

2.3. Descrição do projeto

A obtenção de plantas transformadas com características de tolerância à seca poderá contribuir para amenizar os problemas decorrentes do déficit hídrico. A metodologia escolhida para o desenvolvimento e realização de tal estratégia será descrita a seguir:

Atividade 1: Gestão do projeto

A atividade 01 do projeto se encarregará da Gestão do Projeto e integrará as ações de pesquisa, através da troca de informações por meios eletrônicos e reuniões semestrais entre os executores das atividades do projeto. Ao final de cada ano do projeto pretendem-se também reunir os responsáveis por todas as atividades para apresentação, discussão e compatibilização dos resultados. Ao final do segundo ano do projeto pretende-se conduzir uma reunião com pesquisadores da Embrapa e do Jircas em local ainda a ser definido. Entretanto, a comunicação constante entre as duas instituições será prioridade junto a coordenação do projeto no Brasil. Além do mais, já está no Brasil o Dr. Kanamori, pesquisador do Laboratório da Dra Y-Shinozaki, que estará trabalhando na Embrapa Soja em conjunto com a equipe de biotecnologia no desenvolvimento de soja GM para tolerância à seca.

Atividade 2: Transformação via biobalística de embriões de soja com as construções DREB e AREB.

As plantas de soja GMs serão obtidas através do sistema de co - transformação, utilizando-se para isso construções contendo genes DREB e AREB e, a construção contendo a região codante do gene *ahas*, que codifica a enzima *acetolactato sintase* de *A.thaliana* modificada (acetohydroxyacid synthase, E.C. 4.1.3.18). Esta enzima catalisa uma etapa inicial da síntese dos aminoácidos isoleucina, leucina e valina e, confere resistência ao agente de seleção imazapir (Aragão et al., 2000, Rech et al., 2008). Assim, somente as células transformadas produzirão plântulas de soja geneticamente modificadas.

As construções contendo os genes DREB e AREB foram obtidas através de acordo entre a Embrapa e o Jircas.

Os disparos serão efetuados em embriões de soja da cultivar BR 16 conforme Rech et al., 2008. De forma resumida, para a obtenção dos eventos (linhagens) positivos, inicialmente serão obtidas grandes quantidades dos plasmídios contendo as construções. Utilizando enzimas de restrição genes que codificam para antibióticos serão retirados dos vetores plasmidiais. O DNA (1 µg/ml) contendo as construções gênicas será precipitado sob micropartículas de tungstênio com o auxílio de CaCl₂ (2.5 M) e espermidina (100 mM). Após sonicação por 1 – 2 seg. alíquotas do DNA precipitado nas micropartículas serão distribuídas em membranas carregadoras de Kapton, já posicionadas no suporte de membrana, para o bombardeamento.

Os disparos serão realizados com o acelerador de partículas da Embrapa Soja, desenvolvido no Brasil pela empresa Biomics Ltda. Este acelerador de

partículas de gás hélio de alta pressão sob vácuo de 27 polegadas de Hg. pressão de 1200 psi, distância do alvo de 80 mm dispara o DNA no tecido alvo que, neste experimento, serão as regiões meristemáticas apicais de embriões de soja.

Após a transformação os embriões serão transferidos para placas de vidro contendo meio MS suplementado com BAP (5 mg/mL), para indução de multibrotamento, por um período de 16 h – 20 h, à temperatura ambiente, e ao abrigo da luz. Posteriormente, os embriões serão transferidos para meio seletivo (MS, 3% sacarose, 0,15 µM Imazapyr, 0,8% agar, vitaminas B5, pH 5,7) onde permanecerão por aproximadamente 45 dias em câmara climatizada, a 25°C ± 1°C, a 60% umidade.

A seguir, os embriões serão transferidos para copos plásticos contendo areia:vermiculita (1:1) e após um período de aclimação de aproximadamente 7 – 8 dias, amostras de folhas serão retiradas e o DNA será extraído. Um PCR (*Polymerase Chain Reaction*) utilizando pares de *primers* específicos para as construções utilizadas será realizado e após a confirmação das plantas positivas, estas serão transferidas para vasos, em casa de vegetação, para produção de sementes.

Atividade 3: Método de transformação via *Agrobacterium tumefaciens*.

Agrobacterium tumefaciens também será utilizado como vetor para transferência gênica para células vegetais em nódulos cotiledonares. A descrição detalhada deste protocolo com referências pode ser encontrada em Paz et al, 2004.

Culturas de *Agrobacterium tumefaciens*, cepas EHA101 ou EHA105 serão crescidas *overnight*, até to OD₆₀₀ = 1.0-1.2 ou 0.4-0.6, respectivamente, em meio de cultura YEP, a 28°C, em *shaker* incubador.

A cultura bacteriana será pelletizada a 2.300 g, por 10 min, à 20°C. Os *pellets* serão ressuspensos no volume original, usando, no entanto, meio líquido de co-cultura, suplementado com 40 mg/L acetosyringone.

Cotilédones com 5 dias de cultivo serão utilizados neste método. Os hipocótilos serão cortados a 5 mm abaixo do nódulo cotiledonar, ambos cotilédones serão separados por excisão na área meristemática. Para promover a infecção da zona morfogênica, 8-12 cortes superficiais serão feitos no nódulo cotiledonar.

Os cotilédones serão incubados com suspensão de *Agrobacterium* por 30 min e então co-cultivados em meio de cultura semi-sólido, por 5 dias a 25°C.

Após o co-cultivo, os explantes serão lavados e colocados para meio para indução de multibrotamento, por 30 dias. Para controlar o crescimento bacteriano, este meio será suplementado com um *pool* de antibióticos (Cefotaxime, Vancomicina e Timentina).

Os nódulos morfogênicos, já separados de seus cotilédones, serão transferidos para meio de elongação, suplementado com 5 mg/L PPT como agente seletivo. Caules com 3 cm serão excisados e colocados em meio de enraizamento.

Plantas transgênicas serão recuperadas depois de 6-7 meses após o início do cultivo em *in vitro*.

Os vetores binários utilizados contendo genes de resistência Basta são derivados de plasmídios da série pPZP.

Atividade 4: Análise de integração das construções DREB/AREB nas plantas de soja GM e em sua descendência.

A confirmação da integração do DNA exógeno nas plantas T_0 , e as análises de segregação nas gerações T_1 , T_2, \dots, T_n será inicialmente realizada através da técnica de PCR utilizando-se *primers* específicos para as construções utilizadas.

A técnica de PCR em Tempo Real ainda será utilizada na quantificação absoluta do número de cópias do inserto conforme Bustin (2000). E plantas positivas, com menor número de cópias do transgene, serão, posteriormente, avaliadas através da técnica de *Southern Blot* (Southern, 1975) utilizando-se uma sonda correspondente a construção *rd29A: AtDREB2A*, marcada com ^{32}P dATP (Sambrook et al., 1989). A detecção de fragmentos com diferentes tamanhos em DNA digerido com diferentes enzimas de restrição indicará a integração do DNA exógeno no genoma da planta e, nos permitirá inferir sobre o número de cópias do gene na planta.

Um PCR em tempo real quantitativo (RT- qPCR) também será realizado, comparando-se a expressão relativa de genes DREB/AREB introduzidos em condições normais (15% de UG) e, em diferentes níveis de déficit hídrico, moderado (5% de UG) e severo (2,5% de UG) utilizando para isso, plantas GM positivas e plantas controle BR16 não transformadas.

Atividade 5: Delineamentos experimentais para indução de déficit hídrico em regime de contenção (casa de vegetação).

Para indução e análise do nível de expressão gênica serão montados experimentos em vasos, em casa de vegetação. O monitoramento da temperatura e umidade será realizado, através de medições constantes por termohigrógrafo. O delineamento experimental será o de blocos ao acaso com tratamentos em arranjo fatorial, contendo quatro blocos, com três repetições por tratamento, dentro de cada bloco, da seguinte forma: a cultivar BR 16 e a linhagem GM positiva, em dois níveis iniciais de stress hídrico, a 5% UG e 15% UG, totalizando 48 parcelas.

O material experimental, ou seja, sementes da geração T_2 provenientes do evento GM positivo e, sementes BR 16 não transformadas, será plantado em vaso de PVC, com 8.5 kg de areia lavada. Para evitar os efeitos da evaporação e melhorar a uniformidade entre os tratamentos, os vasos serão cobertos com cubos pequenos de poliestireno expandido. As plantas em todos os tratamentos crescerão em condições normais de umidade com 15% UG.

Após um período de aproximadamente 30 dias, o déficit hídrico será iniciado nas plantas do tratamento estressado. A irrigação será gradualmente retirada até que a umidade de 5% UG (estresse moderado) seja atingida. As

plantas ficarão sob esse teor de água no solo por 30 dias e, após este período a umidade será reduzida novamente para 2,5% UG (estresse severo). O controle dos teores de água no solo será realizado pesando-se os vasos diariamente, para posterior reposição da água evapotranspirada no período, sempre que necessário. Os vasos serão regados semanalmente com 50 mL de solução nutritiva (Polizel, 2007; Salinet et al., 2007).

Para a análise de variância, se o efeito de vasos por um dado bloco não for significativo, este será somado ao resíduo, aumentando-se a eficiência das estimativas obtidas. O teste de Tukey (5%) será utilizado para comparações múltiplas de médias.

Experimento de Teor Crítico de Água (TCA)

Sementes positivas (geração T_1) obtidas de cada linhagem gerada (geração T_0) serão submetidas à suspensão total de irrigação em um experimento denominado Teor Crítico de Água (TCA).

As sementes serão semeadas em potes de 8 L, com areia lavada e mantidas na umidade de 15% até atingirem o estágio de desenvolvimento R_1 (Fehr e Caviness, 1977). A partir deste estágio, a irrigação dos potes será suspensa até que se detecte murchamento das folhas, quando a água será repostada até ser atingida novamente a turgidez completa da planta.

Após a recuperação total da turgidez das folhas, a irrigação será suspensa novamente até que se observe novo murchamento, quando então se retorna a irrigação. Este procedimento será realizado várias vezes e, individualmente em cada linhagem semeada, até que se observem linhagens que se recuperem mais rapidamente, e/ou que levem mais tempo para murchar, e/ou que consigam sobreviver durante todo o experimento (Salinet et al., 2007).

Sementes geradas nos melhores eventos identificados serão utilizadas em experimentos posteriores. Caso não sejam geradas sementes nos eventos identificados como mais promissores devido à severidade dos tratamentos durante o experimento de TCA, serão utilizadas outras sementes T_1 dessas linhagens. Durante a fase de desenvolvimento vegetativo, as plantas receberão semanalmente suplementação com solução nutritiva. As sementes obtidas das linhagens identificadas como mais promissoras neste experimento serão multiplicadas, a fim de gerar número suficiente de sementes para os próximos experimentos.

Experimento de Respostas Fisiológicas e Agronômicas (RFA).

Sementes de geração T_2 ou T_3 , dependendo da linhagem testada, serão novamente semeadas em potes com areia lavada, em casa de vegetação, em procedimento semelhante ao experimento anterior de TCA. Cada linhagem será avaliada pelo mesmo delineamento anterior. Entretanto, cada repetição será composta por três potes onde as avaliações para parâmetros fisiológicos e agronômicos serão feitos individualmente para cada planta e, ao final, comporão uma média para aquela repetição.

As épocas de amostragem para parâmetros fisiológicos agronômicos e moleculares ocorrerão no início de cada estágio de desenvolvimento das

plantas, sendo que somente uma amostragem será realizada no estágio vegetativo V_n antes do estágio reprodutivo R_1 .

Os parâmetros agrônômicos que serão amostrados e analisados no final do ciclo de vida das plantas serão o número de legumes, número de nós, número de legumes com sementes, número de sementes, massa seca da semente e massa seca do caule. Também será mensurada a altura das plantas em três períodos distintos de estresse moderado (5% UG), durante o decorrer do experimento (Salinet et al., 2007).

Todos os dados coletados oriundos das avaliações fisiológicas e agrônômicas serão analisados pelo programa SAS (SAS Institute, 1990).

Alterações e modificações anatômicas em resposta ao déficit hídrico serão observadas utilizando-se para isto, segmentos de folíolos medianos do 3º trifólio, coletados em duas fases distintas de estresse moderado (5% UG) e severo (2,5% UG). Estes estudos serão realizados em microscopia fotônica e em eletromicrografia de varredura (Polizel, 2007).

- **Análise da expressão de genes induzidos por diferentes estresses**

Para as avaliações de expressão gênica e metaboloma serão coletados folíolos centrais de cada uma das três plantas da repetição do experimento anterior de RFA e, unidos em um "bulk" da repetição.

Três técnicas para confirmação de expressão e análise de níveis de expressão serão utilizadas. Para confirmação da expressão da proteína *AtDREB2A* em todos os eventos, serão desenvolvidas as técnicas de *Ribonuclease Protection Assay* (RPA) e *Northern Blot* de acordo com Ausubel et al., (1995), e, para quantificação da expressão gênica, e determinação do número de cópias do transgene inseridas, a técnica de PCR em tempo real será realizado.

Serão analisadas plantas da geração T_0 , assim como das gerações T_1 , T_2 , T_3, \dots , T_n . Para isto, folíolos serão coletados em nitrogênio líquido e, posteriormente, armazenados em freezer a -80°C , até o momento da extração de RNA total, que será realizada utilizando-se o reagente trizol (*Invitrogen*), conforme recomendações do fabricante.

As reações de transcrição reversa para obtenção do cDNA serão realizadas utilizando-se a enzima transcriptase reversa (*Moloney Murine Leukemia Virus – M-MLV*) de acordo com as instruções do fornecedor.

Para cada gene a ser estudado, primeiramente será realizada uma curva de eficiência de amplificação, conforme recomendado pela *Applied Biosystems*, CA, USA. Os parâmetros de ciclagem para as reações serão 50°C por 2min, 95°C por 2 min e 45 ciclos de 95°C por 15 seg, 55°C por 30 seg e 72°C por 30 seg, sendo os dados coletados na fase de extensão (72°C). O gene *RNAr 18S* (*GenBank* nº X02623.1) será utilizado como controle endógeno em cada tratamento para a normalização das amostras.

Para o cálculo de quantificação relativa será utilizado o método Ct calculado pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ conforme (Bustin 2002). As análises de quantificação relativa seguirão os mesmos parâmetros de ciclagem e coleta de dados das amostras, utilizados para gerar a curva de eficiência de amplificação. Os resultados serão analisados pelo programa *Sequence Detection* (*Applied*

Biosystems, CA, USA). Os *primers* utilizados nas reações, serão desenhados pelo programa *Primer Express* (*Applied Biosystems*, CA, USA), próximo à região 3' do gene, obtendo *amplicons* de aproximadamente 150 pares de base (pb).

As reações de PCR serão realizadas, em termociclador 7300 *Real Time System* (*Applied Biosystems*, Foster, CA, USA), utilizando-se o *Kit Platinum[®] SYBER[®] Green qPCR SuperMix UDG* (*Invitrogen*), conforme recomendações do fabricante.

Em todos os eventos positivos obtidos, os níveis de expressão dos fatores DREB e AREB, assim como os níveis de expressão de genes conhecidos como estresse induzidos e ativados por estes fatores de transcrição (Sakuma et al., 2006a, 2006b) terão seus níveis de expressão analisados por PCR em Tempo Real quantitativo (RT qPCR). As seqüências desses genes em *A. thaliana* e em outras espécies serão utilizadas para identificar seqüências homólogas de soja através de BLAST em bancos de dados específicos (ex: *Soybean EST data bank*). Outros genes reconhecidamente induzidos, durante situações de déficit hídrico em soja, como *GmP5CS*, *GmTPS1*, *GmPIP*, *GmGOLS* e *GmDefensin* também serão analisados.

- **Caracterização Fisiológica**

As variáveis a serem amostradas e analisadas nos experimentos de caracterização serão: área foliar, taxa de crescimento relativa (TCR), taxa fotossintética (A), eficiência fotossintética, taxa de transpiração, condutância estomática (g_s), temperatura foliar, concentração intercelular de CO_2 (C_i), teor de clorofila, discriminação de carbono ($^{13}C/^{12}C$) e macro e micronutrientes nas folhas. A área foliar será amostrada através de um Area Meter, LI-3100.

A TCR será calculado usando a fórmula $TCR = \ln(MSF) - \ln(MSI) / \text{tempo}$, onde MSF é a massa seca final e MSI é a massa seca inicial (Ferri, 1985). Taxa fotossintética, condutância estomática e concentração intercelular de CO_2 , serão aferidas através de um aparelho portátil de fotossíntese (LICOR, Inc., LI-6400), no folíolo mediano do 3º par foliar, completamente expandido com intensidade luminosa de, aproximadamente, $2000 \mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

O teor de clorofila será medido em um aparelho portátil de clorofila (SPAD-502) no mesmo folíolo em que serão feitas as medidas de taxa fotossintética. A discriminação de carbono será feita em espectrofotômetro de massa (*ThermoFinnigan Delta XP Plus*), utilizando amostras da parte aérea das plantas, secas e trituradas.

A análise de nutrientes será realizada em ICP-OES (*Inductively Coupled Plasma- Optic Emission Spectrometry*), Optima 3300 DV, Perkin Elmer, utilizando-se 0.5 g da amostra, sendo feita digestão seca por maceração em mufla elétrica (450-550°C).

Para a análise de nitrogênio será utilizado o aparelho *Kjeltec auto Sampler System*, 1035 com 0.1g de amostra, sendo a digestão feita com ácido sulfúrico e peróxido de hidrogênio.

- **Caracterização Metabólica**

Amostras das plantas de soja GM submetidas aos tratamentos descritos terão sua composição química avaliada que, será comparada com a de plantas

não GM submetidas aos mesmos tratamentos. Para a identificação de gliceolíinas (fitoalexinas da soja), extratos de folhas de soja serão analisados através de HPLC (Cromatografia líquida de alta eficiência) enquanto outros sinalizadores moleculares para resistência de plantas a estresses bióticos e abióticos como os ácidos salicílico e jasmônicos serão analisados através de cromatografia gasosa.

Atividade 6: Delineamentos experimentais para indução de déficit hídrico em regime de Liberação Planejada no Meio Ambiente (campo)

O líder do projeto estará preparando conforme normas da CTNBio (Resolução Normativa N° 6) proposta de liberação planejada no meio ambiente para instalação de experimentos a campo na Embrapa Soja.

O delineamento experimental será o de blocos ao acaso em parcelas subdivididas. Os tratamentos na parcela serão: irrigado (I), não irrigado (NI) e sob coberturas móveis (CM) (*rain out shelters*; que serão programados para fechar toda vez que ocorrerem chuvas em um período de 30 dias entre os estádios mais sensíveis a falta de água em soja, estádios R₃ a R₆).

Os tratamentos nas sub-parcelas serão: eventos de soja GM com os genes DREB e AREB e a variedade BR16 não GM (controle). Os tratamentos culturais (adubação, espaçamento e densidade de semeadura, etc) serão conduzidos conforme as recomendações técnicas da Embrapa para a cultura da soja na região.

Todo o monitoramento das condições edafoclimáticas do experimento (balanço hídrico, precipitação pluviométrica, conteúdo de água no solo por sonda de nêutrons, radiação solar, temperaturas e umidade do ar, etc), assim como, as avaliações de parâmetros fisiológicos e agrônômicos será realizado conforme protocolos estabelecidos pela equipe de Ecofisiologia da Embrapa Soja, similares aos descritos acima para os experimentos em regime de contenção.

2.4. Quadro institucional

O projeto será composto por várias atividades (A) sendo a primeira (A1) responsável pela gestão do projeto onde será coordenada a implementação e a execução de cada ação/atividade visando atender os objetivos e metas gerais do projeto dentro dos prazos, metodologias e recursos propostos. As atividades A2 e A3 permitirão a obtenção, via transformação por biobalística e via *Agrobacterium tumefaciens*, respectivamente de eventos "elite" de soja GM contendo as construções DREB e AREB. A A4 permitirá a identificação e caracterização molecular dos melhores eventos gerados a serem utilizados nos trabalhos de casa de vegetação (A5) e de campo (A6).

As atividades serão executadas com o auxílio das estudantes Berenice Brene Sanches, aluna do curso de Ciências Biológicas da FALM – Faculdade Luiz Meneghel em Bandeirantes - PR; da aluna Juliana Paula Leite, graduanda do curso de Ciências Biológicas pela Unifil - Centro Universitário Filadélfia, Londrina - PR e ainda da recém mestre em Fisiologia Vegetal, Larissa Giroto, pela Universidade Federal de Lavras- MG.

Cooperação Científica - Brasil e Japão

Em parceria, com a Universidade Estadual de Londrina, alunas de Mestrado (Cibelle Engels) e de Doutorado (Amanda Paiva), matriculadas no Curso de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular, como parte das atividades práticas de suas dissertações.

As análises de metaboloma serão realizadas e coordenadas pela Dra. Clara Beatriz Hoffman Campo. Os experimentos de campo serão coordenados pelo Dr. José Renato B. Farias, mas somente serão implementados após autorização da CTNBio.

Todas as análises estatísticas em cada Atividade serão coordenadas pela equipe de estatística da Embrapa Soja coordenada pela Dra. Maria Cristina Neves de Oliveira. As análises de Bioinformática serão auxiliadas pelo Dr. Eliseu Binneck, bioinformata da unidade.

Pesquisadores da área de Melhoramento da Embrapa Soja e Embrapa Trigo (Dr. Carlos A. Arias, Dr. Ricardo Abdelnoor e Dra. Rita Maria Alves de Moraes) acompanharão a evolução dos resultados nas A01, A02, A03 e A04 e estarão auxiliando na escolha dos melhores eventos com potencial para uso nos testes de campo e no programa de melhoramento.

A Dra. Kazuko Yamagushi-Shinozaki (autora da patente DREB) estará acompanhado as avaliações e poderá ser consultada na interpretação dos resultados e nas tomadas de decisão durante o decorrer do projeto. O projeto também contará com a participação do Dr. Kanamori, cientista do JIRCAS já presente no Brasil e que estará participando ativamente de todo o projeto por 2,5 anos. Os pesquisadores Dr. Gedi Sfredo, Dr. César de Castro, Dra. Maria Fátima de Sá e Dr. Francisco Aragão estarão participando de atividades e colaborando na interpretação das análises: do status nutricional das plantas, de fisiologia vegetal, de expressão gênica e da estabilidade genética dos eventos, respectivamente.

O projeto também contará com a participação de uma bolsista Pós-Doutora, Dra Renata Fuganti que auxiliará o coordenador do projeto na condução e supervisão das atividades propostas.

Toda a metodologia detalhada acima será executada nos laboratórios da Embrapa Soja sediada em Londrina, PR. Esta instituição vem conduzindo desde 1975, trabalhos relacionados ao desenvolvimento tecnológico da cultura da soja no Brasil e a partir de 1992, alguns projetos resultaram em vários genótipos de soja, que têm sido caracterizados fisiologicamente em relação às respostas ao déficit hídrico. Estas informações foram publicadas (Nepomuceno et al., 1994; 2001b; 2002; Neumaier e Nepomuceno, 1994; Farias et al., 1995; Neumaier et al., 1995; 1997; Oya et al., 2001) e repassadas ao programa de melhoramento da Embrapa Soja objetivando auxiliar no desenvolvimento de cultivares mais tolerantes a períodos de déficit hídrico.

Seção 3 – Objetivo e resultados

3.1. Objetivo de desenvolvimento

Introduzir por biobalística e *Agrobacterium tumefaciens* construções DREB e AREB visando à geração de plantas GM com níveis maiores de

tolerância à seca e ao calor, e, identificar e caracterizar molecular, fisiológica e agronomicamente potenciais plantas GMs (eventos "elite") para uso no programa de melhoramento genético da Embrapa.

3.2. Objetivo imediato

- Caracterizar quanto à estabilidade genética, número de cópias e níveis de expressão gênica os eventos (linhagens) de soja GM contendo construções DREB e AREB;
- Avaliar a ocorrência de indução e os níveis de expressão de genes de defesa celular nativos de soja em eventos (linhagens) de soja GM, contendo as construções DREB e AREB, quando comparados com soja não GM, submetidas à condições de déficit hídrico e calor;
- Caracterizar respostas fisiológicas e agrônômicas de eventos (linhagens) de soja GM contendo construções DREB e AREB, sob condições de déficit hídrico, em regime de contenção (casa de vegetação) e, em condições de campo.

3.3. Resultados Esperados

Como resultado das atividades implementadas neste projeto em parceria com o JIRCAS, objetiva-se o total cumprimento do plano de trabalho proposto e de cada atividade específica, metas e indicadores. Assim serão gerados e testados vários eventos GM em soja que serão caracterizados visando identificação de eventos "Elite" a serem repassados para programas de melhoramento de soja da Embrapa e instituições parceiras. Neste enfoque após o desfecho deste projeto, com o sucesso da obtenção de eventos positivos contendo construções DREB e AREB, novas opções de cultivares de soja GM tolerantes à seca serão desenvolvidas por programas de melhoramento genético. Cabe ressaltar, que as estratégias de engenharia genética sendo testadas não conferem somente tolerância à seca, mas também ao calor, segundo resultados obtidos em laboratório com outras espécies vegetais testadas e discutidos no item estado da arte deste projeto. Temperaturas extremas muitas vezes acompanham períodos de déficit hídrico e assim plantas mais tolerantes poderão estar disponíveis para os produtores, favorecendo principalmente, àqueles que trabalham em regiões que são mais gravemente assoladas por esses estresses abióticos. Os benefícios econômicos e sociais podem ser significativos para pequenos e grandes produtores, no Brasil e em países em desenvolvimento e mesmo países já desenvolvidos, mostrando que a engenharia genética é uma importante ferramenta a ser utilizada na solução ou mitigação de graves questões ambientais e humanitárias.

Seção 4- Plano de trabalho

4.1. Plano de trabalho

Como já descrito anteriormente o projeto será composto por varias atividades (A) descritas abaixo:

Atividade 01 – Gestão

Descrição

Coordenação das atividades.

Objetivo

Coordenar a implementação e a execução de cada atividade visando atender os objetivos e metas gerais do projeto dentro dos prazos, metodologias e recursos propostos.

Metas

Implementar as atividades de 2 a 6.

Atividade 02 - Obtenção do evento “elite” de soja por Biobalística, contendo as construções DREB e AREB.

Descrição

Obter de Plantas Geneticamente Modificadas tolerantes a seca e ao calor for Biobalística utilizando processo patenteado pela Embrapa.

Objetivo

Obter eventos “elite” de soja GM, contendo construções DREB e AREB.

Metas

Obter no mínimo 50 eventos por construção utilizada nas transformações.

Atividade 03 - Obtenção do evento “elite” de soja por *Agrobacterium tumefaciens*.

Descrição

Utilizar metodo desenvolvido pelo JIRCAS para obtenção de Plantas Geneticamente Modificadas através de *Agrobacterium tumefaciens*.

Objetivo

Gerar Plantas Geneticamente Modificadas tolerantes a seca

Metas

Gerar no mínimo 50 eventos por construção utilizada nas transformações.

Atividade 4 - Análise de integração das construções DREB/AREB nas plantas de soja GM e em sua descendência.

Descrição

Identificar eventos promissores do ponto de vista molecular para serem caracterizados fisiologicamente e agronomicamente em condições de contenção e a campo.

Objetivo

Identificar entre os eventos gerados, eventos que tenham potencial para serem considerados eventos elite que expressem tolerância a seca e calor e que possam ser utilizados em programas de melhoramento e no desenvolvimento de variedades comerciais.

Metas

Caracterizar todos os eventos gerados por construção utilizada.

Atividade 05 - Caracterização em condições de casa de vegetação

Descrição

Caracterização em condições de casa de vegetação.

Objetivo

Caracterizar em condições de casa de vegetação (CV) as respostas fisiológicas e agrônomicas dos eventos mais promissores para tolerância e selecionar os com maior potencial para testes a campo e futuro uso em programa de melhoramento.

Metas

Semear linhagens de geração T_1/T_2 com melhor expressão genes DREB e AREB e genes de defesa nativos de soja, Indução de déficit hídrico nas linhagens selecionadas, Proceder às avaliações fisiológicas, Proceder às avaliações agrônomicas, Caracterização preliminar via PCR-TR do número de cópias e Escolher eventos a serem utilizados nos exp. de RFA em campo.

Atividade 06 - Caracterização em condições de campo

Descrição

Caracterizar em condições de campo as respostas fisiológicas e agrônomicas.

Cooperação Científica - Brasil e Japão

Objetivo

Caracterizar em condições de campo as respostas fisiológicas e agronômicas dos eventos mais promissores para tolerância à seca e introdução no programa de melhoramento.

Metas

Obter autorização da CTNBio para Lib.Planejada no Meio Ambiente, Instalação de experimento em campo, Indução de déficit hídrico nas linhagens selecionadas, Proceder às avaliações fisiológicas, Proceder às avaliações agronômicas, *Southern Blot* nos eventos escolhidos para estudo de campo e Identificação dos eventos promissores para serem utilizados no programa de melhoramento e estudos de Biossegurança.

4.2. Indicadores e meios de verificação

Indicadores	Meios de verificação
Transformar embriões de soja, via biobalística e <i>Agrobacterium</i> , com a construção gênicas DREB e AREB	Número de eventos obtidos (mínimo 50/construção gênica)
Caracterizar molecularmente a expressão das proteínas DREB e AREB em cada evento identificando os eventos mais promissores.	Mínimo de 25 eventos positivos caracterizados/construção gênica.
Caracterizar molecularmente o nível de expressão de genes de defesa nativos da soja e induzidos pelas proteínas DREB e AREB em cada evento identificando os eventos mais promissores.	Mínimo de 25 eventos positivos testados/construção gênica..
Caracterizar em condições de casa de vegetação (CV), as respostas fisiológicas e agronômicas dos eventos mais promissores para tolerância e selecionar os com maior potencial para testes a campo e futuro uso em programa de melhoramento.	Mínimo de 10 eventos/construção gênica identificados como promissores como eventos elite caracterizados em condições de CV.
Caracterizar em condições de campo as respostas fisiológicas e agronômicas dos eventos mais promissores para tolerância à seca e introdução no programa de melhoramento.	Mínimo de 10 eventos/construção gênica identificados como promissores como eventos elite caracterizados em condições de campo.
Identificar eventos "elite" contendo construções DREB e AREB que expressem tolerância à seca a ao calor e introduzi-los no programa de melhoramento da Embrapa para desenvolvimento de variedades comerciais e desregulamentação	Identificar no mínimo 2 eventos "elite" por construção gênica utilizada

4.3. Cronograma de execução

Atividades	Ano 01	Ano 02	Ano 03	Ano 04
Transformar embriões de soja, via biobalística e <i>Agrobacterium</i> , com as construções gênicas DREB e AREB.	X	X		
Caracterizar molecularmente a expressão da proteína AtDREB2A em cada evento identificando os eventos mais promissores.		X	X	
Caracterizar molecularmente o nível de expressão de genes de defesa nativos da soja e induzidos pela proteína AtDREB2A em cada evento identificando os eventos mais promissores.		X	X	
Caracterizar em condições de casa de vegetação (CV), as respostas fisiológicas e agrônômicas dos eventos mais promissores para tolerância e selecionar os com maior potencial para testes a campo e futuro uso em programa de melhoramento.		X	X	
Caracterizar em condições de campo as respostas fisiológicas e agrônômicas dos eventos mais promissores para tolerância à seca e introdução no programa de melhoramento.			X	X

Seção 5 – Cooperação externa solicitada

5.1. Justificativa para Escolha da Fonte Externa

A tecnologia DREB esta patenteada pelo Jircas sob as Pat. n^{os} P3183458 e P3178672, assim como, o processo de transformação de soja pela Embrapa Pat. n^o WO09918223A1. Em dezembro de 2003, Embrapa e Jircas assinaram Memorando de Entendimento (MOU) e Acordo de Transferência de Material (MTA) para trabalhos conjuntos de transformação genética de soja com as construções AtDREB1A. Em resumo, o MOU e o MTA detalham que os resultados científicos obtidos através desse acordo serão publicados em conjunto. Royalties obtidos de variedades comerciais geradas a partir deste trabalho serão divididos em até 50%, dependendo dos gastos que serão realizados por cada parte nas fases posteriores como programa de melhoramento, análises de biossegurança e desregulamentação junto às agências federais e internacionais competentes. Em novembro de 2007, a Embrapa e o Jircas novamente firmaram acordo para o desenvolvimento de soja

Cooperação Científica - Brasil e Japão

GM, contendo o gene *DREB2A* e *AREB*, em complemento ao acordo anterior, assinado para o gene *DREB1A*.

5.2 Treinamento

Treinamento em Análises de Microarranjos de DNA – Tsukuba, Japão. Dois Meses.
Treinamento em Elaboração de Construções Gênicas – Tsukuba, Japão. Dois Meses.

5.3. Equipamentos

- (3) Termocicladores de PCR.
- (1) Termociclador de PCR em Tempo Real.
- (1) Quantificador de DNA/RNA (Nanodrop).
- (1) Sistema Portátil de Fotossíntese (LI6400 XT e acessórios)
- (1) Centrífuga de Placa Refrigerada
- (1) Ultrafreezer -80 °C
- (1) Fluorescent Image Analyses (FujiFilm – FLA-3000)
- (2) Fitotrons

5.4. Custo Estimado da Cooperação Solicitada

US\$ 3.000,000.00

Custeio – US\$ 1,500,000.00

Investimento – US\$ 1,500,000.00

Seção 6 – Contrapartida oferecida pelo Brasil

6.1. Pessoal

- 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/mêsTotal Bolsistas (60 meses): US\$186,000.00

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

6.2. Treinamento

Cooperação Científica - Brasil e Japão

Estudantes de Graduação, Mestrado e Doutorado estarão sendo treinados no desenvolvimento de Plantas Geneticamente Modificadas em todas suas fases. Desde a concepção da estratégia de engenharia genética a ser utilizada, passando pela prova de conceito, desenvolvimento, desregulamentação e colocação no mercado.

6.3. Material Permanente

Desde março de 1997, a Embrapa Soja possui instalações para trabalhos em várias áreas da biologia molecular. Como exemplos existem salas para manuseio de radioisótopos, cultura de tecidos, transformação de plantas, preparação e limpeza de materiais, eletroforese e visualização de géis, etc. Vários equipamentos como seqüenciadores de DNA (1) ABI 3100 e (1) ABI 377 (*Applied Biosystems*), e (1) *Megabace (Pharmacia)*; PCR em Tempo Real (1) ABI 7300 e (1) ABI7500; Termocicladores (4) PTC-200 (MJ), (5) Mastercycler (*Eppendorf*), (1) ABI9700; (2) Canhões de Biobalística, espectrofotômetros, centrífugas de placa, etc., fazem parte do patrimônio do laboratório. Equipamentos básicos como freezers, geladeiras, balanças de precisão, centrífugas, autoclaves, etc também se encontram em pleno uso.

O laboratório de Biotecnologia Vegetal também possui estrutura de Bioinformática com um servidor Dell Power Edge 2950 que permite disponibilizar bancos de dados, assim como, o uso de ferramentas de bioinformática desenvolvidas no laboratório e/ou de domínio público, para pesquisadores da Embrapa Soja, Instituições parceiras e/ou interessados, mediante acesso ao endereço eletrônico da Embrapa Soja por senha.

A Embrapa Soja possui ainda outros laboratórios especializados na área de solos e nutrição de plantas, fisiologia vegetal, bioquímica, controle biológico, entomologia, fitopatologia, análise de sementes, microbiologia, agrometeorologia e biotecnologia do solo. São laboratórios modernos e bem equipados, que oferecem as condições necessárias para a execução de todas as atividades relacionadas a esse projeto. Além da estrutura laboratorial, a unidade tem estruturas básicas de apoio de casas de vegetação e campo.

6.4. Obras e Instalações

O laboratório de biotecnologia da Embrapa esta sendo ampliado e permitirá até o final de 2009 uma maior área de trabalho tendo em vista a necessidade de maior espaço devido ao aumento de estudantes e técnicos participando do projeto. E também pelo aumento do número de eventos de soja GM sendo gerados.

6.5. Custo Estimado da Contrapartida Oferecida

US\$ 3,906,000.00 conforme descrito nos itens 1.4. e 6.1.

6.6. Demonstrativo das Contribuições Financeiras

Cooperação Científica - Brasil e Japão

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

Seção 7 – Riscos e Dificuldades

Havia inicialmente o risco de que os elementos gênicos de *A.thaliana* presentes nas construções DREB e AREB não fossem reconhecidos em soja. No entanto, estudos anteriores com a construção *AtDREB1A* eliminaram esta possibilidade (Beneventi, 2006). Cada evento é independente e conforme o local de inserção, número de cópias, ou interação com outras regiões cromossômicas podem ocorrer alterações ou inibição na expressão do transgene. Assim, os demais eventos a serem analisados não necessariamente expressarão a proteína *AtDREB1A* introduzida.

Deste modo e baseado nestes resultados com a construção gênica *AtDREB1A*, acredita-se que as construções gênicas que serão utilizadas neste projeto sejam reconhecidas em soja.

Também é possível que mesmo sendo expressas em soja as proteínas DREB e AREB não sejam capazes de ativar genes de defesa celular nativos de soja. Ou mesmo ativando genes de defesa nativos da soja, não o faça em níveis que possibilitem aumento da tolerância à seca e calor.

Os experimentos de campo não serão instalados caso não seja possível obter junto a CTNBio autorização para Liberação Planejada no Meio Ambiente.

Seção 8 - Impacto Sócio - Ambiental

Conforme exposto anteriormente nos estados do sul do Brasil onde ~40% da soja brasileira é produzida os produtores que trabalhavam áreas menores que 100 ha representavam quase 50% da área cultivada com soja. 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. Caso se tenha sucesso em desenvolver plantas GM com maior tolerância à seca e ao calor, será possível influenciar positivamente este quadro. Na safra passada, por exemplo, o Rio Grande do Sul perdeu em média 70% de sua produtividade. Se esta tecnologia já estivesse disponível poder – se - ia esperar perdas inferiores a isso, influenciando assim positivamente na economia desta e de outras regiões que sofrem com o problema.

Seção 9 - Medidas de Segurança Ambiental, Biológica E Pessoal

Todas as instituições envolvidas no projeto têm conhecimento e atendem a Lei de Biossegurança (Lei 11.105 de 24 de março de 2005) e seu decreto regulamentador (Decreto nº 5.591, de 22 de novembro de 2005) seguindo todas as determinações de descarte e redução de risco estipuladas pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) e pelas Comissões Internas de Biossegurança (CIBio) para trabalhos com Organismos Geneticamente Modificados (OGMs).

As instituições participantes da proposta possuem ainda Certificado de Qualidade em Biossegurança (CQB) e podem conduzir experimentos e trabalhos com organismos da Classe de Risco 1 (situação deste projeto) seguindo as Resoluções Normativas nº1 e nº2 da (CTNBio).

O CQB da Embrapa Soja é 02/97.

Para testes a campo de PGMs geradas no Projeto, as devidas autorizações serão providenciadas junto a CTNBio.

Qualquer alteração no projeto, dificuldade de execução ou acidente com OGMs serão comunicados imediatamente a CTNBio. Os relatórios trimestrais do projeto também serão encaminhados as respectivas CIBio para que possam compor o Relatório Anual de CQB de cada instituição a ser encaminhado anualmente a CTNBio.

Cada instituição também possui pessoal qualificado e treinado em segurança do trabalho que acompanham as atividades de laboratório, casa de vegetação e campo.

Cooperação Científica - Brasil e Japão

Seção 10 – Equipe

	Título	CV Lattes	CPF	Inst./Unidade	E-mail	Atividade	Funções
Alexandre Lima Nepomuceno	Ph.D	x	440.090.500-62	Embrapa Soja	nepx@cnpsa.embrapa.br	01 a 05	a
André Fausto Borges Ribeiro	-	x	347.068.729-27	Embrapa Soja	rubira@cnpsa.embrapa.br	02	c
Carlos Arnaldo Anan	Ph.D	x	792.291.19-08	Embrapa Soja	anan@cnpsa.embrapa.br	05 e 06	c
Celso Junior Marur	Dr	x	200.959.509-59	Japar	cmarur@ujpar.br	05 e 06	d
Cibele Enge's	Ms	x	067.689.275-84	Embrapa Soja - UEL	cibele@cnpsa.embrapa.br	03 e 04	c
Clara Beatriz Hoffman-Campa	Ph.D	x	283.413.179-15	Embrapa Soja	hoffman@cnpsa.embrapa.br	04	c
Elbio Rech	Ph.D	x	210.402.491-91	Embrapa Cenargen	rech@cenargen.embrapa.br	03	c
Fabio Suano de Souza	Dr	x	276.920.775-77	Japar		05 e 05	b
Francoeur C. Marcolino	Dr	x	052.095.777-19	Embrapa Soja	francom@cnpsa.embrapa.br	03 e 04	d
Francoeur Aragão	Dr	x	308.609.971-20	Embrapa Cenargen	aragao@cenargen.embrapa.br	03	c
Geel Jorge Sfredo	Ph.D	x	065.912.809-87	Embrapa Soja	sfredo@cnpsa.embrapa.br	05 e 06	d
Jose Renato Escavas Franco	Dr	x	417.876.170-68	Embrapa Soja	rematto@cnpsa.embrapa.br	04	b
Kazuko Yamaguchi-Shinozaki	Ph.D	-	Japão	Jircas	kazu@jircas.affrc.go.jp	03	d
Maria de Fátima Grossi de Sá	Ph.D.	x	151.364.691-53	Embrapa Cenargen	fatimasa@cenargen.com.br	04	b
Mana Thereza Bazzo Martins	-	x	317.527.229-25	Embrapa Soja	mbazzo@cnpsa.embrapa.br	02	c
Norohito Nakamon	Ph.D.	-	Japão	Jircas	norohito@affrc.go.jp	01 a 06	
Norman Neumaier	Ph.D.	x	103.577.420-87	Embrapa Soja	norman@cnpsa.embrapa.br	04	c
Renata Fuganti	Dr	x	005.664.129-00	Embrapa Soja	rfuganti@cnpsa.embrapa.br	02 a 06	b
Ricardo Abdelmoor	Ph.D.	x	574.933.145-15	Embrapa Soja	ricardo@cnpsa.embrapa.br	03	d
Silvana R. Mann	Bsc.	-	763.619.839-49	Embrapa Soja	silvana@cnpsa.embrapa.br	02 a 06	b

a Líder / Coordenador substituído do projeto; b Responsável por atividades; c. Colaborador; d. Consultor

Seção 11 - Referências bibliográficas

- Aen - Agência Estadual de Notícias - Disponível no site <www.agenciadenoticias.pr.gov.br>, 2006.
- Agência CT- Mudança de clima- Aquecimento ameaça agricultura. Fonte: O Estado de São Paulo. 2005.
- Allen, K. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:9568–9572, 2002.
- Anbio - Associação Nacional de Biossegurança - Disponível no site <<http://www.anbio.org.br>>. 2006.
- Aprossul - Associação dos Produtores de Sementes de Mato Grosso do Sul. Perdas na safra de soja chegam a R\$ 189 milhões. Fonte: Tribuna Popular- O Jornal da Cidade. Disponível no site <www.tribunapopularnews.com.br>, 2006.
- Aragão, F.J.L. Development of transformation methods toward producing transgenic plants with abiotic stress tolerance. JIRCAS Working Report, p.35-42. 2002.
- Aragão, F.J.L., Sarokin, L., Vianna, G.R., Rech, E.L. Selection of transgenic meristematic cells utilizing an herbicidal molecule results in recovery of fertile transgenic soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] plants at a high frequency. Theor Appl. Genet, 101:1-6, 2000.
- Ausubel, F.; Brent, R.; Kingston, R.E.; Moore, D.D.; Seidman, J.G.; Smith, A.J.; Struhl, K. Short protocols in molecular biology. John Wiley & Sons. 809p. 1995.
- Baker, J.; Steele, C.; Dure, L. I.I.I. Sequence e characterization of 6 LEA proteins and their genes from cotton. Plant Mol Biol. 11: 277-291, 1988.
- Balbinotti, O.F.; Roessing, A.C. O papel da grande propriedade no agronegócio brasileiro. Embrapa Série Documentos, in press. 2006.
- Beever, D. Os transgênicos e o futuro da agricultura. Biotecnologia e Desenvolvimento. 15:4-7. 2000.
- Beneventi, M.A. Transformação genética em soja pela inserção da construção gênica contendo a região promotora do gene *rd29A* e a região codante do gene *DREB1A* de *Arabidopsis thaliana*, visando tolerância à seca. 126 f. Dissertação. 2006.
- Bonato, E. R. Estresses em soja. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 254 p. 2000.
- Boyer, J.S. Plant productivity and environment. Science. 218: 443–448, 1982.
- Bray, E. A.; Bailey-Serres, J.; Weretilnyk, E. Response to abiotic stress. In: Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologist, Rockeville, MD. p 1158-1249, 2000.
- Bray, E. A.; Baley-Serres, J.; Weretilnyk, E. Responses to abiotic stress. In: Wang, W.; Vinocur, B.; e Altman, A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. Planta. 218: 1-14. 2003.
- Bray, E.A. Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*. Journal of Experimental Botany. 55: 2331-2341, 2004.
- Bustin, S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. Journal of Molecular Endocrinology, 25:169–193, 2000.
- Bustin, S.A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. Journal of Molecular Endocrinology 29, 23–39, 2002.
- Chaves, M. M.; Maroco, J. P.; Pereira, J. S. Understanding plant responses to drought from genes to the whole plant. Functional Plant Biology, 30: 239-264, 2003.
- Chen, M.; Wang, Q-Y.; Cheng, X-G.; Xu, Z-S.; Li, L-C.; Ye, X-G.; Xia, L-Q.; Ma, Y-Z. *GmDREB2*, a soybean DRE-binding transcription factor, conferred drought and high-salt tolerance in transgenic plants. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 353:2, 299-305. 2007.
- Chinnusamy, V.; Schumaker, K. and Zhu, J-K. Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signaling in plants Journal of Experimental Botany, 55(395):225-236, 2004.
- Chinnusamy, V.; Xiong, L.; Zhu, J-K. Use of genetic engineering and molecular biology approaches for crop improvement for stress environments. Abiotic Stresses: plant resistance through breeding and molecular approaches. M. Ashraf, P. J. C. Harris, editors. 2005.
- Close, T. J. Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. Physiologia Plantarum 100:291-296, 1996.
- Conab - Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível no site <<http://www.conab.gov.br>> Acesso em dezembro de 2004.
- Conab - Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível no site <<http://www.conab.gov.br>> Acesso em dezembro de 2007.
- Comstock, J. P. Hydraulic and chemical signaling in the control of stomatal conductance and transpiration. J. Exp Bot. 53: 193-200. 2002.
- Cooper, G. M. A cultura: uma abordagem molecular. 2. ed. São Paulo: ArtMed Editora, 2002.
- Cultivar – Grupo Cultivar da Publicoções Ltda. Exportações do agronegócio crescem 18% em oito anos. Fonte: www.agricultura.gov.br. Disponível no site <www.grupocultivar.com.br>. 2008.
- De Costa, W. A. J. M.; Shanmugathasan, K. N. Physiology of yield determination of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] under different irrigation regimes in the subhumid zone of Sri Lanka. Field Crops Resour. 10: 23-35. 2001.

Cooperação Científica - Brasil e Japão

- Deguchi, M.; Watanabe, M.; Kanayama, Y. Increase in sorbitol biosynthesis in stressed Japanese pear leaves. *International Society for Horticultural Science*. 2002.
- Desclaux, D.; Huynh, T. T.; Roumet, P. Identification of soybean plant characteristics that indicate the timing of drought stress. *Crop Science*, 40: 716-722, 2000.
- Dubouzet, J.G.; Sakuma, Y.; Ito, Y.; Kasuga, M.; Dubouzet, E.D.; Miura, S.; Seki, M.; Shinozaki, K.; Yamaguchi-Shinozaki, K. Os-DREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encoded transcription activators that function in drought, high-salt and cold-responsive gene expression. *Plant Journal*. 33:751-763, 2003.
- Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível no site <www.cnpso.embrapa.br> 2008.
- Farias et al. Efeito da variação diária da umidade do solo sobre a fotossíntese e resistência estomática da soja. In *Sociedade Brasileira Agrometeorologia*, 9, ed, Anais. Congresso Brasileiro de Agrometeorologia, 9. Campina Grande, PB, pp 68-70, 1995.
- Farias, J. R. B.; Nepomuceno, A. L.; Neumaier, N.; Marion, E. Efeito de regimes pluviométricos sobre o rendimento de grãos de soja. In: Congresso Brasileiro de Agrometeorologia, 14, 2005. Campinas, SP. Anais. Campinas: Sociedade Brasileira de Agrometeorologia – SBA, UNICAMP: CD-ROM. 2005.
- Farias, J. R. B.; Nepomuceno, A. L.; Neumaier, N.; Tobita, S.; Almeida, I. R. de. Restrições de disponibilidade hídrica à obtenção de elevados rendimentos de grãos de soja. In: Congresso Brasileiro de Soja, 4., 2006, Londrina. Resumos. Londrina: Embrapa Soja, p. 32-33. 2006.
- Fehr, W.R.; Caviness, C.E. Stage of soybeans development. Ames: Iowa State University, 12p. (Special Report, 80.) 1977.
- Flagella, Z., Campanile, R.G., Stoppelli, M.C., De Caro, A., Di Fonzo, N. Drought tolerance of photosynthetic electron transport under CO₂-enriched and normal air in cereal species. *Physiol. Plant*. 104: 753-759, 1998.
- Frederick, J.R., Alm, D.M., Hesketh, J.D.: Leaf photosynthetic rates, stomatal resistances, and internal CO₂ concentrations of soybean cultivars under drought stress. *Photosynthetica*. 23: 575-584, 1989.
- Fujita, M.; Fujita, Y.; Maruyama, K.; Ski, M.; Hiratsu, K.; Ohme-Takagi, M.; Tran, L-S. P.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Shinozaki, K. A dehydration-induced NAC protein, RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway. *The Plant Journal*. 39: 863-876, 2004.
- Garg, A. K. Kim, J.; Owens, T. G.; Ranwala, A. P.; Choi, Y.; Kochian, L. V.; Wu, R. J. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 99:15898-15903, 2002.
- Gilmour, S. J.; Zarka, D. G.; Stockinger, E. J.; Slazar, M. P. Houghton, J. M.; Tomashow, M. F. Low temperature regulation of the Arabidopsis CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression. *Plant Journal*. 16: 433-442, 1998.
- He, J.X., Wang, J., Liang, H. G. Effects of water stress on photochemical function and protein metabolism of photosystem II in wheat leaves. *Physiol. Plant*. 93: 771-777, 1995.
- Hong, Z.; Lakkineni, K.; Zhang, Z.; Verma, D. P. S. Removal of Feedback Inhibition of 1-Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase Results in Increased Proline Accumulation and Protection of Plants from Osmotic Stress. *Plant Physiology*. 122: 1129-1136, 2000.
- Hsieh, T.; Lee, J.; Charng, Y.; Chan, M. Tomato plants ectopically Expressing Arabidopsis CBF1 show enhanced resistance to water deficit stress. *Plant Physiology*. 130: 618-626. 2002.
- Ingram, J.; Bartels, D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu Rev Plant Biol*. 47:377-403, 1996.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Disponível no site <<http://www.ibge.gov.br>>, 2005.
- Isoda, A.; Wang, P. Leaf temperature and transpiration of field-grown cotton and soybean under arid and humid conditions. *Plant Prod. Sci*. 5: 224-228, 2002.
- Isoda, I. A. Adaptive responses of soybean and cotton to water stress II. Changes in CO₂ assimilation rate, chlorophyll fluorescence and photochemical reflectance index in relation to leaf temperature. *Plant Production Science*. 8: 131-138. 2005.
- James, C. Global status of commercialized biotech/GM crops. 2007. ISAAA Briefs nº37, 2007.
- Javot, H.; Maurel, C. The role of aquaporins in root water uptake. *Annals of Botany*. 90: 301-313. 2002.
- Kačafetoglu, T.; Fkmeççi, Y. The effects of drought on plants and tolerance mechanisms. *Journal of Science* 19(4): 723-740. 2005.
- Kang, J. Y.; Choi, H. I.; Im, M. Y.; Kim, S. Y. Arabidopsis basic leucine zipper proteins that mediate stress-responsive abscisic acid signaling. *Plant Cell*. 14: 343-357. 2002.
- Kasuga, M.; Liu, Q.; Miura, S.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Shinozaki, K. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature Biotech*. 17: 257-261. 1999.
- Kasuga, M.; Miura, S.; Shinozaki, K.; Yamaguchi-Shinozaki, K. A Combination of the Arabidopsis DREB1A Gene and Stress-inducible rd29A Promoter Improved Drought- and Low-Temperature Stress Tolerance in Tobacco by Gene Transfer. *Plant Cell Physiol*. 45(9): 948-950. 2004.
- Kumar, D. J.; Goley, C. C.; Kucenas, J. D. RNA recognition towards identifying determinants of specificity. *Trends Biochem Sci*. 19: 214-220. 1994.

Cooperação Científica - Brasil e Japão

- Kim, Y. J.; Kim, J. E.; Lee, J-H.; Lee, M. H.; Jung, H. W.; Bahk, Y. Y.; Hwang, B. K.; Hwang, I.; Kim, W. T. The Vr-PLC3 gene encodes a putative plasma membrane-localized phosphoinositide-specific phospholipase C whose expression is induced by abiotic stress in mung bean (*Vigna radiate* L.). *FEBS Letters*. 556: 127-136, 2004.
- Kim, Y-O.; Kim, J. S.; Kang, H. Cold-inducible zinc finger-containing glycine-rich RNA binding protein contributes to the enhancement of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. 42: 890-900, 2005.
- Kinight, H. Calcium signaling during abiotic stress in plants. *Int. Rev Cytol*. 195: 269-325, 2002.
- Kizis, D.; Lumberras, V.; Pages M. Role of AP2/EREBP transcription factors in gene regulation during abiotic stress. *FEBS Letters*. 498:187-189, 2001.
- Kramer, P. J. Water relations of plants. New York. Academic Press. 498p, 1983.
- Li, J.; Gong, X.; Lin, H.; Song, Q.; Chen, J.; Wang, X. DGP1, a drought-induced guard cell-specific promoter and its function analysis in tobacco. *Sci China Life Sci*. 48:181-6, 2005.
- Lima, A. L. S.; DaMatta, F. M.; Pinheiro, H. A.; Totola, M. R.; Loureiro, M. E. Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under deficit conditions. *Environment and Experimental Botany*, 47: 239-247, 2002.
- Liu, Q.; Kasuga, M.; Sakuma, Y.; Abe, H.; Miura, S.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Shinozaki, K. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal pathways in drought and low-temperature responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 10: 1391-1406, 1998.
- Liu, F.; Jensen, C. R.; Andersen, M. N. A review of drought adaptation in crop plants: changes in vegetative and reproductive physiology induced by ABA-based chemical signals. *Australian Journal of Agricultural Research*, 56: 1245-1252, 2005.
- Maruyama, K. Sakuma, Y.; Kasuga, M.; Ito, Y.; Seki, M.; Goda, H.; Shimada, Y.; Yoshida, S.; Shinozaki, K.; Yamaguchi-Shinozaki, K. identification of cold-inducible downstream genes of the *Arabidopsis* DREB/CBF3 transcriptional factor using two microarray systems. *The Plant Journal*. 38: 982-993, 2004.
- MCT- Ministério da Ciência e Tecnologia. 2005. Índice de investimentos em P&D com relação ao PIB de 2000-2005. Disponível no site <<http://www.mct.gov.br>>. Acesso em 2006.
- Miyasaka, S; Medina, J. C. A soja no Brasil. 1º ed. São Paulo: ITAL, p. 1-174, 1981.
- Mundy, J.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Chua, N. H. Nuclear proteins bind conserved elements in the abscisic acid-responsive promoter of a rice rab gene. *Proc. Natl Acad Sci USA*. 87: 406-410, 1990.
- Nakashima, K.; Shinwari, Z. K.; Sakuma, Y.; Seki, M.; Miura, S.; Shinozaki, K.; Yamaguchi-Shinozaki, K. Organization and expression of two *Arabidopsis* DREB2 genes encoding DRE-binding proteins involved in dehydration and high salinity responsive gene expression. *Plant Molecular Biology*. 42: 657-665, 2000.
- Nanjo, T.; Kobayashi, M.; Yoshida, Y.; Kakubari, Y.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Shinozaki, K. Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*. 23: 12-18, 2001.
- Nepomuceno et al. Efeitos da disponibilidade hídrica no solo sobre a cultura da soja. In: EMBRAPA-CNPSo, ed, Ata - Documentos 72. Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil, 15. Londrina, PR, pp 42-43, 1994.
- Nepomuceno, A.L.; Neumaier, N.; Farias, J.R.B. Oya, T. Tolerância à seca em plantas. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*. 23: 12-18, 2001a.
- Nepomuceno et al. Estratégias para amenizar impactos decorrentes das adversidades climáticas. In: Resultados de Pesquisa da Embrapa Soja, 2001b.
- Nepomuceno et al. Transformação de plantas de soja por biobalística com genes de interesse. Resultados de Pesquisa da Embrapa Soja, Londrina, PR, v. 198, p. 40-43, 2002.
- Netto, A. O. A.; Rodrigues, J. D.; Pinho, S. Z. Análise de crescimento na cultura de batata submetida a diferentes lâminas de irrigação. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 35, p. 901-907, 2000.
- Neumaier e Nepomuceno. Water management. In: FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations ed, Tropical soybean: Improvement and production. FAO - Plant Production and Protection Series. 27, Rome Italy, pp 153-160, 1994.
- Neumaier et al. Índice de tolerância à seca em quatro cultivares de soja. In: Sociedade Brasileira de Agrometeorologia ed Anais Congresso Brasileiro de Agrometeorologia, 9. Campina Grande PB. pp 80-82, 1995.
- Neumaier et al. Diferenças no índice de tolerância à seca entre cultivares de soja. In: UFJF/DEAGO ed. Ata e Resumos Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil 12. Uberlândia MG. p 274, 1997.
- Oh, S-J; Song, S. I.; Kim, Y. S.; Jang, H.; Kim, S. Y.; Kim, M.; Kim, Y.-K.; Nahm, B. H.; Kim, J.-K. *Arabidopsis* CBF3, DREB1A, and ABF3 in Transgenic Rice Increased Tolerance to Abiotic Stress without Stunting Growth. *Plant Physiology*. 138: 341-351, 2005.
- Okamoto, J. M.; Custer, B.; Janda, R.; Van Montagu, M.; Inoué, K.; D. The AP2 domain of APETALA 3 defines a large and new family of DNA binding proteins in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 704 to 7076-7081, 1997.

Cooperação Científica - Brasil e Japão

- Oono, Y.; Seki, M.; Nanjo, T.; Narusaka, M.; Fujita, M.; Satoh, R.; Satou, M.; Sakurai, T.; Ishida, J.; Akiyama, K.; Lida, K.; Maruyama, K.; Satoh, S.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Shinozaki, K. Monitoring expression profiles of Arabidopsis gene expression during rehydration process after dehydration using ca. 7000 full-length cDNA Microarray. *The Plant Journal*, v.34, p.868-887, 2003.
- Oya et al. Agronomic, Physiological and Molecular characteristics of drought tolerant soybean cultivars. In: Workshop on Soybean Improvement, Production and Utilization in South America, 2001, Londrina, PR. Documents. 138:13-14, Londrina, PR, 2001.
- Oya, T.; Nepomuceno, A. L.; Neumaier, N.; Farias, J. R. B.; Tobita, S.; Ito, O. Drought tolerance characteristics of Brazilian soybean cultivars – Evaluation and characterization of drought tolerance of various Brazilian soybean cultivars in the field - . *Plant Production Science*, 7, : 129-137, 2004.
- Panikulangara, T. J.; Eggers-Schumacher, G.; Wunderlich, M.; Stransky, H.; Schoffl, F. Galactinol synthase1. A Novel Heat Shock Factor Target Gene Responsible for Heat-Induced Synthesis of Raffinose Family Oligosaccharides in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 136: 3148–3158, 2004.
- Pattanagul, W.; Madore, M. A. Water Deficit Effects on Raffinose Family Oligosaccharide Metabolism in Coleus. *Plant Physiology*, 121: 987-993, 1999.
- Pellegrineschi, A.; Ribaut, J.-M.; Trethowan, R.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Hoisintong, D. Progress in the genetic engineering of wheat for water-limited conditions. *JIRCAS Working Report*. p.55-60, 2002.
- Peña, L.; Cervera, M.; Juárez, J.; Ortega, C.; Pina, J.A.; Durá-Vila, N.; Navarro, L. High efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of citrus. *Plant Science*, 104:183-191, 1995.
- Penna, S. Building stress tolerance through over-production trehalose in transgenic plants. *Plant Science*. 8: 355-356, 2003.
- Pimentel, C.; Perez, A. J. de la C. Estabelecimento de Parâmetros para avaliação de tolerância à seca, em genótipos de feijoeiro. *Revista PAB – Pesquisa Agropecuária Brasileira*: Embrapa, 2001.
- Polizel, A. M. Avaliações moleculares, morfo-anatômicas e fisiológicas de soja geneticamente modificada com a construção *rd29A:DREB1A* de *Arabidopsis thaliana*, visando tolerância à seca. 125 f. Dissertação. 2007.
- Porcel, R.; Azcoñ, R.; Ruiz-Lozano, J. M. Evaluation of the role of genes encoding for dehydrin proteins (LEA D-11) during drought stress in arbuscular mycorrhizal Glycine max and Lactuca sativa plants. *Journal of Experimental Botany*, 417: 1933–1942, 2005.
- Portal do Agronegócio. Safra 2004/2005 deve registrar a maior quebra da história do país. Conab reduziu a previsão de colheita da soja e do milho. Fonte: www.opopular.com.br. Disponível no site www.agronegocio.goias.gov.br, 2005.
- Qin, F.; Yoh, S.; Li, J.; Liu, Q.; Li, Y-Q; Shinozaki, K.; Yamaguchi-Shinozaki, K. Cloning and Functional Analysis of a novel DREB1/CBF transcription factor involved in cold-responsive gene expression in *Zea mays* L. *Plant Cell Physiol*. v.45. p. 1042-1052. 2004.
- Qin, F.; Kakimoto, M.; Maruyama, K.; Osakabe, Y.; Tran, L-S.; Shinozaki, K.; Yamaguchi-Shinozaki, K. Regulation and functional analysis of *ZMDREB2A* in response to drought and heat stresses in *Zea mays* L. *The Plant Journal*. 50:54-69, 2007.
- Rech, E. L.; Vianna, G. R.; Aragão, F. J. L. High-efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants. *Nature Protocols*, 3(3): 1-10, 2008.
- Ruiz-Lozano, J. M. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress. New perspectives for molecular studies. *Mycorrhiza*. 13: 309-317, 2003.
- Sakuma, Y.; Maruyama, K.; Qin, F.; Osakabe, Y.; Shinozaki, K.; Yamaguchi-Shinozaki, K. Dual function of an *Arabidopsis* transcription factor DREB2A in water- stress-responsive and heat-stress - responsive gene expression. *Plant Biology*. 1-6. 2006a.
- Sakuma, Y.; Maruyama, K.; Osakabe, Y.; Qin, F.; Seki, M.; Shinozaki, K.; Yamaguchi-Shinozaki, K. Functional Analysis of an *Arabidopsis* transcription factor DREB2A, involved in Drought-Responsive gene expression. *The Plant Cell* 18:1292-1309. 2006b.
- Salinet, L. H.; Farias, J. R. B.; Oliveira, R. F. de; Nepomuceno, A. L. Avaliação Fisiológica de soja geneticamente modificada visando tolerância à seca. Resumo apresentado no XICBFV - Gramado – RS. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, vol. 19, suplemento. 2007.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Press. 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY. 1989.
- Santos, R. F.; Carlesso, R. Déficit hídrico e os processos morfológicos e fisiológicos das plantas. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*. 2(3): 187-204. 1998.
- SAS - Statistical Analysis System. User's guide. SAS Institute Inc. Cary, NC. 142 p. 1990.
- Schiermeier, G. The costs of global warming. *Nature*. 439:374-375. 2006.
- Schramm, F.; Larkincule, J.; Kehlmann, E.; Englisch, G.; Vierling, E.; Pascal von Kle. A cascade of transcription factor HsfA3 regulates the heat stress response in Arabidopsis. *The Plant Journal*. 53:264-274. 2008.
- Yeh, M.; Narusaka, M.; Li, H.; Kasuga, M.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Carnelli, P.; Hayashi, T.; Shinozaki, K. Monitoring the Expression Pattern of 1300 Arabidopsis Genes under Drought and Cold Stresses by Using a Full-Length cDNA Microarray. *Plant Cell*. Vol. 13. p.61-72. 2001.

Cooperação Científica - Brasil e Japão

- Sharp, R. E. Interaction with ethylene: changing views on the role of abscisic acid in root and shoot growth responses to water stress. *Plant, Cell and Environment* 25: 211–222, 2002.
- Shinozaki, K.; Yamaguchi-Shinozaki, K. Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol.* 115: 327-334, 1997.
- Shinozaki, K.; Yamaguchi-Shinozaki, K. Biotechnology Intelligence Unit – Cold, Drought, Heat and Salt Stress in Higher Plants. In: *Molecular Response to Drought Stress*. p 11-25, 1999.
- Shinozaki, K.; Yamaguchi-Shinozaki, K. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology*. 3:217-223, 2000.
- Shinozaki, K. Important roles of drought and cold inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *The plant Journal*. 29: 417-426, 2002.
- Shinozaki, K.; Yamaguchi-Shinozaki, K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance *Journal of Experimental Botany*, 58(2):221-227, 2007.
- Sircelj, H.; Tausz, M.; Grill, D.; Batic, F. Biochemical responses in leaves of two apple tree cultivars subjected to progressing drought. *Journal Plant Physiology*. 62: 1308-1320, 2005.
- Southern, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal Molecular Biology*, 98:503-517, 1975.
- Stockinger, E. J.; Gilmour, S. J. Tomashow, M. F. *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting and water deficit. *Proc. Natl. Sci. USA*. 94: 1035-1040, 1997.
- Stokstad, E. States sue over global warming. *Science*, 305:590, 2004.
- Taiz, L.; Zeiger, E. *Fisiologia Vegetal*. 3ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- Taji, T.; Ohsumi, C.; Iuchi, S.; Seki, M.; Kasuga, M.; Kobayashi, M.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Vasellati, V.; Oesterheld, D.; Medan, D.; Loreti, J. Effects of flooding and drought on the anatomy of *Paspalum dilatatum*. *Annals of Botany*, 88: 355-360, 2001.
- Wang, W.; Vinocur, B.; Altman, A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Pianta*. 218:1-14, 2003.
- Wang, W.; Vinocur, B.; Shoseyov, O.; Altman, A. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Plant Science*. 1360-1385, 2004.
- Wise, M. J.; Tunnacliffe, A. POPP the question: what do LEA proteins do? *Plant Science*. 9: 13-17, 2004.
- Wittenmayer, L.; Merbach, W. Plant responses to drought and phosphorus deficiency: contribution of phytohormones in root-related processes. *Journal Plant Nutrition Soil Science*, 168: 531-540, 2005.
- Xiong, L.; Schumaker, K. S.; Zhu, J. K. Cell Signaling during Cold, Drought, and Salt Stress. *The Plant Cell*, S165-S183, 2002.
- Yamaguchi-Shinozaki, K.; Kasuga, M.; Liu, Q.; Nakashima, K.; Sakuma, Y.; Abe, H.; Shiwari, Z. K.; Seki, M.; Shinozaki, K. Biological mechanisms of drought stress response. *JIRCAS Working Report*. 1-8, 2002.
- Yamaguchi-Shinozaki, K.; Koizumi, M.; Uro, S.; Shinozaki, K. Molecular cloning and characterization of 9 cDNAs for genes that are responsive to desiccation in *Arabidopsis thaliana*: sequence analysis of one cDNA clone that encodes a putative transmembrane channel protein. *Plant Cell Physiol*. 33(3):217-224, 1992.
- Yamaguchi-Shinozaki, K.; Shinozaki, K. Characterization of the expression of a desiccation-responsive rd29 gene of *Arabidopsis thaliana* and analysis of its promoter in transgenic plants. *Mol Gen Genet*. v.236, p.331-340. 1993.
- Zhang, W.; Qin, C.; Zhao, J.; Wang, X. Phospholipase Dα1-derived phosphatidic acid interacts with ABI1 phosphatase 2 C and regulates abscisic acid signaling. *Plant Biology*. 25: 9508-9513, 2004.

Seção 12 – Anexos

- Communication from the Embassy of Republic Federative of Brazil sending the letter from the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply of Brazil to the Ministry of Agriculture, Fisheries and Forestry of Japan.
- Letter, in Portuguese and Japanese, from the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply of Brazil to the Ministry of Agriculture, Fisheries and Forestry of Japan, supporting the proposal.
- Letter, in Japanese, from the Ministry of Agriculture, Fisheries and Forestry of Japan supporting the proposal.