5% em relação as 123,1 milhões de toneladas colhidas no ano agrícola 2002/03, quando não ocorreram problemas climáticos. De janeiro a abril de 2004, a escassez de chuvas nos estados do Sul, causou no PR perdas de aproximadamente 1,9 milhões de toneladas. O estado do RS foi o mais atingido, com uma quebra de 4,1 milhões de toneladas de soja, redução de 47,8% da produtividade da safra no estado. Na região Centro -

Oeste, as perdas foram calculadas em 3,4 milhões de toneladas grãos, sendo 2,1 milhões de toneladas de soja (Conab, 2004).

A safra seguinte, 2004/05, também foi marcada por severas condições climáticas. Nos estados do Sul do Brasil, responsáveis por mais de 40% da produção nacional de soja as perdas somaram mais de 25%. As perdas diretas nesses estados atingiram mais de U\$ 2,32 bilhões. No RS, as perdas foram acima de 70% na cultura da soja (Farias et al., 2005). No PR, SC, MS e GO, a soja foi a cultura mais prejudicada, com perdas respectivas de 2,8 milhões de toneladas, 280 mil toneladas e 1,2 milhões de toneladas (IBGE, 2005).

Esta safra 2004/05 entrou para a história da agricultura como a pior de todos os tempos. Deixaram de serem produzidos 12,4 milhões de toneladas de grãos, por causa da seca que assolou o Sul e o Centro do País. O fenômeno climático, cuja intensidade não foi prevista por nenhum instituto de meteorologia, afetou Estados que concentram 60% da produção nacional de grãos. O produto mais afetado foi novamente a soja, com uma perda de receita da ordem de R\$ 5,4 bilhões. A Conab estimou que a produção na safra 2004/05 seria de 53,119 milhões de toneladas, 8,281 milhões de toneladas abaixo da previsão de dezembro de 2004, que indicava colheita de 61,4 milhões de toneladas. Em outubro do mesmo ano, quando divulgou sua intenção para plantio na safra 2004/05, o governo havia estimado a produção de soja em algo entre 59,518 e 60,808 milhões de toneladas (Portal do Agronegócio, 2005).

Impactos Sociais e Econômicos em função de perdas na produtividade

Outro fator a ser analisado é a influência desses acontecimentos de seca nas questões fundiárias, principalmente nas regiões produtoras do Sul do Brasil, e os reflexos que causam em questões ambientais, principalmente no Norte e Centro - oeste brasileiro. No RS e no PR, os produtores que trabalham áreas menores que 100 ha representam quase 50% da área cultivada com soja. Os produtores que trabalham áreas entre 100 ha e 1.000 ha representam 40% da área total cultivada no RS e 44% no PR (Balbinotti e Roessing, 2006). Se por várias safras consecutivas, estes pequenos produtores de soja sofrem perdas consideráveis, e se, aliado a este fato, ocorre uma diminuição no preço do grão e diferenças no câmbio, a venda de terras por parte dos produtores ou a tomada das mesmas por agentes financeiros é inevitável. Assim, os produtores que podem, migram para áreas onde o custo da terra é menor, como nos estados do Norte e Centro - Oeste, favorecendo em muitas situações, o desmatamento de áreas com vegetação nativa. Os produtores que perdem suas terras e com dificuldades financeiras agravam, deste modo, os problemas fundiários que afligem o país.

Entre as alternativas para amenizar os problemas da deficiência hídrica está o uso da irrigação. Entretanto fatores econômicos e principalmente disponibilidade de recursos hídricos são sérios obstáculos para utilização desta estratégia. Outra possibilidade é o desenvolvimento de cultivares mais adaptadas a condições de déficit hídrico. No entanto, algumas dificuldades surgem para o melhorista na seleção de linhagens, como quantificar o efeito do estresse, seja pela falta de metodologia de avaliação, em razão da

Cooperação Científica - Brasil e Japão

complexidade dos mecanismos envolvidos, seja pela instabilidade e intensidade da ocorrência do fator de estresse. Além disso, a tolerância à seca é considerada uma característica poligênica e difícil de ser trabalhada somente pelo melhoramento genético convencional (Beever, 2000).

Em verdade, quanto mais mecanismos de redução de perdas forem utilizados, menores as chances do produtor em arcar com grandes prejuízos. Neste sentido, a biotecnologia tornou-se uma importante ferramenta no desenvolvimento de variedades adaptadas às diferentes condições de estresses bióticos e abióticos. Grupos de pesquisa no Brasil e no mundo têm direcionado seus trabalhos, objetivando o desenvolvimento de estratégias moleculares que visam criar Plantas Geneticamente Modificadas (PGMs), capazes de suportar por períodos maiores as condições de deficiência hídrica. Não há dúvida de que esta tendência em aperfeiçoamento e busca de novas tecnologias irá continuar, uma vez que, o uso de culturas comerciais GM tem se expandido radicalmente na última década, com a introdução de características de interesse que possibilitem a solução de problemas agrônômicos e que agregam valor ao produto.

Um relatório recente revela que, em 2007, o número de países adotando culturas GMs somou 23, sendo em número de 12, os países em desenvolvimento e 11, os países industrializados. Os três primeiros países que lideram o plantio de OGMs no mundo seriam EUA, com 57,7 milhões de hectares plantados principalmente com soja, milho, algodão, canola, abóbora, papaia e alfafa, seguido da Argentina, com 19,1 milhões de hectares plantados com soja, milho e algodão, e por fim em terceiro lugar, o Brasil, com 15 milhões de hectares semeados principalmente com soja e algodão. Os outros 20 países produtores de PGMs em ordem de hectares seriam Canadá (7 milhões de hectares), Índia (6,2 milhões de hectares), China (3,8 milhões de hectares), Paraguai (2,6 milhões de hectares), África do Sul (1,8 milhões de hectares), Uruguai (0,5 milhões de hectares), Filipinas (0,3 milhões de hectares), Austrália (0,1 milhões de hectares), Espanha (0,1 milhões de hectares), México (0,1 milhões de hectares), Colômbia (<0,1 milhões de hectares), Chile (<0,1 milhões de hectares), França (<0,1 milhões de hectares), Honduras (<0,1 milhões de hectares), República Checa (<0,1 milhões de hectares), Portugal (<0,1 milhões de hectares), Alemanha (<0,1 milhões de hectares), Eslováquia (<0,1 milhões de hectares), Romênia (<0,1 milhões de hectares) e Polônia (<0,1 milhões de hectares) (James. 2007).

Neste mesmo documento, dados mostram que o número de fazendeiros que optaram por adotar culturas GMs ultrapassou 50 milhões em 2007, sendo que 10 milhões destes produtores são pequenos fazendeiros ou de baixa renda que estão sendo beneficiados pelas ferramentas biotecnológicas, uma vez que as culturas GMs possuem performances consistentes e acarretam benefícios econômicos e sociais significativos para pequenos e grandes produtores, em países em desenvolvimento e industriais, mostrando que a biologia molecular implica também em questões humanitárias (James. 2007).

Outro ponto a ser observado é que o equilíbrio dos preços da cimento no mercado nas próximas décadas e a manutenção da competitividade da soja brasileira dependerá da capacidade de instituições brasileiras públicas e

privadas em desenvolver estratégias que viabilizem o desenvolvimento de variedades comerciais de soja GM ou não, que atendam as necessidades dos produtores brasileiros e do mercado. Essas estratégias devem abranger desde a descoberta, desenvolvimento e proteção intelectual de processos moleculares visando à solução de problemas agrônômicos e a agregação de valor à cultura, até a busca de parceiros internacionais que tenham interesses comerciais com o Brasil e, que, possuam tecnologias que favoreçam a sojicultura brasileira. Infelizmente, o Brasil ainda investe pouco em Pesquisa e Desenvolvimento (1,5%) em relação ao seu PIB, quando comparado ao investimento feito sobre PIBs de países desenvolvidos como os EUA (2,6%), Japão (3,06%) e Israel (4,73%) (MCT, 2006).

O Japão, especificamente, possui interesses comerciais na área agrícola com o Brasil, pois importa mais de 90% de sua soja e, sendo um país desenvolvido já vem pesquisando e desenvolvendo há duas décadas, estratégias de engenharia genética de plantas, visando aumento de tolerância à seca. Assim, através do JIRCAS, instituição pública japonesa, foi desenvolvida e patenteada a tecnologia DREB (Patentes DREB1A nº P3183458 e DREB2A nº P3178672 PCT/JP2004/010003) e AREB (em processo de patenteamento) que envolve a utilização de construções gênicas que ativam outros genes envolvidos em defesas celulares contra a dessecação, favorecendo assim maior tolerância à seca, em plantas onde essas construções são introduzidas. Cabe ressaltar que a Embrapa Soja, em parceria, com o JIRCAS é a única instituição, no mundo, que desenvolve trabalhos com construções contendo os genes *DREB1A* (Patente nº P3183458), *DREB2A* (Patente nº 3178672 PCT/JP2004/01003), e AREB em soja.

Estado da Arte da tecnologia DREB/AREB

Esta tecnologia, já mostrou muitos resultados em diferentes espécies vegetais e basicamente fundamenta-se em estudos moleculares recentes de regulação gênica em plantas submetidas ao estresse hídrico que têm identificado genes que respondem à desidratação. A família dos fatores de transcrição DREB (*Dehydration Responsive Element Binding*) também chamados CBF (*C-repeat binding factors*) controla a expressão de genes em resposta a estresses ambientais como seca, salinidade e baixa e alta temperatura. Através da técnica de ensaio de híbridos de levedura, foram isolados os clones de cDNA do gene *DREB1A* e seus homólogos *DREB1B* e *DREB1C* e o clone de *DREB2A* e seu ortólogo *DREB2B*. Dois clones homólogos da família de genes *CBF1* também foram identificados em *Arabidopsis*, *CBF2* e *CBF3* que correspondem *DREB1C* e *DREB1A* respectivamente (Liu et al., 1998; Stockinger et al., 1997; Gilmour et al., 1998). Outros genes também homólogos a essa família foram identificados. *OsDREB1A*, *OsDREB1B*, *OsDREB1C*, *OsDREB1D* e *OsDREB2A* foram isolados em arroz (Dubouzet et al., 2003). *GmDREBa*, *GmDREBb* e *GmDREBc* (Li et al., 2005) e *GmDREB2A* (Chen et al., 2007) em soja e *ZmDREB1A* (Qin et al., 2004) e *ZmDREB2A* (Qin et al., 2007) em milho.

Yamaguchi - Shinozaki et al., (1992) realizaram os primeiros trabalhos sobre o fator de transcrição DREB, identificando nove cDNAs nomeados RD (*Responsive to Desiccation*) de *A. thaliana*. Análises de *Northern blot* revelaram ampla variação no tempo de indução de genes RD, em resposta não somente a déficit hídrico, mas também, estresse salino, baixa temperatura e ácido abscísico (ABA).

O gene *rd29*, caracterizado por Yamaguchi - Shinozaki e Shinozaki (1993) codifica uma proteína com um resíduo de cisteína, altamente hidrofílica semelhante à estrutura das proteínas LEA (Baker et al., 1988; Yamaguchi - Shinozaki e Shinozaki, 1993). Dois genes correspondentes ao *rd29* estão localizados em *tandem* em uma região de 8 kb no genoma de *Arabidopsis*, denominados *rd29A* e *rd29B*. O gene *rd29A* possui dois elementos *cis* - atuantes na região promotora, um envolvido em resposta rápida contra a dessecação, induzido por mudanças no potencial osmótico, ou seja, independente de ABA e outro induzido por ABA, que apresenta uma resposta um pouco mais tardia. O elemento *cis* - atuante envolvido na indução mais rápida do *rd29A*, apresenta uma seqüência conservada de 9 pares de bases, TACCGACAT, denominada DRE (*Dehydration Responsive Element*), essencial para a regulação da expressão do *rd29A* sob condições de seca. O outro elemento de resposta envolvido na indução do *rd29A* é o elemento ABRE (*ABA Responsive Element*) e provavelmente está envolvido na ativação mais tardia do promotor *rd29A*.

A região promotora de alguns genes envolvidos na proteção de estruturas celulares durante o estresse e, que fazem parte da via metabólica independente de ABA, também apresentam o elemento *cis* - atuante DRE. A regulação da expressão desses genes é ativada pelo fator de transcrição estresse - induzido DREB (Kasuga et al., 2004). As proteínas DREB apresentam um domínio conservado de aproximadamente 60 aminoácidos denominado domínio ERF/AP2, inicialmente identificado na proteína APETALA2 de *A. thaliana*, que reconhece a região DRE desses genes (Shinozaki e Yamaguchi - Shinozaki, 2000; Okamuro et al., 1997).

Um grande número de genes expressos em condições de déficit hídrico ativados pela proteína DREB1A, em resposta a seca já foram identificados. Os produtos desses genes apresentam alta homologia com proteínas conhecidas, o que permitiu agrupá-los em categorias funcionais (Kasuga et al., 1999; Seki et al., 2001; Oono et al., 2003; Maruyama et al., 2004).

Deste modo, Kasuga et al., (1999) identificaram seis genes induzidos pela proteína DREB1A, envolvidos na tolerância a seca, salinidade e frio. São os genes *rd29A*, *kin1*, *kin2/cor6.6*, *cor15a*, *rd17/cor47* e *erd10*. Seki et al., (2001) também identificaram outros seis genes, *FL3-5A3*, *FL5-2I22*, *FL5-94*, *FL5-77*, *FL3-27* e *erd4*, envolvidos em resposta à seca e controlados por DREB1A.

Oono et al. (2003) identificaram ainda, 280 genes estresse - induzidos expressos entre o período de desidratação e reidratação em *A. thaliana*. Entre os genes estresse - induzidos identificados alguns eram regulados por DREB1A, como *rd29A*, *cor15A*, *Kin1*, *Kin2*, *rd17*, *erd13*, *rd28*, *erd4*, *rd20*, *erd9*, *erd7* e *rd22*.

Também, trabalhando com o fator de transcrição DREB1A, Maruyama et al., (2004) utilizando dois sistemas de microarranjo de cDNA, identificaram 38

genes ativados pelo fator, em plantas de *A. thaliana* contendo a construção 35S:*DREB1A*, e submetidas ao frio. As proteínas com diferentes funções foram classificadas em dois grupos. O primeiro grupo incluiu proteínas que funcionam na tolerância ao estresse como proteínas LEA, proteínas anticongelamento, proteínas hidrofílicas, proteínas de ligação ao RNA, transportadores de açúcar, e que participam da biossíntese de açúcares, como o galactinol. O segundo grupo continha proteínas envolvidas na regulação da transdução de sinal e na expressão de genes envolvidos na resposta ao estresse, como fatores de transcrição e enzimas que participam do metabolismo de fosfolípidios, como a fosfolipase C.

Quanto à obtenção de plantas geneticamente modificadas contendo este gene, a introdução do fator de transcrição *DREB1A*, sob o controle do promotor estresse induzido, *rd29A*, em *Arabidopsis thaliana*, tabaco e trigo resultou em um aumento da tolerância à seca, a salinidade e ao frio nessas espécies (Kasuga et al., 1999; Hsieh et al., 2002; Kasuga et al., 2004).

Plantas de tomate transformadas com a construção 35S:*CBF1/DREB1B* também apresentaram redução no crescimento, mas o tratamento com ácido giberélico reverteu este retardo, indicando que a super expressão do gene *DREB* pode interferir em processos de desenvolvimento regulados por fitohormônios. Sob condições de déficit hídrico, as plantas transgênicas de tomate mostraram maior tolerância à seca quando comparadas com as plantas selvagens (Hsieh et al., 2002).

Embriões de trigo transformados com construção *rd29A:DREB1A*, apresentaram folhas com turgor reduzido, após 15 dias de déficit hídrico. Entretanto, todas as plantas não transformadas, utilizadas como controles não foram tolerantes e morreram, demonstrando que a construção utilizada é eficiente no processo de tolerância à seca, pois o aumento da expressão da proteína *DREB* sob condições de seca induz a expressão de vários genes de defesa de estruturas celulares (Pellegrineschi et al., 2002; Oono et al., 2003; Bray et al., 2003).

Oh et al., (2005), também geraram arroz transgênico, com a expressão constitutiva dos genes *CBF3/DREB1A* e *ABF3* e verificaram que, após tratamento de estresse hídrico, as plantas não transformadas apresentaram murcha, enrolamento foliar e diminuição na clorofila mais intensos do que as linhagens transgênicas. Também foi observado que, após a reidratação, as plantas transgênicas apresentaram o crescimento praticamente igual às plantas controle e sobreviveram, enquanto que as plantas não transformadas apresentaram uma redução severa no crescimento e morreram. Mesmo utilizando um promotor constitutivo, as plantas transgênicas não sofreram redução no crescimento, possivelmente por *ABF3* ou *CBF3* ativarem em arroz, um menor número e nível de expressão de genes quando comparado com a ativação de genes em *A. thaliana*.

Em *Arabidopsis* submetida ao déficit hídrico o cDNA *rd26*, foi isolado, e a expressão deste gene foi induzida não somente por seca, mas também por ABA e alta salinidade. Plantas transgênicas superexpressando este gene foram altamente sensíveis ao ABA, enquanto que, plantas com o gene *rd26* reprimido foram insensíveis. Análises de microarranjo mostraram que os genes induzidos

por estresses abióticos e ABA apresentaram maior nível de expressão em plantas transgênicas superexpressando o gene *rd26*, e uma redução na expressão em plantas que possuíam o gene *rd26* reprimido. Estes resultados indicam que o gene *rd26* funciona com um ativador transcricional de genes induzidos por ABA, sob condições de estresses abióticos em plantas (Fujita et al., 2004).

Em trabalho recente, desenvolvido na Embrapa Soja, a construção gênica *rd29A:DREB1A*, contendo o promotor estresse induzido *rd29A* e a região codante do fator de transcrição *DREB1A*, ambas de *A. thaliana*, foi introduzida em soja, via biobalística, visando a obtenção de plantas com maior tolerância ao déficit hídrico. A confirmação da expressão do gene *AtDREB1A* em condições de déficit hídrico, pela indução do promotor *rd29A* em eventos positivos e, a confirmação da estabilidade da integração da construção no genoma da soja nas primeiras gerações (T₁) proveniente destes eventos foi realizada (Beneventi, 2006).

Em outro estudo, análises moleculares e estudos morfo - anatômicos e fisiológicos também foram executados nas plantas de soja geneticamente modificadas, geração T₂ e, os resultados mostraram que a inserção da construção *rd29A:DREB1A* induziu a expressão de vários genes envolvidos na resposta à seca quando as plantas foram submetidas ao déficit hídrico, inclusive de genes que não são ativados diretamente pela proteína DREB, e até mesmo o gene DREB endógeno da soja, sugerindo mecanismos indiretos de ativação (Polizel, 2007).

De modo geral, as respostas mais favoráveis das plantas transgênicas ao déficit hídrico, foram relacionadas à maior expressão de genes de defesa contra a dessecação, como os genes envolvidos na regulação da abertura dos estômatos, que garantem maior eficiência na condutância estomática e nas taxas fotossintética e transpiratória, apresentando menores temperaturas foliares. Genes envolvidos na osmoproteção, genes estruturais, que codificam proteínas que funcionam como canais de água e garantem maior captação de água e maior eficiência no uso da água pela planta e ainda genes que, entre outras funções, protegem as estruturas celulares e funcionam com chaperonas moleculares garantindo o funcionamento dos processos metabólicos vitais das plantas, também foram identificados (Polizel, 2007).

O estudo dos parâmetros fisiológicos e anatômicos das plantas GM contendo a construção *rd29A: DREB1A* mostraram que as plantas transgênicas apresentaram maior condutância estomática e, conseqüentemente maiores taxas fotossintética e transpiratória, além de maior eficiência fotossintética e maior teor de clorofila. O aumento de expressão do gene *DREB1A* não levou a formação de características xeromórficas nas folhas, no entanto pode ter causado alterações na sua espessura, pois estas ficaram mais finas, com a face abaxial da epiderme mais espessa. Apesar das plantas GMs terem apresentado respostas fisiológicas que indiquem maior tolerância ao déficit hídrico, elas não apresentaram características agrônômicas mais produtivas nas condições do experimento (Polizel, 2007; Salinet et al. 2007). No entanto, estas características podem ter sido limitadas em razão dos experimentos em casa de vegetação impedindo que as plantas transgênicas apresentassem todo seu

potencial de tolerância ao déficit hídrico, principalmente, em relação ao desenvolvimento do sistema radicular. Assim, novos experimentos em campo estão sendo programados visando uma caracterização agrônômica e fisiológica mais detalhada destes eventos positivos. Desta maneira, se a maior tolerância ao déficit hídrico for confirmada em condições de campo, estas plantas poderão ser transferidas para programas de melhoramento específicos que objetivam uma maior tolerância à seca, reduzindo as perdas de produtividade em ambientes com deficiência hídrica

Mais recentemente, outro fator de transcrição da família DREB também vem sendo utilizado em trabalhos visando tolerância a seca e ao calor. A expressão do gene *DREB2* é ativada, principalmente, em resposta à seca e a salinidade. A proteína DREB2A parece funcionar de maneira ABA independente, uma vez que sua expressão é induzida por seca e alta salinidade, mas não por tratamento com ácido abscísico (ABA). Assim como as outras proteínas da família DREB, a proteína DREB2 possui o domínio de ligação ao DNA conservado ERF/AP2, que se liga ao domínio DRE (*Dehydration Responsive Element*), de seqüência TACCGACAT, um *cis* – elemento ativo presente na região promotora de genes induzidos por seca, alta salinidade e frio (Sakuma et al., 2006a, 2006). Diferente da DREB1, a proteína DREB2 requer modificações pós - traducionais, como fosforilação, para sua ativação (Liu et al., 1998), embora o mecanismo de ativação ainda não esteja completamente elucidado.

O gene *DREB2* também possui o domínio conservado de ligação ao DNA, ERF/AP2 e reconhece a seqüência DRE. Os genes *DREB2A* e *DREB2B* são ativados, especificamente, em resposta à seca e salinidade, e estão localizados respectivamente, nos cromossomos cinco e três de *A. thaliana* (Nakashima et al., 2000). No entanto, um estudo em todo o genoma de *Arabidopsis* revelou a presença de pelo menos mais 6 homólogos de DREB2, porém, *DREB2A* e *DREB2B* são realmente os fatores principais funcionais responsáveis pela resposta a estes estresses (Sakuma et al., 2006b).

As proteínas DREB1A e DREB2A, segundo alguns estudos, possuem diferenças de especificidade na afinidade de ligação ao DNA, de maneira que, DREB1A apresenta maior afinidade de ligação pela seqüência A/GCCGACNT, enquanto DREB2A prefere ligar-se à ACCGAC. Baseados nestes trabalhos, Sakuma et al., (2006b) classificaram as proteínas DREB em três grupos, de acordo com os diferentes genes que regulam *downstream*. Assim, o primeiro grupo contempla genes que são regulados tanto por *DREB1A* quanto pelo *DREB2A*, e, a maioria deles tem em sua região promotora a seqüência ACCGACNT. O segundo grupo possui em sua região promotora a seqüência A/GCCGACNT e são regulados especificamente por DREB1A. O terceiro grupo de genes seria regulado somente pela proteína DREB2A e apresentaria freqüentemente, a seqüência A/GCCGACNA/G/C em sua região promotora. Estas diferenças nos genes *downstream* ativados por *DREB1A* e *DREB2A* resultam em tolerância a diferentes estresses abióticos nas plantas.

Trabalhando com o gene *DREB2A*, Sakuma e colaboradores (2006b) identificaram dois importantes domínios: um na região central da proteína, entre os aminoácidos 136 e 165, que funciona como um regulador negativo e, outro de ativação transcricional, a partir do aminoácido 254 até o final região C - terminal.

A deleção do domínio de regulação negativa transformou a proteína DREB2A em uma forma constitutivamente ativa (DREB2A CA) e análises de microarranjo em plantas de *Arabidopsis* geneticamente modificadas para super expressar a proteína DREB2A CA, sob o controle do promotor 35S de CaMV (*Cauliflower mosaic virus*), mostraram a indução não somente de genes envolvidos na tolerância à salinidade e a seca, mas também genes envolvidos na tolerância ao calor (*Heat - shock*) (Sakuma et al., 2006a). No total, 21 genes foram *up* – regulados pela super expressão de DREB2A CA e dentre eles, 12 genes (*rd29B*, *At1g52690*, *At1g69870*, *At3g53990*, *rd299A*, *rd17*, *Lea14*, *At2g23120*, *Cor15A*, *Kin1*, *Kin2*, *Cor15B* *MT2A* e *At1g22985*) foram *up* – regulados sob seca e seus promotores apresentavam a seqüência *core* DRE. Estes resultados sugerem que estes 14 genes são candidatos a alvos diretos de ativação por DREB2A (Sakuma et al., 2006b). Nove destes genes codificam proteínas LEA, que protegem macromoléculas como enzimas e lipídios, da desidratação (Shinozaki e Yamaguchi – Shinozaki, 1999) e a sua super produção provavelmente aumenta a tolerância ao estresse hídrico nas plantas transgênicas.

Outros trabalhos, também utilizando DREB2A CA em análises de microarranjo, comprovaram que, em *Arabidopsis*, DREB2A induz genes de resposta a calor (*Heat – shock*), inclusive de fatores de choque térmico (*Hsf - Heat shock factors*) (*AtHsfA3*), responsáveis, especificamente, pela regulação e indução de genes responsivos ao choque térmico e de chaperonas moleculares (*CPsHSP*, *At1g52560*, *At3g12580*, *At5g59720*), proteínas que mantém a homeostase do dobramento protéico e auxiliam na manutenção metabólica e estrutural das células durante o estresse térmico (Sakuma et al., 2006a; Schramm et al., 2008). Nestes estudos, resultados de RT – qPCR mostraram rápida indução de DREB2A em tratamento a 37°C, com picos à aproximadamente 30 min, e posterior decréscimo drástico e manutenção de baixo nível de expressão por 10 h após o estresse. Dados utilizando o gene DREB2A em uma construção contendo proteína verde fluorescente (GFP – *green fluorescent protein*) indicaram ainda, que, durante o choque térmico, a proteína é estável e se acumula no núcleo celular de raízes e folhas estudadas (Sakuma et al., 2006a).

O gene DREB2A é ainda gradualmente induzido, em *A. thaliana*, por tratamento com peróxido de hidrogênio (H₂O₂), não respondendo, no entanto, a tratamentos com fitormônios, como ABA, citocinina, etileno, auxina, jasmonato e ácido salicílico. Similarmente, DREB2B também é induzido por seca, salinidade e H₂O₂ em *A. thaliana* (Sakuma et al., 2006a).

Em milho, um homólogo de DREB2A foi isolado, *ZmDREB2A*, e os resultados mostram que seus transcritos acumulam, em plantas, em resposta à estresses de frio, desidratação, salinidade e calor. Análises de microarranjo mostraram que plantas superexpressando *ZmDREB2A*, tiveram indução *up* – regulada, não somente de genes que codificam proteínas LEA (*At3g53040*, *At1g52690*, *At2g36640*, *At3g15670*, *At5g06760*, *At1g01470*, *At2g35300* e *At1g32560*), com também de genes relacionados à resposta choque térmico (*At1g52560*, *At5g03720*, e *At3g12580*) genes de enzimas envolvidas no metabolismo (*At4g37990*, *At1g09350*, *At5g03860*, *At3g21720*, *At5g42800*

At2g38530, *At3g55940*, *At1g34580*, *At4g22870* e *At3g10450*) e detoxificação (*At1g49570* e *At1g48130*) (Qin et al., 2007).

O homólogo de *DREB2*, *GmDREB2A*, foi isolado em soja e sua expressão foi induzida por seca e alta salinidade, após 1 h de tratamento, atingindo o pico máximo em 6 h depois de iniciado os estresses. A baixa temperatura induziu *GmDREB2A* mais tardiamente com pico de expressão após 17 h de estresse. ABA também induziu a expressão deste gene após 30 min de tratamento, com pico em 3 h e posterior redução com 17 h de estresse. Estes resultados mostram que diferentemente dos fatores de transcrição tipo *DREB1* e tipo *DREB2*, *GmDREB2* responde ao ácido abscísico e estaria localizado em algum ponto sobreposto das vias de sinalização ABA dependente e independente. Os resultados deste trabalho mostraram ainda que em *A. thaliana* transgênica contendo o gene *GmDREB2*, a ativação de indução dos genes *rd29A* e *cor15a* ocorre, no entanto, *rd17* não é ativado (Chen et al., 2007).

Quanto ao desenvolvimento de plantas transgênicas mais tolerantes à seca utilizando o gene *DREB2A*, sua forma constitutivamente ativa (*DREB2A CA*) foi escolhida em muitos trabalhos, com construções gênicas contendo promotores constitutivos (35S) e estresse – induzido (*rd29A*) e os genes homólogos de *DREB2A* em *Arabidopsis* (Sakuma et al., 2006a, 2006b; Schramm et al., 2008), milho (Qin et al., 2007) e soja (Chen et al., 2007). Todos os trabalhos relatam que a tolerância não somente ao déficit hídrico, mais também a alta salinidade e calor foram aumentadas em plantas transgênicas de *A. thaliana* contendo as construções, indicando que *DREB2A* pode promover a indução da expressão de genes *downstream* de resposta a estes estresses em diferentes espécies vegetais.

Assim, as construções gênicas 35S: *DREB2A CA* e *rd29: DREB2A CA* foram utilizadas para transformar *A. thaliana*, que foram submetidas aos tratamentos de déficit hídrico, sem irrigação por 2 semanas e, ao congelamento a -6°C, por 30 h, seguido de 5 dias, a 22°C. Os resultados mostraram que, para a construção 35S: *DREB2A CA*, em ambos os estresses, as plantas controle não sobreviveram, no entanto, as plantas transformadas apresentaram taxas de sobrevivência entre 62,8% a 83,3% para o tratamento de seca e, de 5,0% a 11,7% para o tratamento de congelamento, indicando que *DREB2A* confere tolerância a seca, mas não ao frio intenso. Quando estes resultados foram comparados com plantas contendo a construção *rd29: DREB2A CA*, as taxas de sobrevivência pós aplicação do estresse foram maiores, de 21,3%, e de 83,3% a 88,3%, respectivamente, para plantas controle e transgênicas (Sakuma et al., 2006b).

Utilizando ainda construções com promotores constitutivos (35S) e estresse – induzido (*rd29A*), *A. thaliana* foi transformada com o gene *ZmDREB2A*, homólogo de *DREB2A* em milho. Assim, após um estresse hídrico de 10 dias, 30% das plantas controle sobreviveram enquanto que as taxas de sobrevivência para as plantas contendo a construção *rd29: ZmDREB2A* variaram de 81,3% a 96,3%. Quanto a tolerância ao frio, as mesmas plantas *rd29: ZmDREB2A* mostraram taxas de 33,3% a 37,8% e as controle taxas de 28,9%, indicando que *ZmDREB2A* confere importante tolerância a seca, mas

não ao frio. Resultados similares foram observados quando a construção 35S: *ZmDREB2A* utilizada e analisada (Qin et al., 2007).

Em *Arabidopsis* transformada com o gene *GmDREB2*, após aplicação de estresse hídrico, as plantas controle morreram, enquanto que, plantas transgênicas, sob o controle de promotores constitutivos (35S) e estresse – induzido (*rd29A*), apresentaram respectivamente, taxas de sobrevivência 45,9% e 21%. No tratamento de alta salinidade, as plantas transformadas com a construção 35S: *GmDREB2*, mostraram alta tolerância, com taxas de sobrevivência maiores que as plantas não transformadas. Neste trabalho, o conteúdo de prolina livre também foi analisado em tabaco transformado com *GmDREB2* e, após 12 e 16 dias de déficit hídrico, as linhas transgênicas indicaram maiores níveis de prolina livre (Chen et al., 2007).

Assim, baseado em resultados de testes de laboratório e em casa de vegetação, várias análises mostram que, o desenvolvimento de linhagens de soja GM contendo as construções *rd29A: DREB1A* ou *rd29A: DREB2A* são estratégias comprovadamente promissoras na obtenção de eventos com maior tolerância ao déficit hídrico. Vários estudos têm demonstrado a importância dos fatores de transcrição na aquisição de tolerância a diferentes estresses, contribuindo para a agricultura e para o ambiente, pois plantas GMs transformadas com fatores de transcrição estresse – induzidos, permitem a super expressão de muitos outros genes associados com a tolerância ao estresse. Embora alguns efeitos negativos como o retardo no crescimento das plantas possam ocorrer, estratégias como a utilização de promotores estresses – induzidos para controlar a expressão dos fatores de transcrição podem prevenir ou reduzir tais efeitos (Kasuga et al., 1999; Wang, 2003).

2.2. Situação esperada ao término do projeto

O projeto possibilitará a geração de plantas de soja geneticamente modificadas contendo as construções gênicas com genes da família DREB e AREB, expressando os fatores de transcrição em altos níveis e que por consequência ativem rapidamente, e também em altos níveis genes de defesa celular durante déficit hídrico e calor na soja.

A identificação dos melhores eventos “elite” de soja GM, considerados estáveis geneticamente, e apresentando características fisiológicas e agrônômicas de tolerância à seca e calor e de Biossegurança serão repassadas ao programa de melhoramento genético da Embrapa Soja, para que a característica seja introduzida por melhoramento genético clássico nas cultivares da Embrapa. Visando assim o aumento de tolerância à seca e calor sem que haja comprometimentos maiores no desenvolvimento da planta GM.

Com esta estratégia em nível de defesas celulares espera-se aumentar o tempo de atividade das células durante situações de déficit hídrico e calor, o que pode repercutir positivamente na manutenção de atividades metabólicas e fisiológicas importantes na composição de características agrônômicas. Assim se teria mais tempo para que uma precipitação pluviométrica ocorra reduzindo ou eliminando o déficit hídrico. Caso isso ocorra, será possível desenvolver plantas de soja GM que apresentem menores perdas de produtividade durante períodos de seca.