

**ブラジル連邦共和国**  
**(科学技術)**  
**地球環境劣化に対応した環境ストレス**  
**耐性作物の作出技術の開発**  
**終了時評価調査報告書**

平成 26 年 12 月  
(2014年)

独立行政法人国際協力機構  
農村開発部

農 村
J R
14-109

**ブラジル連邦共和国**  
**(科学技術)**  
**地球環境劣化に対応した環境ストレス**  
**耐性作物の作出技術の開発**  
**終了時評価調査報告書**

平成 26 年 12 月  
(2014年)

**独立行政法人国際協力機構**  
**農村開発部**

## 序 文

日本国政府は、ブラジル連邦共和国政府の要請に基づき、「(科学技術) 地球環境劣化に対応した環境ストレス耐性作物の作出技術の開発」プロジェクトを2010年3月から2015年3月まで実施することとしています。

今般、プロジェクトの協力機関の終了まで残すところ半年を切ったことから、当機構は、2014年10月19日から11月10日までの間、独立行政法人国際協力機構永代成日出国際協力専門員を団長とする終了時評価調査団を現地に派遣し、ブラジル連邦共和国側評価チームと合同で、プロジェクトの進捗状況の確認とDAC評価5項目に基づいた評価分析、並びに今後の方向性に係る協議を行いました。これらの評価結果は、日本国・ブラジル連邦共和国双方の評価チームによる討議を経て合同評価報告書としてまとめられ、署名・交換のうえ、両国の関係機関に提出されました。

本報告書は、同調査団による協議結果、評価結果を取りまとめたものであり、今後プロジェクトの実施にあたり広く活用されることを願うものです。

終わりに、本調査の実施にあたり、ご協力とご支援を頂いた関係者の皆様に対し、心から感謝の意を表します。

平成26年12月

独立行政法人国際協力機構  
農村開発部長 北中 真人

# 目 次

序 文

目 次

プロジェクト位置図

現地写真

略語表

評価調査結果要約表（和文・英文）

第1章 評価調査の概要	1
1-1 調査団派遣の経緯と目的	1
1-2 調査団の構成と調査日程	1
1-3 対象プロジェクトの概要	2
第2章 評価の方法	3
2-1 評価設問と必要なデータ・評価指標	3
2-2 データ収集方法	3
2-3 データ分析方法	3
2-4 評価調査の制約・限界	4
第3章 プロジェクトの実績	5
3-1 投入実績	5
3-2 アウトプット（成果）の達成状況	7
3-3 プロジェクト目標の達成度	12
3-4 実施プロセスにおける特記事項	15
第4章 評価結果	17
4-1 妥当性	17
4-2 有効性	19
4-3 効率性	19
4-4 インパクト	20
4-5 持続性	22
4-6 結 論	24
第5章 提言及び教訓	25
5-1 提 言	25
5-2 教 訓	26
第6章 所 感	27
6-1 JST 研究主幹所感	27
6-2 団長所感	28

付属資料

1. 調査日程	33
2. 主要面談者	34
3. ミニッツ	36
4. PDM 仮和訳	100
5. 評価グリッド（和文・英文）	104
6. Embrapa 組織図	116

# プロジェクト位置図



## 現 地 写 真



中間レビューレポートへの署名（評価チーム）



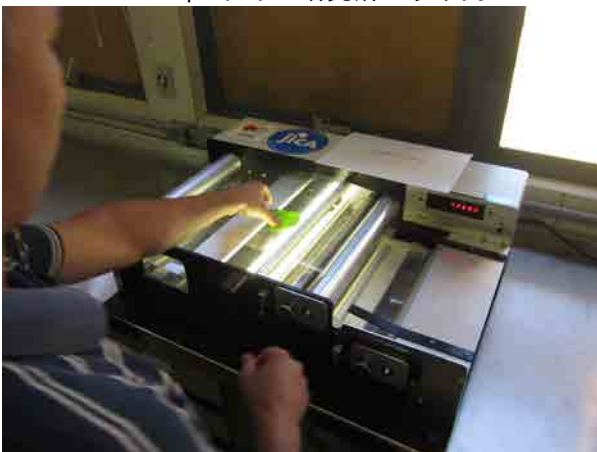
ミニッツ署名



Embrapa ダイズ研究所のラボ内



クリーンベンチでの実験作業



植物光学計測機器



温室内でのポット試験



JICA 予算で設置した温室内の1室



雨除けシェルター付きの試験圃場

## 略 語 表

略語	英文	和文
DREB	Dehydration Responsive Element Binding gene	DREB遺伝子
Embrapa	Brazilian Agricultural Research Corporation	ブラジル農牧研究公社
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations	国際連合食糧農業機関
GMO	Genetically Modified Organism	遺伝子組み換え作物
JCC	Joint Coordinating Committee	合同調整委員会
JIRCAS	Japan International Research Center for Agricultural Sciences	独立行政法人国際農林水産業研究センター
JST	Japan Science and Technology Agency	独立行政法人科学技術振興機構
MTA	Material Transfer Agreement	材料移転契約
PDM	Project Design Matrix	プロジェクト・デザイン・マトリックス
PO	Plan of Operations	活動計画
R/D	Record of Discussions	討議議事録
SATREPS	Science and Technology Research Partnership for Sustainable Development	地球規模課題対応国際科学技術協力



## 評価調査結果要約表

<b>1. 案件の概要</b>	
国名：ブラジル連邦共和国	案件名：(科学技術) 地球環境劣化に対応した環境ストレス耐性作物の作出技術の開発
分野：農林水産-農業-農業一般	援助形態：技術協力プロジェクト
所轄部署：農村開発部農業・農村開発第一グループ第二チーム	協力金額：約3億1,000万円
協力期間	(R/D)：2010年3月4日～2015年3月3日(5年間)
	先方関係機関：ブラジル農牧研究公社(Embrapa)ダイズ研究センター
	日本側協力機関：独立行政法人国際農林水産業研究センター(JIRCAS)(*代表研究機関)、国立大学法人東京大学、独立行政法人理化学研究所(RIKEN)
他の関連協力：	
<p><b>1-1 協力の背景と概要</b></p> <p>ブラジル連邦共和国(以下、「ブラジル」と記す)は、人口約1億9,000万人、国土面積約851万2,000km<sup>2</sup>を有し、コーヒー、タバコ、ダイズ等の輸出大国である。特にダイズに関しては、2006/07年には5,840万tが生産され、世界のダイズ総生産量の約1/4を占めている。また、米国に次いで世界第2位の生産量を誇っている。一方、世界におけるダイズの消費は増え続け、特に中華人民共和国(以下、「中国」と記す)では人口の増加や食生活の変化に伴うダイズの消費拡大が著しい。このような状況のなか、ブラジルは、既に世界最大の農産物貿易黒字国であるとともに、世界最大規模の農用地開拓可能地帯を有しており、食糧供給国としての役割を強く期待されている。しかし、急激な人口増加と工業化による温室効果ガスの上昇によって地球の温暖化が進み、作物耕作地における干ばつ・作物の収量の減少・食糧や飼料の確保といった世界的な問題が生じている。そのような状況のなか、ダイズやトウモロコシなど、大規模生産で比較的降水量の少ない地域においても栽培されている作物を対象とした干ばつ等の環境ストレスに強い品種の開発は、世界的にも最も重要な育種目標となってきた。従来の育種方法により干ばつに強い系統の選抜と育種への利用が試みられているが、近年、世界的に進展している作物のゲノム研究の成果をもとに、遺伝子組み換え技術による作物の開発が注目されるようになった。</p> <p>本プロジェクトでは、これまでの環境ストレス耐性遺伝子群に関する研究結果や急速に進展しているダイズのゲノム解析技術を基盤として、ダイズの乾燥等の環境ストレスに対する耐性獲得に関与する遺伝子群やその発現を制御するプロモーターを明らかにする。そして、これらの遺伝子やプロモーターをダイズに導入することで干ばつに強い品種を作出する。さらに、圃場条件において乾燥ストレスに対する耐性等を評価し、耐性遺伝子とプロモーターの最適の組み合わせを明らかにするとともに、耐性レベルが向上した形質転換系統を選抜し、環境ストレス耐性の作出技術の開発を行う。なお、本プロジェクトは、「地球規模課題に対応する科学技術協力」事業のひとつであり、環境・エネルギー等を含めた地球規模課題に対し、開発途上国と共同研究を実施するとともに、途上国側の能力向上を図ることをめざすことを目的としている。</p>	

日本側代表研究機関として(独)国際農林水産業研究センター(Japan International Research Center for Agricultural Sciences : JIRCAS)、ブラジル側研究機関としてブラジル農牧研究公社ダイズ研究センター(Brazilian Agricultural Research Corporation : Embrapa Soybean)が、共同研究を実施するものである。

## 1-2 協力内容

### (1) 上位目標

環境ストレスに適応したダイズが開発され、ブラジルのダイズ生産の安定化に資する。

### (2) プロジェクト目標

環境ストレス耐性ダイズの作出技術が開発される。

### (3) 成果

1. 環境ストレスに対する耐性獲得に関与する有用遺伝子が同定される。
2. ストレス応答性プロモーターの単離と有用遺伝子との組み合わせの最適化が行われる。
3. プロモーターと有用遺伝子の組み合わせが導入されたダイズ系統が得られる。
4. 環境ストレス耐性を示す組み換えダイズ系統が選抜される。

### (4) 投入(評価時点)

日本側：

長期専門家派遣 延べ1名、 短期専門家派遣 計13名、 日本側研究機関で活動に従事した研究者 計33名、 研修員受入 計13名、 機材供与(ブラジル側へ) 総額8,000万円、機材調達(日本の研究機関向け) 総額1,800万円、 ローカルコスト負担 総額5,100万円

相手国側：

研究者等の配置 延べ35名(終了時評価調査時)、 機材購入費 総額1億2,600万円、 ローカルコスト(光熱費等の負担)、 土地・施設提供：日本人専門家及び研究者の執務室、バイオテクノロジー実験棟(既存、新規)、各種実験室、温室、試験圃場など

## 2. 評価調査団の概要

調査者	総括：	永代 成日出	JICA国際協力専門員
	協力企画：	安達 巧	JICA農村開発部農業・農村開発第一グループ第二チーム企画役
	科学技術計画評価： (オブザーバー)	浅沼 修一	独立行政法人科学技術振興機構(JST)地球規模課題対応国際科学技術協力(SATREPS)生物資源分野研究主幹(国立大学法人名古屋大学教授)
	科学技術計画評価： (オブザーバー)	佐藤 雅之	JST国際科学技術部地球規模課題協力グループ上席主任調査員
	評価分析：	道順 勲	中央開発株式会社海外事業部
調査期間	2014年10月19日～2014年11月10日		評価種類：終了時評価

### 3. 評価結果の概要

#### 3-1 実績の確認

成果1:「環境ストレスに対する耐性獲得に関与する有用遺伝子が同定される。」

成果1に関する3つの指標、すなわち、①ストレス耐性制御遺伝子の同定、②ストレス受容に関与する膜タンパク質遺伝子の同定、③ストレス応答制御遺伝子の同定、に関する指標すべてが、目標値を達成した。

成果2:「ストレス応答性プロモーターの単離と有用遺伝子との組み合わせの最適化が行われる。」

成果2に関する3つの指標、すなわち、①ストレス応答性遺伝子の同定、②ストレス応答性プロモーターの同定、③プロモーターと有用遺伝子の組み合わせの最適化、に関する指標すべてが、目標値を達成した。

成果3:「プロモーターと有用遺伝子の組み合わせが導入されたダイズ系統が得られる。」

成果3に関する3つの指標、すなわち、①遺伝子組み換え技術の確立、②プロモーターと有用遺伝子の組み合わせのダイズへの導入、③T1世代種子が増殖、に関する指標すべてが、目標値を達成した。

成果4:「環境ストレス耐性を示す組み換えダイズ系統が選抜される。」

成果4に関する6つの指標、すなわち、①乾燥応答性遺伝子をもつダイズ系統の選抜、②高温応答性遺伝子をもつダイズ系統の選抜、③ダイズ系統の遺伝子発現が解析、④温室、圃場でのダイズのストレス耐性試験手法の確立、⑤温室でのダイズのストレス耐性評価、⑥圃場でのダイズのストレス耐性評価、に関する指標すべてが、目標値を達成した。

プロジェクト目標:「環境ストレス耐性ダイズの作出技術が開発される。」

プロジェクト目標に関するすべての指標は、その数値目標を達成し、環境ストレス耐性ダイズ作出に係る遺伝子工学技術は以下の説明のとおり開発された。したがって、プロジェクト目標の達成水準は、非常に高いといえる。

#### 3-2 評価結果の要約

##### (1) 妥当性: 高い

①地球規模における気候変動への対応の必要性、②ブラジルにおける耐乾性・耐暑性のダイズ品種開発の必要性、③ターゲット・グループ (Embrapa ダイズ研究所) のニーズとの整合性、④ブラジルの国家開発政策等との整合性、⑤日本の援助方針との整合性、の観点から判断して、本プロジェクトの妥当性は高い。

##### (2) 有効性: 高い

本プロジェクトを通じて、環境ストレス耐性ダイズの作出のための複数の遺伝子工学技術が開発された。アグロバクテリウム法で形質転換されたダイズの1つの系統については、温室試験と圃場試験を経て、非常に強い干ばつ耐性があること並びに害虫抵抗性も

もつことが示された（害虫抵抗性は発現することを予期しなかった特性であるが、一方でさらに解明を進める必要もある）。非常に有用な成果が出たということは、本プロジェクトで開発された遺伝子工学技術が環境ストレス耐性ダイズを開発するうえで非常に適切かつ有効なものであることを示しているといえる。

(3) 効率性：おおむね高い

MTA 締結に長い時間を要したものの、本プロジェクトの効率性はおおむね高いといえる。

(4) インパクト

1) 上位目標「環境ストレスに適応したダイズが開発され、ブラジルのダイズ生産の安定化に資する」達成の見通し

遺伝子組み換えダイズの商品化までには通常、安全性試験など多くの時間を要するステップがあることを勘案すると、目標年である 2019 年までに上位目標を達成することは困難である。達成までには、プロジェクト終了後から少なくとも 8～10 年程度は必要と想定される。

2) 将来発現することが期待されるインパクト

- ① 干ばつ耐性ダイズの商品化品種が開発された際の干ばつ被害地域における生産性の向上
- ② 本プロジェクトで開発された知見・技術の有用性
- ③ アグロバクテリウム法による形質転換効率が改善したことの有用性
- ④ マイクロアレイ分析技術開発の有用性

(5) 持続性

政策面、組織面、技術面では、本プロジェクトの持続性は高いと考えられる。環境ストレス耐性ダイズに関し開発された遺伝子工学技術は、ダイズの干ばつ耐性品種の開発のために、Embrapa ダイズ研究所において持続的に活用できるであろう。ただし、資金面では一般的に、安全性評価や規制緩和などに莫大な資金が必要となるため、遺伝子組み換えダイズの商品化に興味を有し、資金力も有するパートナーを探索することが重要になる。

### 3-3 効果発現に貢献した要因

(1) 計画内容に関すること

特になし

(2) 実施プロセスに関すること

日本側研究機関とブラジル側研究機関が研究課題について明確に役割分担を行いつつ、信頼関係を基礎に研究活動を実施してきたこと。また、良好なコミュニケーションが取られ、研究活動実施に関し適切な調整が実施されてきたこと。

### 3-4 問題点及び問題を惹起した要因

#### (1) 計画内容に関すること

特になし

#### (2) 実施プロセスに関すること

①材料移転契約（Material Transfer Agreement : MTA）締結に長い時間を要したこと、② JICA 費用で設置した温室の冷房設備の不調、③研究活動に必要な試薬の購入に時間を要したこと。

### 3-5 結論

合同終了時評価チームは、すべての成果の指標及びプロジェクト目標が達成していることを確認した。研究活動の成果として、環境ストレス耐性に関するダイズの遺伝子工学的技術に関する科学的知見と情報が蓄積され、複数の有用な技術が確立された。圃場試験の結果、1つの遺伝子組み換えダイズ系統が強い干ばつ耐性を示すとともに、害虫抵抗性も示した（圃場試験レベルで干ばつ耐性を示すダイズが開発されたことは、世界で初めてであると推定されている）。さらに複数の種類の遺伝子をもつダイズ系統の試験が温室及び圃場で実施される。そして、より多くのダイズ系統が環境ストレス耐性の特性をもつことが期待される。将来、農民が利用できる商品品種開発までには、今後、複数の段階と課題があるものの、本プロジェクトで開発された技術は、基礎的研究に有用だけでなく、ダイズの商品化品種開発に向けた研究活動にも大いに有用なものである。

### 3-6 提言（当該プロジェクトに関する具体的な措置、提案、助言）

#### 3-6-1 プロジェクト終了までの残りの期間において対応すべき事項

未締結の MTA の迅速な署名

#### 3-6-2 プロジェクト終了後において対応すべき事項

##### (1) 温室用の冷房システム導入に向けた予算措置

##### (2) 干ばつ耐性ダイズの商品化に向けて重要な点について

①商品化に向けた戦略策定、②商品化に向けた両国関係機関による協力関係の継続、③害虫抵抗性発現メカニズムの解明、④より干ばつ状況が発生しやすい気象条件をもつ場所での圃場試験の実施、⑤安全性評価と規制緩和)

### 3-7 教訓（当該プロジェクトから導き出された他の類似プロジェクトの発掘・形成、実施、運営管理に参考となる事柄）

#### (1) 高い研究成果を上げた要因について

ブラジル側研究機関と日本側研究機関の信頼関係と明確な役割分担などがプロジェクト成果達成の要因となっている。

(2) MTA に関する手続きへの留意について

類似プロジェクトやプロジェクトに関係した共同研究を実施する際には、円滑に研究活動を進めるうえで MTA の迅速化が望まれる。

## 評価調査結果要約表（英文）

### Summary of Terminal Evaluation

<b>I. Outline of the Project</b>		
<b>Country :</b> Federative Republic of Brazil		<b>Project title :</b> Development of Genetic Engineering Technology of Crops with Stress Tolerance against Degradation of Global Environment
<b>Issue/Sector :</b> Agriculture General		<b>Cooperation scheme :</b> Technical Cooperation Projects (SATREPS)
<b>Division in charge :</b> Rural Development Department		<b>Total cost :</b> 310,000,000YEN
<b>Period of Cooperation</b>	From March 4, 2010 - March 3, 2015 (5 years)	<b>Partner Country's Implementing Organization :</b> Embrapa Soybean
		<b>Supporting Organization in Japan :</b> Japan International Research Center for Agricultural Sciences (JIRCAS), The University of Tokyo and RIKEN
<b>1-1. Background of the Project</b>		
<p>The population of Brazil is approximately 190 million people and Brazil has land area of about 8.512 million km<sup>2</sup>. Coffee, tobacco, and soybean are the main export commodities for Brazil. Especially with respect to soybean, the 2006/7 year's production is 5,840 million tons and accounted for about a quarter of the world's soybean total production. Brazil is the second world soybean producer after America. Consumption of soybean is increasing continuously in the world, especially in China, change of the population growth and dietary habit caused significant consumption rise of soybean. On the other hand, Gradual warming of the earth, first caused by the increasing amount of greenhouse gases with rapid population growth and industrialization has subsequently been raising global problems such as desertification of cropland, reduction of crop yield and security of food and feedstuff. Therefore, development of drought-tolerant soybean plants and maize is now considered as the most important target of such technology because these plants are grown on such a large scale in areas of relatively low rainfall.</p> <p>This project intends to develop the genetic engineering technology of soybean that is adapted to tolerate drought and heat with the aim to stabilize soybean production in Brazil, in cooperation between Japanese institutions and Embrapa Soybean. The research group at first took steps to isolate useful genes related to environmental stress tolerance and stress-inducible promoters in soybean plants on the basis of research of genes related to environmental stress tolerance and rapidly evolving soybean genome research carried out elsewhere. It selects candidate combinations of such genes and promoter, and then introduces them to the soybean plant. It further evaluates environmental stress tolerance of transgenic soybean plants in greenhouses and under field conditions, with continued result feedback to improve the combination of useful genes and promoters, with the eventual aim to select elite transgenic lines with improved tolerance to environmental stresses. It should be noted that the present project, is one of the business, "science and technology cooperation corresponding to the global issues", with</p>		

respect to global issues, including the environment, energy, etc., as well as conduct joint research with developing countries, developing countries it is an object of the present invention is aimed to be made side capacity building.

## **1-2. Project Overview**

### **(1) Overall Goal**

Soybeans adapted to environmental stresses are developed, which contributes to the stabilization of the soybean production in Brazil.

### **(2) Project Purpose**

Genetic engineering technology of soybean with environmental stress tolerance is developed.

### **(3) Outputs**

- 1) Useful genes related to environmental stress tolerance are identified.
- 2) Stress-responsive promoters are isolated and combinations with useful genes are optimized.
- 3) Transgenic soybean lines containing constructs of promoters and useful genes are produced.
- 4) Transgenic soybean lines with environmental stress tolerance are selected.

### **(4) Inputs**

**Japanese side :** Japanese Expert: 1 long-term expert and 13 short-term experts in total, Researchers participated in the researches in Japan: 33 persons, Trainees received in Japan: 13 persons, Provision of equipment: around 744,000 US dollars, Local cost expenditure: around 476,000 US dollars

**Brazilian side :** Assignment of counterparts: 17 persons (at the terminal evaluation), Purchase of equipment: around 1.2 million US dollars, Local Cost: running expenses and scholarships (around 73,765 US dollars), Provision of land and facilities: office spaces for Japanese expert and researchers, biotechnology buildings (existing and newly built), various laboratories, green house, and crop experiment fields etc.

## **II. Evaluation Team**

<b>Members of Evaluation Team</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) Leader: Dr. Narihide NAGAYO, Senior Advisor, JICA</li> <li>2) Cooperation Planning: Mr. Takumi ADACHI, Advisor, Team 2, Group 1, Rural Development Department, JICA</li> <li>3) Science and Technology Planning and Evaluation (As observer): Dr. Shuichi ASANUMA, Evaluation Committee, Science and Technology Research Partnership for Sustainable Development (SATREPS) Program, JST/ Professor, Nagoya University</li> <li>4) Science and Technology Planning and Evaluation (As observer): Dr. Masayuki SATO, Principal Researcher, Department of International Affairs, Research Partnership for Sustainable Development Group, JST</li> <li>5) Evaluation Analysis: Mr. Isao DOJUN, Consultant, Chuo Kaihatsu Corporation</li> </ol>	
<b>Period of Evaluation</b>	From October 19, 2014 to November 10, 2014	<b>Type of Evaluation:</b> Terminal



### **III. Results of Evaluation**

#### **3-1. Project Performance**

**Output 1:** Useful genes related to environmental stress tolerance are identified.

**Achievement:** All indicators of Output 1, which are related with identification of genes involved in regulation of stress tolerance, genes for membrane proteins involved in stress perception, and genes involved in regulation of stress response, have been achieved their targets.

**Output 2:** Stress-responsive promoters are isolated and combinations with useful genes are optimized.

**Achievement:** All indicators of Output 2, which are related with identification of stress-responsive genes, identification of stress-responsive promoters, and optimization of constructs of useful genes and promoters, have been achieved their targets.

**Output 3:** Transgenic soybean lines containing constructs of promoters and useful genes are produced.

**Achievement:** All indicators of Output 3, which are related with establishment of gene transformation method, introduction of constructs of useful genes and promoters in soybean, and collection of T1 seeds, have been achieved its target.

**Output 4:** Transgenic soybean lines with environmental stress tolerance are selected.

**Achievement:** All indicators of Output 4 have been achieved its target.

**Project Purpose:** Genetic engineering technology of soybean with environmental stress tolerance is developed.

**Achievement:**

The numerical targets of all indicators for the Project purpose have been achieved and genetic engineering technologies of soybean with environmental tolerance have been developed as explained below. Therefore, it is said that level of achievement of the Project purpose is very high.

#### **3-2. Summary of Evaluation Results**

##### **(1) Relevance**

The relevance of the Project is high from the following viewpoints. 1) Needs to respond to global climate change, 2) Needs for the development of drought tolerant soybean varieties in Brazil, 3) Needs of the target group (Embrapa Soybean), 4) Relevance to the national development plans of Brazil, and 5) Conformity to assistance policy of Japan to Brazil.

##### **(2) Effectiveness**

The Project Purpose is achieved an effective way (effectiveness of the Project is high). Several genetic engineering techniques for producing environmental stress tolerant soybean have been developed. One of the lines generated by Agrobacterium method and tested in greenhouse and field showed very strong character on drought tolerance and also insect pest resistance (insect pest resistance

is not prospected to be expressed, but needed to be analyzed the mechanism and potential furthermore). It can said that this very positive results of the joint research indicate that developed genetic engineering techniques under the Project are very appropriate and effective for developing environmental stress tolerant soybean.

### **(3) Efficiency**

The efficiency of the Project is high in general, despite of longer time required for signing on MTA.

### **(4) Impact**

1) Prospect of achieving the Overall Goal “Soybeans adapted to environmental stresses are developed, which contributes to the stabilization of the soybean production in Brazil.”

It is difficult to say that the Overall Goal of the Project will be achieved by 2019 considering time consuming steps required for commercialization of genetically modified soybean. It may take around 8 to 10 years at least after the completion of the Project.

2) Other potential impacts in future

- a) Productivity gain for farmers facing reduced production by drought when commercial variety of drought tolerant soybean is developed.
- b) Usefulness of knowledge and techniques developed under the Project
- c) Usefulness of improved transformation efficiency of Agrobacterium method
- d) Usefulness of developed technique on Microarray analysis

### **(5) Sustainability**

Sustainability of the Project is expected to be high in terms of policy, organizational, and technical aspects. Developed genetic engineering technology of soybean with environmental stress tolerance can be utilized in sustainable way by Embrapa for developing drought tolerant soybean variety. However, it is said in general, a large amount of budget is required for biosafety evaluation and deregulation procedures, therefore, it is important to seek partners who could have an interest in commercialization of genetically modified organisms (GMO) of transformed soybean and have financial capacity.

### **3-3. Factors that promoted realization of effects**

(1) Factors concerning to the implementation process

None

(2) Factors concerning to the implementation process

1) The Japanese and Brazilian research institutions have carried out research activities with clearly demarcated roles on research themes based on trust relationship. 2) Good communication between Japanese and Brazilian researchers and good coordination for carrying out research activities.

### **3-4. Factors that impeded realization of effects**

(1) Factors concerning to planning

None

(2) Factors concerning to the implementation process

1) Long term needed to sign on MTA (Material Transfer Agreement), 2) malfunction of cooling system for greenhouse which was constructed with JICA budget, and 3) long term needed for purchasing reagents necessary for research activities.

### **3-5. Conclusion**

The Joint Terminal Evaluation Team has confirmed that indicators of all outputs and the Project Purpose are achieved. As the results of the research activities, scientific knowledge and information on genetic engineering technology of soybean with environmental stress tolerance have been accumulated and various useful techniques have been established. A line of transgenic soybean showed higher drought tolerance and insect pest tolerant characters as a result of field experiment. There are some more types of gene which will be tested at greenhouse and field levels. It is expected that more varieties of soybean may have environmental stress tolerant characteristics. Although, there are several steps and challenges in future for developing commercial variety which can be used by farmers, it can be said that developed technology under the Project is very useful not only for basic research but also research activities toward developing soybean commercial variety.

### **3-6. Recommendations**

3-6-1. Recommended actions to be taken by the Project in the remaining cooperation period

(1) Acceleration of finalization of MTA

3-6-2. Recommended actions to be taken after the termination of the Project

(1) Budget allocation for purchasing and installing cooling system for greenhouse

(2) Important points toward commercialization

1) Strategy for commercialization, 2) Continuation of cooperative relationship, 3) Analysis of potential on insect resistant expression in soybean which SAT5 gene is introduced, 4) Field experiments at locations where drought climate condition is occurred more frequently, and 5) Biosafety risk assessment and deregulation.

### **3-7. Lessons Learned**

(1) Contributing factors that brought significant research results

Good relationship through past joint research and definition “roles and responsibilities” between Embrapa Soybean and Japanese institutions contributes to obtaining significant research results.

(2) Acceleration of MTA procedure

It is necessary to concern about MTA procedure for keeping from delay so that negative effect about progress of project can be reduced when similar project or joint research is carried out in future.

# 第1章 評価調査の概要

## 1-1 調査団派遣の経緯と目的

本終了時評価調査は、現在までの実績、プロジェクト目標と成果の達成度をプロジェクト・デザイン・マトリックス（Project Design Matrix：PDM）に基づき確認し、さらに評価5項目の観点からプロジェクトの評価を行うとともに、プロジェクト終了前後の活動に関する提言と類似案件のための教訓を得ることを目的とする。

なお、本案件は地球規模課題対応国際科学技術協力（Science and Technology Research Partnership for Sustainable Development：SATREPS）プロジェクトであり、現地調査には独立行政法人科学技術振興機構（Japan Science and Technology Agency：JST）も参加し収集済みの情報等をもとに研究の進捗状況や成果を確認し、科学技術的視野からの評価を行うとともに、国際共同研究運営の改善のための提言を行う。JICAは科学技術の専門的観点からの助言をJSTから得る。

### <JST>

地球規模課題解決に資する、科学技術水準の向上、科学技術政策及び社会への貢献などの観点から日本国内及びブラジルを含めた国際共同研究全体の評価を行う。

### <JICA>

プロジェクト運営監理の一環として、ODA事業としてブラジルにおける人材育成、能力強化及び開発課題に対する貢献の観点から、5項目評価の視点に基づき、プロジェクトの現状を評価する。

具体的には、以下の項目をブラジル側と合同で実施する。

- ① プロジェクトの実績（活動、投入）及び実施プロセスを把握・検証する。
- ② プロジェクト目標と成果の調査時点での達成状況、貢献要因、阻害要因の分析、上位目標の達成見込みを検証する。
- ③ 上記を踏まえて、評価5項目（妥当性、有効性、効率性、インパクト及び持続性）の観点から総合的に評価する。
- ④ プロジェクト終了までに行うべきこと、並びにプロジェクト終了後に先方政府が行うべきことについて提言をする。
- ⑤ 類似プロジェクトのための教訓抽出

## 1-2 調査団の構成と調査日程

### (1) 調査団構成

#### <日本側>

	担 当	氏 名	所 属
JICA	統 括	永代 成日出	JICA 国際協力専門員
	評価分析	道順 勲	中央開発株式会社海外事業部
	協力企画	安達 巧	JICA 農村開発部農業・農村開発第一グループ 第二チーム企画役

JST	科学技術計画・評価	浅沼 修一	JST SATREPS 生物資源分野研究主幹（国立大学法人名古屋大学教授）
	科学技術計画・評価	佐藤 雅之	JST 国際科学技術部地球規模課題協力グループ 上席主任調査員

<ブラジル側>

リーダー	Dr. Hugo Bruno Correa Molinari	Senior scientist, Embrapa Agroenergy
委員	Dr. Sergio Luiz Gonçalves	Senior scientist, Embrapa Soybean

(1) 調査日程

2014年10月19日～11月10日（うち、JICA 団員は2014年10月26日～11月10日）

1-3 対象プロジェクトの概要

(1) プロジェクトサイト

ブラジルパラナ州ロンドリーナ

(2) 協力期間

2010年3月4日～2015年3月3日（5年間）

(3) 相手国機関名

ブラジル農牧研究公社 ダイズ研究所（Embrapa Soybean）

(4) 日本側協力機関名

独立行政法人国際農林水産業研究センター（JIRCAS）（\*代表研究機関）

国立大学法人東京大学

独立行政法人理化学研究所（RIKEN）

(5) 上位目標

環境ストレスに適応したダイズが開発され、ブラジルのダイズ生産の安定化に資する。

(6) プロジェクト目標

環境ストレス耐性ダイズの作出技術が開発される。

(7) 成果

1. 環境ストレスに対する耐性獲得に関与する有用遺伝子が同定される。
2. ストレス応答性プロモーターの単離と有用遺伝子との組み合わせの最適化が行われる。
3. プロモーターと有用遺伝子の組み合わせが導入されたダイズ系統が得られる。
4. 環境ストレス耐性を示す組み換えダイズ系統が選抜される。

## 第2章 評価の方法

### 2-1 評価設問と必要なデータ・評価指標

本プロジェクトに関する各種資料（詳細計画調査報告書、中間レビュー調査報告書、月報、事前資料など）、PDM Version 2などを参考にしつつ、5項目評価や実施プロセスに関する評価設問と必要なデータ等を設定した。評価設問等については、付属資料5（評価グリッド）を参照のこと。

### 2-2 データ収集方法

情報・データ収集は以下の方法により実施した。

表2-1 情報・データ収集の方法

情報・データ 収集方法	目的	主な情報源
①文献調査	プロジェクトに関連する政策、プロジェクトの実績に関連する資料	ブラジルの多年度計画 2012-2015（計画・予算・運営省） 成長加速プログラム 2（PAC2：2011-2014） 農務省の多年度計画 2012-2015（Plano Plurianual 2012 - 2015） 国別データブック 2016（外務省） 対ブラジル 国別援助方針 2012年12月（外務省） 詳細計画策定調査報告書（JICA、2009年10月） 中間レビュー調査報告書（JICA、2013年2月） 実施報告書（2009年度から2013年度まで） プロジェクトの投入・活動・実績等に関する事前資料 プロジェクトに関する進捗報告書（月報及び半期報告書等）
②インタビュー	プロジェクトの実績・進捗状況及び実施プロセスに関するヒアリング・確認	日本人専門家・研究者 Embrapa ダイズ研究所 所長及び研究者/テクニシャン等 Embrapa 本部 業務部コーディネーターや国際調整部等のスタッフ
③質問票	プロジェクトの実績、成果等の達成状況、効率性、インパクト、持続性等に関する事項の把握	Embrapa ダイズ研究所のカウンターパート（研究者、テクニシャン、ポスドク等）

### 2-3 データ分析方法

プロジェクトの投入・活動・実績に関する事前資料や月報等の進捗報告書、日本人研究者に対するインタビュー結果（国内）、Embrapa ダイズ研究所のカウンターパートからの質問票回答及び

インタビュー結果、その他関連資料を用いて、プロジェクトの投入実績、成果やプロジェクト目標の達成状況、実施プロセスに関するデータ・情報を取りまとめたうえで、評価を行った。

#### 2-4 評価調査の制約・限界

本プロジェクトは、遺伝子組み換え技術を用いて、主として乾燥耐性をもつダイズ系統の開発技術の確立を目的に、日本側研究機関（JIRCAS、理化学研究所、東京大学）とブラジル側研究機関（Embrapa ダイズ研究所）が役割分担しつつ研究を進めるものであり、地球規模課題解決のために日本とブラジルの研究者が共同で行う5年間の研究プログラム（SATREPS）の枠組みで実施されている。研究テーマは、遺伝子組み換え技術という最先端分野のものであるが、日本側及びブラジル側双方の研究者の真摯な取り組み結果として、設定された指標をすべて達成し、非常に大きな成果が出ている。終了時評価においては、特に大きな制約や限界はなかった。

## 第3章 プロジェクトの実績

### 3-1 投入実績

#### 3-1-1 日本側投入

##### (1) プロジェクト活動に参加した日本側研究者

本プロジェクトの研究活動に参加した JIRCAS、理化学研究所、東京大学（以下、「東大」と記す）の研究者は、延べ 33 名である。研究機関別では、JIRCAS が 10 名、理化学研究所が 5 名、東大が 18 名（大学院の学生を含む）である。詳細については、付属資料 3. ミニッツの Annex 3 を参照のこと。

##### (2) 日本人専門家及び日本人研究者のブラジルへの派遣

長期専門家（業務調整専門家）が 1 名派遣され、また、短期派遣として、13 名の研究者がブラジルに派遣された。担当分野は、植物分子生物学及び分子育種技術（アグロバクテリウム法）である。研究機関別では、JIRCAS が 8 名、理化学研究所が 2 名、東大が 3 名である。詳細については、付属資料 3. ミニッツの Annex 4 を参照のこと。

##### (3) ブラジル人研究者の本邦研修

延べ 13 名のブラジル側研究者が本邦研修を受講した。研修先は、JIRCAS で 11 回、東大で 1 回、理化学研究所で 1 回である。研修分野は、以下のとおりである。詳細については、付属資料 3. ミニッツの Annex 5 を参照のこと。

- ・ 「ダイズのストレス誘導性遺伝子の発現<sup>1</sup>解析技術」
- ・ 「ダイズの耐乾性遺伝子のプロモーター<sup>2</sup>の分離技術」
- ・ 「アグロバクテリウム法<sup>3</sup>を用いた形質転換<sup>4</sup>と遺伝子発現解析技術」
- ・ 「ダイズの耐乾性評価の生理実験と遺伝子発現解析技術の習得」
- ・ 「形質転換ダイズにおける遺伝子発現解析技術に関する研修」
- ・ 「ダイズの自動灌水装置を用いた乾燥ストレス処理時の応答にかかわる生理生化学的特性の解析技術や耐乾性の付与にかかわる遺伝子発現及び機能解析技術の習得」
- ・ 「次世代シーケンサーを用いた植物の乾燥ストレス応答性遺伝子の発現解析技術の習得」

##### (4) 機材供与

###### 1) Embrapa ダイズ研究所への機材供与

JICA は、車輛、事務用機器（コンピュータ、プリンターなど）、研究活動用各種機器を供与した。機材購入額は、94 万リアル及び 3,892 万円であった（参考：ドル換算値で

<sup>1</sup> 遺伝子もっている遺伝情報に基づいてタンパク質が合成されることで、さまざまな生体機能を現すこと。

<sup>2</sup> 遺伝子が発現するための役割をもつ遺伝子の上流 DNA 領域のこと。

<sup>3</sup> 土壌細菌のアグロバクテリウムを利用した遺伝子導入方法。アグロバクテリウムは細菌自身もつプラスミド（核外にある環状 DNA）の一部を植物細胞に入れ、その細胞の DNA を組み換える働きをもつ。この性質を利用して、改良したい植物に目的遺伝子を組み込み、遺伝子が導入できる。

<sup>4</sup> 外部から与えられた DNA が遺伝情報として組み込まれ、個体あるいは細胞の遺伝形質が変化すること。突然変異とは異なり、与えられた遺伝情報に従って変化が決まった方向へ進む。



約 74 万 4,000 ドル)。詳細については付属資料 3. ミニッツの Annex 6 を参照のこと。

2) 日本側研究機関への機材供与

研究活動のための各種機器が JIRCAS、理化学研究所、東大のために調達された。調達された機器の購入額は、合計 1,790 万円である（参考：ドル換算値で約 16 万 6,000 ドル）。詳細については、付属資料 3.ミニッツの Annex 7 参照のこと。

(5) 日本側負担現地活動費

日本側がブラジル現地での活動経費として支出した金額は、2014 年 8 月時点で、116 万 7,000 レアル（参考：ドル換算値で約 47 万 6,000 ドル）である。詳細については付属資料 3.ミニッツの Annex 6 を参照のこと。

3-1-2 ブラジル側投入

(1) プロジェクト活動に参加したブラジル側研究者

プロジェクト活動に参加した研究者/テクニシャン等は延べ合計 35 名である。その大半は、Embrapa ダイズ研究所の研究者で、一部、大学の学部学生、大学院学生や JICA が雇用したテクニシャン（プロジェクト開始から約 2 年半雇用）が含まれる。終了時レビュー時点では、17 名の Embrapa ダイズ研究所の研究者/テクニシャン等と 5 名の大学院学生がプロジェクト活動に従事している。詳細については付属資料 3.ミニッツの Annex 9 を参照のこと。

(2) ブラジル側の機材調達

ブラジル側は、研究活動のために各種の機器類を調達し、Embrapa ダイズ研究所の敷地内にある新バイオテクノロジー実験棟、旧バイオテクノロジー実験棟、生態生理実験室、化学分析実験室、試験圃場などに設置された。機器類調達費用は、288 万 5,000 レアルである（参考：ドル換算値で約 120 万ドル）。詳細については付属資料 3.ミニッツの Annex 10 を参照のこと。

(3) 施設の提供

Embrapa ダイズ研究所が、プロジェクト活動のために提供している施設は、次のとおりである。詳細については、付属資料 3.ミニッツの Annex 11 参照のこと。なお、中間レビュー時に比較して、本プロジェクトで利用している施設の範囲は拡大している。

- ① 日本人専門家及び日本人研究者の執務室：1 部屋、40m<sup>2</sup>
- ② 既存のバイオテクノロジー実験棟：424m<sup>2</sup>
- ③ 新規のバイオテクノロジー実験棟（新規にブラジル側が建設）：581m<sup>2</sup>
- ④ 生態生理学実験室：120m<sup>2</sup>
- ⑤ 化学分析実験室：100m<sup>2</sup>
- ⑥ Embrapa ダイズ研究所の温室：1,181m<sup>2</sup>
- ⑦ JICA 費用で建設した温室用の用地提供：314m<sup>2</sup>

- ⑧ 遺伝子組み換え (GMO<sup>5</sup>) 種子の保管庫 : 160m<sup>2</sup>
- ⑨ GMO ダイズ用の温室 : 237m<sup>2</sup>
- ⑩ 圃場試験用地 : 2 万 8,300m<sup>2</sup>
- ⑪ レインアウト・シェルター (ダイズに雨が掛からないよう特定の場所を保護する装置で、乾燥ストレスを制御しつつ試験を行うためのもの) : 6 台 (1 台当たり 3 万 3,000 レアル、計 19 万 8,000 レアル。約 8 万ドルに相当する)

#### (4) ブラジル側負担活動経費

ブラジル側は、本プロジェクトの活動に参加した学部学生、大学院学生及びポストクの奨学金、光熱費、インターネット、JICA 公用車が使えないときの Embrapa ダイズ研究所の公用車と運転手の経費等を負担した。支給された奨学金の総額は、146 万レアル (参考 : ドル換算値で 59 万 6,000 ドル) である。支給された奨学金に関する詳細データについては付属資料 3. ミニッツの Annex 12 を参照のこと。

このほか、Embrapa ダイズ研究所では、その他の作物 (ワタ、ユーカリ、サトウキビ、インゲン豆など) に関する DREB ワークショップが開催された (2011 年と 2012 年)。これらワークショップ開催費用として、4 万レアル (参考 : ドル換算値で約 1 万 6,000 ドル) が計上された。Embrapa のダイズ、ワタ、ユーカリ、サトウキビ、インゲン豆の DREB 遺伝子 (Dehydration Responsive Element Binding gene : DREB) プロジェクト総予算は、4 年間で 450 万レアルである (参考 : ドル換算値で約 180 万ドル)。

### 3-2 アウトプット (成果) の達成状況<sup>6</sup>

3-2-1 成果 1 : 環境ストレスに対する耐性獲得に関与する有用遺伝子が同定される。

成果 1 に関する 3 つの指標、すなわち、①ストレス耐性制御遺伝子の同定、②ストレス受容に関与する膜タンパク質遺伝子の同定、③ストレス応答制御遺伝子の同定、に関する指標すべてが、目標値を達成した。したがって、成果 1 の達成度は非常に満足できるものであるといえる。

指標 1-1 : ダイズ等のストレス耐性制御遺伝子が 5 種類以上同定される。

JIRCAS が、7 種類のストレス耐性制御遺伝子を同定した。同定した遺伝子の名称は、*AtDREB1A*、*AtDREB2A*、*AtAREB1*、*GmAREB1*、*GmAREB2*、*GmAREB3*、*GmAREB4* である。数値目標は達成された。

指標 1-2 : ダイズ等のストレス受容に関与する膜タンパク質遺伝子が 2 種類以上同定される。

東大が、2 種類のストレス受容に関与する膜タンパク質遺伝子 (*GmHK1A;1* 及び *GmHK1B;1*) を同定した。数値目標は達成された。

<sup>5</sup> Genetically Modified Organism : 遺伝子組み換え作物

<sup>6</sup> 論文等の形で研究成果を発表する前に、重要な研究成果が外部に漏れることを避けるため、遺伝子やプロモーターの名称については、実際の名称でなく、仮のコード名を用いている場合がある。

指標 1-3：ダイズ等のストレス応答制御遺伝子が3種類以上同定される。

理化学研究所が、2種類のストレス応答制御遺伝子（*GmNCED3A* 及び *GmNCED3B*）を、また、東大が1種類のストレス応答制御遺伝子（*GmDREB2A;2*）を同定した（計3種類）。数値目標は達成された。

3-2-2 成果2：ストレス応答性プロモーター<sup>7</sup>の単離と有用遺伝子との組み合わせの最適化が行われる。

成果2に関する3つの指標、すなわち、①ストレス応答性遺伝子の同定、②ストレス応答性プロモーターの同定、③プロモーターと有用遺伝子の組み合わせの最適化、に関する指標すべてが、目標値を達成した。したがって、成果2の達成度は非常に満足できるものであるといえる。

指標 2-1：ダイズのストレス応答性遺伝子が少なくとも100種類同定される。

JIRCAS が、100種類以上のストレス応答遺伝子を同定した（マイクロアレイ分析<sup>8</sup>の結果、ダイズから4,433種類の乾燥応答性遺伝子と3,371種類の高温応答遺伝子が同定された）。数値目標は達成された。

指標 2-2：ダイズのストレス応答性プロモーターが少なくとも3種類同定される。

JIRCAS が、ダイズから5種類のストレス応答性プロモーター（Gm2、Gm3、Gm4、Gm5、Gm11）を同定した。数値目標は達成された。さらに、JIRCAS は、同定されたプロモーターを比較・解析し、最も有用なプロモーターとし Gm3 プロモーターを選定した。このように数値目標は達成された。

指標 2-3：少なくとも5種類のプロモーターと有用遺伝子の組み合わせの最適化が試みられる。

JIRCAS は、9種類のコンストラクト（J1、J2、J3、J4、J5、J6、J7、J8 及び J9）の最適化を実施した。理化学研究所は、2種類のコンストラクト（R1 及び R2）の最適化を実施した。東大は、6種類のコンストラクト（T1、T2、T3、T4、T5 及び T6）の最適化を実施した。ただし、1つのコンストラクト（T6）については、日本側で最適化が実施されたが、ブラジル側との材料移転契約（MTA）が済んでいないため、ブラジル側へ送付されていない。なお、数値目標は達成された。

3-2-3 成果3：プロモーターと有用遺伝子の組み合わせが導入されたダイズ系統が得られる。

成果3に関する3つの指標、すなわち、①遺伝子組み換え技術の確立、②プロモーターと有用遺伝子の組み合わせのダイズへの導入、③T1 世代種子が増殖、に関する指標すべてが、目標

<sup>7</sup> 遺伝子が機能を発現するための駆動装置となる役割をもつ DNA 領域のこと。

<sup>8</sup> 網羅的遺伝子発現解析手法のひとつで、どういった機能をもつ遺伝子が発現しているかを明らかにするために用いる分析手法である。

値を達成した。したがって、成果3の達成度は非常に満足できるものであるといえる。

指標 3-1：ダイズへの形質転換効率が1.5%以上の遺伝子組み換え技術が確立される。

本プロジェクトでは、遺伝子組み換え技術として2種類の方法、すなわち、パーティクルガン法<sup>9</sup>とアグロバクテリウム法が用いられてきた。Embrapa が特許をもつパーティクルガン法を用いた DREB 遺伝子導入ダイズの作出はかなり進んでおり、圃場試験を行うまでに至った。一方、遺伝子導入のもうひとつの方法であるアグロバクテリウム法については、JIRCAS の形質転換担当研究員が遺伝子導入効率を上げるための研究を実施してきた。2012年1月からは、Embrapa ダイズ研究所の研究者（シルバーナ研究者）が日本から導入した *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 及び GV3101 を用いた形質転換を開始した。また、LB4404 を用いた形質転換も試みたが、依然として転換効率が悪かった。

これらは、中間レビュー実施までの状況であり、中間レビュー調査団から、形質転換効率を大幅に向上させるべきとの指摘を受けた。中間レビュー実施後には、形質転換担当研究員らが転換効率を上げるため、プロトコルの改良、すなわち、形質転換材料を入れる場所をダイズ胚からダイズ子葉に変える、用いるダイズの品種を変えるなどの工夫を行った結果、転換効率は、1.74%に向上した（数値目標を達成した）。この数値は、文献や論文で報告されている転換効率である 0.51%～1.03%より高い数値である。目標値である 1.5%を超えただけでなく、アグロバクテリウム法で形質転換されたダイズの1系統に害虫抵抗性がみられるという試験結果は注目に値するものである。なお、Embrapa ダイズ研究所では、環境ストレス耐性ダイズの今後の商品化を考慮に入れ、パーティクルガン法による形質転換を2013年10月にやめ<sup>10</sup>、アグロバクテリウム法による形質転換に専念することになった。

指標 3-2：プロモーターと有用遺伝子の組み合わせが少なくとも5種類ダイズに導入される。

7種類のプロモーターと有用遺伝子の組み合わせ（コンストラクト）（コンストラクト名：J1、J2、J3、J4、J5、J6 及び J7）がパーティクルガン法でダイズに導入され、3種類のコンストラクト（コンストラクト名：J5、R1 及び R2）がアグロバクテリウム法でダイズに導入された。さらに5種類のコンストラクト（コンストラクト名：J9、T2、T3、T4 及び T5）が、アグロバクテリウム法を用いてダイズに導入中である。よって、数値指標は達成された。

指標 3-3：少なくとも3系統の T1 世代種子が増殖される。

パーティクルガン法によって形質転換された6種類のコンストラクト（計29系統）とアグロバクテリウム法で形質転換された3種類のコンストラクト（計7系統）が、T1世代で、ポジティブな（遺伝子が次世代に引き継がれた）系統であることが確認された。このうち5種類のコンストラクト（J1、J2、J5、J6 及び R1）については、遺伝子導入された系統数が3以上である。したがって、数値指標は達成された。

<sup>9</sup> 金やタングステンなどの金属の微粒子に DNA をコーティングしたものを弾丸として、高速で射出して細胞内に DNA を導入する方法。

<sup>10</sup> パーティクルガン法による形質転換では、目的の遺伝子が断片化したり、過剰に多くの遺伝子が導入されたりしやすくなり、目的遺伝子の効果が発揮されなくなるという現象を起こしやすい。また、どこに遺伝子が入り込むかわからないため、形質転換後の育種作業が大変になる。

3-2-4 成果4：環境ストレス耐性を示す組み換えダイズ系統が選抜される。

成果4に関する6つの指標、すなわち、①乾燥応答性遺伝子をもつダイズ系統の選抜、②高温応答性遺伝子をもつダイズ系統の選抜、③ダイズ系統の遺伝子発現が解析、④温室、圃場でのダイズのストレス耐性試験手法の確立、⑤温室でのダイズのストレス耐性評価、⑥圃場でのダイズのストレス耐性評価、に関する指標すべてが、目標値を達成した。したがって、成果4の達成度は非常に満足できるものであるといえる。

指標 4-1：乾燥応答性遺伝子を少なくとも2種類同定され、遺伝子解析が行われ、組み換えダイズが少なくとも2系統選抜される。

ダイズにおいて4,433種類の乾燥応答性遺伝子が同定された。遺伝子解析に基づくSAT1及びSAT3等の組み換えダイズの系統の選抜が実施された。すなわち、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の乾燥応答性遺伝子であるSAT1を利用したコンストラクトSAT1を導入したダイズについて、遺伝子発現解析から1a系統、1b系統が選抜された。さらに、シロイヌナズナの乾燥応答性遺伝子であるSAT3遺伝子を利用したコンストラクトSAT3を導入したダイズについて、遺伝子発現解析から3a系統、3b系統及び3c系統が選抜された。したがって、数値目標は達成された。

指標 4-2：高温応答性遺伝子を少なくとも2種類同定され、遺伝子解析が行われ、組み換えダイズが少なくとも2系統選抜される。

ダイズにおいて3,317種類の高温応答性遺伝子が同定された。遺伝子解析に基づくSAT2組み換えダイズの系統の選抜を実施した。すなわち、シロイヌナズナの高温応答性遺伝子であるSAT2遺伝子を利用したコンストラクトSAT2を導入したダイズについて、遺伝子発現解析から2a系統及び2b系統が選抜された。したがって、数値指標は達成された。

指標 4-3：少なくとも2種類の遺伝子とプロモーターの組み合わせに由来する独立な系統から、少なくとも2系統の遺伝子発現が解析される。

SAT8コンストラクト導入ダイズ2系統(8a及び8b)とSAT4コンストラクト導入ダイズ2系統(4a及び4b)について遺伝子発現が解析された。したがって、数値指標は達成された。

指標 4-4：温室、圃場でのダイズのストレス耐性試験手法が確立する。

本プロジェクトで作出された遺伝子組み換え系統について、相対水分量、光合成、蒸散量、収量条件などのパラメーターを用いて、生態生理学的・農学的特徴を把握するため、温室並びに圃場条件における試験が実施された。例えば、ストレス耐性評価に用いられたひとつの方法は、5日間の水不足条件下で生き延び、水不足条件下でも高い光合成効率と高い相対的成長率を示し、再灌水後に葉にダメージがなかった植物体があることである。また、Embrapaダイズ研究所において、ストレス耐性のスクリーニング手法も確立された<sup>11</sup>。したがって、数値指標

<sup>11</sup> 遺伝子組み換えダイズの栽培試験において、生態生理学及び農学的な特徴、例えば、光合成、水効率、土壌水分、炭素変換効率、開花期、成熟期、草丈、根の数、種子数、収量など数多くのパラメーターを測定して、干ばつ耐性や高温耐性のストレス耐性がどの程度あるか分析し、有望な系統を選抜する手法。

は達成された。

指標 4-5：温室で2種類以上（各2ライン以上）の組み換えダイズのストレス耐性評価が行われる。

5種類のコンストラクトから作出された11種類の組み換えダイズ（系統）の分子学的・生理学的応答の評価が温室レベルで実施された。さらにプロジェクト終了までに2種類のコンストラクトから作出された5種類の組み換えダイズ系統の耐性評価を実施する予定である。数値指標は達成された。

指標 4-6：圃場で2種類以上（各2ライン以上）の組み換えダイズのストレス耐性評価が行われる。

2系統（SAT1 コンストラクトを有する1a系統とSAT2 コンストラクトを有する2a系統）の圃場試験が、2009/2010年、2010/2011年、2011/2012年、2012/2013年の4作期で継続実施された。2011/2012年及び2012/2013年の作期には、1a'系統（1a系統とその親品種との交配系統）とBR16品種を用いた圃場試験での評価が実施された。2013/2014年の作期には、これらに加えて、SAT5 コンストラクトから作出された5a系統を使用した試験が実施された。試験圃場の面積と、圃場試験に必要な十分な量の種子を準備することが困難であったため、1コンストラクトにつき、1系統の圃場試験が実施された。SAT5 遺伝子をもつ5a系統は、2013/14年作期において、非常に強い干ばつ耐性を示し、また害虫抵抗も示した（この作期には、小降雨で厳しい干ばつ状況が生じた）。既に、数値指標は達成された。

上記で、2013/14年作期の圃場試験において、1つの系統が非常に強い干ばつ耐性を示したと記載したが、具体的には、以下のような状況と結果であった。

- ① 気象状況：通常年であれば、降雨量が300mm程度ある時期に、49日間で44mmの降雨量しかなく、40℃を越す気温も記録した。
- ② 収量の差：異なる干ばつ条件の下で、遺伝子組み換えされた系統と遺伝子が組み換えされていない品種（通常品種）が栽培され、強い干ばつ耐性を示した系統と通常品種との収量比較の結果は表3-1のとおりとなった。特に、生殖成長期に干ばつ条件が生じた場合に、+44%という大きな収量差が出た。

表3-1 比較試験結果

比較試験項目	ある1つの遺伝子組み換え系統の収量が、どの程度、通常品種の収量を上回ったか (%)
天水条件で栽培	+15%
栄養成長期 (Vegetative Stage) に降雨を遮断	+35%
生殖成長期 (Reproductive Stage) に降雨を遮断	+44%

### 3-3 プロジェクト目標の達成度

プロジェクト目標：環境ストレス耐性ダイズの作出技術が開発される。

以下に説明するように、プロジェクト目標に関するすべての指標は、その数値目標を達成し、環境ストレス耐性ダイズ作出に係る遺伝子工学技術の開発は非常に満足すべきものである。したがって、プロジェクト目標の達成水準は、非常に高いといえる。

指標 1：ダイズ等の環境ストレスに対する耐性獲得に関与する有用遺伝子が少なくとも 10 種類同定される。

環境ストレス耐性に関する 12 種の有用遺伝子が、JIRCAS、理化学研究所、東大の研究者によって同定された。数値目標は達成された。表 3-2 に、上記各機関が同定した遺伝子の数量と名称を記載する。

表 3-2 同定された遺伝子の数量と名称

機関名	同定された有用遺伝子の数	遺伝子の名称
JIRCAS	7	<i>AtDREB1A, AtDREB2A, AtAREB1, GmAREB1, GmAREB2, GmAREB3, GmAREB4</i>
理化学研究所	2	<i>GmNCED3A, GmNCED3B</i>
東大	3	<i>GmDREB2A;2, GmHK1A;1, GmHK1B;1</i>
計	12	

指標 2：ダイズのストレス応答性プロモーターが少なくとも 5 種類単離され、有用遺伝子との組み合わせの最適化が行われる。

ダイズのストレス応答性プロモーターが 6 種類単離され、プロモーターと有用遺伝子の組み合わせの最適化が 17 通り行われた。数値目標は達成された。

#### ① 単離されたプロモーターの情報

- ・ シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) から単離された 1 種類のストレス応答性プロモーター (RD29A)。
- ・ ダイズから単離された 5 種類のストレス応答性プロモーター (Gm2、Gm3、Gm4、Gm5、Gm11)。

② 最適化の組み合わせ情報

表 3-3 最適化の組み合わせ

機関名	コンストラクト数	最適化の組み合わせ
JIRCAS	9	J1, J2, J3, J4, J5, J6, J7, J8, J9
理化学研究所	2	R1, R2
東大	6	T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9 *
Total	17	

\* 日本国内で最適化されたものの、MTA 未締結のため、ブラジルへは未送付。

指標 3：プロモーターと有用遺伝子の組み合わせが少なくとも 5 種類ダイズへ導入され、各組み合わせから少なくとも 3 系統の組み換え体を得る。

プロモーターと有用遺伝子の組み合わせである 7 種類のコンストラクト (J1、J2、J3、J4、J5、J6 及び J7) がパーティクルガン法でダイズに導入され、3 種類のコンストラクト (J5、R1 及び R2) がアグロバクテリウム法でダイズに導入された。これらについては、T0 世代<sup>12</sup>で、導入遺伝子のゲノムへの挿入が確認された。パーティクルガン法によって形質転換された 6 種類のコンストラクト (計 29 系統) とアグロバクテリウム法で形質転換された 3 種類のコンストラクト (計 7 系統) が、T1 世代で、ポジティブな系統であることが確認された。5 種類のコンストラクト (J1、J2、J5、J6 及び R1) については、遺伝子導入された系統数が 3 以上である。したがって、数値指標は達成された。なお、さらに 5 種類のコンストラクト (J9、T2、T3、T4 及び T5) についてアグロバクテリウム法でダイズに導入中である。

指標 4：少なくとも 1 種類の環境ストレス耐性系統が選抜される。

T1 世代への遺伝子導入と形質転換イベント<sup>13</sup>における遺伝子の発現状況を考慮し、プロジェクト開始初期にパーティクルガン法により作られた 1a (SAT1 コンストラクト) と 2a (SAT2 コンストラクト) の系統を用いて、温室、圃場での試験並びに交配が実施された。その結果、1a 系統が乾燥耐性の特徴を有することが確認された。さらに、本プロジェクトで形質転換効率向上が図られたアグロバクテリウム法によって作出された 5a (SAT5 コンストラクト) 系統を用いて、温室及び圃場での試験が実施された。その結果、5a 系統が非常に強い干ばつ耐性を有すること、それに加えて、害虫抵抗性という優れた特性も兼ね備えることが示された。さらに、生育期あるいは生殖成長期に干ばつ状況が発生した場合、BR16 品種のダイズと比較して、収量が高くなることも判明した。さらにまた、この系統は、除草剤 (グルホシネート) 耐性遺伝子 (*bar* 遺伝子) を含むので、新品種開発が容易である。なお通常、*bar* 遺伝子は形質転換工程における選抜マーカーとして用いられる。以上から、数値指標の達成のみならず、ブラジルで近年問題となっている害虫に対する抵抗性をもつという重要な特性も示された。ただし、今後、安全性についての確認試験が必要である。

<sup>12</sup> T0 世代は、遺伝子が導入された世代。T1 世代は、T0 世代の作物から取れた種子から生育した世代。

<sup>13</sup> イベントとは、「transformation event」のことであり、EU (EU のトレーサビリティに関する規則の提案書における定義) においては、次の定義がなされている。「形質転換イベントとは、改変された DNA 配列の移入を通じて 1 つの従来の生物が形質転換される事象であり、その結果として 1 つの GMO が作出される」



その他の成果 1：開発あるいは確立された主な遺伝子工学技術や成果

研究機関ごとの主な開発・確立技術や成果を表 3-4 に示す。

表 3-4 研究機関ごとの主な開発技術と成果

機関名	主な開発技術及び成果
JIRCAS	<ul style="list-style-type: none"> <li>① 有用遺伝子とプロモーターの組み合わせであるコンストラクトを複数最適化し、最適化されたコンストラクトを Embrapa ダイズ研究所に提供したこと。</li> <li>② マイクロアレイを用いたダイズにおける網羅的遺伝子発現解析技術が確立されたこと。</li> <li>③ 環境ストレス耐性を制御する転写因子の機能が解析され、ストレス耐性誘導性プロモーターが同定されたこと。</li> <li>④ JIRCAS が Embrapa ダイズ研究所にアグロバクテリウム法を導入し、アグロバクテリウム法にかかわる技術を Embrapa のテクニシャンに移転した。そして、Embrapa ダイズ研究所と共同して、形質転換効率の向上を図り、アグロバクテリウム法に関するプロトコール（実施方法）を作成したこと。</li> <li>⑤ Embrapa ダイズ研究所で遺伝子組み換えされたダイズを日本国内で分析し、ダイズに組み入れられた遺伝子が機能していることを確認したこと。</li> </ul>
理化学研究所	<ul style="list-style-type: none"> <li>① 有用遺伝子とプロモーターの組み合わせであるコンストラクトを複数最適化し、最適化されたコンストラクトを Embrapa ダイズ研究所に提供したこと。</li> <li>② ダイズの ABA (アブシジン酸<sup>14</sup>) 合成酵素 GmNCED の発現及び機能を解析したこと。</li> <li>③ 干ばつストレス環境下におけるダイズの遺伝子発現と代謝の特徴を、統合的代謝・因子解析手法を用いて明らかにしたこと。</li> </ul>
東大	<ul style="list-style-type: none"> <li>① 有用遺伝子とプロモーターの組み合わせであるコンストラクトを複数最適化し、最適化されたコンストラクトを Embrapa ダイズ研究所に提供したこと。</li> <li>② ダイズのコシヒキナーゼ GmHK (環境ストレス受容に関連する) の機能と Gm DREB2 などの転写因子 (環境ストレス耐性を制御する) を同定したこと。</li> </ul>
Embrapa ダイズ研究所	<ul style="list-style-type: none"> <li>① Embrapa ダイズ研究所において JIRCAS と共同で、アグロバクテリウム法による形質転換効率が 1.7%<sup>15</sup>に向上し、アグロバクテリウム法によるダイズの形質転換技術が確立されたこと。この手法を用いることができる能力を有するテクニシャンが複数存在すること。</li> </ul>

<sup>14</sup> 乾燥など環境ストレスに耐性を付与する生理活性をもった植物ホルモン。葉の脱離を誘導したり、気孔を閉鎖させたり、乾燥耐性を付与するタンパク質を誘導したりする。

<sup>15</sup> 172 個のダイズの子葉軸にアグロバクテリウムを感染させて遺伝子導入を図ったところ、T0 世代 3 系統で遺伝子導入が確認された。3/172=1.74%。用いたダイズの品種は、BRS184 で、マーカー遺伝子である GUS 遺伝子を用いて形質転換した際の実績。

	<p>② 温室及び圃場におけるダイズの環境ストレス耐性評価手法が確立されたこと。</p> <p>③ 4種類のコンストラクトから作出された遺伝子組み換えダイズについては、温室試験の結果、干ばつ耐性の特徴をもつことが確認されたこと。</p> <p>④ 2013/2014 作期における圃場試験の結果、1つの系統が干ばつ条件下であっても高い収量を示すとともに、害虫抵抗性も示した。</p> <p>なお、遺伝子組み換えダイズの干ばつ耐性が圃場レベル試験で確認されたのは、世界で初めてのことである。</p>
--	--

#### その他の成果2：論文及び特許申請

作成された論文数や発表数は、以下のとおりである。なお、論文等のタイトルと著者名については、付属資料3.ミニッツの Annex 13 を参照のこと。

##### ① 論文等の数

表 3-5 作成された論文等の数

原著論文数	計 67 件の原著論文（内訳は、21 件がブラジル人研究者、また、41 件が日本人研究者によるもので、ブラジル人研究者と日本人研究者との共著が 5 件）
その他の著作物 （総説及び書籍等）	計 46 件（内訳は、ブラジル人研究者によるもの 5 件、日本人研究者によるもの 38 件、ブラジル人研究者と日本人研究者との共著が 3 件）

##### ② 特許申請について

以下の特許申請が日本、ブラジル、米国、中国で行われた。

- ・ 「向上した環境ストレスに対する耐性を示す植物体及びその製造方法」、篠崎和子、佐藤輝、東京大学、2013 年 1 月 22 日、PCT/JP2013/051210、PCT 出願（日本、ブラジル、米国、中国）

### 3-4 実施プロセスにおける特記事項

#### (1) 材料移転契約（Material Transfer Agreement：MTA）について

日本側研究機関が作製したコンストラクトを、Embrapa ダイズ研究所に送る場合、また、Embrapa ダイズ研究所がダイズ種子（遺伝子組み換えダイズ）を日本側研究機関に送る場合、Embrapa ダイズ研究所と日本の当該研究所間で、毎回、材料移転契約（MTA）を結ぶことが必要となる。プロジェクト開始当初は 1 年～2 年程度の期間を要し、最近でも半年から 1 年程度要している。MTA 締結に時間を要したことが、プロジェクト活動の進捗に大きな影響を与えたことはないが、MTA 締結に関する日本側研究機関と Embrapa 間のやり取り調整や Embrapa 内の手続き進捗状況モニタリングに手間を要するという状況が続いた。

MTA 文書については、単にコンストラクト名が異なるだけであっても、全文について再度、公証翻訳（公証翻訳人による英語からポルトガル語への翻訳）が必要となるという面倒さが

あった。

(2) JICA 費用で設置した温室の冷房設備の不調について

温室に取り付けた冷房設備<sup>16</sup>が正常に稼働せず、適切な温度調節ができない時期があった。販売会社に対して修理・調整を依頼し、温度調節ができるようになるまで時間を要した。既存の温室内で行っているポット試験（根の生育範囲が狭いポット内に限定される）と異なり、この温室では、実際の土壌に播種して栽培試験を行うので、より実際の圃場に近い条件で試験が実施できるという利点があり、的確に干ばつ状況をつくり出すうえで冷房設備は有用な設備である。冷房設備の不調が、プロジェクト活動に大きな支障をもたらすということはないが、冷房設備がより適切に稼働していれば、よりの確な試験が実施できたであろうと考えられる。

(3) 研究活動に必要な試薬の購入について

試薬の種類によっては、ブラジル側の規定に沿って、Embrapa ダイズ研究所所長の公式文書を販売会社に提出することが必要になる場合がある。また、試薬の多くは外国製であり、発注から手元に届くまでに時間を要することもあった（事例としては、抗生物質を米国から輸入する際に4カ月要したことがある）。

---

<sup>16</sup> この温室は4室に分かれ、そのうち、2室分の冷房設備を日本側費用で設置した。

## 第4章 評価結果

### 4-1 妥当性

本プロジェクトの妥当性は高い。

#### (1) 地球規模における気候変動への対応の必要性

急激な人口増加と世界的な工業化による温室効果ガスの増加に伴って、地球の温暖化が進んでいるとされ、地球規模での問題となっている。世界各地で、干ばつ、集中豪雨、大型の台風やハリケーンの多発といった異常気象による災害が頻繁に発生している。地球温暖化に伴い、世界各地で頻繁に干ばつ被害が報告されるとともに、作物耕作地での乾燥が進み、干ばつによる作物の収量低下が生じ、食料や家畜飼料などの生産にとって大きな問題となっている。

国際連合食糧農業機関（Food and Agriculture Organization of the United Nations : FAO）の報告書（2015～2030年に向けての世界農業予測）では、気候変動、特に気温上昇、降雨の年間分布の変化、降水量減少、土壌水分低下が取り上げられている。この報告書では、対策として、干ばつに強い品種、高温耐性品種、耐塩性品種の開発の必要性を強調している。

なお、従来の育種方法を用いて、干ばつに強い系統の選抜と育種への利用が試みられているが、多くの時間を要し、あまり目覚ましい成果は上げられていないのが現状である。近年急激に作物のゲノム研究が進展しており、干ばつに強い作物開発のためには、これらの成果を利用した分子育種技術に期待がかけられている。そのため、ゲノム研究の成果を利用し作物の乾燥耐性にかかわる遺伝子を明らかにして、それらの遺伝子を利用した遺伝子組み換え技術を開発することが求められている。

#### (2) ブラジルにおける耐乾性・耐暑性のダイズ品種開発の必要性

ブラジルでは、ダイズの商業栽培が南部地域で1960年代に始まり、ブラジルは現在、世界で最もダイズ生産が多い国のひとつになり（米国と同水準のダイズ生産量<sup>17</sup>がある）、世界の生産量の約1/3を占め、ダイズ供給面で国際的に重要な地位にある。ブラジルでは、ダイズ生産地域の拡大によって、降雨が不安定であるブラジル中西部でも栽培が行われるようになり、頻発する干ばつと水資源の枯渇がダイズ生産に大きな影響<sup>18</sup>をもたらしている（近年では、2011/12作期及び2013/14作期に干ばつによる大きな被害が発生した）。このような状況下、干ばつに強いダイズの育種が重要な研究開発テーマのひとつとなっており、遺伝子組み換え技術を用いて干ばつに強いダイズを作出する研究は喫緊の課題である。

このように、耐乾性・耐暑性のダイズ品種開発の必要性は、ブラジルにおいて非常に重要であるだけでなく、地球規模の気候変動への対応策のひとつとして、また、食糧の安定供給に貢献する方策として重要であり、対象地域や地球社会のニーズに合致しているといえる。

<sup>17</sup> 米国農務省データ（2014年11月）によると、2013/14年のダイズ生産量（推計値）は、米国が9,130万t、ブラジルが8,670万tで、世界のダイズ生産量のそれぞれ32.1%、30.4%を占める。

<sup>18</sup> Embrapaダイズ研究所作成プレゼン資料によると、2003/04年～2012/13年の10年間の干ばつによるダイズ生産量の減少は、466億ドル（約5兆円）に相当するとしている。

(3) ターゲット・グループ（Embrapa ダイズ研究所）のニーズとの整合性

Embrapa ダイズ研究所は、1996 年から遺伝子組み換えダイズの研究を始め、除草剤耐性遺伝子の組み換えダイズの開発に成功した経験を有する。Embrapa ダイズ研究所と JIRCAS 間で、1995 年に共同研究合意書が締結され、「農牧輪換」や「南米ダイズ」プロジェクトを通じて研究協力が行われてきた。2003 年からは、遺伝子組み換え技術を利用して、干ばつあるいは高温耐性ダイズを作出することを目的に共同研究が実施されてきた。このように、ブラジルでダイズへの遺伝子導入技術の開発が進んできており、乾燥耐性を付与するために利用できる遺伝子を求めていた。しかし、ブラジルにおいては、分子生物学的研究や遺伝子研究が始まったばかりであり、わが国との協力でこれらの研究を発展させることが望まれていた。具体的には、農家圃場で利用可能な乾燥耐性の遺伝子組み換えダイズの開発を成功させたいと強く期待していた。

このように、Embrapa ダイズ研究所は遺伝子組み換えダイズ開発において研究実績をもつものの、乾燥耐性ダイズの開発は緊急の研究課題であったことから、ターゲット・グループのニーズに合致したプロジェクトであるといえる。

(4) ブラジルの国家開発政策等との整合性

ブラジル政府の「多年度計画 2012-2015 年」によると、農業セクターは、ブラジルの経済と社会にとって非常に重要であるとしている。ブラジルにおいて農業は、国内市場への産品供給と雇用及び収入を創出している。さらに余剰生産物が輸出され、外貨獲得に大きく貢献している。また、この多年度計画では農業セクターの主要課題について指摘しており、そのひとつが気候変動による影響を緩和することである。

農務省の「農業牧畜計画 2012/2013」では、Embrapa の役割のひとつは、地球温暖化による農業生産への影響を緩和することに貢献することであるとしている。言い換えると、Embrapa ダイズ研究所は、食料安全保障及び再生可能エネルギーのために有用な作物を提供するための農業研究において貢献することが求められている。気候変動対応を含む農業牧畜分野のための研究開発・革新が重要視されている。

本プロジェクトは、干ばつ耐性ダイズ品種育成のための技術開発を目的とするものであり、ブラジル政府の開発政策との整合性があるといえる。

(5) 日本の援助方針との整合性

わが国の対ブラジル支援の基本方針は、ブラジル政府が掲げる「成長加速化プログラム」を踏まえ、急速な都市化がもたらす弊害を緩和し、天然・食料資源の安定的供給に資する分野への支援を行っていくことである。事業展開計画において本プロジェクトは、気候変動対策プログラムの中のプロジェクトとして位置づけられている。気候変動対策支援は、対ブラジルのみならず、わが国の国際協力における重点事項のひとつに含まれている。本プロジェクトで開発された干ばつ耐性ダイズの作出技術は、将来的に、ダイズの安定的生産に貢献することが期待されるものであり、さらに、開発された技術を他の作物にも適用することを通じて、ブラジルの食糧資源の安定的供給に資することが期待される。本プロジェクトの目的は、ブラジルにおいて環境ストレスに適応した安定的ダイズ生産に貢献することであり、したがって、本プロジェクトは、わが国の援助方針と合致しているといえる。

## 4-2 有効性

本プロジェクトの有効性は高い。

既に述べたように、本プロジェクトを通じて、環境ストレス耐性ダイズの作出のための複数の遺伝子工学技術が開発された。その遺伝子工学技術のなかでも重要な技術のひとつは、アグロバクテリウム法である。アグロバクテリウム法による転換効率については、中間レビュー時点ではまだ低かったものの、形質転換に係るプロトコル（実験方法）を改善したあとは、形質転換効率が向上し、目標値を上回った。アグロバクテリウム法で形質転換されたダイズのひとつの系統については、温室試験と圃場試験を経て、非常に強い干ばつ耐性があること並びに一部害虫抵抗性ももつことが示された。この系統を用いた圃場試験は、2013/14 作期のわずか1作期に実施されたものであることから、これらの特性を確認するため圃場試験を継続する必要がある。ただし、非常に有用な成果が出たことは、本プロジェクトで開発された遺伝子工学技術が環境ストレス耐性ダイズを開発するうえで非常に適切かつ有効なものであることを示しており、アウトプットはプロジェクト目標達成に十分であったといえる。

## 4-3 効率性

MTA 締結に長い時間を要したものの、本プロジェクトの効率性はおおむね高いといえる。

### (1) 日本側投入

日本側研究機関（JIRCAS、理化学研究所、東大）から、比較的多くの日本人研究者が本プロジェクトの研究活動に従事し、有用遺伝子を同定した。14名の日本人研究者と1名の長期専門家が、植物分子生態学及び分子育種技術（アグロバクテリウム法）並びに業務調整の分野で Embrapa ダイズ研究所に派遣された。これら研究者等は、共同研究活動による良い成果を出すうえで貢献した。

ブラジル人研究者の本邦研修については、バイオテクノロジー分野で11名が研修に参加した。本邦研修を通じて Embrapa 研究者の能力向上が非常に効果的に図られただけでなく、大学院学生（9名が参加）の能力強化も図られ<sup>19</sup>、本プロジェクトの研究活動促進に貢献した。

日本側が Embrapa ダイズ研究所に供与した機器や設備類は、本プロジェクトの活動のために有効に活用された。新規に設置された1つの温室（温室は4室に分かれている）のための冷房施設が、設置からしばらくの間、適切に稼働しなかったが、機器販売会社による修理が施されたあとにおおむね稼働するようになった。

### (2) ブラジル側投入

Embrapa ダイズ研究所の比較的多くのまた高い資格をもつ研究者等並びに学生が Embrapa ダイズ研究所におけるプロジェクト活動に参画した。Embrapa 研究者/テクニシャン等の研究活動への参画度は、適切であったといえる。そして、研究者等の積極的な参画が、強い干ばつ耐性の特性をもつダイズ系統を開発することができた重要な要因であると考えられる。

---

<sup>19</sup> なかには、Embrapaダイズ研究所及び本邦研修で得られた研究データを取りまとめて博士資格を取得した者や、高く評価されている学術雑誌（Transgenic Research等）に論文を投稿できた者もいる。

Embrapa は本プロジェクトのために各種研究機器・設備を調達し、新しいバイオテクノロジー実験棟も新設した。また、既存の実験室、温室、圃場試験設備も本プロジェクトのために提供した。Embrapa ダイズ研究所が行ったこれらの機器・設備の提供は、プロジェクト活動を円滑に進めるうえで重要な貢献要因となった。また、プロジェクト活動の円滑な進捗に寄与した要因には、Embrapa が運営費用、すなわち、光熱費、消耗品費、大学院学生の奨学金提供において貢献したことも含まれる。

### (3) ブラジル側研究者と日本側研究者間のコミュニケーションについて

E-メール、テレビ会議等の方法を用いて、ブラジル側及び日本側の研究者間で良いコミュニケーションと調整が実施されたこと<sup>20</sup>、そして遺伝子工学技術に係る科学的知見とスキルの効果的交換が行われたことが、プロジェクト活動の円滑な進捗に貢献した。

### (4) MTA 締結について

既に述べたように、MTA 締結に時間を要することをプロジェクト開始前から日本側研究機関が把握していたので、早め早めに MTA 締結手続きを進める方針で取り組んできたため、本プロジェクトの活動実施や成果を出すうえで、大きな支障とはならなかったものの、特に、Embrapa 内での MTA 書類審査に多くの時間を要し、プロジェクト活動の円滑な進捗に若干の影響を与えた。中間レビュー時に MTA の迅速な締結について提言したこともあって、中間レビュー実施後約 2 カ月間、MTA 締結に要する期間が短縮されたが、その後は、以前の状況に戻ってしまった（プロジェクト開始当初は、1 年～2 年程度要し、最近では半年から 1 年程度要している）。

## 4-4 インパクト

### (1) 上位目標の達成見込み

上位目標：環境ストレスに適応したダイズが開発され、ブラジルのダイズ生産の安定化に資する。

遺伝子組み換えダイズの商品化までに時間を要するステップがあることを勘案すると、目標年である 2019 年までに上位目標の達成することは困難である。達成までには、プロジェクト終了後から少なくとも 8～10 年程度は必要と想定される。なお、市場に供給可能な干ばつ耐性ダイズが開発されれば、ブラジル内だけでなく、世界的にも大きなインパクトをもたらすであろうと考えられる。

指標：2019 年までに環境劣化に対応したダイズが開発される。

Embrapa ダイズ研究所の研究者によると、新しい遺伝子組み換えダイズ、すなわち、干ばつ耐性といったような環境ストレス耐性の性質をもつダイズの新品種開発を、遺伝子探索のための研究から始めて、品種を商品化するまでに必要な期間は、おおむね 12 年から 20 年であるという。

<sup>20</sup> ブラジル研究者側からは、業務調整専門家が、両国の研究者間の良好なコミュニケーション確保やプロジェクト活動の調整、異なる文化をもつ研究者間の理解促進において、非常に大きく貢献したとの評価があった。

本プロジェクトにおける共同研究の結果、干ばつ耐性の点で非常に有望なひとつの系統が見い出された。このほかにも、現在試験中で候補となり得る系統があり、そのほかにもさらに候補となり得る系統が見い出される可能性がある（形質転換中の遺伝子が5種類ある）。候補となる系統については、圃場試験を複数回実施する必要がある。その後、最も有望な系統について、異なる試験地域で圃場試験を実施することや安全性評価試験を実施することが必要である。これらの試験に加えて、規制緩和（栽培等の許可）がブラジルにおいて必要となるだけでなく、ダイズの主要輸入国で輸入許可を得るためにも規制緩和が必要である（輸入国それぞれで必要）。現時点では、規制緩和に要する期間や必要な経費を推定することが困難である。なお、参考として、遺伝子組み換えダイズの研究開始から商品化までに必要と想定される概略のステップを以下に示す。

本プロジェクトが実施したステップに該当する範囲



（注：この図は、既存文献<sup>21</sup>等を参考に Embrapa ダイズ研究所の研究者が作成した図を基に作成したもの。各ステップの内容、必要とする年数については、想定上のものである。実際の工程や必要年数は、種々の要因に加え、作物の種類やどのような形質あるいはどのような環境ストレス耐性をもつ作物を作出するか（市場需要による複数形質導入のケースなども含む）によって左右されると考えられる。したがって、本プロジェクトで作出されつつある環境ストレス耐性（主として干ばつ耐性）ダイズの商品化まで、実際に必要とするステップや必要年数を確定的に示すことは現時点では困難である。

図 4 - 1 遺伝子組み換えダイズ商品化までのステップ

本プロジェクトは 2015 年 3 月に終了する。2019 年までは 4~5 年しかない。したがって、そのときまでに、商品化段階にある干ばつ耐性のダイズ品種を開発することは難しい。環境ストレス耐性ダイズの品種の商品化までに 10 年は必要であろう。

<sup>21</sup> A Consultancy Study for Crop Life International, September 2011, Phillips McDougall, United Kingdom



(2) 将来発現することが期待されるインパクト

1) 干ばつ耐性ダイズの商品化品種が開発された際のインパクト

上述のとおり、商品化には多くの年数がかかると想定されるが、干ばつ耐性を有する品種の商品化が実現されれば、干ばつによるダイズ生産減少に直面するブラジルの農家にとって大きなインパクトを与えるだけでなく、その他のダイズ生産国、たとえば、アルゼンチン共和国、パラグアイ共和国（以下、「アルゼンチン」「パラグアイ」と記す）、アフリカ諸国のダイズ生産者も裨益することが期待される。

2) 本プロジェクトで開発された知見・技術の有用性

研究成果として得られた、遺伝子及びプロモーターの特定技術、遺伝子の発現・代謝に関するデータベース、マイクロアレイによる分析技術は、ダイズの環境ストレス耐性に関する基本的な研究や分析などにおいて有用だけでなく、他の作物にも適用できる有用な技術となり得る。

3) アグロバクテリウム法による形質転換効率が改善したことの有用性

アグロバクテリウム法は、干ばつ耐性遺伝子のダイズへの形質転換に利用できるだけでなく、他の有用な形質を発現する遺伝子を形質転換する際にも応用できる。すなわち、複数の有用な形質（性質・特徴）をもつダイズ品種の開発を可能とする。

4) マイクロアレイ分析技術開発の有用性

マイクロアレイ分析技術は、組み換え作物の分子特性を解析するうえで有用であるととも、安全性や環境に対して有用な情報を提供することができる。

#### 4-5 持続性

政策面、組織面、技術面では、本プロジェクトの持続性は高いと考えられる。環境ストレス耐性ダイズに関し開発された遺伝子工学技術は、ダイズの干ばつ耐性品種の開発のために、Embrapa ダイズ研究所において持続的に活用できるであろう。ただし、資金面では一般的に、安全性評価や規制緩和などに莫大な資金が必要となるため、遺伝子組み換えダイズの商品化に興味を有し、資金力も有するパートナーを探索することが重要になる。

(1) 政策面

妥当性の項で述べたように、ブラジルにとって、気候変動の影響を緩和することは農業セクターにおける主要な課題のひとつである。そして、ダイズはブラジルの経済社会にとって重要な輸出作物のひとつである。Embrapa の重要な役割のひとつは、地球温暖化の農業生産に与える影響を緩和させることに貢献することである。したがって、本プロジェクトの政策面での持続性は確保される見通しである。

(2) 組織面

Embrapa ダイズ研究所には、遺伝子組み換えダイズ開発のために必要な各種の研究部署と組織体制がある。具体的には、バイオテクノロジー、生態生理学、育種などの部署があり、

高い資格を有する研究者、テクニシャン、大学生等<sup>22</sup>がいる。Embrapa ダイズ研究所は、過去に民間企業と連携して遺伝子組み換えダイズ（除草剤耐性ダイズ）を開発した経験を有している。したがって、環境ストレス耐性ダイズの開発を継続できる組織的持続性を有する。

表 4-1 に Embrapa ダイズ研究所の人員を示す。

表 4-1 Embrapa ダイズ研究所の人員

	分類	中間レビュー時の情報 (2012年9月)	終了時評価時の情報 (2014年10月)
1.	正職員	310名 (研究者70名、研究支援スタッフ240名)	313名 (研究者69名、研究支援スタッフ244名)
2-1	Embrapa 技術移転	7名	8名
2-2	学生	167名	178名
2-3	パートナー及び外部 調達労務者	85名	91名
	計	569名	590名

### (3) 資金面

投入の項で述べたように、Embrapa は、機器類調達と新規のバイオテクノロジー実験棟建設、運営経費などのためにかかなり大きな予算を支出した。しかし、遺伝子組み換え作物の安全性評価を実施し、ブラジル並びに主要ダイズ輸入国における規制緩和手続きを進めるためには、非常に大きな資金が必要となる。したがって、干ばつ耐性ダイズ品種を開発し、商品化まで進めるためには、資金源を捜すこと並びにその費用を提供できるパートナーを捜す必要がある〔安全性評価と規制緩和には、約 3,500 万ドル（約 38 億円）必要との試算<sup>23</sup>もある〕。

参考として、Embrapa ダイズ研究所の過去 3 年間の予算を表 4-2 に示す。

表 4-2 Embrapa ダイズ研究所の過去 3 年間の予算

年	年間予算（リアル）	ドル換算値（ドル）	円換算値（億円）
2012	52,026,362	21,235,250	22.9
2013	58,424,906	23,846,900	25.7
2014（推計値）	51,520,971	21,028,968	22.7

注：1ドル=2.45リアル、1ドル=108円で換算。

### (4) 技術面

既述のとおり、Embrapa ダイズ研究所は、民間企業と連携して除草剤耐性の遺伝子組み換えダイズを開発した実績がある。さらに Embrapa ダイズ研究所は、2003 年から JIRCAS と共同で、環境ストレス耐性ダイズの研究に取り組んできた。このことから、Embrapa ダイズ研

<sup>22</sup> ブラジル政府の奨学金をもらいつつ、Embrapa ダイズ研究所で研究活動に従事している。

<sup>23</sup> A Consultancy Study for Crop Life International, September 2011, Phillips McDougall, United Kingdom

研究所は、この分野で高い専門性を有するといえる。Embrapa に蓄積された遺伝子組み換えダイズ開発経験と本プロジェクトで開発された技術とを勘案すると、環境ストレス耐性ダイズの開発を継続するための技術的持続性は確保されていると考える。

#### 4-6 結論

合同終了時評価チームは、すべての成果の達成度及びプロジェクト目標の達成度が非常に満足できるものであることを確認した。研究活動の成果として、環境ストレス耐性に関するダイズの遺伝子工学的技術に関する科学的知見と情報が蓄積され、複数の有用な技術が確立された。圃場試験の結果、1つの遺伝子組み換えダイズ系統が強い干ばつ耐性を示すとともに、害虫抵抗性を示した（圃場試験レベルで干ばつ耐性を示すダイズが開発されたことは、世界で初めてであると推定されている）。さらに複数の種類の遺伝子をもつダイズ系統の試験が温室及び圃場で実施される。そして、より多くのダイズ系統が環境ストレス耐性の特性をもつことが期待される。将来、農民が利用できる商品品種開発までには、今後、複数の段階と課題があるものの、本プロジェクトで開発された技術は、基礎的研究に有用だけでなく、ダイズの商品化品種開発に向けた研究活動にも大いに有用なものである。

表 4-3 に評価 5 項目による評価結果要約を示す。

表 4-3 評価 5 項目による評価結果（要約）

評価項目	評価結果要約
妥当性	高い
有効性	高い
効率性	おおむね高い
インパクト	上位目標達成には、約 10 年必要と考えられる。 将来、発現することが期待されるインパクトがある。
持続性	高くなる見通し

## 第5章 提言及び教訓

### 5-1 提言

#### (1) 残りのプロジェクト期間にプロジェクトが対応すべき事項

指標については達成しているものの、プロジェクト残りの期間で実施する予定であった MTA が締結（最終化を含む）されていないため Embrapa での対応の迅速化が求められる（T6 のコンストラクトに関する MTA が最終化されていないため、日本からブラジルに送付されていない。また、SAT6 及び SAT7 コンストラクトを導入したダイズに関する MTA についても、確認分析等で必要であるが、Embrapa で準備中であるため送付されていない）。

#### (2) プロジェクト終了後において対応すべき事項

##### 1) 温室用の冷房システム導入に向けた予算措置 MTA の手続きの迅速化

本プロジェクトで設置した温室は、4 室に分かれている。4 室のうち 2 室が日本側の予算措置により冷房設備が設置されている。現在、形質転換を進めている系統や、今後、形質転換を行う系統について、効率的かつ的確な温室試験を実施するためには、Embrapa ダイズ研究所は、残り 2 室分の冷房設備導入について予算措置を図るべきである。

##### 2) 干ばつ耐性ダイズの商品化に向けて重要な点について

###### a) 商品化に向けた戦略

日本の研究機関と相談しつつ、Embrapa ダイズ研究所は商品化に向けた詳細な事項について戦略を策定することを推奨する。

###### b) 商品化に向けた両国関係機関による協力関係の継続

干ばつ耐性ダイズの商品化に向けて、Embrapa ダイズ研究所と日本側研究機関との協力関係が継続することを期待する。

###### c) SAT5 遺伝子導入による害虫抵抗性発現のポテンシャルの解明

SAT5 遺伝子には、乾燥、塩（塩化ナトリウム）に対する抵抗性を発現させる機能があるといわれていた。それに加えて、害虫抵抗性を付加する可能性について、Embrapa ダイズ研究所及び日本側研究機関が解明することが期待される。

###### d) Embrapa ダイズ研究所が、より干ばつ状況が発生しやすい気象条件をもつ場所で圃場試験を実施することについて

Embrapa ダイズ研究所で毎年、レインアウト・シェルター圃場と通常圃場を用いて圃場試験が実施されてきたが、降雨が少なく、干ばつ条件が発生したのは、2013/14 作期だけであった。Embrapa ダイズ研究所が所在する場所は、他の地域より干ばつ発生頻度が低いので、望ましい干ばつ状況下で圃場試験を行うためには、気象条件の異なる地域で圃場試験を実施する必要がある。Embrapa ダイズ研究所で候補地の検討を進めているが、2015/16 作期に他の地域で圃場試験が実施できるよう、必要な準備を進めることが期待される。

e) Embrapa による安全性評価と規制緩和について

安全性評価実施と規制緩和手続き実施のためには、大きな資金が必要とされる。そのため、民間企業等から適切なパートナーを選定し、安全性評価と規制緩和を進めていく必要がある。その際、Embrapa は、民間企業だけが独占的な権利や利益を確保することがないように、留意すべきであろう。

## 5-2 教訓

(1) 高い研究成果を上げた要因について

本プロジェクトでは、環境ストレス耐性ダイズ作出技術開発及び干ばつ耐性が高い系統の開発において、非常に高い研究成果が上がっている。その主な要因には、Embrapa ダイズ研究所と JIRCAS が、長年研究協力を実施してきた実績があり、信頼関係が築かれていること、さらには、本プロジェクトにおけるブラジル側研究機関と日本側研究機関の役割・分担が明確にされ研究が実施されたことなどが挙げられる。

(2) MTA 締結の迅速化に向けて

MTA 締結に時間を要することを十分に考慮しつつ、MTA 締結手続きを進めてきたので、プロジェクト活動の進捗に大きなマイナスの影響を与えたわけではないが、MTA 文書案作成から MTA 契約にサインするまで、相当の時間を要した（プロジェクト開始当初は、約 1 年間、その後においても、半年以上を要している）。日本から送付する材料（コンストラクト）の名称だけが異なる場合であっても、全文についての英文からポルトガル語への公証人翻訳が必要とされたり、Embrapa 内での手続きがどこかで止まっていないかどうかをチェックする必要があった。

今後、類似のプロジェクトやプロジェクトに関係した共同研究を実施する際、円滑に研究活動を進めるうえでは、MTA の迅速化が望まれることから、あらかじめ MTA に関する文書処理を迅速に実施できる手順や文書様式を決めておく等の対処が行われることが望ましい。

## 第6章 所感

### 6-1 JST 研究主幹所感

#### (1) 国際科学技術協力のあり得べき姿の好事例

JICA/JST 連携による SATREPS はわが国の研究機関と相手国の研究機関間の国際共同研究によって、地球規模課題の解決をめざし、研究成果を上げるだけにとどまらず、その成果を現場の問題の解決に生かす道を示すプログラムである。このプロジェクトでは、干ばつ耐性ダイズの実用品種の開発をめざして、日本の研究機関が遺伝子発見に努め、発見した遺伝子とその導入技術をブラジルの研究機関に提供して、ブラジルのダイズで形質転換を図り、室内での検定を経て、野外の実験圃場でも干ばつ耐性を確認できた。野外の結果は1年限りの結果なので、今後引き続き実証を重ねて結果の確認を行う必要があり、実用品種の開発にはまだ相当の年月を要すると推測される。

しかし、今の段階でもいえることは、プロジェクト目標を共有した両国の協働により、日本側の基礎的な研究とブラジル側の応用をめざした研究がうまくかみ合って現場の問題の解決に一步近づいたことである。両国の研究機関間の長い共同研究の実績のうえに本プロジェクトが実施され、基礎から応用までをカバーする国際科学技術協力による顕著な成果が得られた好事例といえることができる。研究遂行能力が高く、問題意識を共有したうえで、両者の信頼のうえにプロジェクトを遂行できる体制が構築できる相手国とその研究機関を選定することが重要であると思われる。

#### (2) 他の遺伝子発現を誘導する遺伝子の新たな機能の可能性

本プロジェクトで形質転換に用いた遺伝子は、ダイズの干ばつストレス耐性を発現させる機能を有していることが圃場レベルでの実験で初めて実証された。同時に鱗翅目害虫 (*Anticarsia sp.*) の幼虫によるダイズ葉の食害の程度が形質転換の母本 (BR16) に比較して非常に少なく、害虫に対する抵抗性も観察された。プロジェクトの残り期間でこの抵抗性の確認がなされる計画である。

また、その確認がなされた場合、次にはこの害虫抵抗性が導入遺伝子によって誘導されたものかどうかの検証が必要であるが、もしそうだと検証されれば、導入遺伝子には害虫抵抗性を誘導する機能があることになり、これまで明らかにされた乾燥、高温、塩類等の非生物学的ストレスに対する効果のほかに生物的ストレスに対する効果もあることになる。害虫抵抗性誘導のメカニズムの解明が待たれる。また、他の遺伝子発現を誘導する遺伝子の全機能は今の科学技術では完全には予測できないが、本プロジェクトで示され既に確認されている非生物学的ストレス耐性誘導機能とは別の他の機能の誘導の可能性は、この種の遺伝子の特徴といえるものか興味があるところである。

#### (3) 圃場での乾燥耐性の実証から実用品種開発までの長いプロセス

遺伝子組み換え技術を使った品種育成は、人工交配による通常 10~20 年の長い品種育成期間の短縮につながるといわれてきた。しかし、遺伝子組み換えによって育成された品種を一般の野外圃場で栽培するには、それ以前に、組み換え体の生物的安全性や環境に対する影響のリスク評価を行い、安全性を注意深く確認する必要があることが今回の調査で明らかに

なり、そのためには相当の年数を要することが議論された。これは農薬や医薬品の実用化の場合に必要な検証と類似しているといえる。今回の終了時評価における議論のなかで、実験圃場における乾燥耐性の確認がなされてから実用品種の開発までには、上記のプロセスを経る必要があり、検証に必要な施設や検証にかかる費用の面で、将来この組み換え体から開発される干ばつ耐性ダイズの種子の利用に関心を寄せる民間企業等とのパートナー関係の構築の必要性が明らかになった。また検証には相当の期間（12～20年、モンサントのRR1<sup>24</sup>ダイズの場合は16年かかった）が必要である。本プロジェクトの成果を生かした地球規模課題の解決に向かうには今後もまだ相当の年数がかかることを認識し、関係機関は今のうちから実用化に向けた行動戦略を練る必要があると思われる。

## 6-2 団長所感

本科学技術協力は「環境ストレス耐性ダイズ（乾燥耐性遺伝子組み換えダイズ）の作出技術の開発」を目標として開始された。終了時評価の結果、圃場試験においても強い干ばつ耐性を示す系統が選抜されたなど、プロジェクト目標の達成だけではなく、世界で初めてとなる商品化に向けた特筆すべき成果を上げたことが確認された。このような成果が出た背景には、「JIRCAS と Embrapa ダイズ研究所間の長い研究交流の実績と信頼感の存在」「日本側関係組織（JIRCAS、理研、東大）とダイズ研究所間の明確な役割分担に基づく効率的な連携活動の実施」がある。

ブラジルは1970年からダイズ生産量を増やしていったが、1990年代まで生産高は3,000万t程度であった。その後急速に栽培地域を増やし、2012/13作期におけるダイズ生産高は8,200万tと世界の米国の8,205万tと拮抗するまでになっている。一方輸出面では2011/12作期の時点で既に米国に追いついており、2013/14年度には4,400万tを輸出すると予想されている。1980年の統計では日本のダイズ総輸入量の96%が米国からでブラジルからは1%にも満たなかったが、2012年の統計では米国64.6%、ブラジル20%というように、食料安全保障の観点からみても日本でのブラジルのダイズの重要度は増してきている。ブラジルのダイズ生産の近年における深刻な問題は干ばつ被害である。ここ10年間に4回（2004/05、2008/09、2011/12、2013/14作期）もの干ばつ被害が報告されており、主要生産地であるリオグランデ・ド・スル州の2004/05作期の単収は前年の50%までに減少したと報告されている（出典：金森紀仁「ブラジルのダイズ生産と日本の技術協力」Journal of The Agriculture No. 1584 2014.4）。

なお2003/04作期から2012/13作期の間の干ばつによるブラジル全土におけるダイズの想定被害額は、466億ドルと巨額である（出典：Farias et al. 2014, 2010/11作期を基準とした推定値）。

以上のようにブラジルではダイズの干ばつ被害が拡大しており、乾燥耐性ダイズ品種の開発は急務のこととなっている。公表されている資料から判断すると、本協力下での乾燥耐性遺伝子組み換えダイズの圃場試験の成功（干ばつ耐性の確認）は世界で初めてであり、この成果が商品化にまで結び付けば、ブラジルだけでなく世界に対しても大きなインパクトを与えると期待される。

なお今後の商品化のためには相当な期間と莫大な資金を必要とする。ダイズ研究所側の説明によれば、商品化に向けては技術面でのさらなる検討と検証、安全性試験、輸入国における規制緩和手続きなど多くのステップがあり、過去の事例などから推測すると期間的には少なくとも10年、資金的には約1億3,000万ドルが必要かもしれないとのこと。このことからダイズ研究所は、

---

<sup>24</sup> ラウンドアップ耐性（除草剤耐性）

商品化に向けては資金力がありかつ安全性試験や規制緩和手続きなどについてのノウハウをもつ関連大手企業等の参画が不可欠と考えている。

世界各地でダイズの干ばつ被害が大きな問題となっている状況下、今後、乾燥耐性遺伝子組み換え品種の開発競争は激化するであろう。よって現在は本協力がトップランナーとはいえ、商品化への行動はより迅速に行わないと他に先んじられるおそれがある。

なお将来的に当該開発に参画する民間業者は、莫大な投資を行う分、大きな発言力を有し、知的所有権などについての議論も彼らが主導権を握り展開していく可能性が高いと思われる。JIRCAS、理研、東大は本科学技術終了後も商品化に向けた技術支援を継続する意向を示しているが、民間企業の参画によりこれまでの日本側の大きな貢献やプレゼンスがかすんでしまわないよう留意する必要がある。

そのような観点から終了時評価レポートの提言部で、「ダイズ研究所が商品化に向けた戦略をJIRCAS、理研、東大と相談のうえ、策定することが勧められる」と記述した。その戦略策定の過程で、商品化へのステップや必要な活動を明確化するとともに日本関係組織と Embrapa に属する知的所有権などについても検討することが望ましい。このような戦略なしに民間企業等への参画呼び掛けを行った場合、企業が完全に主導権を握った開発になるおそれがあるので、その呼び掛けは戦略を策定したあとに行われることが適切と判断される。



## 付 属 資 料

1. 調査日程
2. 主要面談者
3. ミニッツ
4. PDM仮和訳
5. 評価グリッド（和文・英文）
6. Embrapa組織図

1. 調査日程

月 日			ブラジル側評価メンバー	日本側評価メンバー		JIRCAS	JST	
			Dr. Molinari and Dr. Gonçalves	永代・安達	道順	中島・金森	浅沼	佐藤
1	10月19日	日			日本発			
2	10月20日	月			ロンドリーナ着			
3	10月21日	火			日本人専門家と打合わせ Embrapa ダイズ研究所研究者インタビュー			
4	10月22日	水			Embrapa ダイズ研究所研究者インタビュー ラボラトリー及び試験圃場視察			
5	10月23日	木			Embrapa ダイズ研究所研究者インタビュー			
6	10月24日	金			Embrapaダイズ研究所研究者インタビュー ダイズ栽培農家の視察・インタビュー			
7	10月25日	土			資料整理			
8	10月26日	日			日本発			
9	10月27日	月	ロンドリーナ着	現地調査・情報収集	ロンドリーナ着	日本発	ロンドリーナ着	
			日本人専門家と打合わせ					
10	10月28日	火	Embrapaダイズ研究所 所長表敬、研究者インタビュー、終了時報告書内容協議、ダイズ加工施設視察					ロンドリーナ着
11	10月29日	水	研究成果進捗報告、研究者インタビュー、施設視察、終了時報告書内容協議					
12	10月30日	木	研究者インタビュー、終了時報告書案作成					
13	10月31日	金	合同評価委員会、終了時報告書案作成					
14	11月1日	土	資料整理					
15	11月2日	日	資料整理					ロンドリーナ発
16	11月3日	月	合同評価チームによる終了時評価報告書の内容検討					
17	11月4日	火	合同評価チームによる終了時評価報告書の内容検討、Embrapa ダイズ研究所 所長への評価概要説明、終了時評価報告書署名					
18	11月5日	水	終了時評価結果の関係者への説明（JCC）、ミニッツ署名					ロンドリーナ発
19	11月6日	木	ロンドリーナ発、ブラジリア着、現地報告書作成、資料整理					
20	11月7日	金	JICA 事務所報告 日本大使館報告 Embrapa 本部訪問 外務省報告					
21	11月8日	土	ブラジリア発					
22	11月9日	日	---					
23	11月10日	月	日本着					

## 2. 主要面談者

### <Embrapa 本部>

Dr. Arnoldo M. da Fonseca Jr. 業務部（知的財産所有部）Secretaria de Negócios, Administrative Coordinator

Dr. Jose Americo Bordini do Amaral 研究者、Scientific Cooperation (CCC), International Relations Secretariat（SRI、国際調整部）, Embrapa HQ

Dr. Ronaldo Pereira 研究者、Products and Markets

Mr. Marcelo Castro テクニシャン、(SRI、国際調整部)

### <Embrapa ダイズ研究所 (Embrapa Soybean) >

Dr. Jose Renato Faria ダイズ研所長

Dr. Alexandre José Cattelan 技術移転部長（前大豆研所長）

Dr. Fabio Alvares de Oliveira 総務部長/所長代行

Dr. Alexandre Lima Nepomuceno ブラジル側プロジェクトリーダー

Dr. Norman Neumaier Americo ブラジル側プロジェクト副リーダー/インターナショナル リエゾン  
オフィサー

Dr. Sergio Luiz Golçalves 終了時評価合同評価委員/研究者

Dra. Renata Fuganti ポスドク

Ms Silvana Marin バイテク棟ラボ長、テクニシャン

### <Embrapa Agroenergy>

Dr. Guy de Capdaille Assistant Director of Research & Development

Dr. Hugo Bruno Correa Molinari 研究者

Dr. Adilson Kenji Kobayashi 研究者

Dr. Leticia Jungmann 研究者

Ms. Melissa Braga Analyst of Interlectual Property

Ms. Marcia Mitiko Onoyama 技術移転副部長

### <ブラジル外務省科学技術部>

Dr. Ademar Seabra da Cruz Jr. 部長

### <在ブラジル日本国大使館>

星野 芳隆 公使

犬飼 武 二等書記官

森田 健太郎 二等書記官（農務担当官）

### <JICA ブラジル事務所>

室澤 智史 所長

石黒 亮 次長補佐

<プロジェクト専門家>

工藤 博 業務調整員  
金森 紀仁 長期専門家

JCC 会議参加者

<Embrapa ダイズ研究所>

Dr. Alexandre Lima Nepomuceno ブラジル側プロジェクトリーダー  
Dr. Fabio Alvares de Oliveira 総務部長  
Dr. José Alexandre Cattelan 技術移転部長  
Dr. Norman Neumaier プロジェクト副リーダー/インターナショナル リエゾン オフィサー  
Dr. Sergio Luiz Golçalves 終了時評価委員/研究者  
Dra. Liliane Marcia Mertz Henning 研究者  
Dra. Renata Fuganti ポスドク  
Dr. Leonardo Cesar Serreira ポスドク  
Mr. Claudinei de Freitas Toledo テクニシャン  
Mr. Rubson Natal Ribeiro Sibaldelli テクニシャン

<Embrapa Agroenergy>

Dr. Hugo Bruno Correa Molinari 終了時評価合同評価委員/研究者

<Embrapa 本部>

Dr. Alexandre Morais do Amaral Head of Scientific Cooperation (CCC) , International Relations  
Secretariat (SRI、国際調整部)  
Dr. Jose Americo Bordini do Amaral Researcher of CCC

<ブラジル外務省科学技術部>

Dr. Douglas Pitta de Souza Assistente de Chancelaria, Divisão de Ciência e Tecnologia (DCTEC),  
Ministério das Relações Exteriores (Chancellery Assistant, Division of Science  
and Technology (DCTEC), Ministry of Foreign Affairs)

**MINUTES OF MEETING  
BETWEEN  
JAPAN INTERNATIONAL COOPERATION AGENCY  
AND  
AUTHORITIES CONCERNED OF THE FEDERATIVE REPUBLIC OF BRAZIL  
ON  
THE TERMINAL EVALUATION ON  
DEVELOPMENT OF GENETIC ENGINEERING TECHNOLOGY OF CROPS WITH  
STRESS TOLERANCE AGAINST DEGRADATION OF GLOBAL ENVIRONMENT**

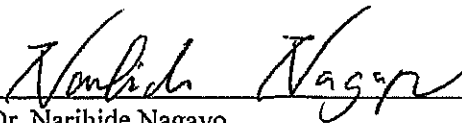
The Japanese Terminal Evaluation Team, organized by the Japan International Cooperation Agency (hereinafter referred to as "JICA") and headed by Dr. Narihida Nagayo, reviewed the progress of Development of Genetic Engineering Technology of Crops with Stress Tolerance against Degradation of Global Environment (hereinafter referred to as "the Project") from 21 October to 5 November, 2014 together with the Brazilian Evaluation Team in the form of joint Terminal Evaluation.

The Joint Evaluation Team (hereinafter referred to as "the Team"), which consists of five (5) members from Japanese side and two (2) members from the Brazilian side, was organized for the purpose of conducting the evaluation of the progress and for preparation of necessary recommendations to the respective governments.

After intensive study and analysis of the activities and achievements of the Project, the Team prepared the Joint Terminal Evaluation Report (hereinafter referred to as "the Report") presented it to the Joint Coordinating Committee (hereinafter referred to as "the JCC").

The JCC discussed the major issues presented in the Report, and accepted on the matters referred to in the document attached hereto.

Londrina, 5 November, 2014

  
\_\_\_\_\_


Dr. Narihida Nagayo  
Team Leader  
Japanese Terminal Evaluation Team  
Japan International Cooperation Agency  
Japan

  
\_\_\_\_\_

Dr. José Renato Farias  
General Head  
Brazilian Agricultural Research Corporation  
(Embrapa) Soybean  
Federative Republic of Brazil

  
\_\_\_\_\_

Dr. Kazuo Nakashima  
Project Leader  
Japan International Research Center for  
Agricultural Sciences  
Japan

  
\_\_\_\_\_

Dr. Alexandre Lima Nepomuceno  
Project Leader in Brazil  
Embrapa Soybean  
Federative Republic of Brazil

## Attached Document

### I. Presentation of the Report

The Team presented the Report to the JCC, and the JCC confirmed the current progress and evaluation of the Project. The Report is attached as APPENDIX.

### II. Understanding of the recommendations from the Team

After the discussion of the Report, both the Japanese and Brazilian sides understood the recommendations in the Report. Recommendations suggested by the Team are as follows;

#### 1. Recommended actions to be taken by the Project in the remaining cooperation period

##### Acceleration of finalization of MTA

A construct (T6) is not sent from Japan to Brazil, because MTA is not finalized yet. MTAs for sending GM soybean seeds (soybeans with SAT6 and SAT7 constructs) are under preparation in Embrapa. It is necessary for Embrapa to accelerate finalization of MTA in order to carry out gene transformation or analysis.

#### 2. Recommended actions to be taken after the termination of the Project

##### (1) Budget allocation for purchasing and installing cooling system for greenhouse

The greenhouse, which was constructed under the Project, has 4 separated rooms. 2 rooms out of 4 rooms have cooling system which was installed with budget allocated by Japanese side. In order to carry out efficient and precise greenhouse experiments using genes which are under transformation currently and genes which will be transformed in future, Embrapa should allocate budget for cooling system for remaining 2 rooms.

##### (2) Important points toward commercialization

###### 1) Strategy for commercialization

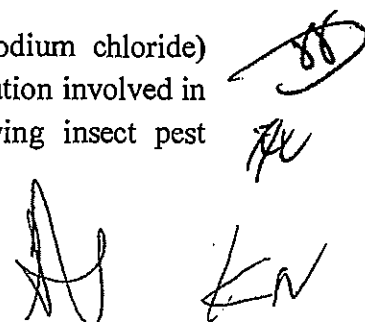
It is recommended that Embrapa Soybean in consultation with Japanese institutions concerned (JIRCAS, RIKEN, and the University of Tokyo) starts to formulate the strategy to clarify detailed steps for commercialization.

###### 2) Continuation of cooperative relationship

It is expected that Embrapa Soybean and Japanese research institutions involved in the Project continue cooperative relationship toward commercialization of soybean variety.

###### 3) Analysis of potential on insect resistant expression in soybean which *SAT5* gene is introduced.

It was said that *SAT5* gene has function to express drought and salt (sodium chloride) tolerances. It is expected that Embrapa Soybean and Japanese research institution involved in the Project analyze whether *SAT5* gene has additional potential for giving insect pest

Handwritten signatures and initials are present in the bottom right corner of the page. There are three distinct marks: a large signature that appears to be 'ST', a smaller signature that appears to be 'PC', and another signature that appears to be 'KN'.

resistance in soybean.

**4) Field experiments at locations where drought climate condition is occurred more frequently**

Field experiments using fields with rainout shelters and normal field in Embrapa Soybean have been carried out every year during the project period and water deficit condition or drought situation at the fields was occurred only in 2013/14 cropping season. Embrapa Soybean locates in an area where frequency of occurrence of drought is fewer than other areas, therefore, it is necessary to carry out field experiments at areas where climate condition is different. It is expected for Embrapa Soybean to take necessary measures for implementing field experiments at other areas in 2015/16 cropping season.

**5) Biosafety risk assessment and deregulation**

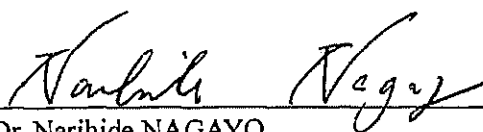
A large amount of funds will be necessary for carrying out biosafety risk assessment and deregulation procedures. Therefore, it is necessary to select appropriate partner from private companies for these biosafety risk assessment and deregulation. When Embrapa Soybean set up partnership, Embrapa should consider contents of agreement so as not to only private sector get exclusive rights and benefits.

APPENDIX: Terminal Evaluation Report

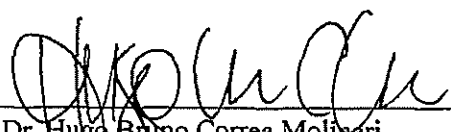
Handwritten signatures and initials in the bottom right corner of the page. There are three distinct signatures: one large, stylized signature on the left, and two smaller signatures on the right, one of which appears to be 'KA'.

THE JOINT TERMINAL EVALUATION REPORT  
ON JAPANESE TECHNICAL COOPERATION (SATREPS) FOR  
DEVELOPMENT OF GENETIC ENGINEERING TECHNOLOGY OF  
CROPS WITH STRESS TOLERANCE AGAINST DEGRADATION OF  
GLOBAL ENVIRONMENT

Londrina, 4 November, 2014



Dr. Narihida NAGAYO  
Leader  
Japanese Terminal Evaluation Team  
Japan International Cooperation Agency



Dr. Hugo Bruno Correa Molinari  
Leader  
Brazilian Terminal Evaluation Team  
Embrapa Agroenergy





## Table of Contents

### 1. Introduction

- 1-1 Objectives of the Terminal Evaluation
- 1-2 Member of the Joint Terminal Evaluation Team
- 1-3 Process and Schedule of the Terminal Evaluation
- 1-4 Methodology of the Terminal Evaluation

### 2. Outline of the Project

- 2-1 Background of the Project
- 2-2 Summary of the Project

### 3. Achievement of the Project

- 3-1 Inputs
- 3-2 Outputs
- 3-3 Project Purpose

### 4. Results of Evaluation

- 4-1 Relevance
- 4-2 Effectiveness
- 4-3 Efficiency
- 4-4 Impact
- 4-5 Sustainability
- 4-6 Conclusions

### 5. Recommendations and Lessons Learned

- 5-1 Recommendations
- 5-2 Lessons Learned

### Annexes

- Annex 1: Schedule of the Terminal Evaluation
- Annex 2: Project Design Matrix (version 1 and 2)
- Annex 3: List of Japanese Researchers Involved in the Project Activities
- Annex 4: Dispatches of Japanese Expert/Researchers
- Annex 5: Brazilian Researchers Trained in Japan
- Annex 6: Equipment Provided by Japanese Side for Brazilian Implementing Agency (Embrapa Soybean)
- Annex 7: Equipment Procured for the Research Institutes in Japan (JIRCAS, RIKEN and the University of Tokyo)
- Annex 8: Local Cost Allocated by Japanese Side
- Annex 9: List of Brazilian Researchers Involved in the Project Activities
- Annex 10: Equipment Procured and Facilities Constructed by Brazilian Side
- Annex 11: Location of Facilities (Embrapa Soybean) Used for the Project Activities
- Annex 12: Local Expenses Borne by Brazilian Side (scholarship)
- Annex 13: List of Publications
- Annex 14: Assumed Steps from Start of Research to Commercialization of Genetically Modified Soybean
- Annex 15: Plan of Operations (comparison of progress with planned schedule)
- Annex 16: Project Implementation Structure
- Annex 17: Project Implementation Structure at Embrapa Soybean

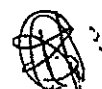


JK

KA/

## Abbreviations and Acronyms

Embrapa	Brazilian Agricultural Research Corporation
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
JCC	Joint Coordination Committee
JICA	Japan International Cooperation Agency
JIRCAS	Japan International Research Center for Agricultural Sciences
JST	Japan Science and Technology Agency
MTA	Material Transfer Agreement
PDM	Project Design Matrix
PO	Plan of Operations
R/D	Record of Discussions
SATREPS	Science and Technology Research Partnership for Sustainable Development



*Handwritten signature or initials.*

## 1. Introduction

### 1-1 Objectives of the terminal evaluation

- (1) To evaluate the inputs for the Development of Genetic Engineering Technology of Crops with Stress Tolerance against Degradation of Global Environment (herein after referred to as “the Project”); as well as the progress and achievements of project activities based on the Project Design Matrix (PDM) and the Plan of Operations (PO); and to exchange opinions with the Brazilian authorities concerned through the visit to the project sites,
- (2) To evaluate the Project from the viewpoints of five evaluation criteria (Relevance, Effectiveness, Efficiency, Impact and Sustainability),
- (3) To formulate the Joint Terminal Evaluation Report and make necessary recommendations on project activities in the remaining period of the Project to both the Brazilian and Japanese sides, and
- (4) To explain and discuss the results of the terminal evaluation on the Project with the Brazilian authorities concerned and sign related Minutes of Meeting.

### 1-2 Member of the Joint Terminal Evaluation Team

The Project was evaluated by the Japanese and Brazilian Joint Terminal Evaluation Team (hereinafter referred to as “the Team”). The Team was composed of 5 members from the Japanese side and 2 members from the Brazilian side.

#### 1-2-1 Japanese Terminal Evaluation Team

No.	Assignment	Name	Position and Organization
1	Leader	Dr. Narihideo NAGAYO	Senior Advisor, Japan International Cooperation Agency (JICA)
2	Cooperation Planning	Dr. Takumi ADACHI	Advisor, Team 2, Group 1, Rural Development Department, JICA
3	Science and Technology Planning and Evaluation (Observer)	Dr. Shuichi ASANUMA	Program Officer, Japan Science and Technology Agency (JST)/ Professor, International Cooperation Center for Agricultural Education (ICCAE), Nagoya University
4	Science and Technology Planning and Evaluation (Observer)	Mr. Masayuki SATO	Principal Researcher, Research Partnership for Sustainable Development Group, Japan Science and Technology Agency (JST)
5	Evaluation and Analysis	Mr. Isao DOJUN	Consultant, Chuo Kaihatsu Corporation

#### 1-2-2 Brazilian Terminal Evaluation Team

No.	Assignment	Name	Position and Organization
1	Leader	Dr. Hugo Bruno Correa Molinari	Senior Scientist, Embrapa Agroenergy
2	Member	Dr. Sergio Luiz Gonçalves	Senior scientist, Embrapa Soybean

### 1-3 Process and schedule of terminal evaluation

The schedule is attached as Annex I. The terminal evaluation was conducted along the following process.



### **1-3-1 Initial examination in Japan**

The Team reviewed available documents related to the Project, interviewed some Japanese researchers involved in the Project, and prepared an evaluation grid which listed the specific review points and the data collection methods.

### **1-3-2 Evaluation activities in the Federal Republic of Brazil**

The Team carried out evaluation activities for the following objectives.

- To identify to what extent the activities, the outputs and the project purpose described in the PDM (Project Design Matrix) have been implemented and/or achieved.
- To review the process and results of technology development.
- To observe the current conditions of equipment and facilities provided by the Project.
- To make recommendations on the project activities for the remaining project period.

The Team visited the Brazilian Agricultural Research Corporation- National Soybean Research Center (hereinafter referred to as “Embrapa Soybean”) and carried out a series of interviews and discussions with Brazilian researchers and Japanese researchers, etc.

The Team also visited laboratories and experimental fields and generally checked the equipment procured for the Project.

## **1-4 Methodology of the terminal evaluation**

### **1-4-1 Method of terminal evaluation**

The Project was evaluated jointly by the Team based on materials showing the framework of the Project such as PDM, PO and the Record of Discussions (R/D). The review activities including analysis on reports, field surveys, and interviews with the researchers of Embrapa Soybean and Japanese side, JICA experts, etc. have been carried out. This terminal evaluation was implemented using the following Five Evaluation Criteria.

### **1-4-2 Evaluation criteria (Five Evaluation Criteria)**

#### **(1) Relevance**

Relevance refers to the validity of the Project Purpose and the Overall Goal in connection with the development policy of the authorities concerned of Brazil as well as the needs of the beneficiaries and the assistance policy of Japan.

#### **(2) Effectiveness**

Effectiveness refers to the extent to which the expected benefits of the Project have been achieved as planned. It also examines whether these benefits have been brought about as a result of the Project.

#### **(3) Efficiency**

Efficiency refers to the productivity of the implementation process. It examines whether the inputs of the Project have been efficiently converted into outputs.

#### **(4) Impact**

Impact refers to direct and indirect, positive and negative impacts caused by the implementation of the Project, including the extent to which the overall goal has been attained.



## **(5) Sustainability**

Sustainability refers to the extent to which the Project can be further developed by the authorities concerned of Brazil and the extent to which the benefits generated by the Project can be sustained under national policies, technology, systems and financial state.

## **2. Outline of the Project**

### **2-1 Background of the Project**

Gradual warming of the earth, first caused by the increasing amount of greenhouse gases with rapid population growth and industrialization has subsequently been raising global problems such as desertification of cropland, reduction of crop yield and security of food and feedstuff. Although conventional crop breeders challenged themselves to produce crop plants tolerant to drought, results so far are not outstanding. On the other hand, recent technical progress in genetic engineering based on plant genome research has been attracting attention since crops having improved tolerance to drought by gene transfer have been developed. Under such situations research for elucidation of genes has involved for drought tolerance in crops so the utilization of the outcome of genomic research and development of genetic engineering technology utilizing these genes has become important. Technology such as genetic engineering has evolved into very significant successes in soybean, maize and cotton with herbicide and/or insect-resistance, which has led to their dominance in global trade. Development of drought-tolerant soybean plants and maize is now considered as the most important target of such technology because these plants are grown on such a large scale in areas of relatively low rainfall. Japan is a significant importer of these crops and needs to ensure a stable food supply from the world. Based on such conditions briefly mentioned here, the government of Brazil submitted a proposal on “Development of Soybean with Tolerance to Drought and Heat” to Japan.

This proposal intends to develop the genetic engineering technology of soybean that is adapted to tolerate drought and heat with the aim to stabilize soybean production in Brazil, in cooperation between Japan International Research Center for Agricultural Sciences (hereinafter referred to as “JIRCAS”) and Embrapa Soybean. The research group at first took steps to isolate useful genes related to environmental stress tolerance and stress-inducible promoters in soybean plants on the basis of research of genes related to environmental stress tolerance and rapidly evolving soybean genome research carried out elsewhere. It selects candidate combinations of such genes and promoter, and then introduces them to the soybean plant. It further evaluates environmental stress tolerance of transgenic soybean plants in greenhouses and under field conditions, with continued result feedback to improve the combination of useful genes and promoters, with the eventual aim to select elite transgenic lines with improved tolerance to environmental stresses.

### **2-2 Summary of the Project**

The framework of the project was determined on basis of the R/D signed on 28 December 2009. PDM for the Project was modified at a Joint Coordination Committee (JCC) meeting held on March 15, 2012. The project summary described in PDM version 2 is as follows; (For more details, see Annex 2).

#### **(1) Overall Goal**

Soybeans adapted to environmental stresses are developed, which contributes to the stabilization of the soybean production in Brazil.



## **(2) Project Purpose**

Genetic engineering technology of soybean with environmental stress tolerance is developed.

## **(3) Outputs**

- Output 1: Useful genes related to environmental stress tolerance are identified.
- Output 2: Stress-responsive promoters are isolated and combinations with useful genes are optimized.
- Output 3: Transgenic soybean lines containing constructs of promoters and useful genes are produced.
- Output 4: Transgenic soybean lines with environmental stress tolerance are selected.

## **(4) Responsible organizations**

Japanese side: JIRCAS, RIKEN and the University of Tokyo

Brazilian side: Embrapa Soybean

## **(5) Project Period**

From March 4, 2010 to March 3, 2015 (5 years)

## **3. Achievement of the Project**

### **3-1 Inputs**

#### **3-1-1 Japanese Side**

##### **(1) Japanese researchers involved in project activities**

The number of researchers who participated in the research activities of the project in Japan is 33 persons in total. JIRCAS 10 persons, RIKEN 5 persons and the University of Tokyo 18 persons including participated graduate students. For further details, refer to the Annex 3.

##### **(2) Dispatches of Japanese experts/ researchers**


A long-term expert (project coordinator) has been dispatched and total of 13 researchers (short and long-term) in the fields of Molecular Breeding Techniques and Plant Molecular Biology have been dispatched to Brazil. These are 8 persons from JIRCAS, 2 persons from RIKEN and 3 persons from the University of Tokyo. For further details, refer to the Annex 4.

##### **(3) Brazilian researchers trained in Japan**

Thirteen (13) Brazilians have participated in the training programs in Japan. The venues of training are JIRCAS 11, the University of Tokyo 1 and RIKEN 1. Field of trainings are as follows.

- Technical learning of expression analysis of soybean stress-responsive genes
- Participation in the kick-off meeting
- Technical training on isolation of promoters related to soybean stress-responsive genes
- Technical training on gene expression analysis in transgenic soybean plants
- Technical learning of expression analysis of plant drought stress responsive genes by next generation sequencer, and
- Technical learning of physiological and biochemical analyses of drought responses in soybean plants cultivated under the regulated soil moisture content, and functional and expression analyses of genes that function in improvement of drought stress tolerance in soybean

For further details on the training programs in Japan, refer to the Annex 5.



#### **(4) Provision of equipment**

##### **1) Equipment provided by the Japanese side for Embrapa Soybean**

Vehicles, office equipment such as computers and printers, various kinds of equipment for research activities, have been provided by JICA. The amount of expenses for purchasing of the equipment is 940 thousand Reals and 38.9 million Yen (for reference, equivalent to around 744 thousand US dollars in total). For further details, refer to the Annex 6.

##### **2) Equipment provided by Japanese side for the research institutes in Japan**

Various kinds of equipment for research activities have been provided by the Japanese side for JIRCAS, RIKEN and the University of Tokyo. The amount of expenses for purchasing of equipment is 17.9 million Yen (for reference, equivalent to around 16.6 thousand US dollars in total). For further details, refer to the Annex 7.

#### **(5) Local cost allocated by Japanese side**

Local cost (in Brazil) allocated by the Japanese side for implementing the project activities is 1,167 thousand Reals (for reference, equivalent to around 476 thousand US dollars in total) as of August 2014. For further details, refer to the Annex 8.

### **3-1-2 Brazilian side**

#### **(1) Brazilian researchers involved in the Project activities**

Total of 35 researchers have been involved in the project activities. The majority are the researchers of Embrapa. Others are university students, graduate students and technicians employed through JICA for the first two and half years. At the terminal evaluation, 17 Embrapa researchers and 5 graduate students are carrying out the Project activities. For further details, refer to the Annex 9.

#### **(2) Equipment provided by Brazilian side**

Various kinds of equipment for research activities have been provided by the Brazilian side and installed at the new biotechnology building, the biotechnology building, the eco physiology laboratory, the chemical analysis building and Embrapa experimental field. The amount of expenses for purchasing equipment is 2.885 million Reals (for reference, equivalent to around 1.2 million US dollars in total). For further details, refer to the Annex 10.

#### **(3) Provision of facilities**

Embrapa is providing the following facilities for the project activities. For further details, refer to the Annex 11, which shows the Embrapa map for 2012 and 2014. It shows Embrapa facilities have been expanded since 2012 when the mid-term review of the Project was carried out.

- 1) An office space for Japanese expert/researchers: 40 m<sup>2</sup>
- 2) Biotechnology building (existing): 424m<sup>2</sup>
- 3) New biotechnology building (newly constructed): 581m<sup>2</sup>
- 4) Eco physiology laboratory : 120m<sup>2</sup>
- 5) Chemical analysis laboratory: 100 m<sup>2</sup>
- 6) Greenhouse of Embrapa: 1,181 m<sup>2</sup>
- 7) Land for JICA greenhouse (the greenhouse was built by JICA): 314m<sup>2</sup>
- 8) Storage room for GM seeds: 160m<sup>2</sup>
- 9) Greenhouse for GM soybean: 237m<sup>2</sup>
- 10) Experimental field: 28,300m<sup>2</sup>



*JK*

- 11) Rain-out shelter (Rainout shelter is a facility to protect a certain area of land against receiving precipitations so that an experimentally controlled drought stress can be imposed on that area.): 6 x R\$33,000/unit=R\$198,000

Locations above facilities are shown in the Annex 11.

#### (4) Project operation cost allocated by Brazilian side

Brazilian side provided scholarship for undergraduate, graduate, and postdoctoral students who participated in the project activities, office space, electricity, internet, driver and Embrapa car when JICA car is not available and others. The total amount allocated for scholarships is 1.46 million Reals (for reference, equivalent to around 596 thousand US dollars). For further details on scholarships, refer to the Annex 12.

DREB workshop for crops (soybean, cotton, eucalyptus, sugarcane common bean) has been held at Embrapa soybean in 2011 and 2012. The cost of the workshop was 40 thousand Reals (for reference, equivalent to around 16 thousand US dollars). The DREB project budget for soybean, cotton, eucalyptus, sugarcane and common bean at Embrapa is 4.5 million Reals (for reference, equivalent to around 1.8 million US dollars) for 4 years.

### 3-2 Outputs

#### 3-2-1 Output 1: Useful genes related to environmental stress tolerance are identified.

All of the following 3 indicators of Output 1, which are related with identification of genes involved in regulation of stress tolerance, genes for membrane proteins involved in stress perception, and genes involved in regulation of stress response, have been achieved their targets. Therefore, it can be said that Output 1 is achieved at very satisfactorily.

Indicator 1-1: At least five (5) genes involved in regulation of stress tolerance are identified in plants such as soybean.

JIRCAS identified 7 genes involved stress tolerance. The names of identified genes are *AtDREB1A*, *AtDREB2A*, *AtAREB1*, *GmAREB1*, *GmAREB2*, *GmAREB3*, and *GmAREB4*. Thus, the numerical target has been achieved.

Indicator 1-2: At least two (2) genes for membrane proteins involved in stress perception are identified in plants such as soybean.

The University of Tokyo has identified 2 genes (*GmHK1A;1* and *GmHK1B;1*) for membrane proteins involved in stress perception. The numerical target has been achieved.

Indicator 1-3: At least three (3) genes involved in regulation of stress response are identified in plants such as soybean.

RIKEN has identified 2 genes (*GmNCED3A* and *GmNCED3B*) and the University of Tokyo identified 1 gene (*GmDREB2A;2*) involved in regulation of stress response (in total three). The numerical target has been achieved.



JL



**3-2-2 Output 2: Stress-responsive promoters are isolated and combinations with useful genes are optimized.**

All of the following 3 indicators of Output 2, which are related with identification of stress-responsive genes, identification of stress-responsive promoters, and optimization of constructs of useful genes and promoters, have been achieved their targets. Therefore, it can be said that Output 2 is achieved at very satisfactorily.

Indicator 2-1: At least 100 stress-responsive genes are identified in soybean.

JIRCAS has identified more than 100 stress-response genes (4,433 drought-inducible genes have been identified and 3,371 heat-inducible genes were identified in soybean as the result of microarray analysis). The numerical target has been achieved.

Indicator 2-2: At least three (3) stress-responsive promoters are identified in soybean.

JIRCAS has identified 5 stress-responsive promoters (Gm2, Gm3, Gm4, Gm5 and Gm11) from soybean. The numerical target has been achieved. Furthermore, JIRCAS compared and analyzed the identified promoters and selected Gm3 promoter as the most useful promoter. The numerical target has been achieved.

Indicator 2-3: At least five (5) constructs of useful genes and promoters are optimized.

JIRCAS has optimized 9 constructs (J1, J2, J3, J4, J5, J6, J7, J8 and J9).

RIKEN has optimized 2 constructs (R1 and R2).

The University of Tokyo has optimized 6 constructs (T1, T2, T3, T4, T5 and T6). Although the optimization has done by Japanese side, a construct (T6) is not sent to Brazil, because MTA (Material Transfer Agreement) is not finalized yet.

The numerical target has been achieved.

**3-2-3 Output 3: Transgenic soybean lines containing constructs of promoters and useful genes are produced.**

All of the following 3 indicators of Output 3, which are related with establishment of gene transformation method, introduction of constructs of useful genes and promoters in soybean, and collection of T1 seeds, have been achieved its target. Therefore, it can be said that Output 3 is achieved at very satisfactorily.

Indicator 3-1: Genetic engineering technology with more than 1.5 % of transformation efficiency is established in soybean.

Two types of genetic engineering techniques for gene transfer have been utilized under the Project, namely particle gun method and *Agrobacterium* method. The production of DREB-transformed soybean was well advanced using particle gun method, which Embrapa has a patent and was able to carry out field



*Handwritten signature or initials.*

experiment. A Japanese researcher (Dr. Kanamori) of JIRCAS has been working to improve transformation efficiency of *Agrobacterium* mediated transformation method. Since January 2012, an Embrapa's researcher (Ms. Silvana) started transformation by using *Agrobacterium tumefaciens* EHA105, GV3101. She also tested the transformation by LB4404 for improving transformation efficiency, however efficiency was still low.

Above is the situation until the mid-term review of the Project and it was pointed out by reviewers of the mid-term review team that the transformation efficiency should be greatly improved. After the mid-term review, as the result of Dr. Kanamori's attempt to improve the transformation efficiency by improvement of protocol, changing transformation material from soybean embryo to soybean cotyledon and so on, transformation efficiency was improved to 1.74 %, which is better than 0.51% to 1.03% that are reported in literatures/papers. It should be noteworthy that not only the numerical target has been achieved but also one line of transformed soybean showed resistant to insect pest. Due to difficulty procedures to be faced in the breeding phase, Embrapa stopped to use particle gun method by October 2013 and has concentrated to use *Agrobacterium* method.

Indicator 3-2: At least five (5) constructs of useful genes and promoters are introduced in soybean.

Seven (7) combinations of promoter and useful gene (construct, J1, J2, J3, J4, J5, J6 and J7) were introduced by particle gun method and 3 constructs (J5, R1 and R2) were introduced by *Agrobacterium* method. Furthermore, 5 constructs (J9, T2, T3, T4 and T5) are being transformed by *Agrobacterium* method. Thus, numerical target has been achieved.

Indicator 3-3: T1 seeds of at least three (3) lines are collected.

Six (6) constructs (total of 29 lines) introduced by particle gun method and 3 constructs (total of 7 lines) introduced by *Agrobacterium* method have been confirmed as positive at T1 generation. Among these 5 constructs (J1, J2, J5, J6 and R1), the number of lines introduced are more than 3. Therefore, numerical target has been achieved.

#### 3-2-4 Output 4: Transgenic soybean lines with environmental stress tolerance are selected.

All of the following 6 indicators of Output 4 have been achieved its target. Therefore, it can be said that Output 4 is achieved at very satisfactorily.

Indicator 4-1: At least two (2) drought-inducible genes are identified and at least two (2) transgenic lines are selected for each construct based on gene analysis.

4,433 drought-inducible genes have been identified in soybean. Selection of transgenic lines of soybean such as *SAT1* and *SAT3* genes etc. has been carried out based on gene expression analysis. Namely, 1a line and 1b line have been selected from transgenic line introduced with the *SAT1* construct having *SAT1* gene of drought-responsive gene from *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) by gene expression analysis. In addition, the lines, 3a, 3b and 3c, introduced with *SAT3* construct, having *SAT3* gene of drought-responsive gene from *Arabidopsis* has been selected by gene expression analysis. The numerical target has been



Handwritten initials or signature, possibly 'JCC', located at the bottom right of the page.

achieved.

Indicator 4-2: At least two (2) heat-inducible genes are identified and at least two (2) transgenic lines are selected for each construct based on gene analysis.

3,317 heat inducible genes have been identified in soybean. Selection of transgenic lines of *SAT2* soybean based on gene analysis has been analyzed. Namely, soybean lines of 2a and 2b introduced with *SAT2* construct having *SAT2* gene of heat-responsive gene from *Arabidopsis* has been selected by gene expression analysis. The numerical target has been achieved.

Indicator 4-3: Gene expression of at least two (2) independent lines derived from at least two (2) constructs is analyzed.

Two (2) lines (8a and 8b) of *SAT8* construct introduced soybean and 2 lines (4a and 4b) of *SAT4* construct introduced soybean have been analyzed for gene expression. Although the delay of material transfer agreement (MTA) have been affected this analysis, the numerical target has been achieved.

Indicator 4-4: Evaluation methods of stress tolerance of soybean in greenhouse and field are established.

Experiments have been conducted in greenhouse and in field conditions to characterize physiologically and agronomically the transgenic line using parameters such as relative water content, photosynthesis, transpiration, yield components, etc.; which are described in the material and methods of the publication produced under the project. For example, one of the methodologies used to evaluate stress tolerance is plants that survive under the water deficit for 5 days and have higher photosynthesis rates and relative rate of high growth during water deficit and no leaf damage after rewatering. Embrapa Soybean has been also established the methodology for screening of stress tolerance. The numerical target has been achieved.

Indicator 4-5: Stress tolerance of at least two (2) independent lines derived from at least two (2) constructs is evaluated in greenhouse.

Eleven (11) lines derived from 5 constructs (*SAT1*, *SAT2*, *SAT3*, *SAT4* and *SAT5* constructs) of transgenic soybean have been evaluated for molecular and physiological responses at greenhouse condition. Five (5) lines containing 2 constructs (*SAT6* and *SAT7* constructs) of transgenic soybean are planned to be evaluated by the end of the project. The numerical target has been achieved.

Indicator 4-6: Stress tolerance of at least two (2) independent lines derived from at least two (2) constructs is evaluated in field.

Two (2) lines (1a line derived from *SAT1* construct and 2a line derived from *SAT2* construct) have been evaluated in field during four consecutive cropping season (2009/2010, 2010/2011, 2011/2012 and 2012/2013). 1a' line crossing between the 1a line and its parental variety, BR16, has been evaluated in field during 2011/2012 and 2012/2013. In addition to these experiments, 5a line derived from *SAT5* construct has been evaluated in 2013/2014 cropping season. As it has been difficult to use enough field area and enough seed for field test, 1 line per 1 construct has been evaluated. 5a line containing the *SAT5* gene showed very strong character of drought tolerance and also showed insect resistance in 2013/14 season



when exposed to severe drought due to very little rainfall. The numerical target has been achieved.

### 3-3 Project Purpose

**Project Purpose:** Genetic engineering technology of soybean with environmental stress tolerance is developed.

The numerical targets of all indicators for the Project purpose have been achieved and genetic engineering technologies of soybean with environmental tolerance have been developed at very satisfactorily as explained below. Therefore, it is said that level of achievement of the Project purpose is very high.

Indicator 1: At least 10 useful genes related to environmental stress tolerance are identified in plants such as soybean.

Twelve (12) useful genes related to environmental stress tolerance have been identified by the researchers of JIRCAS, the University of Tokyo and RIKEN. The numerical target has been achieved.

The table below presents the name of the genes and the number of identified genes by each institution.

Institution	Number of useful genes identified	Name of genes
JIRCAS	7	<i>AtDREB1A</i> , <i>AtDREB2A</i> , <i>AtAREB1</i> , <i>GmAREB1</i> , <i>GmAREB2</i> , <i>GmAREB3</i> , <i>GmAREB4</i>
The University of Tokyo	3	<i>GmDREB2A;2</i> , <i>GmHK1A;1</i> , <i>GmHK1B;1</i>
RIKEN	2	<i>GmNCED3A</i> , <i>GmNCED3B</i>
Total	12	

Indicator 2: At least five (5) stress-responsive promoters are identified and combinations with useful genes are optimized.

Six (6) stress-responsive promoters have been identified and 17 combinations with useful genes are optimized. The numerical target has been achieved.

#### (a) Identified promoters

- 1 stress-responsive promoter (RD29A) from Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*).
- 5 stress-responsive promoters (Gm2, Gm3, Gm4, Gm5, Gm11) from soybean.

#### (b) Optimized combinations by institution

Institution	Number of construct	Optimized combination
JIRCAS	9	J1, J2, J3, J4, J5, J6, J7, J8, J9
RIKEN	2	R1, R2
The University of Tokyo	6	T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9 *
Total	17	

\*Optimization has been done but the constructs is not sent to Brazil yet as MTA is not concluded.

Indicator 3: At least five (5) constructs of useful genes and promoters are introduced in soybean and at least three transgenic lines are produced for each construct.

Seven (7) constructs (J1, J2, J3, J4, J5, J6 and J7) of useful genes and promoters have been introduced by particle gun method in soybeans and 3 constructs (J5, R1 and R2) have been introduced in soybeans by Agrobacterium method. Currently, 5 constructs (J9, T2, T3, T4 and T5) are being introduced by Agrobacterium method. Introduction of transgene to genome has been confirmed at T0 generation. Six (6) constructs (total 29 lines) transformed by particle gun method and 3 constructs (total 7 lines) transformed by Agrobacterium method have been confirmed to be positive at T1 generation. More than three transgenic lines were produced for 5 constructs (J1, J2, J5, J6 and R1). The numerical target has been achieved.

Indicator 4: At least one (1) stress-tolerant line with environmental stress tolerance is selected.

Considering events generated and transmitted to T1 generation, experiments in greenhouse and field, and also crossing with the genotypes using 1a (SAT1 construct) and 2a (SAT2 construct) lines, that were generated particle gun method at the beginning stage of the project, were performed. It was confirmed that 1a line has character of drought tolerance. Experiment in greenhouse and field using 5a (SAT5 construct) line generated by Agrobacterium method, which was established under this project, has been carried out. 5a line showed very strong character of drought tolerance and also showed insect pest resistance. Also grain yield of event was higher in comparison with BR16 when drought occurred in vegetative and reproductive phases. In addition, this event contains herbicide (ammonium glufosinate) tolerant gene (*bar* gene) that helps breeders to develop more easily new cultivar. This *bar* gene was used as a selectable marker in the transformation process. Therefore, not only the numerical target has been achieved but also showed the important character of insect pest resistant (Damages by insect pest is a big problem in Brazil recently). However, the biosafety should be confirmed in future (after the completion of the Project).

Other outcome 1: Main developed/established genetic engineering techniques and outcomes

Main developed/established genetic engineering techniques and outcomes by research institution are as follows.

Institution	Developed techniques and main outcomes
JIRCAS	<ul style="list-style-type: none"> <li>(1) Constructs of useful genes and promoters were optimized and those constructs were provided for Embrapa Soybean.</li> <li>(2) Comprehensive gene expression analysis technology by Microarray in soybean is established.</li> <li>(3) Function of transcription factors (GmDREB1 and GmAREB) that control the environmental stress tolerance is analyzed and stress tolerant inducible promoters are identified.</li> <li>(4) JIRCAS has introduced Agrobacterium method into Embrapa Soybean and techniques on Agrobacterium have been transferred to technicians of Embrapa Soybean. Transformation efficiency has been improved jointly with Embrapa Soybean an improved protocol on Agrobacterium method was prepared.</li> <li>(5) Genetically modified soybeans, which are transformed at Embrapa Soybean, are analyzed and it is confirmed that transgene functions in soybean.</li> </ul>

RIKEN	<p>(1) Constructs of useful genes and promoters were optimized and those constructs were provided for Embrapa Soybean.</p> <p>(2) Expression and function of ABA (abscisic acid) biosynthetic enzyme GmNCED are analyzed.</p> <p>(3) Characteristics of expression and metabolism in soybean under drought stress environment are analyzed by integrative metabolome and transcriptome analysis method.</p>
University of Tokyo	<p>(1) Constructs of useful genes and promoters were optimized and those constructs were provided for Embrapa Soybean.</p> <p>(2) Functions of histidine kinase GmHK (related with environmental stress perception) and transcription factors (GmDREB2 etc.) that control the environmental stress tolerance are identified.</p>
Embrapa	<p>(1) Transformation efficiency by Agrobacterium method improved to 1.7% and transformation technique on Agrobacterium method for soybean is established at Embrapa Soybean with JIRCAS. An improved protocol on Agrobacterium method was prepared. There are several skilled technicians who can use this method.</p> <p>(2) Evaluation methods of stress tolerance of soybean in greenhouse and field are established.</p> <p>(3) It was confirmed in greenhouse that soybean lines produced using 4 kinds of construct have drought tolerant characteristic.</p> <p>(4) A line of soybean showed higher yield under drought condition as a result of field experiment in 2013/14 cropping season and this line showed insect pest resistance characteristic too. Confirmation of drought tolerance of genetically modified soybean at field experiment level is the first case in the world.</p>

Other outcome 2: Publications and patent

Number of publications and presentations are as follows.

(1) Publications:

1) Original papers

Sixty-seven (67) original papers in total (21 papers by Brazilian researchers, 41 papers by Japanese researchers, and 5 co-authored papers by Brazilian and Japanese researchers)

2) Publications such as review articles and books etc.:

Forty-six (46) in total (5 by Brazilian researchers, 38 by Japanese researchers, and 3 co-authored papers by Brazilian and Japanese researchers)

Titles and names of authors of publications are shown in the Annex 13.

(2) Patent applied

The following patent has been applied in Japan, Brazil, United States and China

Plants showing improved resistance against environmental stress and its procedure method.

Kazuko Yamaguchi-Shinozaki, Hikaru Sato and the University of Tokyo. 2013.01.22. PCT/JP2013/051210, PCT applied (Japan, Brazil, United States and China)



Handwritten mark

## **4. Results of Evaluation**

### **4-1 Relevance**

The relevance of the Project is high.

#### **4-1-1 Needs to respond to global climate change**

It is said that global warming is in progress due to an increase of greenhouse gas emissions which is related to the rapid population increase and global industrialization. Global warming has become a problem on a global scale. In many parts of the world, disasters caused by extreme weather events such as drought, torrential rains, typhoons, and hurricanes are increasingly occurring. Due to global warming, damages by drought are also increasing being reported in many parts of the world. Desertification of agricultural lands has been progressing, which is resulted in decreased yields, and this becomes a more serious problem for the production of food and animal feed.

The FAO has estimated in a recent report (World agriculture: towards 2015/2030, An FAO Perspective) that world agriculture in the years between 2015-2030 will significantly decline due to climate changes, particularly temperature rise, change of distribution of annual rainfall, reduced precipitation, and soil moisture decline. The report stressed the necessity of development of foodstuff varieties with a drought, high temperature and salt-tolerances as countermeasures.

In recent years, crop genome research has rapidly progressed and it is expected that molecular breeding technology can be used effectively for developing drought tolerant varieties. Therefore, there is a need to develop genetic engineering technology that identifies genes related to drought tolerance utilizing results of crop genome researches.

#### **4-1-2 Needs for the development of drought tolerant soybean varieties in Brazil**

Commercial production of soybeans started in the southern part of Brazil in the 1960s. Brazil is now one of the largest soybean producers (almost same production as that production of the United States of America), producing one third of soybean production in the world, and thereby has quite an important position in the supply of soybeans worldwide. Because of the increase of soybean cultivation area in Brazil, cultivation has been expanding into the mid-western part of Brazil, an erratic precipitation region of the country, and frequent drought and shortage of water resources have negatively affected soybean production (severe drought was occurred in 2011/12 and 2013/14 cropping seasons in recent years). In this situation, breeding of drought tolerant soybean plant varieties becomes one of the important research themes and research on drought tolerant soybeans using transgenic technology are therefore urgently required in Brazil.

Therefore, the need of development of a drought and heat tolerant soybean plant variety is quite important not only in Brazil but also as one of measures to deal with global climate change and to contribute stable supply of foods. Therefore this project is relevant to the needs of the target area and global society as a whole.

#### **4-1-3 Needs of the target group (Embrapa Soybean)**

Embrapa Soybean started research on a transgenic soybean plant in 1996 and succeeded to develop transgenic soybean which is tolerant to herbicide. Embrapa Soybean and JIRCAS have jointly carried out research on the "Agro-Pastoral System" and "Soybeans in South America" having a joint research

agreement in place since 1995. Joint search activities have been carried out to develop a heat tolerant soybean plant using transgenic technology since 2003. Although, soybean gene transfer technology has been developed in Brazil as mentioned above, there is the necessity to have genes for drought tolerance as well. Specifically, there remains a strong desire to succeed in the development of drought tolerant soybean plant varieties, which are genetically modified and can be cultivated in the farmers' field.

In this way, Embrapa Soybean has made considerable research and achievements in transgenic soybean development, however, the need for the development of a drought-tolerant soybean plant has become a new and urgent target of research. Therefore, this project is consistent with the needs of the target group.

#### **4-1-4 Relevance to the national development plans of Brazil**

According to the multi-year Plan 2012-2015 of the Federal Government of Brazil, the agricultural sector is very important economically and socially for Brazil. Agriculture in Brazil supplies products in domestic market, and generates employment and income. In addition, surplus of production are exported and generates significant amount of foreign currency. This plan mentions also major challenges in agricultural sector and one of that is mitigation of effects by climate change (adapting to new climate scenarios).

Under the "Agricultural and Livestock Plan 2012/2013" one of the roles of Embrapa is to contribute to the reduction of the effects of global warming on agricultural production. In other words, Embrapa Soybean will contribute to Embrapa's agricultural research on the provision of crops useful for food security and renewable energy. Innovation, research & development for agriculture and livestock sector including adaptation to climate change are regarded important.

This project is aiming at the development of technologies for producing drought tolerant soybean plant variety. Therefore, this project is consistent with the development policy of the Federative Republic of Brazil.

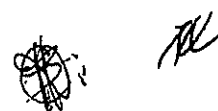
#### **4-1-5 Conformity to assistance policy of Japan to Brazil**

Basic policy of Japanese official assistance for Brazil is to provide supports for mitigating adverse effects of rapid urbanization and ensuring stable supplies of natural and food resources in taking into account the Growth Acceleration Program (Programa de Aceleração do Crescimento: PAC) of the Government of Brazil. This project is one of projects in the climate change adaptation program in the country-wise cooperation plan of the Government of Japan. Assistance to climate change adaptation is a priority issues not only for Brazil but also for the Japanese international cooperation policy. Drought tolerant soybean development technologies, which have been developed under the Project, will contribute stable production of soybeans in future, and it is expected also to contribute stable food supplies by Brazil through applying developed technologies to other crops. One of the objectives of the Project is to contribute stable soybean production adapted to environmental stresses in Brazil, therefore, this project is consistent with the Japanese cooperation policy.

#### **4-2 Effectiveness**

The Project Purpose is achieved an effective way (effectiveness of the Project is high).

As mentioned above, several genetic engineering techniques for producing environmental stress tolerant soybean have been developed. One of important genetic engineering techniques is Agrobacterium method and transformation efficiency of this method was low at the mid-term evaluation. After improvement of





protocol on transformation, the efficiency was improved and efficiency was exceeded the target value. One of the lines generated by Agrobacterium method and tested in greenhouse and field showed very strong character on drought tolerance and also insect pest resistance. Field experiment using this line was carried out 2013/14 cropping season, therefore, further experiment for confirming these characteristics is necessary, however, it can be said that this very positive results of the joint research indicate that developed genetic engineering techniques under the Project are very appropriate and effective for developing environmental stress tolerant soybean.

#### **4-3 Efficiency**

The efficiency of the Project is high in general, despite of longer time required for signing on MTA.

##### **4-3-1 Inputs by Japanese side**

Relatively large number and highly qualified Japanese researchers have been involved in the research activities of the Project in Japan (JIRCAS, RIKEN and the University of Tokyo) and they have identified useful genes. Fourteen (14) Japanese researchers and an expert have been dispatched to Embrapa Soybean in the fields of plant molecular biology, molecular breeding techniques (Agrobacterium method) and project coordinator. They have contributed to obtaining successful results of the joint research activities.

As for training program in Japan for Brazilian researchers, 11 persons in the field of biotechnology have participated in. It seems that the trainings in Japan have shown high effectiveness in improving not only capacity of researchers of Embrapa but also capacity development of university students (9 persons participated in), and contributed for carrying out research activities related with the Project.

It seems that machinery, equipment and facilities which were provided by Japanese side for Embrapa Soybean have been utilized effectively for Project activities in general. A cooling system for a new greenhouse (which has 4 separated rooms) was not worked properly in certain period. After the repair of the cooling system by the suppliers, this system has been running good in general, however, often adjustment of temperature has been required.

##### **4-3-2 Inputs by Brazilian side**

Relatively large number and highly qualified researchers of Embrapa Soybean and university students<sup>1</sup> have involved in the research activities of the Project at Embrapa Soybean. It seems that degree of involvement of researchers/ technicians etc. at Embrapa Soybean is appropriate and their positive involvement was an important success factor in developing promising drought tolerant line of soybean as tested in field experiment.

Embrapa has procured various kinds of research equipment and facilities, and constructed a new biotechnology building for the Project. Embrapa has facilitated existing laboratories, greenhouses, field experiment facilities. These kinds of arrangement done by Embrapa Soybean are also important factors for making a great progress in Project activities.

Other factors that promoted effective progress of the Project activities are allocation of running expenses by Embrapa such as electricity, water, and consumables, and also provision of scholarship for university students.

---

<sup>1</sup> Undergraduate students and graduate students who received scholarship



#### **4-3-3 Communication between Brazilian and Japanese researchers**

Good communication and coordination between Brazilian and Japanese researchers have been taken using e-Mail, TV-conference system, etc. and effective exchange of scientific knowledge and skills on genetic engineering technology on plant brought good progress of the Project activities.

#### **4-3-4 Material Transfer Agreement (MTA)**

In order to ship the constructs from Japan to Embrapa Soybean and to ship soybean seeds from Brazil to Japan, MTA is necessary between Embrapa and institution in Japan every time. Usually a lot of time on examination of document on MTA is required in Embrapa and affecting smooth progress of Project activities. Duration necessary for signing on MTA was shortened for a while after the mid-term evaluation, however, it has turned to previous situation after that.

#### **4-4 Impact**

##### **4-4-1 Prospect for achieving the overall goal**

**Overall Goal: Soybeans adapted to environmental stresses are developed, which contributes to the stabilization of the soybean production in Brazil.**

It is difficult to say that the Overall Goal of the Project will be achieved by 2019 considering time consuming steps required for commercialization of genetically modified soybean. It may take around 8 to 10 years at least after the completion of the Project. When a drought tolerant line ready for marketing is developed, it will give a great impact not only in Brazil but also in the world.

Indicator: Soybeans adapted to environmental stresses are developed before 2019.
--

According to Embrapa Soybean, it may take in general 12 to 20 years for developing a new commercial genetically modified soybean from start of research for gene discovery to commercialization of a new variety which has characteristics of environmental stress tolerance such as drought tolerance.

As a result of the joint research under the Project, a promising elite event which is drought tolerant was identified. There are other candidates of elite event which are tested at field and it is expected that some more candidates will be identified (5 kinds of genes are under transformation) as elite event. Field experiment using candidates of elite event should be carried out for several years to confirm drought tolerance. After that, most promising elite event(s) will be tested at field of different locations and biosafety evaluation are also required. In addition to these tests, deregulation not only in Brazil but also in major soybean importing countries (European countries, China and Japan, etc.) is necessary for enabling GM soybean export. Thus, it is, at the moment, difficult to prospect duration and cost necessary for deregulation. Assumed steps from start of research to commercialization of genetically modified soybean are indicated in Annex 14.

This project will terminate in March 2015 and there are only 4 or 5 years for the year 2019. Therefore, it would be rather difficult to develop drought tolerant soybean variety as a commercial variety by then. Around 10 years would be necessary to commercialize environmental stress tolerant soybean variety.

##### **4-4-2 Other potential impacts in future**

###### **(1) Impact of development of drought tolerant soybean commercial variety**

As mentioned above, it will take many years to obtain commercial variety. When commercial variety is developed, its impact will be very significant for farmers facing reduced production of soybean by drought not only in Brazil but also in other soybean producing countries such as Argentina, Paraguay and African countries.

**(2) Usefulness of knowledge and techniques developed under the Project**

Identified genes, promoters, database on their expression and metabolism, microarray analysis technique etc. can be used for basic research and developing and development of environmental stress tolerant plants not only soybean but also other crops

**(3) Usefulness of improved transformation efficiency of Agrobacterium method**

Agrobacterium method can be used not only in transforming drought tolerant genes but also in transforming other useful genes in soybean. Therefore it is expected to become possible to develop soybean varieties that have various useful characteristics.

**(4) Usefulness of developed technique on Microarray analysis**

Techniques on Microarray analysis can be used for analyzing molecular property of transgenic plant and provide information of impact on safety and ecology.

**4-5 Sustainability**

Sustainability of the Project will be secured in terms of policy, organizational, and technical aspects. Developed genetic engineering technology of soybean with environmental stress tolerance can be utilized in sustainable way by Embrapa for developing drought tolerant soybean variety. However, it is said in general, a large amount of budget is required for biosafety evaluation and deregulation procedures, therefore, it is important to seek partners who could have an interest in commercialization of genetically modified organisms (GMO) of transformed soybean and have financial capacity.

**4-5-1 Policy aspect**

As mentioned in the item of the relevance, for Brazil, mitigation of effects by climate change (adapting to new climate scenarios) is a major challenge in agricultural sector. Soybean is one of very important crops for Brazil economically and socially. One of the important roles of Embrapa is to contribute reduction of effects of global warming on agricultural production. Therefore, sustainability policy of the Project will be secured.

**4-5-2 Organizational aspect**

Embrapa Soybean has necessary research sections and organizational setup for developing genetically modified soybeans such as biotechnology, physiology and breeding etc. with highly qualified researchers, technicians and university students. Embrapa Soybean has experiences in developing genetically modified soybeans (herbicide tolerant) jointly with a private company. Therefore, organizational sustainability for continuing development of stress tolerant soybean is secured.

The following table shows human resources of Embrapa Soybean.

	Category	Information obtained at the Mid-term Review (Sep. 2012)	Current situation at the Terminal Evaluation (Oct. 2014)
1.	Regular staff	310 employees (70 scientific researchers and 240 support staff for	313 employees (69 scientific researchers and 244 support

		research)	staff for research)
2-1	Embrapa Technology Transfer	7 persons	8 persons
2-2	Students	167 persons	178 persons
2-3	Partners and outsourcing workers	85 persons	91 persons
Total		569 persons	590 persons

#### 4-5-3 Financial aspect

As mentioned in the article of the inputs, Embrapa invested significant amounts of budget for procuring machinery, equipment and construction of new biotechnology building, and running expenses. However, very large amount of financial resources are required for carrying out biosafety evaluation of GM crops and proceeding deregulation procedures in Brazil and major soybean importing countries. Therefore, in order to develop and commercialize stress tolerant soybean variety, it is necessary to seek financial resources and/or partners which can support the cost.

For reference, the following table shows the annual budget of Embrapa Soybean in past three years.

Year	Annual budget	Equivalent in US dollar
2012	R\$ 52,026,362	21,235,250
2013	R\$ 58,424,906	23,846,900
2014 (estimated)	R\$ 51,520,971	21,028,968

#### 4-5-4 Technical aspect

As mentioned before, Embrapa Soybean has experiences in developing genetically modified soybeans (herbicide tolerant) in cooperation with a private company. In addition, Embrapa Soybean has conducted researches on stress tolerant soybean jointly with JIRCAS from 2003. Therefore, Embrapa Soybean has quite high expertise in this field. Technicians of Embrapa Soybean have acquired skills of the Agrobacterium transformation method with higher transformation efficiency. Evaluation methods of stress tolerance of soybean in greenhouse and field are established at Embrapa Soybean. Considering Embrapa's accumulated experiences for developing GM soybeans and techniques developed under the Project, technical sustainability for continuing development of stress tolerant soybean will be secured.

#### 4-6 Conclusions

The Joint Terminal Evaluation Team has confirmed that degree of achievement of all outputs and the Project Purpose is at very satisfactorily. As the results of the research activities, scientific knowledge and information on genetic engineering technology of soybean with environmental stress tolerance have been accumulated and various useful techniques have been established. A line of transgenic soybean showed higher drought tolerance and insect pest tolerant characters as a result of field experiment. There are some more types of gene which will be tested at greenhouse and field levels. It is expected that more varieties of soybean may have environmental stress tolerant characteristics. Although, there are several steps and challenges in future for developing commercial variety which can be used by farmers, it can be said that developed technology under the Project is very useful not only for basic research but also research activities toward developing soybean commercial variety.

The summary of evaluation based on five evaluation criteria is described in the table below.

Criteria	Evaluation
Relevance	High
Effectiveness	High
Efficiency	High in general
Impact	Around 10 years will be necessary to attain the Overall Goal. Several potential impacts for future are observed.
Sustainability	Likely to be high

## 5. Recommendations and Lessons Learned

### 5-1 Recommendations

#### 5-1-1 Recommended actions to be taken by the Project in the remaining cooperation period

##### Acceleration of finalization of MTA

A construct (T6) is not sent from Japan to Brazil, because MTA is not finalized yet. MTAs for sending GM soybean seeds (soybeans with SAT6 and SAT7 constructs) are under preparation in Embrapa. It is necessary for Embrapa to accelerate finalization of MTA in order to carry out gene transformation or analysis.

#### 5-1-2 Recommended actions to be taken after the termination of the Project

##### (1) Budget allocation for purchasing and installing cooling system for greenhouse

The greenhouse, which was constructed under the Project, has 4 separated rooms. 2 rooms out of 4 rooms have cooling system which was installed with budget allocated by Japanese side. In order to carry out efficient and precise greenhouse experiments using genes which are under transformation currently and genes which will be transformed in future, Embrapa should allocate budget for cooling system for remaining 2 rooms.

##### (2) Important points toward commercialization

###### 1) Strategy for commercialization

It is recommended that Embrapa Soybean in consultation with Japanese institutions concerned (JIRCAS, RIKEN, and the University of Tokyo) starts to formulate the strategy to clarify detailed steps for commercialization.

###### 2) Continuation of cooperative relationship

It is expected that Embrapa Soybean and Japanese research institutions involved in the Project continue cooperative relationship toward commercialization of soybean variety.

###### 3) Analysis of potential on insect resistant expression in soybean which *SAT5* gene is introduced.

It was said that *SAT5* gene has function to express drought and salt (sodium chloride) tolerances. It is expected that Embrapa Soybean and Japanese research institution involved in the Project analyze whether *SAT5* gene has additional potential for giving insect pest resistance in soybean.

###### 4) Field experiments at locations where drought climate condition is occurred more frequently

Field experiments using fields with rainout shelters and normal field in Embrapa Soybean have been

carried out every year during the project period and water deficit condition or drought situation at the fields was occurred only in 2013/14 cropping season. Embrapa Soybean locates in an area where frequency of occurrence of drought is fewer than other areas, therefore, it is necessary to carry out field experiments at areas where climate condition is different. It is expected for Embrapa Soybean to take necessary measures for implementing field experiments at other areas in 2015/16 cropping season.

#### **5) Biosafety risk assessment and deregulation**

A large amount of funds will be necessary for carrying out biosafety risk assessment and deregulation procedures. Therefore, it is necessary to select appropriate partner from private companies for these biosafety risk assessment and deregulation. When Embrapa Soybean set up partnership, Embrapa should consider contents of agreement so as not to only private sector get exclusive rights and benefits.


#### **5-2 Lessons Learned**

##### **(1) Contributing factors that brought significant research results**

There are excellent research results of the Project in development of genetic engineering technology of soybean with environmental stress tolerance and development of drought tolerant soybean line. Main contributing factors in obtaining significant research results are past joint research results produced by Embrapa Soybean and JIRCAS, good relationship built between Embrapa Soybean and JIRCAS. Other factor is that research activities under the Project have been carried out by defining roles and responsibilities of Brazilian and Japanese research institutions.

##### **(2) Acceleration of MTA procedure**

Because longer period necessary until signing MTA was taking into consideration, there was no significant negative effect on the progress of the Project activities. However, it took very long period from start of preparation of draft MTA until signing on MTA (around one year at the beginning of the project term and more than half year in later half of the project term). Notary translations of full text of MTA document from English to Portuguese is needed for every MTA document, even in the case that on name of material (construct) to be sent from Japan to Brazil is different. It is also needed to monitor whether examination of MTA document has not stopped somewhere in Embrapa. It is necessary to decide in advance about procedures of examination of MTA document and standard format of MTA document for accelerating MTA procedure, when similar project or joint research is carried out in future.



**Annex 1 Schedule of the Terminal Evaluation**

Date			Brazilian Evaluation Members	Japanese Evaluation Members (JICA)		JIRCAS	Japanese Evaluation Members (JST)				
			Dr. Molinari and Dr. Gonçalves	Dr. Nagayo and Dr. Adachi	Mr. Dojun	Dr. Nakashima and Dr. Kanamori	Dr. Asanuma	Mr. Sato			
1	19-Oct	Sun			Leave Japan						
2	20-Oct	Mon			Arrival at Londrina						
3	21-Oct	Tue			Meeting with Japanese Expert Courtesy call to Head General of Embrapa Soybean Interview with researchers of Embrapa Soybean						
4	22-Oct	Wed			Observation of experimental field Interview with researchers of Embrapa Soybean						
5	23-Oct	Thu			Interview with researchers of Embrapa Soybean						
6	24-Oct	Fri			Visit to office of an agricultural cooperative (Integrada) and soybean farmers						
7	25-Oct	Sat			Documentation						
8	26-Oct	Sun			Leave Japan				Documentation	Leave Japan	Leave Japan
9	27-Oct	Mon			Arrival at Londrina				Additional information collection	Arrival at Londrina	Leave Japan
				Meeting with Japanese Expert, Internal meeting among Japanese evaluation members			Same with JICA members				
10	28-Oct	Tue	Courtesy call to Embrapa Soybean and interview Explanation about evaluation method to Brazilian evaluation team members Interview with researchers of Embrapa Soybean Visit and observation of processing facilities of soybean			Arrival at Londrina	Same with JICA members				
11	29-Oct	Wed	Facility Observation (laboratory, greenhouse, experimental field of Embrapa Soybean) Receiving presentation about progress report by Japanese & Brazilian sides, and question and answer								
12	30-Oct	Thu	Interview with a researcher of Embrapa Soybean Receiving presentation on research activities using DREB gene for other crops (Sugarcane, Cotton, and Maize) Interview with researchers of Embrapa Soybean								
13	31-Oct	Fri	Receiving explanation about research activities to be carried out (proposed project) Discussion on draft terminal evaluation report by Joint Evaluation Team								
14	1-Nov	Sat	Documentation								
15	2-Nov	Sun	Documentation			Leave Londrina	Documentation				
16	3-Nov	Mon	Discussion on draft terminal evaluation report by Joint Evaluation Team				Same with JICA members				
17	4-Nov	Tue	Finalization on the terminal evaluation report by Joint Evaluation Team Explanation of summary of the terminal evaluation report to main researchers of Embrapa Soybean Sign on the terminal evaluation report.								
18	5-Nov	Wed	JCC meeting, presentation of results of the terminal evaluation to stakeholders, and sign on M/M (Minutes of Meeting)								
19	6-Nov	Thu		leave Londrina, arrive at Brasilia			Leave Londrina				
20	7-Nov	Fri		Report to JICA Brazil Office Report to the Embassy of Japan Visit to Embrapa Headquarters Report to DCTEC of the Ministry of External Relations							
21	8-Nov	Sat		Leave Londrina							
22	9-Nov	Sun		(via Atlanta)							
23	10-Nov	Mon		Arrive at Japan							

## Annex 2 Project Design Matrix (version 1 and 2)

(1) PDM Version 1

Site of the Project: Londrina City, the State of Parana, Brazil

Direct beneficiary: Embrapa Soybean

Period of collaboration: From Mar 2010 to Mar 2015

Prepared: August 31, 2009 (Minutes of Meetings)

Brief of project	Objectively Verifiable Indicator	Means of Verification	Important Assumption
<p><b>[Overall Goal]</b> Soybeans adapted to environmental stresses are developed, which contributes to the stabilization of the soybean production in Brazil.</p>	Soybeans adapted to environmental stresses are developed before 2019.	---	---
<p><b>[Project purpose]</b> Genetic engineering technology of soybean with environmental stress tolerance is developed.</p>	<p>1. At least 10 useful genes related to environmental stress tolerance are identified in plants such as soybean.                      2. At least five (5) stress-responsive promoters are identified and combinations with useful genes are optimized.                      3. At least five (5) constructs of useful genes and promoters are introduced in soybean and at least three transgenic lines are produced for each construct.                      4. At least one (1) stress-tolerant line with environmental stress tolerance is selected.</p>	---	---
<p><b>[Outputs]</b> 1. Useful genes related to environmental stress tolerance are identified.</p>	<p>1-1 At least five (5) genes involved in regulation of stress tolerance are identified in plants such as soybean.                      1-2 At least two (2) genes for membrane proteins involved in stress perception are identified in plants such as soybean.                      1-3 At least three (3) genes involved in regulation of stress response are identified in plants such as soybean.</p>	---	---
<p>2. Stress-responsive promoters are isolated and combinations with useful genes are optimized.</p>	<p>2-1 At least 100 stress-responsive genes are identified in soybean.                      2-2 At least three (3) stress-responsive promoters are identified in soybean.                      2-3 At least five (5) constructs of useful genes and promoters are optimized.</p>	---	---
<p>3. Transgenic soybean lines containing constructs of promoters and useful genes are produced.</p>	<p>3-1 Genetic engineering technology with more than 2 % of transformation efficiency is established in soybean.                      3-2 At least five (5) constructs of useful genes and promoters are introduced in soybean.                      3-3 T1 seeds of at least three (3) lines are collected.</p>	---	---
<p>4. Transgenic soybean lines with environmental stress tolerance are selected.</p>	<p>4-1 At least two (2) drought-inducible genes are identified and at least two (2) transgenic lines are selected for each construct based on gene analysis.                      4-2 At least two (2) heat-inducible genes are identified and at least two (2) transgenic lines are selected for each construct are selected based on gene analysis.                      4-3 Gene expression of at least two (2) independent lines derived from at least two (2) constructs is analyzed.                      4-4 Evaluation methods of stress tolerance of soybean in greenhouse and field are established.                      4-5 Stress tolerance of at least two (2) independent lines derived from at least two (2) constructs is evaluated in greenhouse.                      4-6 Stress tolerance of at least two (2) independent lines derived from at least two (2) constructs is evaluated in field.</p>	---	---



MK



[Activities]	[Inputs]		
<p>1-1 Genes involved in regulation of stress tolerance are identified in plants such as soybean.</p> <p>1-2 Genes involved in stress perception are identified in plants such as soybean.</p> <p>1-3 Genes involved in regulation of stress response are identified in plants such as soybean.</p> <p>2-1 Stress-responsive genes are searched in soybean.</p> <p>2-2 Stress-responsive promoters are identified in soybean.</p> <p>2-3 Constructs of useful genes and promoters are optimized.</p> <p>3-1 Genetic engineering technology is established in soybean.</p> <p>3-2 Constructs of useful genes and promoters are introduced in soybean.</p> <p>3-3 T1 seeds of transgenic lines are collected.</p> <p>4-1 Drought-inducible genes are identified and transgenic lines are selected based on gene analysis.</p> <p>4-2 Heat-inducible genes are identified and transgenic lines are selected based on gene analysis.</p> <p>4-3 Gene expression of transgenic plants is analyzed.</p> <p>4-4 Evaluation methods of stress tolerance of soybean are established.</p> <p>4-5 Stress tolerance of transgenic soybean lines is evaluated in greenhouse.</p> <p>4-6 Stress tolerance of transgenic soybean lines is evaluated in field.</p>	<Japanese side>	<Brazilian side>	---
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• the Project Coordinator</li> <li>• Short-term researchers</li> <li>• Invitation of Brazilian researchers to Japan</li> <li>• the Equipment</li> <li>• Partial contribution for expenses of contract with two post-doctoral researchers (or one post-doctoral and one post-master researcher) and two technicians.</li> <li>• Cost for project and others</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Arrangement of researchers and technicians</li> <li>• Partial contribution for expenses of contract with two post-doctoral researchers (or one post-doctoral and one post-master researcher) and two technicians.</li> <li>• Offer of facilities and project office</li> <li>• the Equipment and running cost</li> <li>• Securement of cost for project</li> </ul>	<p>---</p> <p><b>[Pre-Conditions]</b></p> <p>---</p>

**(2) PDM Version 2**

Site of the Project: Londrina City, the State of Parana, Brazil

Direct beneficiary: Embrapa Soybean

Period of collaboration: From Mar 2010 to Mar 2015

Version 2: Modified in February 15, 2012

Brief of project	Objectively Verifiable Indicator	Means of Verification	Important Assumption
<p><b>[Overall Goal]</b> Soybeans adapted to environmental stresses are developed, which contributes to the stabilization of the soybean production in Brazil.</p>	<p>Soybeans adapted to environmental stresses are developed before 2019.</p>	<p>--</p>	<p>--</p>
<p><b>[Project purpose]</b> Genetic engineering technology of soybean with environmental stress tolerance is developed.</p>	<p>1. At least 10 useful genes related to environmental stress tolerance are identified in plants such as soybean. 2. At least five (5) stress-responsive promoters are identified and combinations with useful genes are optimized. 3. At least five (5) constructs of useful genes and promoters are introduced in soybean and at least three transgenic lines are produced for each construct. 4. At least one (1) stress-tolerant line with environmental stress tolerance is selected.</p>	<p>--</p>	<p>--</p>
<p><b>[Outputs]</b> 1. Useful genes related to environmental stress tolerance are identified.</p>	<p>1-1 At least five (5) genes involved in regulation of stress tolerance are identified in plants such as soybean. 1-2 At least two (2) genes for membrane proteins involved in stress perception are identified in plants such as soybean. 1-3 At least three (3) genes involved in regulation of stress response are identified in plants such as soybean.</p>	<p>--</p>	<p>--</p>
<p>2. Stress-responsive promoters are isolated and combinations with useful genes are optimized.</p>	<p>2-1 At least 100 stress-responsive genes are identified in soybean. 2-2 At least three (3) stress-responsive promoters are identified in soybean. 2-3 At least five (5) constructs of useful genes and promoters are optimized.</p>	<p>--</p>	
<p>3. Transgenic soybean lines containing constructs of promoters and useful genes are produced.</p>	<p>3-1 Genetic engineering technology with more than 1.5 % of transformation efficiency is established in soybean. 3-2 At least five (5) constructs of useful genes and promoters are introduced in soybean. 3-3 TI seeds of at least three (3) lines are collected.</p>	<p>--</p>	
<p>4. Transgenic soybean lines with environmental stress tolerance are selected.</p>	<p>4-1 At least two (2) drought-inducible genes are identified and at least two (2) transgenic lines are selected for each construct based on gene analysis. 4-2 At least two (2) heat-inducible genes are identified and at least two (2) transgenic lines are selected for each construct are selected based on gene analysis. 4-3 Gene expression of at least two (2) independent lines derived from at least two (2) constructs is analyzed. 4-4 Evaluation methods of stress tolerance of soybean in greenhouse and field are established. 4-5 Stress tolerance of at least two (2) independent lines derived from at least two (2) constructs is evaluated in greenhouse. 4-6 Stress tolerance of at least two (2) independent lines derived from at least two (2) constructs is evaluated in field.</p>	<p>--</p>	

[Activities]	[Inputs]		
<p>1-1 Genes involved in regulation of stress tolerance are identified in plants such as soybean.</p> <p>1-2 Genes involved in stress perception are identified in plants such as soybean.</p> <p>1-3 Genes involved in regulation of stress response are identified in plants such as soybean.</p> <p>2-1 Stress-responsive genes are searched in soybean.</p> <p>2-2 Stress-responsive promoters are identified in soybean.</p> <p>2-3 Constructs of useful genes and promoters are optimized.</p> <p>3-1 Genetic engineering technology is established in soybean.</p> <p>3-2 Constructs of useful genes and promoters are introduced in soybean.</p> <p>3-3 T1 seeds of transgenic lines are collected.</p> <p>4-1 Drought-inducible genes are identified and transgenic lines are selected based on gene analysis.</p> <p>4-2 Heat-inducible genes are identified and transgenic lines are selected based on gene analysis.</p> <p>4-3 Gene expression of transgenic plants is analyzed.</p> <p>4-4 Evaluation methods of stress tolerance of soybean are established.</p> <p>4-5 Stress tolerance of transgenic soybean lines is evaluated in greenhouse.</p> <p>4-6 Stress tolerance of transgenic soybean lines is evaluated in field.</p>	<Japanese side>	<Brazilian side>	---
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• the Project Coordinator</li> <li>• Short-term researchers</li> <li>• Invitation of Brazilian researchers to Japan</li> <li>• the Equipment</li> <li>• Partial contribution for expenses of contract with two post-doctoral researchers (or one post-doctoral and one post-master researcher) and two technicians.</li> <li>• Cost for project and others</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Arrangement of researchers and technicians</li> <li>• Partial contribution for expenses of contract with two post-doctoral researchers (or one post-doctoral and one post-master researcher) and two technicians.</li> <li>• Offer of facilities and project office</li> <li>• the Equipment and running cost</li> <li>• Securement of cost for project</li> </ul>	<p>[Pre-Conditions]</p> <p>---</p>

### Annex 3 List of Japanese Researchers Involved in the Project Activities

#### (1) Group 1 for searching for useful genes to function in response and tolerance to environmental stress (Biological Resources and Post-harvest Division, JIRCAS)

No.	Name	Position	Organization	Period of participation into research activities	
				From	To
1	Kazuo Nakashima	Project leader, Biological Resources and Post-harvest Division	JIRCAS	Mar. 2010	At present
2	Kazuko Yamaguchi-Shinozaki	Former project leader, Biological Resources and Post-harvest Division	JIRCAS	Mar. 2010	Mar. 2013
3	Yasunari Fujita	Senior Researcher	JIRCAS	Mar. 2010	At present
4	Kyonoshin Maruyama	Senior Researcher	JIRCAS	Mar. 2010	At present
5	Norihito Kanamori	Senior Researcher	JIRCAS	Apr. 2010	At present
6	Yukari Nagatoshi	Researcher	JIRCAS	Apr. 2013	At present
7	Megumu Yano	Research Assistant	JIRCAS	Apr. 2013	At present
8	Kyoko Yoshihara	Research Assistant	JIRCAS	Apr. 2013	At present
9	Daisuke Todaka	Post-Doctoral Fellow	JIRCAS	Apr. 2010	Mar. 2011
10	Kensuke Kodaira	Post-Doctoral Fellow	JIRCAS	Nov. 2011	Mar. 2013

#### (2) Group 2 for searching for regulatory genes involved in environmental stresses (Plant Science Center/ Center for Sustainable Resource Science, RIKEN)

No.	Name	Position	Organization	Period of participation into research activities	
				From	To
1	Kazuo Shinozaki	Director, Plant Science Center (PSC)	RIKEN	Mar. 2010	At present
2	Hironori Takasaki	Post-Doctoral Fellow	RIKEN	Apr. 2011	At present
3	Kaoru Urano	Research Scientist, PSC	RIKEN	Jul. 2010	At present
4	Taishi Umezawa	Research Scientist, PSC	RIKEN	Mar. 2010	Jun. 2011
5	Tetsuya Sakurai	Unit Leader, Integrated Genome Informatics Research Unit, PSC	RIKEN	Mar. 2010	Mar. 2013

#### (2) Group 3 for searching for receptor genes involved in environmental stresses (Laboratory of Plant Molecular Physiology, the University of Tokyo)

No.	Name	Position	Organization	Period of participation into research activities	
				From	To
1	Kazuko Yamaguchi-Shinozaki	Professor, Laboratory of Plant Molecular Physiology	University of Tokyo	Mar. 2010	At present
2	Yuriko Osakabe	Lecturer	University of Tokyo	Mar. 2010	Jul. 2011
3	Daisuke Todaka	Special Research Fellow	University of Tokyo	Mar. 2010	Mar. 2010

No.	Name	Position	Organization	From	To
4	Junya Mizoi	Lecturer	University of Tokyo	Apr. 2010	At present
5	Satoshi Kidokoro	Assistant Professor	University of Tokyo	Apr. 2010	At present
6	Takuya Yoshida	Program Specific Researcher	University of Tokyo	Jul. 2011	Mar. 2014
7	Junro Mogami	Project Researcher	University of Tokyo	Apr. 2014	At present
8	Tomoko Watanabe	Technical Assistant	University of Tokyo	Apr. 2013	At present
9	Naohiko Ohama	Graduate School Student	University of Tokyo	Apr. 2010	At present
10	Teru Sato	Graduate School Student	University of Tokyo	Apr. 2010	At present
11	Tepei Ohori	Graduate School Student	University of Tokyo	Apr. 2010	Mar. 2012
12	Aya Tanaka	Graduate School Student	University of Tokyo	Apr. 2010	Mar. 2012
13	Keita Nagamachi	Graduate School Student	University of Tokyo	Apr. 2010	Mar. 2012
14	Haruka Ohiraki	Graduate School Student	University of Tokyo	Apr. 2012	Mar. 2013
15	Keitaro Watanabe	Graduate School Student	University of Tokyo	Apr. 2010	Mar. 2013
16	Midori Abekura	Graduate School Student	University of Tokyo	Apr. 2012	Mar. 2013
17	Shinya Koizumi	Graduate School Student	University of Tokyo	Apr. 2012	At present
18	Maika Nagata	Graduate School Student	University of Tokyo	Apr. 2013	Apr. 2014



*Handwritten signature or initials.*



**Annex 5 Brazilian Researchers Trained in Japan**

No.	Name	Position	Organization	Venue of training	Theme of Training	Training period		
						From	To	Days
1	Ms. Amanda Alves de Paiva Rolla	Student of Master course	State University of Londrina/ Embrapa Soybean	JIRCAS	Expression analysis technology on soybean stress-inducible genes	4-Jun-10	15-Jan-11	226
2	Dr. Alexandre Lima Nepomuceno	Senior Researcher/ Project Leader	Embrapa Soybean	JIRCAS	Participation in the Kick-off Meeting of the Project	16-Jul-10	22-Jul-10	7
3	Ms. Silvana Regina Rockenbach Marin	Chief of Laboratory	Embrapa Soybean	JIRCAS	Expression analysis technology on soybean stress-inducible genes	22-Aug-10	11-Nov-10	82
4	Ms. Maria Cecilia do Amaral Soldera	Technician	(Employed with Japanese budget)	JIRCAS	Isolation techniques for promoters related to soybean drought resistance genes	15-Oct-11	18-Dec-11	65
5	Ms. Cibelle Engels	Student of Doctor course	State University of Londrina/ Embrapa Soybean	JIRCAS	Expression analysis technology on soybean stress-inducible genes	27-Nov-11	6-Sep-12	285
6	Ms. Maria Cecilia do Amaral Soldera	Technician	(Employed with Japanese budget)	JIRCAS	Techniques on Agrobacterium-mediated transformation and expression analysis	17-Jul-12	30-Aug-12	45
7	Ms. Liliane Marcia Mertz Henning	Researcher	Embrapa Soybean	JIRCAS	Physiological experiment on soybean tolerant evaluation and gene expression analysis technology	2013/10/30	20-Dec-13	52
8	Mr. Thiago Jonas Nakayama	Graduate school student	Viçosa University/ Embrapa Soybean	JIRCAS	Expression analysis technology on transformed soybean	2014/6/29	28-Sep-14	92
9	Dr. Alexandre Lima Nepomuceno	Senior Researcher/ Project Leader	Embrapa Soybean	JIRCAS	Discussions on development of molecular breeding technology for producing stress tolerant crops	2014/7/20	2-Aug-14	14
10	Ms. Rafaela Ribeiro Reis	Graduate school student	State University of Londrina/ Embrapa Soybean	JIRCAS	Gene expression analysis technology for transformed soybean	2014/9/4	21-Sep-14	18
11	Ms. Juliane Praela Marinho	Graduate school student	University of North Parana/ Embrapa Soybean	JIRCAS	Gene expression analysis technology for transformed soybean	2014/9/4	21-Sep-14	18
12	Ms. Mayla Daiane Correa Molinari	Graduate school student	Embrapa Soybean	RIKEN	Expression analysis technology of drought stress-responsive genes of crops using next-generation sequencing	2014/10/21	11-Nov-14	22
13	Ms. Patricia Teruko Honna	Graduate school student	São Paulo State University/ Embrapa Soybean	University of Tokyo	Analysis technology of physiological and biochemical characteristics related with response of drought stress of soybean under use of automatic irrigation facilities, and others	2014/10/21	11-Nov-14	22



*Handwritten mark or signature.*

Annex 6 Equipment Provided by Japanese Side for Brazilian Implementing Agency (Embrapa Soybean)

	Place of procurement	Name of equipment	Maker	Model	Main Specification	Quantity	Unit Price (Yen)	Amount (Yen)	Price (Real)	Location of use	Date of arrival	Remarks
1	Brazil	Vehicle	Mitsubishi	Pajero TR4	4WD, Engine (2.0 liters, 16V, 100HP)	1			R\$ 78,000.00		20100319	
2	Brazil	Air conditioner	AAC conditioned	Split	22.000/18.000BTUS	2			R\$ 8,790.00	Biotechnology	20100329	
3	Brazil	Hygrometer	Gehaka	G-800	Range of temperature: 5 ~50°C Humidity accuracy: +/- 0.1%	1			R\$ 6,000.00	Biotechnology	20100318	
4	Brazil	Refrigerator	Electrolux	DC48	462L, 220V, 70.2 x 186.5 x 73.3cm	2			R\$ 3,538.00	Biotechnology	20100326	
5	Brazil	Freezer	Censul	300	246L, 110V, 61.6 x 170 x 69.1	2			R\$ 3,198.00	Biotechnology	20100326	
6	Brazil	Computer	Dell	Inspiron 580 BCC	With monitor and software	6			R\$ 20,472.66	Biotechnology	20100810	
7	Brazil	Printer	HP	HPCP 1515N	Color with scanner	2			R\$ 1,940.00	Biotechnology	20100810	
8	Brazil	Computer (Note type)	Dell	Vostro 13	13 inches, Intel Core 2 Duo T8100	2			R\$ 6,922.54	Biotechnology	20100810	
9	Brazil	Weight scale	Balmak	Be Mod MP-25	25kg, 37 x 37 x 12cm, LED display	2			R\$ 1,088.01	Biotechnology	20100326	
10	Brazil	Low temperature seed storage	Von Stein Refrigeradora	Von Stein Refrigeradora	2 units of digital timer, 2 compressors, 2 evaporators, 3.5m x 2.5m x 2.9m	1			R\$ 21,855.00	Biotechnology	20100731	
11	Brazil	GPS	Garmin	Map60 CXS	Micro SD card, High sensitivity GPS receiver, color TFT, altimeter/ atmospheric pressure/ altitude meter	2			R\$ 2,943.00	Field	20110105	
12	Brazil	pH meter	SPLabor	FX-2,00	16.00PH	2			R\$ 620.00	Biotechnology	20110111	
13	Brazil	Tablet computer	Apple	iPAD 1	Wi-Fi 6463G	2			R\$ 5,395.00	Biotechnology	20110211	
14	Brazil	Meteorological observation equipment	J C da Silva	J C da Silva	Sonder and data logger	2			R\$ 30,521.58	Field	20110221	
15	Brazil	Magnetic stirrer	Fisatom	753A	120 - 1800 RPM, capacity 10L	3			R\$ 3,060.00	Biotechnology	20110223	
16	Brazil	Field alarm system	Alarme System	Alarme System	2 channels video server, dome camera, protection box, telephone cable, radio 5750APSG, 5700MP5G	1			R\$ 19,361.00	Field	20110310	
17	Brazil	Data logger	Hobo	U10,U23,U4, U14	Temperature: -40 ~70°C, humidity: 0~100%	14			R\$ 9,913.00	Ecological physiology	20110325	
18	Brazil	Microscope with camera	Motic	SMZ168	Zoom 1:6.7, scope: 0.75X-5X, max 320X, illumination control: 12v/10W	2			R\$ 10,598.00	Biotechnology	20110329	
19	Brazil	Oximeter	Lutron	DO-5519	Humidity: Máx. 80%, Range of temperature: 0° C - 50°C, DC 6.2mA	2			R\$ 1,915.98	Ecological physiology	20110404	
20	Brazil	Data logger	HOBO	U14-002	Memory 1MB, 36,000 scan	1			R\$ 4,353.00	Ecological physiology	20110614	
21	Brazil	Nobreaks	NHS	Premium GII 3000Va	18Ah	2			R\$ 4,397.10	Biotechnology	20110711	

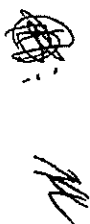


	Place of procurement	Name of equipment	Maker	Model	Main Specification	Quantity	Unit Price (Yen)	Amount (Yen)	Price (Real)	Location of use	Date of arrival	Remarks
22	Brazil	Analytical Balance	Shimadzu	SHI-AY 220	Max measurement: 220g, minimum display: 0.1mg, response time: 3 seconds	2			R\$ 5,220.00	Biotechnology	20110713	
23	Brazil	Oven	Cienlab	CE-220/480	800 x 600 x 1000mm, 900W, 480L	1			R\$ 7,986.00	Biotechnology	20110714	
24	Brazil	Nobreaks	SMS	Net Winner Expert	1800Va	2			R\$ 1,482.36	Biotechnology	20110720	
25	Brazil	Electrophoresis system (vertical)	Loccus	LCH-192	GEL tray: 24 x 26cm, buffer capacity: 1500ml, weight: 1500g, voltage: 300V (max), current: 360mA (max), electric power: 108W (max), temperature control range: 55°C	2			R\$ 5,524.00	Biotechnology	20110721	
26	Brazil	Electrophoresis system (horizontal)	Loccus	LCV-20x20	EVM-E/EVM-XX, buffer capacity: lower part 500ml and upper part 650ml, size: 31cm x 16cm x 20cm, capacity: max 56 samples	2			R\$ 11,490.00	Biotechnology	20110721	
27	Brazil	Shaking incubator	Cienlab	CE-320	Temperature range: 7°C - 70°C, Rotation range: 50 - 250 rpm	1			R\$ 6,900.00	Biotechnology	20110726	
28	Brazil	Ice machine	Termall	EGE300M	EDG-180, 600KG/24 hours	1			R\$ 11,667.00	Biotechnology	20110729	
29	Brazil	Refrigerator	Termall		2 doors, 337L	1			R\$ 1,420.00	Biotechnology	20110729	
30	Brazil	Freczer	Termall	Consul	246L	1			R\$ 1,126.00	Biotechnology	20110729	
31	Brazil	Air conditioner	Termall	Eletrolux	30.000BTUS	2			R\$ 6,270.00	Biotechnology/ Ecological physiology	20110729	
32	Brazil	Multimeter	MINIPA	ET-2042D	Sampling rate: 3x/ second, temperature range: 0 °C - 40°C, altitude range: 2000m	2			R\$ 230.00	Ecological physiology	20110815	
33	Brazil	BOD incubator	Splabor	Sp-225	334L, 60 x 110 x 450cm	1			R\$ 12,800.00	Biotechnology	20110826	
34	Brazil	Clean bench	Vecoflow	Biosafe Plus 12CI II	A2 (B3) 110/120v, ISO class (class 100), size of work area: 623mm x 1,184mm x 605mm, external dimensions: 780mm x 1.270mm x 2.100mm	2			R\$ 32,760.00	Biotechnology	20110829	
35	Brazil	Guelph Permeameter	FUNDAG	IAC	20cm x 60cm, PVC	2			R\$ 19,000.00	Ecological physiology	20110830	
36	Japan	Seesaw shaker	Cole-Parmer	Adjustable Rocker	120V, 4A, 60HZ	2	¥ 210,000	¥ 420,000		Biotechnology	20110725	
37	Japan	Ultrasonic washing machine (large)	Cole-Parmer	8893-21	Capacity: 2.5 gallons, heater, digital timer, temperature monitor	1	¥ 147,000	¥ 147,000		Biotechnology	20110725	
38	Japan	Micro-Volume Spectrophotometer	Nanodrop	ND2000	Measurement time: less than 5 seconds, minimum sample required: 0.5µL, measurement range up to 15,000 ng/µL (dsDNA conversion), without the need for sample dilution of high concentration	1	¥ 1,386,000	¥ 1,386,000		Biotechnology	20110801	

Place of procurement	Name of equipment	Maker	Model	Main Specification	Quantity	Unit Price (Yen)	Amount (Yen)	Price (Real)	Location of use	Date of arrival	Remarks	
39	Japan	Water potential measurement device	DECAGON	PROACHK	Measuring range: 0~300MPa, accuracy: 0~5MPa/±0.05MPa a-5~300MPa/±1%, resolution: 0.01MPa, sample volume: 7~20ml	2	¥ 89,000	¥ 178,000		Ecological physiology	20110829	
40	Japan	Centrifugal Concentrator	Eppendorf	5305C	with PTFE Vacuum pump, micro tube (1.5/2.0ml) max. 96 tubes, revolution: 1,400rpm, temperature setup range: Off/30 /45 /60°C	1	¥ 1,094,027	¥ 1,094,027		Biotechnology	20110831	
41	Japan	Fluorescence scanner	GE Healthcare	Typhoon 7000	High speed scan: 5 minutes for sample size of 20 x 25cm, compact size suitable on experimental table, analytical software: Image Quant TL	1	¥ 9,660,000	¥ 9,660,000		Biotechnology	20110907	
42	Japan	Thermal cycler	Thermal	Veriti 96-well	Correspond applications (standard PCR and fast PCR), VeriFlex block, independent 6 temperature setting zone	2	¥ 956,970	¥ 1,913,940		Biotechnology	20110908	
43	Japan	Ultra-low temperature freezer	Revco	Ult1786-10dd-Btype	Max temperature: -86°C, inside capacity: 705L, temperature recorder, battery for automatic support cooling, remote alarm device	1	¥ 1,972,425	¥ 1,972,425		Biotechnology	20111125	
44	Brazil	Sterilizer	Marconi	1202/CT	Temperature control: 350°C in 20 minutes, stainless steel, 500W, 250V, microprocessor temperature control, digital display	1			R\$ 1,540.00	Biotechnology	20110930	
45	Brazil	Autoclave	Phoenix Luferto	AH-39206/200	Horizontal type, stainless steel, microprocessor control, outside dimensions: 60 x 135 x 1,400cm, inside dimensions: 40 x 40 x 1200cm, pressure steam sterilization	1			R\$ 42,500.00	Biotechnology	20111101	
46	Brazil	Security monitoring system	SCCR Controle de Ponto de Acesso	Prisma Acesso	Registered finger number: large finger 1000, verification search fingers: 200 fingers	3			R\$ 8,510.00	Biotechnology	20111017	
47	Brazil	Thermometer	HANNA	HI-99301	Operation temperature: +55°C ~ +15, Storage Temperature: +65 ~ -20°C	2			R\$ 1,555.00	Ecological physiology	20111103	
48	Brazil	Gas Chromatography	Agilent	7890A	It uses a advanced electronic pneumatic control (EPC) and GC temperature control. Supports simultaneously: two inlets, Three detector and Four detectors signals. GC's operating ambient temperature: +4 to 450°C. Maximum Achievable temperature rate: 120°C/min. To be connected to Liquid Chromatography.	1			R\$ 175,485.00	Soil Lab.	20111031	
49	Brazil	Shaking incubator	Tecnal	TE-421	0~+60°C, 800/550/400mm	1			R\$ 12,800.00	Biotechnology	20111104	
50	Brazil	Security monitoring system	SCCR Controle de Ponto de Acesso	Prisma Acesso	Registered finger number: large finger 1000, verification search fingers: 200 fingers	1			R\$ 2,836.66	Storage of genetically modified organism	20111202	

	Place of procurement	Name of equipment	Maker	Model	Main Specification	Quantity	Unit Price (Yen)	Amount (Yen)	Price (Real)	Location of use	Date of arrival	Remarks
51	Brazil	Furniture for laboratory in newly constructed biotechnology building (first floor)	IMPERIAL	IMPERIAL	shelves, experimental table (water proof), cabinet, and storage unit, etc.	1			R\$ 79,990.00	Biotechnology	20120103	
52	Brazil	Ultrasonic cleaner	Alfa Mare	USC-1600A	with heater	1			R\$ 2,055.00	Biotechnology	20120111	
53	Brazil	Mixer, stirring and shaking	Splabor	AP-56 Vortex	14,5x13x16cm 110/220v	7			R\$ 4,550.00	Biotechnology	20120112	
54	Brazil	pH meter	Mettler-Toledo	PH-S20-K	"3-In-1" pH electrode , buffer sachets (2 each ; 4.01, 7.00 and 9.21),	2			R\$ 7,550.00	Biotechnology	20120126	
55	Brazil	Green house	Londriestufa	Londriestufa	4 unit and corridor= 25.6m x 9.82m x 35m, 1 unit= 6.4m x 7.32m	1			R\$ 73,095.00	Biotechnology	20120213	
56	Brazil	Mini centrifuge	Alfa Marc	Mini Star	110V, 6 micro tubes	10			R\$ 7,220.00	Biotechnology	20120224	
57	Japan	Cooled centrifuge	Sorvall	Legend XTR	230v 50/60Hz, max revolution: 15,200rpm, max centrifugal force: 25,314g, temperature setting range: -10 ~ 40°C	1	¥ 1,000,000	¥ 1,000,000		Chemical analysis office	20120217	
58	Japan	Fixed angle rotor for cooled centrifuge	Sorvall	F14-S6x250LE F15-8x50c	for above cooled centrifuge of Sorvall	2	¥ 199,500	¥ 199,500		Biotechnology	20120217	
59	Japan	Cooled centrifuge	Sorvall	Legend XIR	230V, 50/60Hz	4	¥ 455,140	¥ 1,820,560		Biotechnology	20120217	
60	Japan	Fixed angle rotor for cooled centrifuge	Sorvall	F15-6x100	for above cooled centrifuge of Sorvall	4	¥ 50,000	¥ 200,000		Biotechnology	20120217	
61	Japan	Bucket for Swing rotor	Sorvall	TX-200	for above cooled centrifuge of Sorvall	4	¥ 49,200	¥ 196,800		Biotechnology	20120217	
62	Japan	Potable measuring device for photosynthesis and transpiration	ADC	LCPro	X1 Serials	2	¥ 4,125,000	¥ 8,270,000		Ecological physiology	20120217	
63	Japan	Open type measuring system for photosynthesis and transpiration	Licor	Li-6400XT	SD main unit, leaf chamber, LED	1	¥ 100,000	¥ 100,000		Ecological physiology	20120217	
64	Japan	Desktop type leaf area meter	Licor	Lj3100C	Measuring range: CO2 0~3,000µmol/mol, H2O 0~75mmol/mol	1	¥ 2,169,000	¥ 2,169,000		Ecological physiology	20120217	
65	Japan	Water potential measurement device	Wescor	Psypro	Operation temperature: +55°C ~ +15, Storage Temperature: +65 ~ -20°C	1	¥ 4,019,048	¥ 4,019,048		Ecological physiology	20120217	
66	Japan	Beads type multi Cell Disruption device	Stainless Beads	3-Dimensional High Throughput Bead Type Homogenizer	V-30-SF	1	¥ 2,753,500	¥ 2,753,500		Biotechnology	20120217	
67	Japan	Centrifugal Concentrator	Decagon	WP4C	2.4mm, 5.0mm, 3.0mm, measuring accuracy: ± 0.05MPa, measuring range: 0 ~ -300MPa, Temperature setting: 15~40°C	1	¥ 1,422,750	¥ 1,422,750		Ecological physiology	20120217	
68	Brazil	Integrated Desktop Computer	Apple	iMac	2.50GHZ INTEL MC309BZA, All in one. Speaker, HD, Camera and monitor are included in one unit. Apple operating system.	7			R\$ 25,193.70	Ecological physiology/ Biotechnology	20120920	

	Place of procurement	Name of equipment	Maker	Model	Main Specification	Quantity	Unit Price (Yen)	Amount (Yen)	Price (Real)	Location of use	Date of arrival	Remarks	
69	Brazil	Realtime PCR	Life Technology	Step One Plus	Fast mode: 2.2°C/sec, Standard mode: 1.6°C/sec, Temperature Range: 4-100°C, Temperature Accuracy: 0.25°C (35 to 95°C) of display temperature, Passive Reference Dye: No ROX, ROX (Pre-mixed), ROX (Separate Tube), Reaction Volume Range: 10-30 µl (Standard curve experiments; 40 µl in standard mode is validated)	1			R\$ 126,085.96	Biotechnology	20120927		
70	Brazil	Microsoft Office for MAC	Microsoft	Office 2011	Word, Excel, Outlook and Powerpoint. Home&Student version for MAC	3			R\$ 549.24	Ecological physiology/ Biotechnology	20121015		
71	Brazil	Green Seeker 505	GEO AGRI	505	NDVI : Normalized Difference Vegetative Index, GPS for area information, sensor, shoulder holder and case.	1			R\$ 39,990.00	Ecological physiology	20121205		
72	Brazil	Cooling system (for greenhouse)	VHR	Hitachi	Temperature: keep the minimum temperature of 15°C during the day and 45°C during the night (night maximum), with less than 10% of the variation. Humidity: 50% at night (night maximum) with less than 10% of variation. Its renovate more than 5% of the total volume/hour	2			R\$ 199,710.00	Ecological physiology/ Greenhouse	20120207		
Total								¥ 38,922,550	R\$ 939,723.55				
							Conversion rate: 1 US dollar = 2.45 Real, 1 US Dollar = 108 Yen		Converted to US dollar	360,394	383,561		
							Grand Total (US dollar)		743,955				



**Annex 7 Equipment Procured for the Research Institutes in Japan (JIRCAS, RIKEN and the University of Tokyo)**

	Name of Equipment	Maker	Model	Main Specification	Quantity	Unit Price (Yen)	Amount (Yen)	Location of use	Date of arrival
1	PCR equipment	Applied Biosystems	Thermal Cycler 2720	Range of sample capacity: 5~100µL, 0.2mL, size 21cm x 36cm x 22cm, weight 6.1kg	1	499,590	499,590	JIRCAS	2010/5/20
2	Frame Side Experimental Table	Dulton	MW-61AC-12001	Size: 120cm x 60cm x 80cm, with 2 units of movable cabinet	1	207,270	207,270	JIRCAS	2010/6/3
3	High Speed Refrigerated Micro Centrifuge	Hitachi Koki	CF15RXII	Max revolving speed: 15,000rpm, max centrifugal acceleration: 22,200Xg, revolution control range: 300~15,000rpm, timer: 5-55seconds/ 1-99minutes/ HOLD, temperature setup range: -9~40°C, size: 37cm x 52cm x 84cm, weight: 82kg, rotor: a unit (T15AP31)	1	730,800	730,800	JIRCAS	2010/6/9
4	Computer	Hewlett-Packard Japan	Pavilion Desktop PC HPE-390jp/CT	Windows® 7 Home Premium (64bit), Intel Core i7-930 processor, memory: 6GB (2GBx3), HDD 500GB Serial ATA 3Gb/s (7,200rpm), DVD supermulti drive	1	256,410	256,410	JIRCAS	2010/10/29
5	Artificial climate chambers	Nippon Medical & Chemical Instruments Co.,Ltd	LH-350S	with manual lighting adjusting function, controlled operation of temperature and illuminance, illuminance: 0~27,000lx, chamber capacity: 350L, size: 88cm x 81cm x 188cm, weight: 285kg	1	1,502,550	1,502,550	JIRCAS	2010/11/30
6	Multilabel Reader	Perkin Elmer	ARVO X3 system	Measurable items: absorbance, fluorescence and emission, scanning, fluorescence bottom reading, stirring plate, temperature control, size: 50cm x 60cm x 36cm, weight: 46kg	1	3,617,250	3,617,250	JIRCAS	2010/12/22
7	Multifunctional shaking incubator	THOMAS KAGAKU Co.,Ltd.	AT-24R	Rotary method, temperature range: 5~60°C, shaking number: 20-200times/minute, shaking width: 70mm, size: 128cm x 69cm x 93cm, weight: 230kg	1	1,690,500	1,690,500	JIRCAS	2011/11/10
8	Artificial climate chambers	Nippon Medical & Chemical Instruments Co.,Ltd	LH-410S	with manual lighting adjusting function, controlled operation of temperature and illuminance, illuminance: 0 - 31,000lx, chamber capacity: 410L, size: 88cm x 81cm x 188cm, weight: 285kg	1	1,606,500	1,606,500	JIRCAS	2011/12/20
9	Double Shaker	TAITEC CORPORATION	NR-30	Round trip/ turning switching, shaking speed: 20~200r/mm, shaking width: 10~40mm, size: 45cm x 41cm x 16cm, weight: 17kg	1	274,050	274,050	JIRCAS	2012/3/7
10	Analytical Balance	Mettler Toledo	MS304S/02	Max measurement: 320g, Minimum display: 0.1mg, size of plate: diameter 90mm, size: 21cm x 35cm x 35cm, weight: 6.5kg	1	233,845	233,845	JIRCAS	2012/4/25
11	Artificial climate chambers	Panasonic	MIR-254-PJ	Additional LED unit, inside temperature: -10~60°C, chamber capacity: 254L, size: 70cm x 58cm x 162cm, weight: 108kg	1	2,305,800	2,305,800	JIRCAS	2012/7/19
12	Ultra-low temperature freezer	Nihon Procezer Co., Ltd.	CLM-31UW	Capacity: more than 324L, inside humidity: -80°C~-85°C	1	1,473,150	1,473,150	RIKEN	2010/12/9
13	Artificial climate chambers	Nippon Medical & Chemical Instruments Co.,Ltd	LPH-350SP	Fixed value operation, Switching operation day and night, illumination: 5-sided irradiation, 3-position control function on temperature and humidity	1	1,874,250	1,874,250	RIKEN	2011/2/8
14	High Speed Micro Centrifuge	Hitachi Koki	CF15RXII	Max revolution speed: 15,000rpm, max centrifugal acceleration: 22,200Xg (T15A41), revolution control range: 300~15,000rpm	1	683,550	683,550	University of Tokyo	2010/5/24
15	Shaking incubator	THOMAS KAGAKU Co.,Ltd.	AT-12R	Temperature range: 60°C ~ +5°C, high accuracy on temperature control, shaking and temperature distribution in incubator, automatic operation of freezer	1	996,030	996,030	University of Tokyo	2010/6/28
Total							17,951,545	Yen	
Conversion rate: 1 US Dollar= 108 Yen							Converted to US dollar	166,218	US dollar



Handwritten mark

**Annex 8 Local Cost Allocated by Japanese Side**

Local Expenses (Real)					Total
From April 2010 to March 2011	From April 2011 to March 2012	From April 2012 to March 2013	From April 2013 to March 2014	From April 2014 to Aug 2014	
290,741.34	358,970.48	282,448.87	167,052.56	67,874.02	1,167,087.27
Converted to US dollar					476,362

Conversion rate: 1US dollar = 2.45 Real



*Handwritten signature or initials.*

**Annex 9 List of Brazilian Researchers Involved in the Project Activities**

No.	Name	Position (at the Terminal Evaluation)	Organization	Period of participation into research activities		Field of specialty	Training in Japan
				From	To		
1	Dr. Alexandre Lima Nepomuceno	Senior Researcher/Project Leader	Embrapa Soybean	Mar. 2010	At present	Molecular Biology/ Plant Physiology	2010 & 2014
2	Dr. José Renato B. Farias	General Head	Embrapa Soybean	Mar. 2010	At present	Agrometeorology	
3	Dr. Alexandre José Cattelan	Development (former General Head)	Embrapa Soybean	Mar. 2010	At present	Soil Microbiology	
4	Dr. Norman Neumaier	Senior Researcher	Embrapa Soybean	Mar. 2010	At present	Plant Physiology	
5	Dr. Amélio Dall Agnol	Senior Researcher (former Director of Technology Transfer)	Embrapa Soybean	Mar. 2010.	At present	Breeding/ Technology Transfer	
6	Dr. Carlos Alberto Arrabal Arias	Senior Researcher	Embrapa Soybean	Mar. 2010	At present	Plant Breeding	
7	Dr. Antônio Eduardo Pipolo	Senior Researcher	Embrapa Soybean	Mar. 2012	At present	Plant Breeding	
8	Dr. Renata Fuganti Pagliarini	Post-Doctoral Fellow	Embrapa Soybean	Mar. 2010	At present	Transformation	
9	Dr. Ricardo Vilela Abdelnoor	Senior Researcher/ Acting Project Leader (after October 2012)	Embrapa Soybean	Mar. 2010	At present	Molecular Biology	
10	Dr. Franscimar Correia Marcelino	Researcher	Embrapa Soybean	Mar. 2010	At present	Molecular Biology	
11	Dr. Maria Cristina Neves de Oliveira	Researcher	Embrapa Soybean	Mar. 2010	At present	Statistics	
12	Dr. Clara Beatriz Hoffman-Campo	Senior Researcher	Embrapa Soybean	Mar. 2010	At present	Metabolomics	
13	Dr. Júlio Franchini dos Santos	Senior Researcher	Embrapa Soybean	Mar. 2010	At present	Crop Management	
14	Dr. Gedi Jorge Sfredo	Senior Researcher	Embrapa Soybean	Mar. 2013	Sep. 2013	Plant Nutrition	
15	Dr. Josirley Carvalho	Post-Doctoral Fellow	CNPq (National Council for Scientific and Technological Development)	Dec. 2010	Jan. 2014	Plant Physiology	
16	Ns. Silvana Regina Rockenbach Marin	Chief of Lab./ State University of Londrina	Embrapa Soybean/ Student of State University of Londrina	Mar. 2010	At present	Molecular Biology	2010
17	Dr. Amanda Alves de Paiva Rolla	(Qualified as Ph.D)	State University of Londrina	Mar. 2012	Mar. 2014	Molecular Biology	2010
18	Nr. Cesar Augusto Silveira	Sub-chief of Lab.	Embrapa Soybean	Mar. 2010	At present	Molecular Biology	
19	Dr. Cibelle Engels	(Qualified as Ph.D)	State University of Londrina	Mar. 2012	Mar. 2014	Molecular Biology	2011
20	Ns. Mayla D. C. Molinari	Student of graduate school	UNIFIL University (Londrina)	Mar. 2011	At present	Molecular Biology	2014
21	Nr. Elton Gargioni Grisoste Barbosa	Student of graduate school	State University of Londrina	Mar. 2010	Aug. 2013	Molecular Biology	
22	Ns. Juliana Paula Leite	Student of graduate school	São Paulo State University	Mar. 2010	Jun. 2013	Molecular Biology	
23	Ns. Juliane Marinho	Student of graduate school	University of North Parana	May. 2011	At present	Molecular Biology	2014

No.	Name	Position (at the Terminal Evaluation)	Organization	From	To	Field of specialty	Training in Japan
24	Ms. Patricia Teruko Honna	Student of graduate school	São Paulo State University	May. 2011	At present	Molecular Biology	2014
25	Mr. Rubson Sibaldeli	Technician	Embrapa Soybean	Mar. 2010	At present	Ecophysiology	
26	Ms. Bianca Peral Pereira	Technician	Embrapa Soybean	Mar. 2010	May 2014	Ecophysiology	
27	Ms. Marcia Kamogae Kuwahara	Technician	Embrapa Soybean	Mar. 2010	At present	Molecular Biology	
28	Dr. Liliâne Henning	Researcher	Embrapa Soybean	Apr. 2013	At present	Molecular Biology	2013
29	Mr. Thiago Nakayama	Student of graduate school	Viçosa University	Oct. 2013	At present	Molecular Biology	2014
30	Ms. Rafaela Ribeiro Reis	Student of graduate school	State University of Londrina	Nov. 2013	At present	Molecular Biology	2014
31	Dr. Leonardo Cesar Ferreira	Post-Doctoral Fellow	Embrapa Soybean	Mar. 2013	At present	Ecophysiology	
32	Mr. Claudinei de Freitas Toledo	Technician	Embrapa Soybean	Mar. 2010	At present	Ecophysiology	
33	Ms. Larissa Giroto	Technician	Employed by JICA	Mar. 2010	Aug. 2012	Molecular Biology	
34	Ms. Maria Cecília Amaral Soldera	Technician	Employed by JICA	Oct. 2010	Aug. 2012	Molecular Biology	2011& 2012
35	Ms. Gislaine Vasquez	Technician	Employed by JICA	Oct. 2010	Jun. 2012	Molecular Biology	



Handwritten mark or signature.



**Annex 10 Equipment Procured and Facilities Constructed by Brazilian Side**

	Name of equipment	Location of use	Date of arrival	Price (Real)	Remarks
1	Capillary tube, electrophoresis apparatus	New Biotechnology Building (NBB)	Year 2010	86,000	Agrofuturo project
2	Refrigerator	NBB	25 Oct. 2010	1,799	446L, MABE
3	Autoclave (vertical type)	NBB	26 Oct. 2010	12,150	Phoenix
4	Thermocycler	NBB	10 Nov. 2010	24,372	Veriti 96Well, Applied Biosystems
5	Freezer (vertical type)	NBB	18 Nov. 2010	1,670	296 L, Consul
6	Sample crusher	NBB	20 Nov. 2010	41,296	Geno/Grinder
7	Ice machine	NBB	26 Nov. 2010	12,469	EGE300, TERMALL
8	Refrigerator	NBB	3 Dec. 2010	1,500	362L, Consul
9	Magnetic stirrers with heating	NBB	17 Dec. 2010	1,050	Nova Etica
10	No Brake	NBB	Year 2010	6,000	10KVA. To protect equipment as power failure occurs often.
11	No Brake battery	NBB	Year 2010	4,000	To protect equipment as power failure occurs often.
12	Micropipette	NBB	Year 2010	3,500	Eppendorf. For precise measurement of sample/reagent.
13	Micropipette (6 units)	NBB	Year 2010	4,600	For precise measurement of sample/reagent.
14	Automatic workstation	NBB	Year 2010	300,000	
15	Freezer	NBB	Year 2010	2,000	Electrolux. To keep samples and material in good condition.
16	Genotyper	NBB	Year 2010	19,000	Beadxpress, ILLUMINA
17	Construction of New Biotechnology Building	Next to Biotechnology Building	Building was constructed by September 2010 and used from June 2011	722,400	With air conditioners, growth chamber, etc., PAC project
18	Power supply for electrophoresis	NBB	19 Jan. 2011	900	LSP 300V, Loccus
19	Desktop computers	NBB	23 Mar. 2011	15,856	8units, Elite 8100, HP
20	Thermocycler	NBB	19 Apr. 2011	24,372	Veriti 96Well, Applied Biosystems
21	SNPs Genetic Analysis System	NBB	4 May. 2011	199,546	BX113
22	Cube electrophoresis apparatus	NBB	17 May. 2011	4,206	3units, Thermo
23	Thermocycler	NBB and Biotechnology Building	17 May. 2011	41,111	3units, Veriti 384 Well, Applied Biosystem.
24	NoBrake	Biotechnology Building	5 Aug. 2011	11,994	2units, 10KVA, Maxi Mono, HDS. To protect the equipment as power failure occurs often at Embrapa soybean.
25	Thermostatic bath	Biotechnology Building	5 Aug. 2011	2,992	2units, Marconi. To keep the samples at desired temperature.

	Name of equipment	Location of use	Date of arrival	Price (Real)	Remarks
26	Realtime PCR	Biotechnology Building	Year 2011	230,000	Applied Biosystems. For quantitative analysis of DNA.
27	Oven	NBB	16 Aug. 2011	3,552	SP100/336A, SP Labor. For drying samples.
28	DNA workstation	NBB	30 Aug. 2011	5,600	LWS-01-110V. Installed for DNA work
29	Vortex Mixer	Biotechnology Building	6 Sep. 2011	800	KMC-1300V. For mixing and preparation of samples.
30	Liquid chromatography	Chemical Analysis office	1 Dec. 2011	100,000	For analysis of soybean components.
31	Installation of stainless steel pipe for gas chromatography	Chemical Analysis office	1 Dec. 2011	10,000	Setting lines of carrier gas (nitrogen) for JICA equipment, gas chromatography.
32	Computers (7 Units)	Ecological Physiology	Year 2011	21,000	For data analysis, storage.
33	Renovation of Eco-Physiology Lab.	Ecological Physiology	1 Dec. 2011	40,000	For daily use.
34	GMO Seed storage building	Near greenhouse	Year 2011	319,798	For conserving genetically modified soybean seeds.
35	Green house for GMO	Greenhouse area	Year 2011	300,000	For cultivation of genetically engineered soybean and other experiment.
36	Autoclave	Ground Floor, NBB	Year 2011	4,000	Phoenix Lufereo. For sterilization of equipment and materials.
37	Oven	Ground Floor, NBB	Year 2011	3,300	To dry materials.
38	Balance	Ground Floor, NBB	Year 2011	7,000	Shimadzu. To measure the weight of samples.
39	Centrifugation	Ground Floor, NBB	May. 2011	20,387	Thermo, Scientific X1R. For sample extraction and preparation.
40	Ice Machine	Ground Floor, NBB	Year 2011	7,459	Scotsman. To make ice for sample preparation.
41	Shaker	Ground Floor, NBB	Year 2011	2,000	ILLUMINA. To mix samples.
42	Freezer	Ground Floor, NBB	Year 2011	1,200	Consul. To keep sample, reagent and material in good condition.
43	Thermostatic bath (2 units)	Ground Floor, NBB	Year 2011	2,400	Marconi. To keep samples at desired temperature.
44	Thermostatic bath	Ground Floor, NBB	Year 2011	5,500	Amazonlab. To keep samples at desired temperature.
45	Cart (2 units)	Ground Floor, NBB	Year 2011	2,400	To carry samples, materials and equipment etc.
46	Autoclave	Ground Floor, NBB	Year 2011	5,880	Primatec. For sterilization of equipment and materials.
47	Laboratory Chairs (14 units)	NBB	1 Jan. 2012	4,200	Laboratory
48	Furniture for laboratory (ground floor)	Ground Floor, NBB	Feb. 2012	50,000	Laboratory desk and shelf etc.
49	Washing sink (2 units)	NBB	1 Jan. 2012	2,700	For washing glassware
50	DNA workstation	NBB	Year 2012	6,000	Loccus. To measure and prepare sample automatically.
51	Micropipette Monocanal (10 units)	NBB	Year 2012	4,000	Use for precise measurement of sample/reagent.
52	Micropipette Multicanal (6 units)	NBB	Year 2012	6,000	Use for precise measurement of sample/reagent.
53	Office chairs (4 units)	NBB	Year 2012	2,952	For office work.
54	Microwave	NBB	Year 2012	360	For melting sample such as agar.

Handwritten signature and initials in the bottom left corner of the page.

	Name of equipment	Location of use	Date of arrival	Price (Real)	Remarks
55	Refrigerator	NBB	Year 2012	750	For safe storage of samples and reagents.
56	Office chairs (3 units)	NBB	Year 2012	570	For office work.
57	Chairs for laboratory (8 units)	NBB	Year 2012	6,640	For laboratory work.
58	Chairs (8 units)	NBB	Year 2012	892	For office work.
59	A table with 4 chairs	NBB	Year 2012	854	For preparation of samples.
60	Foundation for installing cooling system	JICA Greenhouse	Year 2012	1,700	To install cooling machine.
61	Freeze dryer	Biotechnology Building	Year 2012	25,000	To preserve samples by freeze dry
62	Refrigerator (260 L)	NBB	Year 2012	1,090	To preserve samples and reagents, etc.
63	Mixer	NBB	Year 2012	980	Mixing samples.
64	Sterilizer	NBB	Year 2013	1,999.60	To disinfect equipment and samples etc.
65	Water purification system	NBB	Year 2013	2,500	For laboratory use.
66	Microscope	NBB	Year 2014	73,956.43	For analysis of sample.
67	Rehabilitation works	Biotechnology Building	Year 2014	12,000	For analysis of sample.
68	LED lamps	Biotechnology Building	Year 2014	4,000	For plant cultivation in growth chamber.
69	Security system	NBB	Year 2014	1,545	Laboratory security.
70	Computer with monitor (3 units)	NBB and Ecological Physiology	Year 2014	7,638	For data storage.
				Total	2,855,386 Real
				Converted to US dollar	1,165,464 US dollar

Conversion rate: 1US dollar = 2.45 Real

Converted to US dollar 1,165,464 US dollar

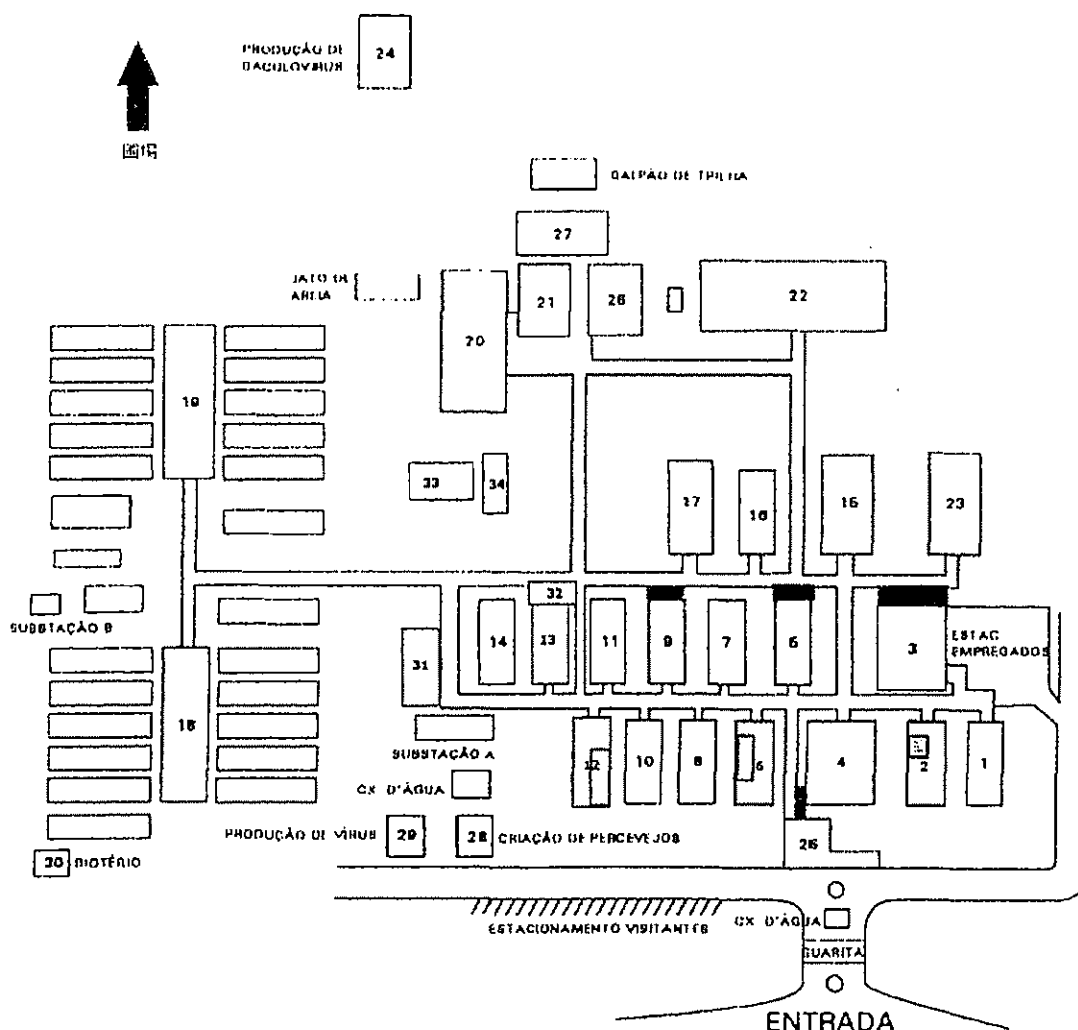


Handwritten signature or initials

## Annex 11. Location of Facilities (Embrapa Soybean) Used for the Project Activities

(1) Land, building, office, facilities and facility plan (2012)

Blue is the facilities used under the Project.



1. Management, 2. SGP, SOF, JICA project office, 3. Auditorium, Meeting room, Video room, Sale of publication, 4. Library, communication, 5. Researcher 1, 6. Eco-physiology, Soil chemical, 7. Agro-meteorology, biometry, information, 8. Entomology, seeds, 9. Researcher 2, 10. Phytopathology, microbiology, 11. SINPAF, technology business, 12. Weeds, Entomology, applied chemical ecology, 13. Plant biotechnology, 14. Soil biotechnology, 15. Restaurant, 16. Technology business, 17. Property, material, warehouse, experimental cooking, 18. Greenhouse, 19. Greenhouse, 20. Experimental fields, 21. Field support shed, 22. Machines, maintenance and transport, 23. Experimental cooking, canteen, 24. Vivarium virus production laboratory, 25. Reception, 26. Experimental fields, 27. Experimental fields, 28. Creation of bedbugs, 29. Laboratory, 30. Vivarium, 31. JICA's Greenhouse, 32. New wing of biotechnology, 33. OGM bank, 34. OGM bank.

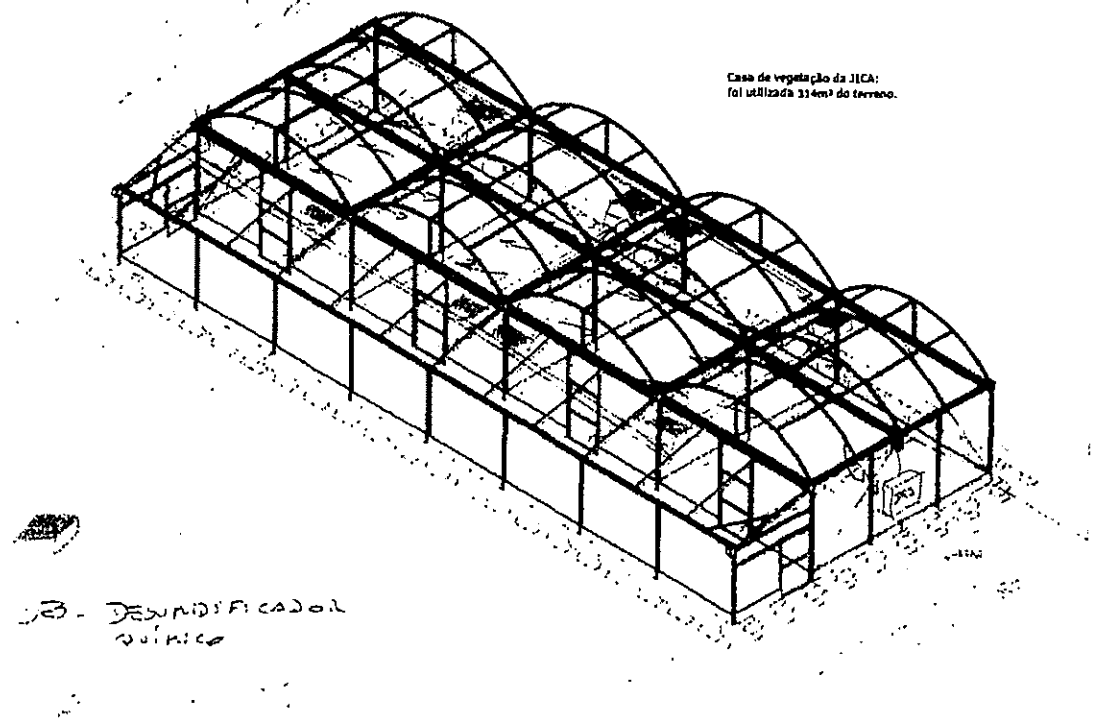
(2) Land, building, office, facilities and facility plan (2014)

Blue is the facilities used under the Project.



A handwritten signature, possibly 'JK', is written in the bottom right corner. To its left is a circular stamp or mark, which appears to be a stylized logo or a seal.

**JICA greenhouse for GMO**



Casa de vegetação da JICA: foi utilizada 31 em² do terreno.

DREB - DESMIDIFICADOR QUÍMICO

**Experimental farm**

Requerimento simplificado de liberação planejada no meio ambiente de soja GM1 com genes que conferem tolerância à seca e ao calor

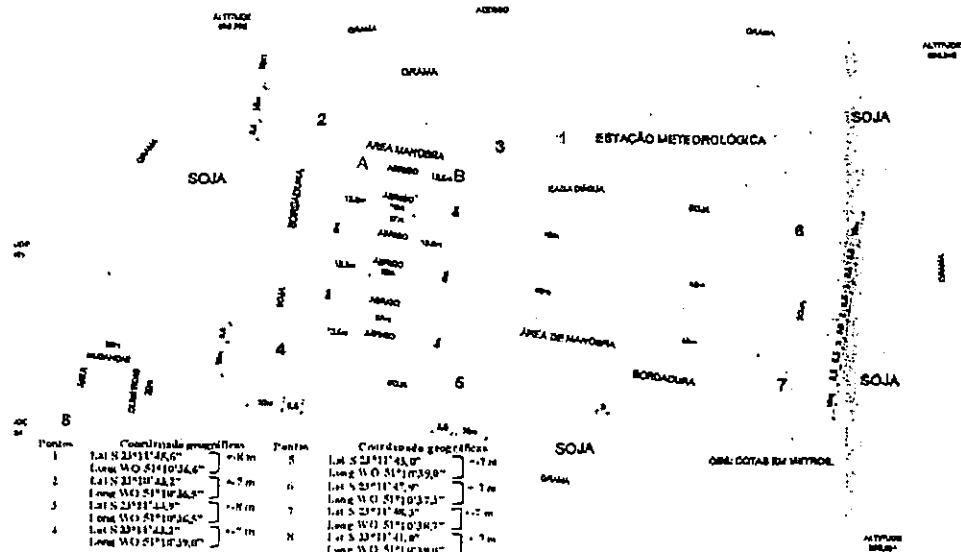


Figura 01 - Área experimental da Ecofisiologia indicando oito pontos com suas respectivas coordenadas geográficas (latitude e longitude) onde será instalado o experimento desta liberação planejada. Em A, local de aplicação do estresse na fase vegetativa e em B, o tratamento será aplicado na fase reprodutiva.

Campo da EMBRAPA: sendo utilizado para projeto da DREB 28.300m². Nesta planta podemos verificar 5 Rain out shelter, (cada um custando aproximadamente R\$39.000,00)

**Annex 12. Local Expenses Borne by Brazilian Side (scholarship)**

(1) From April 2010 to March 2011

(Unit: Real)

	Type of scholarship	Amount /month	Numbers of person	Total amount/year	Remarks
1	PIBIC—CNPq	305.00	4	14,640	Undergraduate student
2	DTI	934.00	1	11,208	Undergraduate degree
3	Embrapa	550.00	4	26,400	Undergraduate student
4	CNPq	1,020.00	2	24,480	Master students
5	CNPq	2,000.00	3	72,000	Doctor student
6	CNPq	2,838.00	2	68,112	Postdoctoral
Sub-Total				216,840	

(2) From April 2011 to March 2012

(Unit: Real)

	Type of scholarship	Amount/month	Numbers of person	Total amount/year	Remarks
1	CNPq	360.00	1	4,320	Undergraduate student/ Biotechnology
2	Embrapa	550.00	1	6,600	Undergraduate student/ Biotechnology
3	CNPq	330.00	1	3,960	Undergraduate student/ Eco physiology
4	Embrapa	550.00	4	26,400	Undergraduate student/ Eco physiology
5	Capes	1,200.00	2	28,800	Master student/ Biotechnology
6	Capes	1,800.00	2	43,200	Doctor student/ Biotechnology
7	CNPq	3,300.00	2	79,200	Postdoctoral/ Biotechnology& Eco physiology
8	CNPq	1,100.00	1	13,200	Technician/ Eco physiology
Sub-Total				205,680	

(3) From April 2012 to March 2013

(Unit: Real)

No.	Type of scholarship	Amount /month	Numbers of person	Total amount/year	Remarks
1	CNPq	360.00	1	4,320	Undergraduate student/ Biotechnology
2	Embrapa	550.00	2	13,200	Undergraduate student/ Biotechnology
3	CNPq	550.00	2	13,200	Undergraduate student/ Eco physiology
4	Embrapa	550.00	4	26,400	Undergraduate student/ Eco physiology
5	Capes	1,200.00	1	14,400	Master student/ Biotechnology
6	CNPq	1,200.00	1	14,400	Master student/ Eco physiology
7	Capes	1,800.00	2	43,200	Doctoral student/ Biotechnology
8	CNPq	3,300.00	2	79,200	Postdoctoral/ Biotechnology /Eco physiology
Sub-Total				208,320	

(4) From April 2013 to March 2014

(Unit: Real)

No.	Type of scholarship	Amount /month	Numbers of persons	Total amount/year	Remarks
1	CNPq	400.00	2	9,600	Undergraduate student/ Eco physiology
2	Embrapa	600.00	2	14,400	Undergraduate student/ Eco physiology
3	Capes	1,500.00	1	18,000	Master student/ Eco physiology
4	DTI A	2,400.00	1	28,800	Master student/ Eco physiology
5	DTI C	1,100.00	1	13,200	Master student/ Eco physiology
6	Capes/CNPq/University	1,800.00	2	43,200	Master student/ Biotechnology
7	Capes/CNPq/University	2,200.00	3	79,200	Doctor student/ Biotechnology
8	CNPq	4,100.00	4	196,800	Postdoctoral/ Biotechnology/Eco physiology
Sub-Total				403,200	

(5) From April 2014 to August 2014

(Unit: Real)

No.	Type of scholarship	Amount /month	Numbers of persons	Amount/year	Remarks
1	CNPq	400.00	2	9,600	Undergraduate student/ Biotechnology/Eco physiology
2	Embrapa	600.00	5	36,000	Undergraduate student/ Biotechnology/Eco physiology
3	Capes/ESALQ	1500.00	1	18,000	Master student/ Eco physiology
4	DTI A	2400.00	1	28,800	Master student/ Eco physiology
5	DTI C	1100.00	1	13,200	Master student/ Eco physiology
6	Capes/CNPq/University	1800.00	2	43,200	Master student/ Biotechnology
7	Capes/CNPq/University	2200.00	3	79,200	Doctoral student/ Biotechnology
8	CNPq	4100.00	4	198,800	Postdoctoral/ Biotechnology/Eco physiology
Sub-Total				426,800	
Grand Total				1,460,840	Real
Converted to US dollar				596,261	US dollar

Conversion rate: 1US dollar = 2.45 Real

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico= National Council for Scientific and Technological Development

PIBIC: Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica = Institutional Program for Scientific Initiation

Capes: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior = Coordination of Improvement of Higher Education Personnel

DTI: Desenvolvimento Tecnológico e Industrial = Industrial and Technological Development

ESALQ: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz = College of Agriculture Luiz de Queiroz



## Annex 13. List of Publications

### (1) Original papers (Japanese journal 0, International journal 67)

1. Nakashima, K., Fujita, Y., Kanamori, N., Katagiri, T., Umezawa, T., Kidokoro, S., Maruyama, K., Yoshida, T., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2009) Three *Arabidopsis* SnRK2 protein kinases, SRK2D/SnRK2.2, SRK2E/SnRK2.6/OST1 and SRK2I/SnRK2.3 involved in ABA-signaling are essential for the control of seed development and dormancy. *Plant Cell Physiol.* 50, 1345-1363.
2. Maruyama, K., Takeda, M., Kidokoro, S., Yamada, K., Sakuma, Y., Urano, K., Fujita, M., Yoshiwara, K., Matsukura, S., Morishita, Y., Sasaki, R., Suzuki, H., Saito, K., Shibata, D., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2009) Metabolic pathways involved in cold acclimation identified by integrated analysis of metabolites and transcripts regulated by DREB1A and DREB2A. *Plant Physiol.* 150, 1972-1980.
3. Umezawa, T., Sugiyama, N., Mizoguchi, M., Hayashi, S., Myouga, F., Yamaguchi-Shinozaki, K., Ishihama, Y., Hirayama, T., Shinozaki, K. (2009) Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106, 17588-17593.
4. Mochida, K., Yoshida, T., Sakurai, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Tran, L.-S.P. (2009) *In silico* analysis of transcription factor repertoire and prediction of stress responsive transcription factors in soybean. *DNA Res.* 16, 353-369.
5. Kidokoro, S., Maruyama, K., Nakashima, K., Imura, Y., Narusaka, Y., Shinwari, Z.K., Osakabe, Y., Fujita, Y., Mizoi, J., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2009) The phytochrome-interacting factor PIF7 negatively regulates *DREB1* expression under circadian control in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 151, 2046-2057.
6. Fujita, Y., Nakashima, K., Yoshida, T., Katagiri, T., Kidokoro, S., Kanamori, N., Umezawa, T., Fujita, M., Maruyama, K., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Nakasone, S., Yamada, K., Ito, T., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2009) Three SnRK2 protein kinases are the main positive regulators of abscisic acid signaling in response to water stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 50, 2123-2132.
7. Schmutz, J., Cannon, S.B., Schlueter, J., Ma, J., Mitros, T., Nelson, W., Hyten, D.L., Song, Q., Thelen, J.J., Cheng, J., Xu, D., Hellsten, U., May, G.D., Yu, Y., Sakurai, T., Umezawa, T., Bhattacharyya, M.K., Sandju, D., Valliyodan, B., Lindquist, E., Peto, M., Grant, D., Shu, S., Goodstein, D., Barry, K., Futrell-Griggs, M., Abernathy, B., Du, J., Tian, Z., Zhu, L., Gill, N., Joshi, T., Libault, M., Sethuraman, A., Zhang, X.-C., Shinozaki, K., Nguyen, H.T., Wing, R.A., Cregan, P., Specht, J., Grimwood, J., Rokhsar, D., Stacey, G., Shoemaker, R.C., Jackson, S.A. (2010) Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature* 463, 178-183.
8. Mochida, K., Yoshida, T., Sakurai, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Tran, L.S. (2010) LegumeTFDB: An integrative database of *Glycine max*, *Lotus japonicus* and *Medicago truncatula* transcription factors. *Bioinformatics* 26, 290-291.
9. Yamada, K., Osakabe, Y., Mizoi, J., Nakashima, K., Fujita, Y., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2010) Functional analysis of an *Arabidopsis thaliana* abiotic stress-inducible facilitated diffusion transporter for monosaccharides. *J. Biol. Chem.* 285, 1138-1146.
10. Yoshida, T., Fujita, Y., Sayama, H., Kidokoro, S., Maruyama, K., Mizoi, J., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2010) AREB1, AREB2, and ABF3 are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation. *Plant J.* 61, 672-685.
11. Kuromori, T., Miyaji, T., Yabuuchi, H., Shimizu, H., Sugimoto, E., Kamiya, A., Moriyama, Y., Shinozaki, K. (2010) ABC transporter AtABCG25 is involved in abscisic acid transport and responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 2361-2366.
12. Osakabe, Y., Mizuno, S., Tanaka, H., Maruyama, K., Osakabe, K., Todaka, D., Fujita, Y., Kobayashi,



- M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2010) Overproduction of the membrane-bound receptor-like protein kinase1, RPK1, enhances abiotic stress tolerance in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 285, 9190-9201.
13. Mizoguchi, M., Umezawa, T., Nakashima, K., Kidokoro, S., Takasaki, H., Fujita, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (2010) Two closely related subclass II SnRK2 protein kinases cooperatively regulate drought-inducible gene expression. *Plant Cell Physiol.* 51, 842-847.
  14. Mochida, K., Yoshida, T., Sakurai, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Tran, L.-S. P. (2010) Genome-wide analysis of two-component systems and prediction of stress-responsive two-component system members in soybean. *DNA Res.* 17, 303-324.
  15. Mitsuda, N., Ikeda, M., Takada, S., Takiguchi, Y., Kondou, Y., Yoshizumi, T., Fujita, M., Shinozaki, K., Matsui, M., Ohme-Takagi, M. (2010) Efficient yeast one-/two-hybrid screening using a library composed only of transcription factors. *Plant Cell Physiol.* 51, 2145-2151.
  16. Taji, T., Komatsu, K., Katori, T., Kawasaki, Y., Sakata, Y., Tanaka, S., Kobayashi, M., Toyoda, A., Seki, M., Shinozaki, K. (2010) Comparative genomic analysis of 1047 completely sequenced cDNAs from an *Arabidopsis*-related model halophyte, *Thellungiella halophila*. *BMC Plant Biol.* 10, 261.
  17. Kuromori, T., Shinozaki, K. (2010) ABA transport factors found in *Arabidopsis* ABC transporters. *Plant Signaling Behav.* 5, 1124-1126.
  18. Le, D.T., Nishiyama, R., Watanabe, Y., Mochida, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Tran, L.S. (2011). Genome-wide expression profiling of soybean two-component system genes in soybean root and shoot tissues under dehydration stress. *DNA Res.* 18, 17-29.
  19. Takahashi F., Mizoguchi T., Yoshida R., Ichimura K., Shinozaki K. (2011) Calmodulin-dependent activation of MAP kinase for ROS homeostasis in *Arabidopsis*. *Mol. Cell* 41, 649-660.
  20. Le, D.T., Nishiyama, R., Watanabe, Y., Mochida, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Tran, L.S. (2011) Genome-wide survey and expression analysis of the plant-specific NAC transcription factor family in soybean during development and dehydration stress. *DNA Res.* 18, 263-276.
  21. Nishiyama, R., Watanabe, Y., Fujita, Y., Le, D.T., Kojima, M., Werner, T., Vanková, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Kakimoto, T., Sakakibara, H., Schmülling, T., Tran, L.-S.P. (2011) Analysis of cytokinin mutants and regulation of cytokinin metabolic genes reveals important regulatory roles of cytokinins in drought, salt and ABA responses, and ABA biosynthesis. *Plant Cell* 23, 2169-2183.
  22. Nanjo, Y., Maruyama, K., Yasue, H., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Komatsu, S. (2011) Transcriptional responses to flooding stress in roots including hypocotyl of soybean seedlings. *Plant Mol. Biol.* 77, 129-144.
  23. Kuromori, T., Sugimoto, E., Shinozaki, K. (2011) *Arabidopsis* mutants of *AtABCG22*, an ABC transporter gene, increase water transpiration and drought susceptibility. *Plant J.* 67, 885-894.
  24. Kuromori, T., Ito, T., Sugimoto, E., Shinozaki, K. (2011) *Arabidopsis* mutant of *AtABCG26*, an ABC transporter gene, is defective in pollen maturation. *J. Plant Physiol.* 168, 2001-2005.
  25. Kodaira, K., Qin, F., Tran, L.-S.P., Maruyama, K., Kidokoro, S., Fujita, Y., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2011) *Arabidopsis* C2H2 zinc-finger proteins AZF1 and AZF2 negatively regulate ABA-repressive and auxin-inducible genes under abiotic stress conditions. *Plant Physiol.* 157, 742-756.
  26. Yoshida, T., Ohama, N., Nakajima, J., Kidokoro, S., Mizoi, J., Nakashima, K., Maruyama, K., Kim, J.-M., Seki, M., Todaka, D., Osakabe, Y., Sakuma, Y., Schöfl, F., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2011) *Arabidopsis* HsfA1 transcription factors function as the main positive regulators in heat shock-responsive gene expression. *Mol. Genet. Genomics* 286, 321-332.
  27. Polizel, A.M., Medri, M.E., Nakashima, K., Yamanaka, N., Farias, J.R.B., Neves de Oliveira, M.C., Marin, S.R.R., Abdelnoor, R.V., Marcelino-Guimarães, Fuganti, F.C.R., Rodrigues, F.A., Stolf-Moreira, R., Beneventi, M.A., Rolla, A.A.P., Neumaier, N., Yamaguchi-Shinozaki, K., Carvalho, J.F.C., Nepomuceno, A.L. (2011) Molecular, anatomical and physiological properties of a soybean



RL

- genetically modified line transformed with *rd29A:AtDREB1A* for the improvement of drought tolerance. *Genet. Mol. Res.* 10, 3641-3656.
28. Kim, J.-S., Mizoi, J., Yoshida, T., Fujita, Y., Nakajima, J., Ohori, T., Todaka, D., Nakashima, K., Hirayama, T., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2011) An ABRE promoter sequence is involved in osmotic stress-responsive expression of the *DREB2A* gene, which encodes a transcription factor regulating drought-inducible genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 52, 2136-2146.
  29. Qin, F., Kodaira, K., Maruyama, K., Mizoi, J., Tran, L.-S.P., Fujita, Y., Morimoto, K., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2011) *SPINDLY*, a negative regulator of GA signaling, is involved in the plant abiotic stress response. *Plant Physiol.* 157, 1900-1913.
  30. Yamada, K., Kanai, M., Osakabe, Y., Ohiraki, H., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2011) The monosaccharide absorption activity of *Arabidopsis* roots depends on the expression profiles of transporter genes under high salinity conditions. *J. Biol. Chem.* 286, 43577-43586.
  31. Maruyama, K., Todaka, D., Mizoi, J., Yoshida, T., Kidokoro, S., Matsukura, S., Takasaki, H., Sakurai, T., Yamamoto, Y.Y., Yoshiwara, K., Kojima, M., Sakakibara, H., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2012) Identification of cis-acting promoter elements in cold- and dehydration-induced transcriptional pathways in *Arabidopsis*, rice and soybean. *DNA Res.* 9, 37-49.
  32. Tanaka, H., Osakabe, Y., Katsura, S., Mizuno, S., Maruyama, K., Kusakabe, K., Mizoi, J., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2012) Abiotic stress-inducible receptor-like kinases negatively control ABA signaling in *Arabidopsis*. *Plant J.* 70, 599-613.
  33. Uraji, M., Katagiri, T., Okuma, E., Ye, W., Hossain, M. A., Masuda, C., Miura, A., Nakamura, Y., Mori, H., Shinozaki, K. and Murata, Y. (2012) Cooperative function of PLDdelta and PLDalpha1 in ABA-induced stomatal closure in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 159, 450-60.
  34. Fujita, M., Fujita, Y., Iuchi, S., Yamada, K., Kobayashi, Y., Urano, K., Kobayashi, M., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (2012) Natural variation in a polyamine transporter determines paraquat tolerance in *Arabidopsis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, 6343-6347.
  35. Kim, J.-S., Mizoi, J., Kidokoro, S., Maruyama, K., Nakajima, J., Nakashima, K., Mitsuda, N., Takiguchi, Y., Ohme-Takagi, M., Kondou, Y., Yoshizumi, T., Matsui, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2012) *Arabidopsis* GROWTH-REGULATING FACTOR 7 functions as a transcriptional repressor of ABA- and osmotic stress-responsive genes including *DREB2A*. *Plant Cell* 24, 3393-3405.
  36. Mizoi, J., Ohori, T., Moriwaki, T., Kidokoro, S., Todaka, D., Maruyama, K., Kusakabe, K., Osakabe, Y., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2012) *GmDREB2A;2*, a canonical *DREB2*-type transcription factor in soybean, is post-translationally regulated and mediates *DRE*-dependent gene expression. *Plant Physiol.* 161, 346-361.
  37. Barbosa, E.G.G., Leite, J.P., Marin, S.R.R., Marinho, J.P., Carvalho, J.F.C., Fuganti-Pagliarini, R., Farias, J.R.B., Neumaier, N., Marcelino-Guimarães, F.C., Oliveira, M.C.N., Yamaguchi-Shinozaki, K., Nakashima, K., Maruyama, K., Kanamori, N., Fujita, Y., Yoshida, T., Nepomuceno, A.L. (2012) Overexpression of the ABA-dependent *AREB1* transcription factor from *Arabidopsis thaliana* improves soybean tolerance to water-deficit. *Plant Mol. Biol. Rep.* 31, 719-730.
  38. Rodrigues, F.A., Marcolino-Gomes, J., Carvalho, J.F.C., Nascimento, L.C., Neumaier, N., Farias, J.R.B., Carazzolle, M.F., Marcelino-Guimarães, F.C., Nepomuceno, A.L. (2012) Subtractive libraries for prospecting differentially expressed genes in the soybean under water deficit. *Genet. Mol. Biol.* 35, 304-314.
  39. Santos, E.L., Cattelan, A. J., Prete, C.E.C., Neumaier, N., Oliveira, M.C.N., Farias, J.R.B., Nepomuceno, A.L., Carvalho, J.F.C. (2012) Estresse hídrico afetando nodulação, óleo, proteína e produtividade de dez cultivares de soja. *Global Sci. Technol.* 5, 109-120.
  40. Benko-Iseppon, A.M., Nepomuceno, A.L., Abdelnoor, R.V. (2012) GENOSOJA - the Brazilian soybean genome consortium: high throughput genomics and beyond. *Genet. Mol. Biol.* 35, i-iv.
  41. Neves-Borges, A.C., Nepomuceno, A.L., Grossi-De-Sá, M.De.F., Loureiro, M.E., Cruz, F., Mesquita,

- R.O., Alves-Ferreira, M., Guimarães-Dias, F., Romano, E., Nepomuceno, A.L. (2012) Expression pattern of drought stress marker genes in soybean roots under two water deficit systems. *Genet. Mol. Biol.* 35, 212-221.
42. Guimarães-Dias, F., Neves-Borges, A.C., Viana, A.A.B., Mesquita, R., Oliveira, M.C.N., Romano, E., Grossi-De-Sá, M.De.F., Nepomuceno, A.L., Loureiro, M.E., Alves-Ferreira, M. (2012) Expression analysis in response to drought stress in soybean: shedding light on the regulation of metabolic pathway genes. *Genet. Mol. Biol.* 35, 222-232.
  43. Soares-Cavalcanti, N.M., Belarmino, L.C., Kido, E.A., Wanderley-Nogueira, A.C., Bezerra-Neto, J. P., Cavalcanti-Lira, R., Pandolfi, V., Nepomuceno, A.L., Abdelnoor, R.V., Nascimento, L.C. Benko-Jseppon, A.M. (2012) In silico identification of known osmotic stress responsive genes from *Arabidopsis* in soybean and *Medicago*. *Genet. Mol. Biol.* 35, 315-321.
  44. Osakabe, Y., Arinaga, N., Umezawa, T., Katsura, S., Nagamachi, K., Tanaka, H., Ohiraki, H., Yamada, K., Seo, S.-U., Abo, M., Yoshimura, E., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2013) Osmotic stress response and plant growth controlled by the potassium transporters in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25, 609-624.
  45. Marcolino-Gomes, J, Rodrigues, F.A., Oliveira, M.C.N., Farias, J.R.B., Neumaier, N., Abdelnoor, R.V., Marcelino-Guimarães, F.C., Nepomuceno, A.L. (2013) Expression patterns of GmAP2/EREB-like transcription factors involved in soybean responses to water deficit. *PLoS One* 8, e62294.
  46. Nakayama, T.J., Rodrigues, F.A., Neumaier, N., Marcelino-Guimarães, F.C., Farias, J.R.B., Oliveira, M.C.N., Borém, A., Oliveira, A.C.B., Emygdio, B.M., Nepomuceno, A.L. (2013) Reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction studies in soybean plants under hypoxic conditions. *Genet. Mol. Res.* 13, 860-871.
  47. Engels, C., Fuganti-Pagliarini, R., Marin, S.R.R., Marcelino-Guimarães, F.C., Oliveira, M.C.N., Kanamori, N., Mizoi, J., Nakashima, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Nepomuceno, A.L. (2013) Introduction of the *rd29A:AtDREB2A* CA gene into soybean (*Glycine max* L. Merrill) and its molecular characterization in the leaves and roots during dehydration. *Genet. Mol. Biol.* 36, 556-565.
  48. Morimoto, K., Mizoi, J., Qin, F., Kim, J.-S., Sato, H., Osakabe, Y., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2013) Stabilization of *Arabidopsis* DREB2A is required but not sufficient for the induction of target genes under conditions of stress. *PLoS One* 8, e80457.
  49. Sakurai, T., Yamada, Y., Sawada, Y., Matsuda, F., Akiyama, K., Shinozaki, K., Hirai, M. Y. and Saito, K. (2013) PRIME update: innovative content for plant metabolomics and integration of gene expression and metabolite accumulation. *Plant Cell Physiol.* 54, e5.
  50. Myouga, F., Akiyama, K., Tomonaga, Y., Kato, A., Sato, Y., Kobayashi, M., Nagata, N., Sakurai, T. and Shinozaki, K. (2013) The chloroplast function database II: a comprehensive collection of homozygous mutants and their phenotypic/genotypic traits for nuclear-encoded chloroplast proteins. *Plant Cell Physiol.* 54, e2.
  51. Behnam, B., Iuchi, S., Fujita, M., Fujita, Y., Takasaki, H., Osakabe, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Kobayashi, M. and Shinozaki, K. (2013) Characterization of the promoter region of an *Arabidopsis* gene for 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase involved in dehydration-inducible transcription. *DNA Res.* 20, 315-324.
  52. Mochida, K., Uehara-Yamaguchi, Y., Takahashi, F., Yoshida, T., Sakurai, T. and Shinozaki, K. (2013) Large-scale collection and analysis of full-length cDNAs from *Brachypodium distachyon* and integration with pooidae sequence resources. *PLoS One* 8, e75265.
  53. Sakurai, T., Mochida, K., Yoshida, T., Akiyama, K., Ishitani, M., Seki, M. and Shinozaki, K. (2013) Genome-wide discovery and information resource development of DNA polymorphisms in cassava. *PLoS One* 8, e74056.
  54. Umezawa, T., Sugiyama, N., Takahashi, F., Anderson, J.C., Ishihama, Y., Peck, S.C. and Shinozaki, K. (2013) Genetics and phosphoproteomics reveal a protein phosphorylation network in the abscisic acid signaling pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Sci Signal* 6, rs8.

55. Britto-Kido, S.A., Neto, J.R.C.F., Pandolfi, V., Marcelino-Guimarães, F.C., Nepomuceno, A.L., Abdelnoor, R.V., Benko-Iseppon, A.M., Kido, E.A. (2013) Natural Antisense Transcripts in Plants: A Review and Identification in Soybean Infected with *Phakopsora pachyrhizi* SuperSAGE Library. *The Scientific World J.* 1-14.
56. Lopes-Caitar, V. S., De Carvalho, M. C., Darben, L.M., Kuwahara, M.K., Nepomuceno, A.L., Dias, W. P., Abdelnoor, R.V., Marcelino-Guimarães, F. C. (2013) Genome-wide analysis of the Hsp20 gene family in soybean: comprehensive sequence, genomic organization and expression profile analysis under abiotic and biotic stresses. *BMC Genomics* 14, 577,1-17.
57. Kido, E.A., Ferreira Neto, J.R.C., Silva, R.L., Belarmino, L.C., Bezerra Neto, J.P. Soares-Cavalcanti, N.M., Pandolfi, V., Silva, M.D., Nepomuceno, A.L., Benko-Iseppon, A.M. (2013) Expression dynamics and genome distribution of osmoprotectants in soybean: identifying important components to face abiotic stress. *BMC Bioinformatic* 14, 1471-2105.
58. Cabreira, C., Cagliari, A., Bülcker-Neto, L., Wiebke-Strohm, B., Freitas, L.B., Marcelino-Guimarães, F.C., Nepomuceno, A.L., Margis-Pinheiro, M.M.A.N., Bodanese-Zanettini, M. (2013) The Lesion Simulating Disease (LSD) gene family as a variable in soybean response to *Phakopsora pachyrhizi* infection and dehydration. *Funct. Integrative Genomics* 13, 323-338.
59. de Paiva Rolla, A.A., Carvalho, J.F.C., Fuganti-Pagliarini, R., Engels, C., do Rio, A., Marin, S.R.R., de Oliveira, M.C.N., Marcelino-Guimarães, F.C., Farias, J.R.B., Neumaier, N., Nakashima, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Nepomuceno, A.L. (2014) Phenotyping soybean plants transformed with rd29A:AtDREB1A for drought tolerance in the greenhouse and field. *Transgenic Res.* 23, 75-87.
60. Kuromori, T., Sugimoto, E., Shinozaki, K. (2014) Inter-tissue signal transfer of abscisic acid from vascular cells to guard cells. *Plant Physiol.* 164, 1587-1592.
61. Nakabayashi, R., Yonekura-Sakakibara, K., Urano, K., Suzuki, M., Yamada, Y., Nishizawa, T., Matsuda, F., Kojima, M., Sakakibara, H., Shinozaki, K., Michael, A.J., Tohge, T., Yamazaki, M., Saito, K. (2014) Enhancement of oxidative and drought tolerance in *Arabidopsis* by overaccumulation of antioxidant flavonoids. *Plant J.* 77, 367-379.
62. Marcolino-Gomes, J., Rodrigues, F.A., Fuganti-Pagliarini, R., Bendix, C., Nakayama, T.J., Celaya, B., Molinari, H.B.C., De Oliveira, M.C.N., Harmon, F.G., Nepomuceno, A.L. (2014) Diurnal oscillations of soybean circadian clock and drought responsive genes. *PLoS One* 9, e86402, 1-13.
63. Nakayama, T.J., Rodrigues, F.A., Neumaier, N., Marcelino-Guimaraes, F.C., Farias, J.R.B., Oliveira, M.C.N., Borem, A., Oliveira, A.C.B., Emygdio, B., Nepomuceno, A.L. (2014) Reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction studies in soybean plants under hypoxic conditions. *Genet. Mol. Res.* 13, 860-871.
64. Oliveira, A.B., Brito Junior, S.L., Marcelino-Guimaraes, F.C., Polizel, A., Nepomuceno, A. L., Stolf-Moreira, R., Binneck, E., Abdelnoor, R. (2014) Análise da expressão de genes relacionados a estresses em soja em resposta ao fungo *Phakopsora pachyrhizi*. *Tropical Plant Pathol.* 37, 766.
65. Leite, J.P., Barbosa, E.G.G., Marin, S.R.R., Marinho, J.P., Carvalho, J.F.C., Pagliarini, R.F., Cruz, A.S., Oliveira, M.C.N., Farias, J.R.B., Neumaier, N., Guimarães, F.C.M., Yoshida, T., Kanamori, N., Fujita, Y., Nakashima, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Desidério, J.A., Nepomuceno, A.L. (2014) Overexpression of the activated form of the AtAREB1 gene (AtAREB1ΔQT) improves soybean responses to water deficit. *Gen. Mol. Res.* 13 (3), 6272-6286.
66. Koizumi, S., Ohama, N., Mizoi, J., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2014) Functional analysis of the Hikeshi-like protein that interacts with HSP70 in *Arabidopsis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 450(1): 396-400.
67. Yoshida, T., Fujita, Y., Maruyama, K., Mogami, J., Todaka, D., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2014) Four *Arabidopsis* AREB/ABF transcription factors function predominantly in gene expression downstream of SnRK2 kinases in abscisic-acid signaling in response to osmotic stress, *Plant Cell Environ.* 12351.



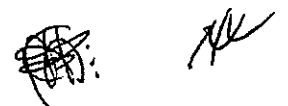
*Handwritten signature or mark.*

## (2) Other publications (review articles and books etc. in Japanese, English and Portuguese).

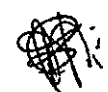
(Remark: Title and authors of publication in Japanese language are not translated in English)

1. 藤田泰成・中島一雄・吉田拓也・篠崎和子 (2010) 植物の水ストレス応答におけるアブシジン酸シグナル伝達. 柿本辰男・高山誠司・福田裕穂・松岡信編『植物のシグナル伝達-分子と応答-』共立出版, 84-91.
2. 浦野薫・篠崎一雄 (2010) メタボローム解析が解き明かす植物の水ストレス応答の代謝ネットワーク. *バイオサイエンスとインダストリー* 68, 398-403.
3. 刑部祐里子 (2013a) 植物の水環境の感知メカニズム, *バイオサイエンスとインダストリー*, 71, 520-524.
4. 篠崎一雄 (2013) Hottest Researchers 2011 に選考された研究家の発展を振り返る-環境ストレス応答の植物遺伝子ネットワークの解明と乾燥耐性作物への応用, *生物の科学 遺伝* 67, 701-707. 理工系専門書出版エヌ・ディー・エス.
5. 刑部祐里子 (2013b) 植物実験法, 実験農芸化学, 東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻・応用生命工学専攻編 (ed), pp 217-227. 朝倉書店.
6. 戸高大輔・篠崎和子 (2013) 乾燥ストレス条件下で植物の生長を制御する遺伝子の特定に成功-干ばつ下での植物の生育不良を改善する技術開発の貢献に期待-, *化学と生物* 51(11), 722-724.
7. Takahashi, F., Ichimura, K., Shinozaki, K., Shirasu, K. (2009) Plant mitogen-activated protein kinase cascades in signaling crosstalk. In Yoshioka, K., Shinozaki, K. (eds.) *Signal Crosstalk in Plant Stress Responses*, Wiley-Blackwell, 23-42.
8. Fujita, Y., Fujita, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (2009) Transcription factors involved in the crosstalk between abiotic and biotic stress-signaling networks. In Yoshioka, K., Shinozaki, K. (eds.) *Signal Crosstalk in Plant Stress Responses*, Wiley-Blackwell, 43-58.
9. Fujita, M., Fujita, Y., Takahashi, F., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (2009) Stress physiology of higher plants: cross-talk between abiotic and biotic stress signaling. In Hirt, H. (ed.) *Plant Stress Biology: From Genomics to Systems Biology*, Willey-VCH, 67-89.
10. Nakashima, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2010) Promoters and transcription factors in abiotic stress-responsive gene expression. In Pareek, A., Sopory, S.K., Bohnert, H.J., Govindjee (eds.) *Abiotic stress adaptation in plants*, Springer-Verlag Berlin, 199-216.
11. Tran, L.-S. P., Nishiyama, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (2010) Potential utilization of NAC transcription factors to enhance abiotic stress tolerance in plants by biotechnological approach. *GM Crops* 1, 34-41.
12. Tran, L.-S. P., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (2010) Role of cytokinin responsive two-component system in ABA and osmotic stress signalings. *Plant Signaling Behav.* 5, 148-150.
13. Hirayama, T., Umezawa, T. (2010) The PP2C-SnRK2 complex: the central regulator of an abscisic acid signaling pathway. *Plant Signal Behav.* 5, 160-163.
14. Urano, K., Kurihara, Y., Seki, M., Shinozaki, K. (2010) 'Omics' analyses of regulatory networks in plant abiotic stress responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13, 132-138.
15. Hirayama, T., Shinozaki, K. (2010) Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present, and future. *Plant J.* 61, 1041-1062.
16. Shinozaki, K. (2010) The ICAR2010 for development of Arabidopsis research beyond 2010. *J. Plant Res.* 123, 265-266.
17. Umezawa, T., Nakashima, K., Miyakawa, T., Kuromori, T., Tanokura, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2010) Molecular basis of the core regulatory network in ABA responses: sensing, signaling and transport. *Plant Cell Physiol.* 51, 1821-1839.
18. Fujita, Y., Fujita, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2011) ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. *J. Plant Res.* 124, 509-525.

19. Umezawa, T. (2011) Systems biology approaches to abscisic acid signaling, *J. Plant Res.* 124, 539-548.
20. Umezawa, T., Hirayama, T., Kuromori, T., Shinozaki, K. (2011) The regulatory networks of plant responses to abscisic acid. In Turkan, I. (ed) *Advances in Botanical Research Vol. 57: Plant Responses to Drought and Salinity Stress: Developments in a Post-Genomic Era*, Elsevier, 201-233.
21. Qin, F., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2011) Achievements and challenges in understanding plant abiotic stress responses and tolerance. *Plant Cell Physiol.* 52, 1569-1582.
22. Kanamori N., Giroto L., Yamaguchi-Shinozaki K., Nepomuceno A.L. (2011) Agrobacterium-mediated Transformation of Brazilian Soybean Variety, BR-16. *JIRCAS Working Rep.* 71, 75-79.
23. Kanamori N., Paiva A.A.R., Fuganti R., Marin S.R.R., Yamaguchi-Shinozaki K., Farias J.R.B., Neumaier N., Nepomuceno A.L. (2011) Development of drought stress tolerant soybean. *JIRCAS Working Rep.* 71, 81-86.
24. Mizoi, J., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2011) AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. *BBA - Gene Regul. Mech.* 1819, 86-96.
25. Nakashima, K., Takasaki, H., Mizoi, J., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2011) NAC transcription factors in plant abiotic stress responses. *BBA - Gene Regul. Mech.* 1819, 97-103.
26. Cramer, G. R., Urano, K., Delrot, S., Pezzotti, M., Shinozaki, K. (2011) Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *BMC Plant Biol.* 11, 163.
27. Ha, S., Vankova, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Tran, L.S. (2012) Cytokinins: metabolism and function in plant adaptation to environmental stresses. *Trends Plant Sci.* 17, 172-179.
28. Bianco, L.F., Carvalho, J.F.C., Terassi, F.S., Seino, Y. W., Trevizan, F.H., Onofre, E., Neumaier, N., Oliveira, M.C.N., Marcelino-Guimaraes, F.C., Farias, J.R.B., Yamaguchi-Shinozaki, K., Nepomuceno, A. L. (2012) Crecimento da soja geneticamente modificada com os gene *AtDREB1A* e *AtDREB2A* sob deficit hidrico. VII Jornada Academia da Embrapa Soja. 108-114.
29. Honna, P.T., Giroto, L., Soldera, M.C.A., Kanamori, N., Marcelino-Guimaraes, F.C., Yamaguchi-Shinozaki, K., Farias, J.R.B. (2012) Identificação de sementes de soja geneticamente modificadas utilizando a técnica de PCR convencional. VII Jornada Academia da Embrapa Soja. 134-138.
30. Choudhary, S.P., Yu, J.-Q., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Tran, L.-S.P. (2012) Benefits of brassinosteroid crosstalk. *Trends Plant Sci.* 17(10), 594-605.
31. Osakabe, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Tran, L-S. (2012) Sensing the environment: Key roles of membrane-localized kinases in plant perception and response to abiotic stress. *J. Exp. Bot.* 64(2), 445-458.
32. Fujita, Y., Yoshida, T., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2013) Pivotal role of the AREB/ABF-SnRK2 pathway in ABRE-mediated transcription in response to osmotic stress in plants. *Physiologia Plantarum* 147, 15-27.
33. Miyakawa, T., Fujita, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Tanokura, M. (2013) Structure and function of abscisic acid receptors. *Trends Plant Sci.* 18, 259-266.
34. Nakashima, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2013) ABA signaling in stress-response and seed development. *Plant Cell Rep.* 32, 959-970.
35. Osakabe, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Phan Tran, L.S. (2013) Sensing the environment: key roles of membrane-localized kinases in plant perception and response to abiotic stress. *J. Ex. Bot.*, 64, 445-458.
36. Curtin, S.J., Voytas, D.F., Stupar, R.M., Nakayama, T., Chiari, L., Nepomuceno. A.L. (2013) Engenharia Genética de Precisão. In: Aluizio Borém, Roberto Fritsche-Neto. (Org.). *Ômicas 360°. Aplicações e Estratégias para o Melhoramento de Plantas*. Led. Viçosa: UFV.
37. Marcolino-Gomes, J., Rodrigues, F.A., Fuganti-Pagliarini, R., Nakayama, T.J., Molinari, H.B.C., Harmon, F.G., Nepomuceno, A.L. (2013) Gene expression networks and cis-elements combinatorial



- models in soybean: circadian clock and drought responses. In: Workshop on Biotic and Abiotic Stress Tolerance in Plants: the Challenge for the 21st Century. *Abstract*.
38. Osakabe, Y., Osakabe, K., Shinozaki, K. (2014) Plant environmental stress responses for survival and biomass enhancement, Tuteja, N., Gill, S.S. (ed), *Climate Change and Plant Abiotic Stress Tolerance*, Wiley-Blackwell, pp 79-108.
  39. Fujita, Y., Nakashima, K., Yoshida, T., Fujita, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2014) Role of ABA signaling in drought tolerance and preharvest sprouting under climate change. In Tuteja, N., Gill, S.S. (eds.) *Climate Changes and Plant Abiotic Stress Tolerance*, Wiley-VCH, 521-553.
  40. Osakabe, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Tran, L. S. (2014a) ABA control of plant macroelement membrane transport systems in response to water deficit and high salinity. *New Phytol.* 202, 35-49.
  41. Osakabe, Y., Osakabe, K., Shinozaki, K., Tran, L. S. (2014b) Response of plants to water stress. *Front Plant Sci.* 5, 86.
  42. Fujita, M., Shinozaki, K. (2014) Identification of Polyamine Transporters in Plants: Paraquat Transport Provides Crucial Clues. *Plant Cell Physiol.* 55, 855-861.
  43. Nakashima, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (2014) The transcriptional regulatory network in the drought response and its crosstalk in abiotic stress responses including drought, cold, and heat. *Front Plant Sci.* 5, 170.
  44. Yoshida, T., Mogami, J., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2014) ABA-dependent and ABA-independent signaling in response to osmotic stress in plants, *Curr. Opin. Plant Biol.* 21, 133-139.
  45. Kuromori, T., Mizoi, J., Umezawa, T., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (2014) Stress Signaling Networks: Drought stress, Howell, S. (ed), *The Plant Sciences - Molecular Biology*, Springer, in press.
  46. Osakabe, Y., Osakabe, K. (2014) Genome editing in higher plants. In: Targeted Genome Editing Using Engineered Nucleases: ZFNs, TALENs, and the CRISPR/Cas9 System, Yamamoto T. (ed), Springer-Verlag, Germany. in press.





Annex 14 Assumed steps from start of research to commercialization of genetically modified soybean

Research & Development Phases	Discovery					Product development									
	Genes discovery		Concept test			Biological asset development		Advanced development		Pre-commercialization					Launch
Estimated cost (million US\$)	31		28.3			13.6		45.9		17.2					
Years	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
	Initial discovery - Hits														
		Advanced discovery - Leads													
	Patenting or obtaining freedom to operate (FTO - "Freedom to Operate")														
		Optimization of constructs													
			Production and selection of commercial events												
			Introgression, improvement and large scale field tests												
			Regulatory science												
			Deregulation and registration												



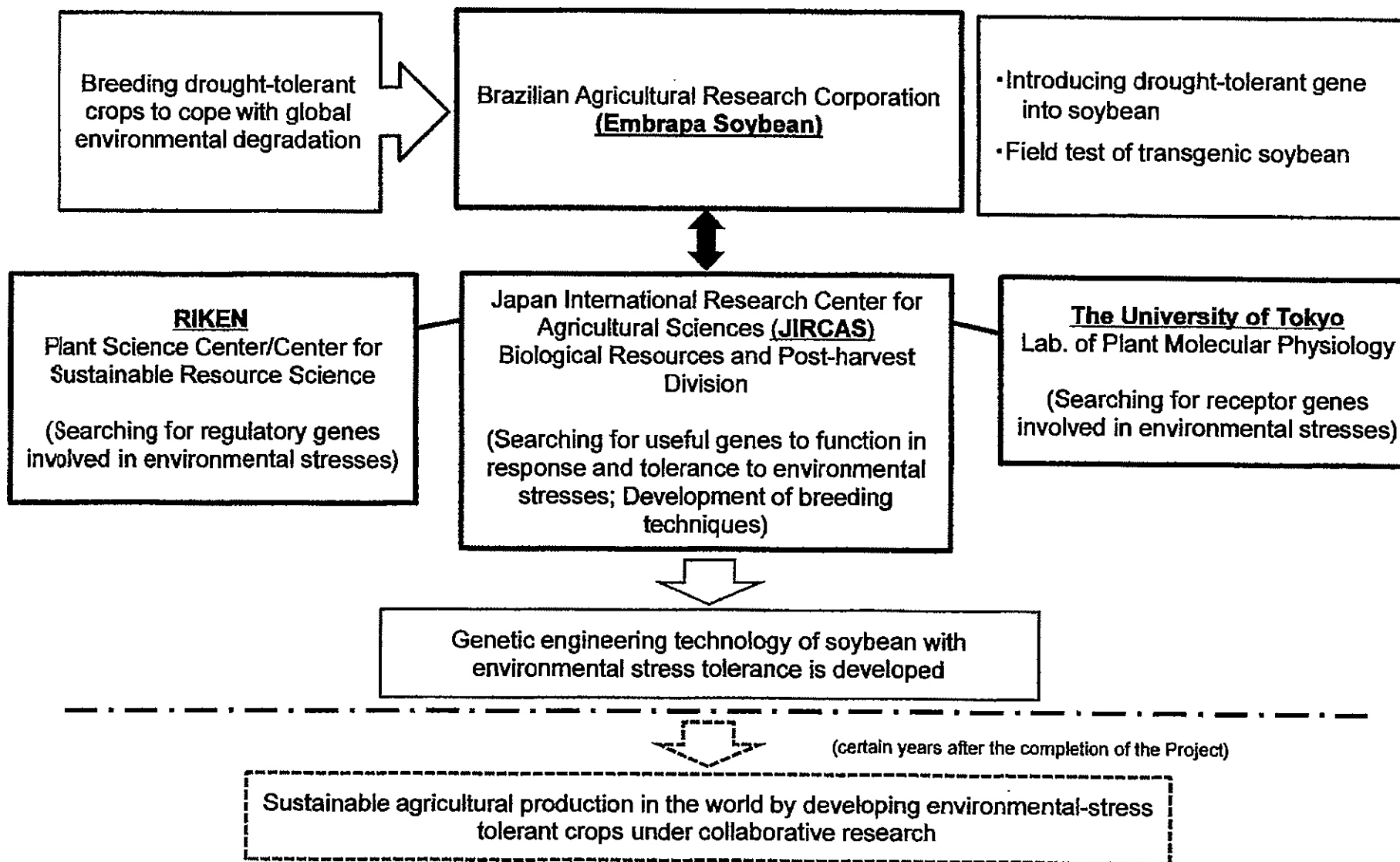
*ML*

Annex 15: Plan of Operations (comparison of progress with planned schedule)

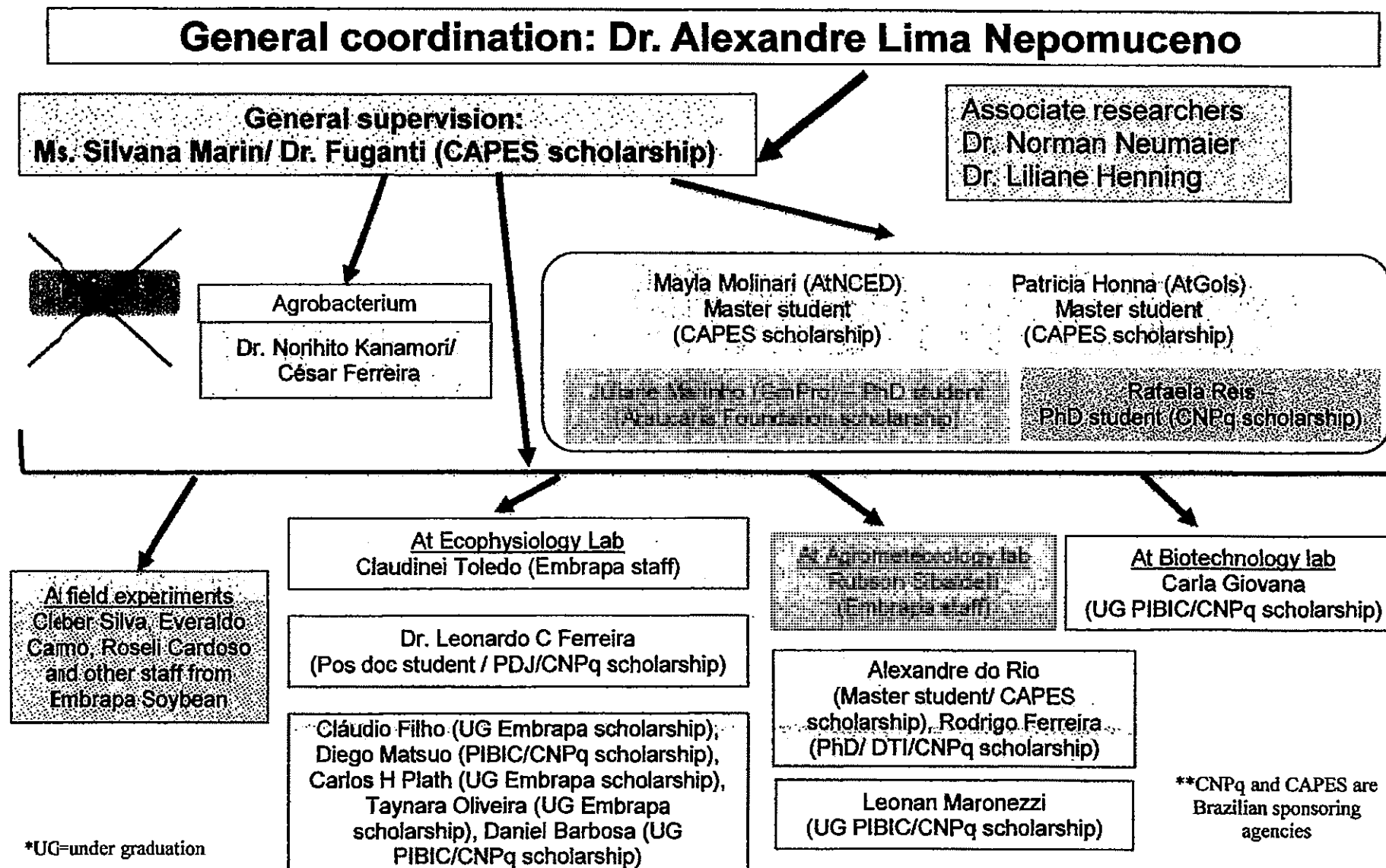
			Main responsible institutions				Planned	FY 2009					FY 2010					FY 2011					FY 2012					FY 2013					FY 2014				
			JIRCAS	University of Tokyo	RIKEN	Embrapa Soybean		IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV					
1. Useful genes related to environmental stress tolerance are identified.	1-1 Genes involved in regulation of stress tolerance are identified in plants such as soybean.	Search of genes involved in regulation of stress tolerance in model plants.					Planned																														
		Search of genes involved in regulation of stress tolerance in soybean.					Actual																														
		Functional analysis of genes involved in regulation of stress tolerance using protoplasts.					Planned																														
		Functional analysis of genes involved in regulation of stress tolerance using transgenic plants.					Actual																														
	1-2 Genes involved in stress perception are identified in plants such as soybean.	Search of genes involved in stress perception in model plants.					Planned																														
		Search of genes involved in stress perception in soybean.					Actual																														
		Functional analysis of genes involved in stress perception using transgenic plants.					Planned																														
		Actual					Actual																														
	1-3 Genes involved in regulation of stress response are identified in plants such as soybean.	Search of genes involved in regulation of stress response in model plants.					Planned																														
		Search of genes involved in regulation of stress response in soybean.					Actual																														
		Functional analysis of genes involved in regulation of stress response using transgenic plants.					Planned																														
		Actual					Actual																														
2. Stress-responsive promoters are isolated and combinations with useful genes are optimized	2-1 Stress-responsive genes are searched in soybean.	Making of oligo-array of soybean.					Planned																														
		Search and identification of stress-responsive genes using oligo-array.					Actual																														
	2-2 Stress-responsive promoters are identified in soybean.	Identification of stress-responsive genes using cDNA array of soybean.					Planned																														
		Isolation of stress-responsive promoters of soybean.					Actual																														
	2-3 Constructs of useful genes and promoters are optimized.	Collection of soybean full-length cDNA and identification of promoter sequences.					Planned																														
		Optimization of combinations of promoters and useful genes.					Actual																														
	3. Transgenic soybean lines containing constructs of promoters and useful genes are produced.	3-1 Genetic engineering technology is established in soybean.	Establishment of high-efficient gene transfer technology for soybean.					Planned																													
			Introduction of constructs containing useful genes.					Actual																													
3-2 Constructs of useful genes and promoters are introduced in soybean.		Check of existence of transgenet.					Planned																														
		Actual					Actual																														
3-3 T1 seeds of transgenic lines are collected.		Collection of next generation seeds.					Planned																														
		Actual					Actual																														
4. Transgenic soybean lines with environmental stress tolerance are selected.	4-1 Drought-inducible genes are identified and transgenic lines are selected based on gene analysis.	Creation of gene expression database of soybean.					Planned																														
		Selection of transgenic soybean lines using gene analysis.					Actual																														
		Planned					Planned																														
		Actual					Actual																														
	4-2 Heat-inducible genes are identified and transgenic lines are selected based on gene analysis.	Creation of gene expression database of soybean.					Planned																														
		Selection of transgenic soybean lines using gene analysis.					Actual																														
		Planned					Planned																														
		Actual					Actual																														
	4-3 Gene expression of transgenic plants is analyzed.	Gene expression analysis of transgenic soybean plants using oligo-array.					Planned																														
		Actual					Actual																														
	4-4 Evaluation methods of stress tolerance of soybean are established.	Establishment of evaluation methods of stress tolerance of soybean.					Planned																														
		Selection of transgenic soybean using PCR.					Actual																														
4-5 Stress tolerance of transgenic soybean lines is evaluated in greenhouse.	Stress tolerance test of transgenic soybean plants in greenhouse.					Planned																															
	Actual					Actual																															
4-6 Stress tolerance of transgenic soybean lines is evaluated in field.	Stress tolerance test of transgenic soybean plants in field.					Planned																															
	Actual					Actual																															

FY: Fiscal Year in Japan ( I :Apr.to Jun. II:Jul.to Sep. III:Oct.to Dec. IV:Jan. to Mar.)

**Annex 16 Project Implementation Structure**



Annex 17 Project Implementation Structure at Embrapa Soybean



## (1) PDM Version 1

プロジェクト名： (科学技術) 地球環境劣化に対応した環境ストレス耐性作物の作出技術の開発

プロジェクトサイト： パラナ州ロンドリーナ

相手国機関名： ブラジル農牧研究公社 (Embrapa) ダイズ研究所

日本側協力機関名： 独立行政法人 国際農林水産業研究センター (JIRCAS) (\*代表研究機関)、国立大学法人 東京大学、独立行政法人 理化学研究所 (RIKEN)

協力期間： 2010年1月～2014年12月(5年間)

作成日： 2009年8月31日(ミニッツ署名時)

プロジェクトの要約	指標	指標入手手段	外部条件
<b>[上位目標]</b> 環境ストレスに適応したダイズが開発され、ブラジルのダイズ生産の安定化に資する。	2019年までに環境劣化に対応したダイズが開発される。	--	--
<b>[プロジェクト目標]</b> 環境ストレス耐性ダイズの作出技術が開発される。	1. ダイズ等の環境ストレスに対する耐性獲得に関与する有用遺伝子3が少なくとも10種類同定される。 2. ダイズのストレス応答性プロモーターが少なくとも5種類単離され、有用遺伝子との組み合わせの最適化が行われる。 3. プロモーターと有用遺伝子の組み合わせが少なくとも5種類ダイズへ導入され、各組み合わせから少なくとも3系統の組み換え体が得られる。 4. 少なくとも1種類の環境ストレス耐性系統が選抜される。	--	--
<b>[アウトプット]</b> 1. 環境ストレスに対する耐性獲得に関与する有用遺伝子が同定される。	1-1. ダイズ等のストレス耐性制御遺伝子が5種類以上同定される。 1-2. ダイズ等のストレス受容に関与する膜タンパク質遺伝子が2種類以上同定される。 1-3. ダイズ等のストレス応答制御遺伝子が3種類以上同定される。	--	--
2. ストレス応答性プロモーターの単離と有用遺伝子との組み合わせの最適化が行われる。	2-1. ダイズのストレス応答性遺伝子が少なくとも100種類同定される。 2-2. ダイズのストレス応答性プロモーターが少なくとも3種類同定される。 2-3. 少なくとも5種類のプロモーターと有用遺伝子の組み合わせの最適化が行われる。	--	--
3. プロモーターと有用遺伝子の組み合わせが導入されたダイズ系統が得られる。	3-1. ダイズへの形質転換4効率が2%以上の遺伝子組み換え技術が確立される。 3-2. プロモーターと有用遺伝子の組み合わせが少なくとも5種類ダイズに導入される。 3-3. 少なくとも3系統のT1世代5種子が増殖される。	--	--
4. 環境ストレス耐性を示す組み換えダイズ系統が選抜される。	4-1. 乾燥応答性遺伝子が少なくとも2種類同定され、遺伝子解析を行い、組み換えダイズが少なくとも2系統選抜される。 4-2. 高温応答性遺伝子が少なくとも2種類同定され、遺伝子解析を行い、組み換えダイズが少なくとも2系統選抜される。 4-3. 少なくとも2種類の遺伝子とプロモーターの組み合わせに由来する独立な系統から、少なくとも2系統の遺伝子発現が解析される。 4-4. 温室、圃場でのダイズのストレス耐性試験手法が確立される。 4-5. 温室で2種類以上(各2系統以上)の組み換えダイズのストレス耐性評価が行われる。 4-6. 圃場で2種類以上(各2系統以上)の組み換えダイズのストレス耐性評価が行われる。	--	--

[活動]	[投入]		---
	<日本側>	<ブラジル側>	
1-1 ダイズ等のストレス耐性制御遺伝子の同定を行う。 1-2 ダイズ等のストレス受容に関与する遺伝子の同定を行う。 1-3 ダイズ等のストレス応答制御遺伝子の同定を行う。  2-1 ダイズのストレス応答性遺伝子の探索を行う。 2-2 ダイズのストレス誘導応答性プロモーターの同定を行う。 2-3 プロモーターと有用遺伝子の組み合わせの最適化を行う。  3-1 ダイズへの遺伝子組み換え技術を確認する。 3-2 プロモーターと有用遺伝子の組み合わせをダイズに導入する。 3-3 遺伝子を導入したダイズの T1 世代種子を増殖する。  4-1 乾燥応答性遺伝子の同定と、遺伝子解析を行って、組み換えダイズ系統の選抜を行う。 4-2 高温応答性遺伝子の同定と、遺伝子解析を行って、組み換えダイズ系統の選抜を行う。 4-3 組み換えダイズの遺伝子発現解析を行う。 4-4 ダイズの乾燥ストレス耐性評価手法を確認する。 4-5 温室での組み換えダイズのストレス耐性評価を行う。 4-6 圃場での組み換えダイズのストレス耐性評価を行う。	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 業務調整員</li> <li>・ 在外研究員(短期)</li> <li>・ ブラジル人研究者招聘</li> <li>・ 実験機器、車両、試薬、実験用消耗品等</li> <li>・ 研究補助者、ポスドク雇用一部負担 (プロジェクト開始後 2 年半まで 4 名を JICA で負担)</li> <li>・ プロジェクトに必要な経費等</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 研究者・技術者の配置</li> <li>・ 学生の募集、雇用</li> <li>・ 施設、プロジェクト事務所提供</li> <li>・ 資機材、ランニングコスト</li> <li>・ プロジェクトに必要な経費の確保</li> </ul>	---  <b>[前提条件]</b>  ---

(2) PDM Version 2

プロジェクト名： (科学技術) 地球環境劣化に対応した環境ストレス耐性作物の作出技術の開発

プロジェクトサイト： パラナ州ロンドリーナ

相手国機関名： ブラジル農牧研究公社 (Embrapa) ダイズ研究所

日本側協力機関名： 独立行政法人 国際農林水産業研究センター (JIRCAS) (\*代表研究機関)、国立大学法人 東京大学、独立行政法人 理化学研究所 (RIKEN)

協力期間： 2010年3月4日～2015年3月3日 (5年間)

作成日： 2012年3月15日のJCCで承認

プロジェクトの要約	指標	指標入手手段	外部条件
<b>[上位目標]</b> 環境ストレスに適応したダイズが開発され、ブラジルのダイズ生産の安定化に資する。	2019年までに環境劣化に対応したダイズが開発される。	---	---
<b>[プロジェクト目標]</b> 環境ストレス耐性ダイズの作出技術が開発される。	1. ダイズ等の環境ストレスに対する耐性獲得に関与する有用遺伝子が少なくとも10種類同定される。 2. ダイズのストレス応答性プロモーターが少なくとも5種類単離され、有用遺伝子との組み合わせの最適化が行われる。 3. プロモーターと有用遺伝子の組み合わせが少なくとも5種類ダイズへ導入され、各組み合わせから少なくとも3系統の組み換え体を得る。 4. 少なくとも1種類の環境ストレス耐性系統を選抜される。	---	---
<b>[アウトプット]</b> 1. 環境ストレスに対する耐性獲得に関与する有用遺伝子が同定される。	1-1 ダイズ等のストレス耐性制御遺伝子が5種類以上同定される。 1-2 ダイズ等のストレス受容に関与する膜タンパク質遺伝子が2種類以上同定される。 1-3 ダイズ等のストレス応答制御遺伝子が3種類以上同定される。	---	---
2. ストレス応答性プロモーターの単離と有用遺伝子との組み合わせの最適化が行われる。	2-1 ダイズのストレス応答性遺伝子が少なくとも100種類同定される。 2-2 ダイズのストレス応答性プロモーターが少なくとも3種類同定される。 2-3 少なくとも5種類のプロモーターと有用遺伝子の組み合わせの最適化が試みられる。	---	---
3. プロモーターと有用遺伝子の組み合わせが導入されたダイズ系統が得られる。	3-1 ダイズへの形質転換効率が1.5%以上の遺伝子組み換え技術が確立される。 3-2 プロモーターと有用遺伝子の組み合わせが少なくとも5種類ダイズに導入される。 3-3 少なくとも3系統のT1世代種子が増殖される。	---	---
4. 環境ストレス耐性を示す組み換えダイズ系統を選抜される。	4-1 乾燥応答性遺伝子が少なくとも2種類同定され、遺伝子解析が行われ、組み換えダイズが少なくとも2系統選抜される。 4-2 高温応答性遺伝子が少なくとも2種類同定され、遺伝子解析が行われ、組み換えダイズが少なくとも2系統選抜される。 4-3 少なくとも2種類の遺伝子とプロモーターの組み合わせに由来する独立な系統から、少なくとも2系統の遺伝子発現が解析される。 4-4 温室、圃場でのダイズのストレス耐性試験手法が確立する。 4-5 温室で2種類以上(各2ライン以上)の組み換えダイズのストレス耐性評価が行われる。 4-6 圃場で2種類以上(各2ライン以上)の組み換えダイズのストレス耐性評価が行われる。	---	---

[活動]	[投入]		[前提条件]
	<日本側>	<ブラジル側>	
1-1 ダイズ等のストレス耐性制御遺伝子の同定を行う。 1-2 ダイズ等のストレス受容に関与する遺伝子の同定を行う。 1-3 ダイズ等のストレス応答制御遺伝子の同定を行う。  2-1 ダイズのストレス応答性遺伝子の探索を行う。 2-2 ダイズのストレス誘導応答性プロモーターの同定を行う。 2-3 プロモーターと有用遺伝子の組み合わせの最適化を行う。  3-1 ダイズへの遺伝子組み換え技術を確立する。 3-2 プロモーターと有用遺伝子の組み合わせをダイズに導入する。 3-3 遺伝子を導入したダイズの T1 世代種子を増殖する。  4-1 乾燥応答性遺伝子の同定と、遺伝子解析を行って、組み換えダイズ系統の選抜を行う。 4-2 高温応答性遺伝子の同定と、遺伝子解析を行って、組み換えダイズ系統の選抜を行う。 4-3 組み換えダイズの遺伝子発現解析を行う。 4-4 ダイズの乾燥ストレス耐性評価手法を確立する。 4-5 温室での組み換えダイズのストレス耐性評価を行う。 4-6 圃場での組み換えダイズのストレス耐性評価を行う。	・ 業務調整員 ・ 在外研究員（短期） ・ ブラジル人研究者の日本への招聘 ・ 機材 ・ ポスドク 2 名（あるいはポスドク 1 名と修士研究員 1 名）及び研究補助者 2 名の雇用費用の一部負担 ・ プロジェクトに必要なその他の経費等	・ 研究者・技術者の配置 ・ ポスドク 2 名（あるいはポスドク 1 名と修士研究員 1 名）及び研究補助者 2 名の雇用費用の一部負担 ・ 施設、プロジェクト事務所提供 ・ 資機材、ランニングコスト ・ プロジェクトに必要な経費の確保	---  [前提条件]  ---



## 評価グリッド (和文—英文)

## (1) 和文版

## 1. 評価グリッド

5項目 その他	評価設問		必要なデータ	情報源	データ収集方法
	大項目	小項目			
妥当性	プロジェクト目標及び上位目標は、対象地域・社会のニーズに合致しているか。	ブラジルにおける耐乾性ダイズ品種開発の必要性	対象地域・社会のニーズに関する情報	Embrapa ダイズ研究所の研究者等及びプロジェクト報告書	資料レビュー、インタビュー
	ターゲット・グループのニーズに合致しているか。	(PDM 上の裨益者： Embrapa ダイズ研究所)	ニーズに関する情報や関係者の意見	Embrapa ダイズ研究所の研究者等	インタビュー
	本プロジェクトがめざす効果は、ブラジルの開発政策に合致しているか。	国家計画等で耐乾性ダイズ品種開発が優先課題として位置づけられているか。	政策面での位置づけ関係者の意見	①国家開発計画 (a: 成長加速プログラム： PAC2 : Plano de Aceleração do Crescimento Econômico 2, b: 多年度計画 2012-2015, Plano Plurianual 2012-2015) ②Embrapa ダイズ研究所関係職員	①資料レビュー ②インタビュー
	日本の援助政策・方針との整合性はあるか。	対ブラジル援助方針との整合性はあるか。	わが国のブラジルに対する協力重点分野	国別援助方針、事業展開計画、国別データブック、その他 (気候変動対応)	資料レビュー
	手段としての適切性	プロジェクトのアプローチ、対象地域の選択は適切であったか。	関係者の意見	①各種プロジェクト報告書 ②日本人専門家/研究者、ブラジル側研究者	①資料レビュー ②インタビュー
		ターゲット・グループの選定は適正だったか。	関係者の意見	①各種プロジェクト報告書 ②日本人専門家/研究者、ブラジル側研究者	①資料レビュー ②インタビュー
	日本の技術の優位性はあるか。	関係者の意見	①各種プロジェクト報告書 ②日本人専門家/研究者、ブラジル側研究者	①資料レビュー ②インタビュー	

5 項目	評価設問		必要なデータ	情報源	データ収集方法
	大項目	小項目			
有効性	プロジェクト目標は、プロジェクト終了時まで達成されるかどうか？ 「環境ストレス耐性ダイズの作出技術が開発される。」		(達成度表のとおり)	(達成度表のとおり)	(達成度表のとおり)
	プロジェクトのアウトプットはプロジェクト目標の達成に貢献しているか。	アウトプットは、プロジェクト目標を達成するために十分であったかどうか。「アウトプットがすべて達成されればプロジェクト目標は達成されるだろう」という論理に無理はなかったか。	・関係者の意見	日本人専門家/研究者、ブラジル側研究者	インタビュー
	外部条件の影響	(PDM に設定なし)			
	プロジェクト以外に貢献した要因はあるか。		・実施プロセスの情報 ・関係者の意見	①各種プロジェクト報告書 ②日本人専門家/研究者、ブラジル側研究者	①資料レビュー ②インタビュー
	プロジェクト目標達成を阻害する要因はあるか。		・関係者の意見	①各種プロジェクト報告書、終了時評価事前資料等 ②日本人専門家/研究者、ブラジル側研究者	①資料レビュー ②インタビュー

5 項目	評価設問		必要なデータ	情報源	データ収集方法
	大項目	小項目			
効率性	アウトプットは、達成されているかどうか。		(達成度表のとおり)	(達成度表のとおり)	(達成度表のとおり)
	達成されたアウトプットからみて、投入の質・量・タイミングは適切か。	日本人専門家派遣の人数、専門分野・能力、派遣のタイミング・期間は適切か。	・派遣実績 ・関係者の意見	①各種プロジェクト報告書、終了時評価事前資料等 ②日本人専門家/研究者、ブラジル側研究者	①資料レビュー ②質問票、インタビュー
		供与機材の種類、量、供与時期は適切か。	・機材供与実績、利用状況 ・関係者の意見	①各種プロジェクト報告書、終了時評価事前資料等 ②日本人専門家/研究者、ブラジル側研究者	①資料レビュー ②質問票、インタビュー
		研修員受入れの人数、内容、時期などは適切か(本邦研修)。	・研修受入実績	①各種プロジェクト報告書、終了時評価事前資料等 ②日本人専門家/研究者、ブラジル側研究者	①資料レビュー ②インタビュー
		日本側の現地活動費の活用は適切であったか。	・予算支出実績	①終了時評価事前資料等 ②日本人専門家/研究者	①資料レビュー ②インタビュー

	ブラジル側研究者等の配置人数、配置のタイミング、能力等は適切か。	・ブラジル側研究者等の配置状況 ・関係者の意見	①各種プロジェクト報告書、終了時評価事前資料等 ②日本人専門家/研究者、ブラジル側研究者	①資料レビュー ②質問票、インタビュー
	事務室、ラボ、試験圃場等の規模、利便性は適切か。	・事務室等の現状 ・関係者の意見	①各種プロジェクト報告書、終了時評価事前資料等 ②日本人専門家/研究者、ブラジル側研究者	①直接観察 ②インタビュー
	ブラジル側のプロジェクト予算支出は、適切な規模であったか。	・相手側コスト負担実績	①各種プロジェクト報告書、終了時評価事前資料等 ②ブラジル側研究者	資料レビュー、質問票
投人は十分活用されているか。	供与機材等は有効に利用されているか。	・供与機材利用状況	①日本人専門家/研究者、ブラジル側研究者 ②直接観察	①インタビュー ②直接観察
効率性を阻害した要因はあるか。	ブラジル側研究者等の定着度は、良好か。	・C/Psの当初の配置と現状との比較	①各種プロジェクト報告書、終了時評価事前資料等 ②ブラジル側研究者	資料レビュー、インタビュー
	その他の要因はあるか。(例：MTA 締結までに要した時間、温室の温度調整がしばらくうまく機能しなかったことなど)	・関係者の意見	日本人専門家/研究者、ブラジル側研究者	質問票、インタビュー

5項目	評価設問		必要なデータ	情報源	データ収集方法
	大項目	小項目			
インパクト	上位目標「環境ストレスに適応したダイズが開発され、ブラジルのダイズ生産の安定化に資する」が将来（2019年までに）達成するかどうかの見通し。		(達成度表のとおり)	(達成度表のとおり)	(達成度表のとおり)
	上位目標を達成するために必要な方策が既に考えられているかどうか。		・関係者からの情報	日本人専門家/研究者、ブラジル側研究者	インタビュー
	上位目標達成のための外部条件が影響する可能性	(設定なし)			
	ターゲット・グループ以外に波及した影響はあるか。	これまでのプロジェクト活動を通じて、ターゲット・グループ以外へ波及したインパクトの事例があるか。	・関係者からの情報	日本人専門家/研究者、ブラジル側研究者	インタビュー
	その他の正負のインパクト	その他のインパクト	・関係者からの情報	日本人専門家/研究者、ブラジル側研究者	インタビュー

5項目	評価設問		必要なデータ	情報源	データ収集方法
	大項目	小項目			
持続性 (見込み)	今後も、国家開発計画や農業セクター戦略等の関連政策において、耐乾性のダイズ品種開発の重要性が継続するかどうか（見込み）。		・国家政策、その他関連政策	①国家開発計画、その他農業セクター関連政策 ②Embrapa ダイズ研究所幹部職員	①資料レビュー ②インタビュー
	カウンターパート機関 (Embrapa ダイズ研究所) 等では、本プロジェクトがどのように認識されているか。		・関係者の意見	Embrapa ダイズ研究所幹部職員	インタビュー
	カウンターパート機関に、本プロジェクトの成果（環境ストレス耐性ダイズの作出技術）を活用・発展させていくために必要な組織体制があるかどうか。（組織面）	プロジェクト終了後、Embrapa ダイズ研究所は、環境ストレス耐性ダイズの作出技術を活用して、実際に農家が使用できるダイズ系統開発までの研究を円滑に実施できる組織体制をもっているかどうか。	・関係者の意見	①Embrapa ダイズ研究所幹部職員 ②日本人専門家/研究者、ブラジル側研究者	①インタビュー ②インタビュー
	カウンターパート機関には、本プロジェクトの成果を活用・発展させていくために必要な資金が確保されているかどうか、あるいは資金を獲得する能力を身に付けているかどうか。（資金面）	プロジェクト終了後、Embrapa ダイズ研究所が独自資金で、実際に農家が使用できるダイズ系統開発までの研究を継続実施できる資金的能力があるかどうか。	・関係者の意見	①Embrapa ダイズ研究所幹部職員 ②日本人専門家/研究者、ブラジル側研究者	①インタビュー ②インタビュー
	カウンターパート機関の関係職員は、本プロジェクト終了後も、適切に、プロジェクトの成果を継続的に活用・実施できる能力を身に付けているかどうか。また、プロジェクトに参加した職員の勤務の継続性があるかどうか。（技術面）	プロジェクトに参加した Embrapa ダイズ研究所の研究者、特に、形質転換から農家が使用できるダイズ系統開発までの研究にかかわる技術者の技術水準が十分高いかどうか。また、プロジェクトに参加した研究者の勤務の継続性があるかどうか。	・関係者の意見	①日本人専門家/研究者、ブラジル側研究者	①インタビュー ②インタビュー
	供与資機材の維持管理は適切に行われているか。また、協力終了後も適切に行われる見通しはあるか。		・関係者の意見	日本人専門家/研究者、ブラジル側研究者	インタビュー
	持続性に影響を与えるその他の貢献・阻害要因は何か。		・関係者の意見	日本人専門家/研究者、ブラジル側研究者	質問票、インタビュー

## 2. 実施プロセスの検証

	評価設問		情報源	データ収集方法
	大項目	小項目		
実施プロセス	当初計画した成果を達成するためにどのような計画・実施体制の変更・軌道修正が行われたか。	プロジェクト実施中に把握されていた課題は何か。その課題はどのように解決されたか。	①各種プロジェクト報告書、終了時評価事前資料等 ②日本人専門家/研究者、ブラジル側研究者	①資料レビュー ②インタビュー
		共同研究や技術移転の方法に問題はなかったか。	問題がある場合、どの分野におけるどのような共同研究や技術移転方法に問題があったか。どのように解決されたか。	①各種プロジェクト報告書、終了時評価事前資料等 ②日本人専門家/研究者、ブラジル側研究者
	相手国のオーナーシップ	①ブラジル側研究者等の配置の適正さ。 ②予算手当ては適切か。	①各種プロジェクト報告書、終了時評価事前資料等 ②日本人専門家/研究者、ブラジル側研究者	資料レビュー
		Embrapa の本プロジェクトについての認識や参加度は高いか。	日本人専門家/研究者、ブラジル側研究者	インタビュー
	プロジェクトのマネジメント体制に問題はなかったか。	JCC は、必要な時期に実施され、必要なテーマが話し合われていたか。	①各種プロジェクト報告書、終了時評価事前資料等 ②日本人専門家/研究者、ブラジル側研究者	①資料レビュー ②インタビュー
		その他の定例会議等を通じて、プロジェクト・チーム内（専門家、関係機関関係者及びカウンターパート）の意志決定メカニズムが十分機能しているか。	①各種プロジェクト報告書、終了時評価事前資料等 ②日本人専門家/研究者、ブラジル側研究者	①資料レビュー ②インタビュー
		プロジェクトの進捗状況は、どのようにモニタリングされていたか。	日本人専門家/研究者、ブラジル側研究者	インタビュー
		日本人専門家・研究者とカウンターパート機関の研究者等とのコミュニケーションは、円滑に行われているか。	日本人専門家/研究者、ブラジル側研究者	質問票
		JICA ブラジル事務所及び JICA 本部との連絡・協力が円滑に実施されたか。	日本人専門家/研究者	インタビュー

3. 達成度表 (上位目標、プロジェクト目標、アウトプットの達成度)

	項目		必要な情報・データ (指標)	情報源	データ収集方法
	主項目	サブ項目			
達成度	上位目標の達成見込み 環境ストレスに適応したダイズが開発され、ブラジルのダイズ生産の安定化に資する。		2019年までに環境劣化に対応したダイズが開発される。	Embrapa ダイズ研究所の記録	資料レビュー
	プロジェクト目標の達成見込み 環境ストレス耐性ダイズの作出技術が開発される。		1. ダイズ等の環境ストレスに対する耐性獲得に関与する有用遺伝子が少なくとも10種類同定される。 2. ダイズのストレス応答性プロモーターが少なくとも5種類単離され、有用遺伝子との組み合わせの最適化が行われる。 3. プロモーターと有用遺伝子の組み合わせが少なくとも5種類ダイズへ導入され、各組み合わせから少なくとも3系統の組み換え体を得る。 4. 少なくとも1種類の環境ストレス耐性系統を選抜される。	1. プロジェクトの記録 2. プロジェクトの記録 3. プロジェクトの記録 4. プロジェクトの記録	資料レビュー
	アウトプットは計画どおり産出しているか。	1. 環境ストレスに対する耐性獲得に関与する有用遺伝子が同定される。	1-1 ダイズ等のストレス耐性制御遺伝子が5種類以上同定される。 1-2 ダイズ等のストレス受容に関与する膜タンパク質遺伝子が2種類以上同定される。 1-3 ダイズ等のストレス応答制御遺伝子が3種類以上同定される。	1-1. プロジェクトの記録 1-2. プロジェクトの記録 1-3. プロジェクトの記録	資料レビュー
		2. ストレス応答性プロモーターの単離と有用遺伝子との組み合わせの最適化が行われる。	2-1 ダイズのストレス応答性遺伝子が少なくとも100種類同定される。 2-2 ダイズのストレス応答性プロモーターが少なくとも3種類同定される。 2-3 少なくとも5種類のプロモーターと有用遺伝子の組み合わせの最適化が試みられる。	2-1. プロジェクトの記録 2-2. プロジェクトの記録 2-3. プロジェクトの記録	資料レビュー
		3. プロモーターと有用遺伝子の組み合わせが導入されたダイズ系統が得られる。	3-1 ダイズへの形質転換効率が1.5%以上の遺伝子組み換え技術が確立される。 3-2 プロモーターと有用遺伝子の組み合わせが少なくとも5種類ダイズに導入される。 3-3 少なくとも3系統のT1世代種子が増殖される。	3-1. プロジェクトの記録 3-2. プロジェクトの記録 3-3. プロジェクトの記録	資料レビュー
		4. 環境ストレス耐性を示す組み換えダイズ系統を選抜される。	4-1 乾燥応答性遺伝子を少なくとも2種類同定され、遺伝子解析が行われ、組み換えダイズが少なくとも2系統選抜される。 4-2 高温応答性遺伝子を少なくとも2種類同定され、遺伝子解析が行われ、組み換えダイズが少なくとも2系統選抜される。 4-3 少なくとも2種類の遺伝子とプロモーターの組み合わせに由来する独立な系統から、少なくとも2系統の遺伝子発現が解析される。 4-4 温室、圃場でのダイズのストレス耐性試験手法が確立する。 4-5 温室で2種類以上(各2ライン以上)の組み換えダイズのストレス耐性評価が行われる。 4-6 圃場で2種類以上(各2ライン以上)の組み換えダイズのストレス耐性評価が行われる。	4-1. プロジェクトの記録 4-2. プロジェクトの記録 4-3. プロジェクトの記録 4-4. プロジェクトの記録 4-5. プロジェクトの記録 4-6. プロジェクトの記録	資料レビュー

## (2) 英文版

## 1. Evaluation Grid

Evaluation criterion	Evaluation Question		Information/ data required	Information source	Data collection method	
	Main Question	Sub Question				
Relevance	Are the Project Purpose and the Overall Goal relevant to the needs of the target area and society?	Is there higher necessity to develop soybean varieties (lines) resistant to environmental stresses (drought tolerance) in Brazil?	• Information about the needs of the target area and society	• Researchers of Embrapa Soybean, etc. and project reports	Data review and Interview	
	Is the Project in line with the needs of the target group?	(Remarks: Target beneficiary is Embrapa Soybean)	• Information about the needs and opinions of persons concerned	• Researchers of Embrapa Soybean, etc.	Interview	
	Are the aims of the Project relevant to the national development plan of Brazil, etc.?	Importance of development of soybean varieties resistant to environmental stresses (drought tolerance) within the national development plan of Brazil and others.	• Policy status or importance • Opinions of persons concerned	• National Development Plan (a: Plano de Aceleração do Crescimento Econômico 2, b: Plano Plurianual 2012-2015) • Staff concerned in Embrapa Soybean	Data review and Interview	
	Conformity to ODA policy of Japan and JICA's assistance poolicy	Conformity of priority assistance subjects of Japanese Government and JICA	• Priority assistance subjects of Japanese Government and JICA to Brazil	• Assistance policy of Japan, Country-wise Implementation Plan, others (measures against climate changes)	Data review	
	Suitability as a means	Were the project approach and the target areas adequately selected?		• Opinions of persons concerned	1) Various project reports, etc. 2) Japanese experts/ researchers & Brazilian researchers	1) Data review 2) Interview
		Is the selection of the target group?		• Opinions of persons concerned	1) Various project reports, etc. 2) Japanese experts/ researchers & Brazilian researchers	1) Data review 2) Interview
Are there advantages in Japanese technologies?			• Opinions of persons concerned	1) Various project reports, etc. 2) Japanese experts/ researchers & Brazilian researchers	1) Data review 2) Interview	

Evaluation criterion	Evaluation Question		Information/ data required	Information source	Data collection method
	Main Question	Sub Question			
Effectiveness	Will the Project Purpose be achieved by the end of the Project? "Genetic engineering technology of soybean with environmental stress tolerance is developed."		(Table of achievement)	(Table of achievement)	(Table of achievement)
	Contribution of the Outputs to achieve the Project Purpose.	Were the Outputs enough to achieve the Project Purpose? Is it no wonder in the logic that "the Project Purpose would be achieved if all the Outputs were achieved?"	• Opinions of persons concerned	• Japanese experts/ researchers & Brazilian researchers	Interview
	Influence of Important Assumptions which are described in PDM	(no important assumption in PDM)			
	Factors promoted to achieve the Project Purpose.	Other factors influenced.	• Information of implementation process • Opinions of persons concerned	1) Various project reports, etc. 2) Japanese experts/ researchers & Brazilian researchers	1) Data review 2) Interview
	Factors hampered to achieve the Project Purpose.	Other factors influenced.	• Opinions of persons concerned	1) Various project reports, etc. 2) Japanese experts/ researchers & Brazilian researchers	1) Data review 2) Interview

Evaluation criterion	Evaluation Question		Information/ data required	Information source	Data collection method
	Main Question	Sub Question			
Efficiency	Degree of achievement of the Outputs		(Table of achievement)	(Table of achievement)	(Table of achievement)
	Were quality, quantity and timing of Inputs to the Project appropriate compared to outputs achieved by the Project?	Appropriateness about number, specialty, capability, duration, timing of dispatch of Japanese experts/researchers.	• Record of dispatch of Japanese experts/researchers • Opinions of persons concerned	1) Various project reports including the preparatory report for the terminal evaluation 2) Japanese experts/ researchers & Brazilian researchers	1) Data review 2) Questionnaire, Interview
		Appropriateness about kind, quantity and timing of provision of equipment	• Record of procurement of equipment, situation of use of equipment • Opinions of persons concerned	1) Various project reports including the preparatory report for the terminal evaluation 2) Japanese experts/ researchers & Brazilian researchers	1) Data review 2) Questionnaire, Interview
		Appropriateness of trainings in Japan (number of persons, training contents, and duration)	• Record of trainings	1) Various project reports including the preparatory report for the terminal evaluation 2) Japanese experts/ researchers & Brazilian researchers	1) Data review 2) Questionnaire, Interview
		Appropriateness of budget allocated by Japanese side	• Record on allocation of budget for local activities	1) The preparatory report for the terminal evaluation 2) Japanese experts/ researchers	1) Data review 2) Interview
		Appropriateness about number, capability and timing of assignment of	• Record of assignment of Brazilian researchers	1) Various project reports including the preparatory report for the terminal evaluation	1) Data review 2) Questionnaire, Interview



	Brazilian researchers	• Opinions of persons concerned	2) Japanese experts/ researchers & Brazilian researchers	
	Appropriateness about size and convenience of office space, laboratories, experimental field, etc. utilized for the Project.	• Situation of office space etc. that are utilizing under the Project. • Opinions of persons concerned	1) Various project reports including the preparatory report for the terminal evaluation 2) Japanese experts/ researchers & Brazilian researchers	1) Site observation 2) Interview
	Appropriateness about budget allocated by Brazilian side	• Record on budget allocated by Brazilian side to the Project	1) Various project reports including the preparatory report for the terminal evaluation 2) Brazilian researchers	1) Data review 2) Questionnaire
Utilization of inputs	Utilization of equipment provided under the Project	• Situation of utilization of equipment	1) Japanese experts/ researchers & Brazilian researchers 2) Observation at site	1) Interview 2) Observation at site
Factors hampered that influenced on efficiency of the Project	Stability of Brazilian researchers involved in the project activities	• Compare planned assignment of Brazilian researchers and their present assignment	1) Various project reports including the preparatory report for the terminal evaluation 2) Brazilian researchers	Data review, Interview
	Other factors influenced. (for example, duration necessary for signing MTA and mal function of temperature control of green house)	• Opinions of persons concerned	• Japanese experts/ researchers & Brazilian researchers	Questionnaire, Interview

Evaluation criterion	Evaluation Question		Information/ data required	Information source	Data collection method
	Main Question	Sub Question			
Impact	Is there expectation of achievement of the Overall Goal in future (before 2019)? “Soybeans adapted to environmental stresses are developed, which contributes to the stabilization of the soybean production in Brazil.”		(Table of achievement)	(Table of achievement)	(Table of achievement)
	Are measures for promoting achievement of the Overall Goal considered already?		• Opinions of persons concerned	• Japanese experts/ researchers & Brazilian researchers	Interview
	Important assumption for achieving the Overall Goal	(no important assumption)			
	Influence to persons who are not within the target group of the Project	Are there any examples that the project activities made influence to persons other than targeted group?	• Opinions of persons concerned	• Japanese experts/ researchers & Brazilian researchers	Interview
	Other positive and negative impacts of the Project.	Other positive/ negative effects/ impact	• Opinions of persons concerned	• Japanese experts/ researchers & Brazilian researchers	Interview, questionnaire

Evaluation criterion	Evaluation Question		Information/ data required	Information source	Data collection method
	Main Question	Sub Question			
Sustainability	Prospect on continuity of importance of development of variety of soybeans resistant to environmental stresses (drought tolerance) in national development plan and other related policies. (prospect)		• National development plan and other related policies	1) National development plan and other agricultural development policies 2) Managerial persons of Embrapa Soybean	1) Data review 2) Interview
	Recognition of this project by the counterparts agencies (Embrapa Soybean)		• Opinions of persons concerned	Managerial persons of Embrapa Soybean	Interview
	Does counterpart agency have necessary organizational capacity in order to utilize and develop further the outcomes (development of soybean varieties resistant to environmental stresses) of the Project after the completion of the JICA cooperation? (Organizational aspect)	Does Embrapa Soybean have suitable organizational setup for continuing research activities efficiently for developing environmental stresses tolerant soybean varieties (lines) which can be used by farmers after the completion of the Project?	• Opinions of persons concerned	1) Managerial persons of Embrapa Soybean 2) Japanese experts/ researchers & Brazilian researchers	1) Interview 2) Interview
	Does counterpart agency have budgetary capacity in order to utilize and develop further the outcomes of the Project after the completion of the JICA cooperation? (Financial aspect)	Prospect of financial capability of Embrapa Soybean to continue research activities for developing environmental stresses tolerant soybean varieties (lines) which can be used by farmers after the completion of the Project?	• Opinions of persons concerned	1) Managerial persons of Embrapa Soybean 2) Japanese experts/ researchers & Brazilian researchers	1) Interview 2) Interview
	Do researchers of counterpart agency have appropriate skills and knowledge in order to utilize project outcomes after the completion of JICA cooperation? Is continuity of researchers participated in the project activities at their works is expected? (Technical aspect)	Are knowledge and technical levels of researchers of Embrapa Soybean involved in the Project high enough, especially researchers who involved in the activities from gene transformation to development of new soybean lines which can be used by farmers? Is continuity of researchers participated in the project activities at their works is high?	• Opinions of persons concerned	• Japanese experts/ researchers & Brazilian researchers	1) Interview 2) Interview
	Is equipment procured under the Project maintained well? Will equipment be maintained well after the completion of the Project?		• Opinions of persons concerned	• Japanese experts/ researchers & Brazilian researchers	• Questionnaire, Interview
	What are major factors that facilitated or hampered the sustainability, or could facilitate or hamper in future?		• Opinions of persons concerned	• Japanese experts/ researchers & Brazilian researchers	• Questionnaire, Interview

## 2. Implementation Process

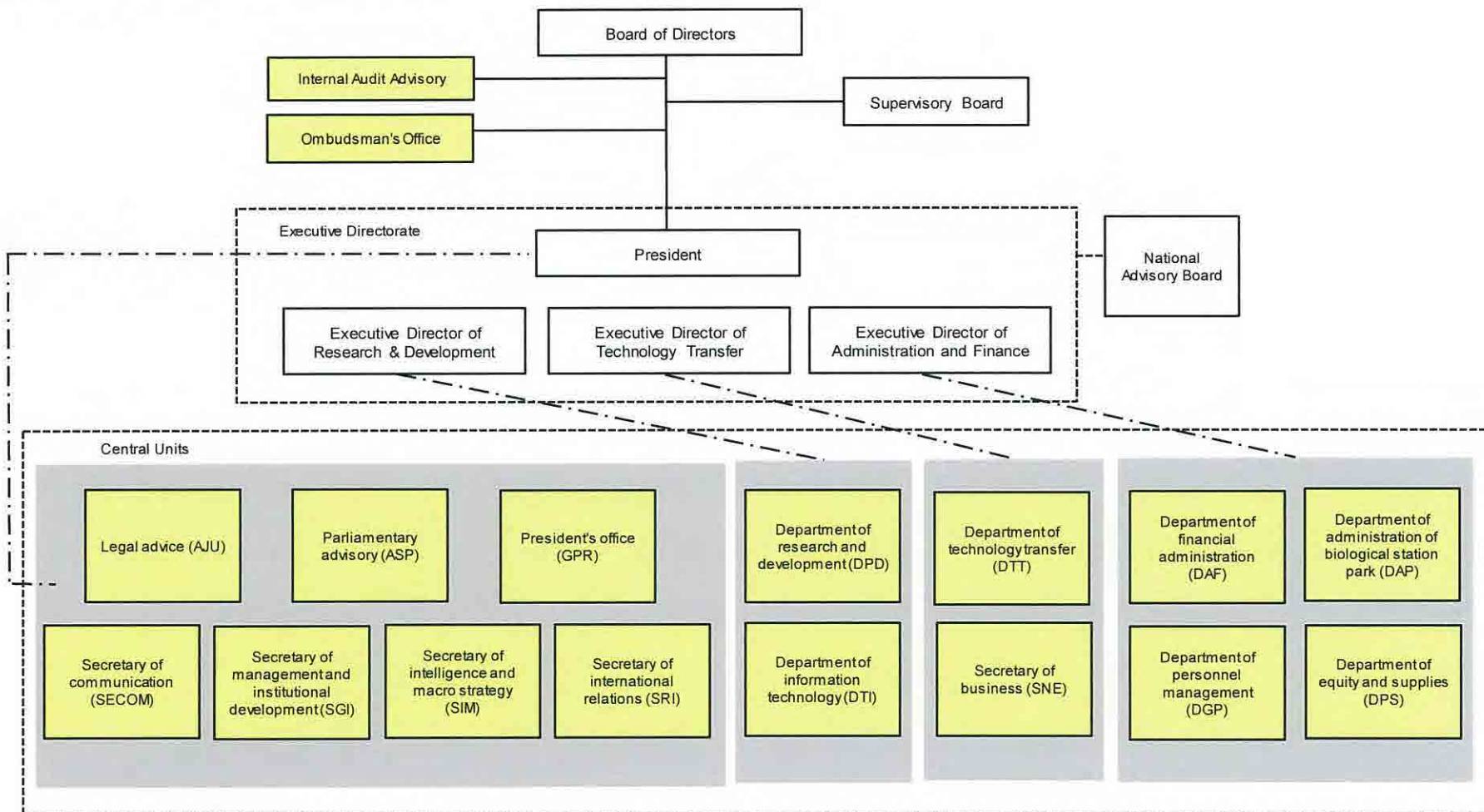
	Evaluation Question		Information source	Data collection method
	Main Question	Sub Question		
	Were there any modification of project plan, implementation structure for accomplishing initial target of the Project?	Were there any problems on progress of implementation? How those problems solved?	1) Various project reports, etc. 2) Japanese experts/ researchers & Brazilian researchers	1) Data review 2) Interview
	Appropriateness of methodology of joint research and technical transfer	Were there any problems on methodology of joint research and technical transfer? If available, what kinds of problems. How those problems solved?	1) Various project reports, etc. 2) Japanese experts/ researchers & Brazilian researchers	Interview
	Ownership of Brazilian side	1) Appropriateness of assignment of Brazilian researchers 2) Appropriateness of allocation of budget for the Project by Brazilian side	1) Various project reports, etc. 2) Japanese experts/ researchers & Brazilian researchers	Data review and Interview
		Are degree of recognition and participation into the Project by Embrapa Soybean high?	Japanese experts/ researchers & Brazilian researchers	Interview
	Project management system	Have JCC (Joint Coordinating Committee) meetings been held at appropriate timing with appropriate themes.	1) Various project reports, etc. 2) Japanese experts/ researchers & Brazilian researchers	1) Data review 2) Interview
		Decision making mechanism among Brazilian counterparts and Japanese experts functioned well? (for example, through other periodical meetings)	Japanese experts/ researchers & Brazilian researchers	Interview
		Appropriateness of monitoring system on project progress	Japanese experts/ researchers & Brazilian researchers	Interview
		Appropriateness of communication between Japanese experts/researchers and Brazilian researchers of counterpart agency	Japanese experts/ researchers & Brazilian researchers	Questionnaire
		Communication and collaboration among Japanese experts, JICA Brazil office, and JICA headquarters	Japanese experts/ researchers	Interview

**3. Table of achievement** (Achievement of the Overall Goal, the Project Purpose and the Outputs at the time of evaluation)

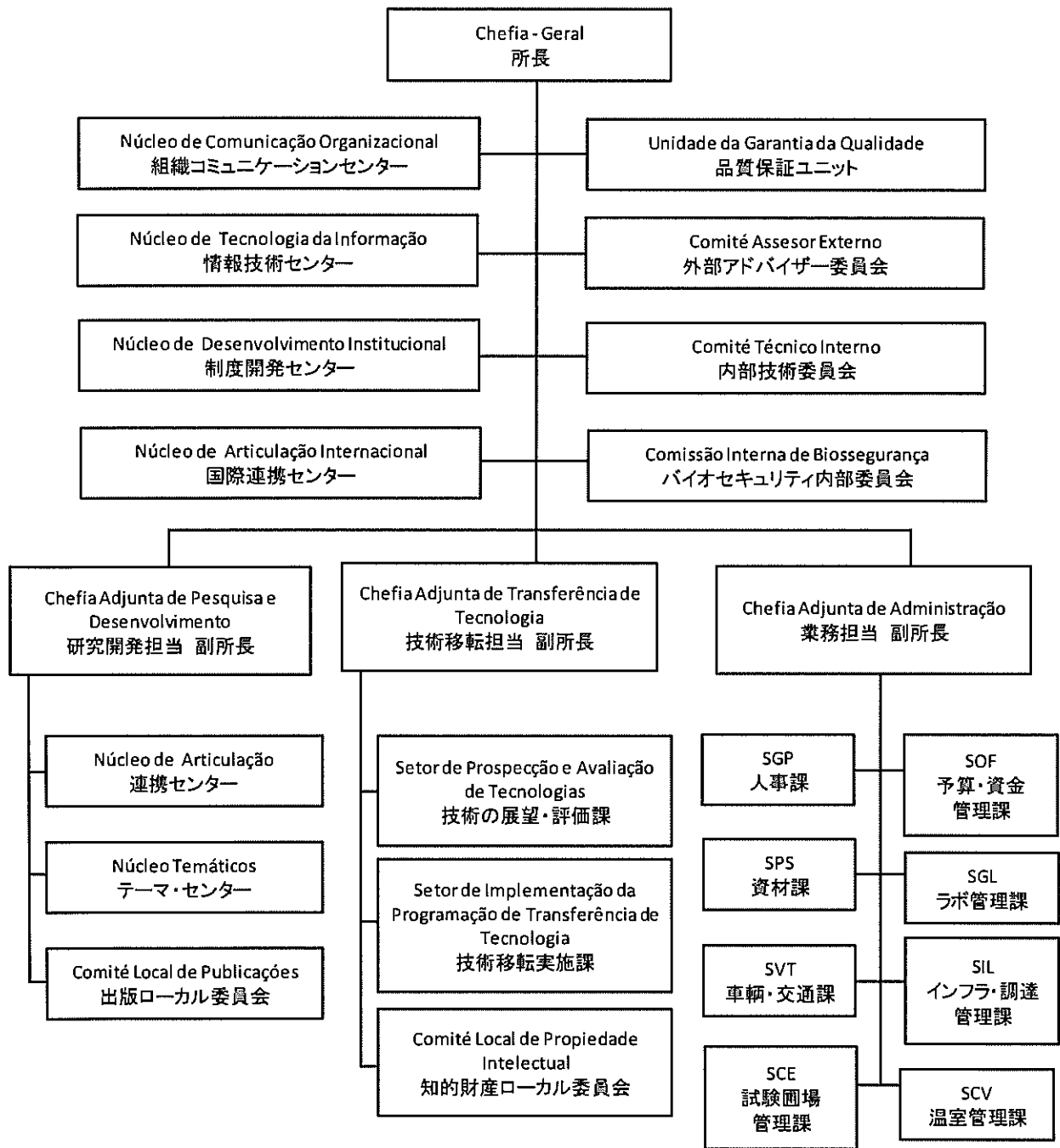
	Items		Information/ data required (Indicators)	Information source	Data collection method
	Main items	Sub items			
Achievement	[Prospect for achievement of the Overall Goal] Soybeans adapted to environmental stresses are developed, which contributes to the stabilization of the soybean production in Brazil.		Soybeans adapted to environmental stresses are developed before 2019.	Records of Embrapa Soybean	Data review
	[Prospect for achievement of the Project Purpose] Genetic engineering technology of soybean with environmental stress tolerance is developed.		1. At least 10 useful genes related to environmental stress tolerance are identified in plants such as soybean. 2. At least five (5) stress-responsive promoters are identified and combinations with useful genes are optimized. 3. At least five (5) constructs of useful genes and promoters are introduced in soybean and at least three transgenic lines are produced for each construct. 4. At least one (1) stress-tolerant line with environmental stress tolerance is selected.	Records of the Project	Data review
	Are Outputs producing as planned?	1. Useful genes related to environmental stress tolerance are identified.	1-1 At least five (5) genes involved in regulation of stress tolerance are identified in plants such as soybean. 1-2 At least two (2) genes for membrane proteins involved in stress perception are identified in plants such as soybean. 1-3 At least three (3) genes involved in regulation of stress response are identified in plants such as soybean.	1-1. Records of the Project 1-2. Records of the Project 1-3. Records of the Project	Data review
		2. Stress-responsive promoters are isolated and combinations with useful genes are optimized.	2-1 At least 100 stress-responsive genes are identified in soybean. 2-2 At least three (3) stress-responsive promoters are identified in soybean. 2-3 At least five (5) constructs of useful genes and promoters are optimized.	2-1. Records of the Project 2-2. Records of the Project 2-3. Records of the Project	Data review
		3. Transgenic soybean lines containing constructs of promoters and useful genes are produced.	3-1 Genetic engineering technology with more than 1.5 % of transformation efficiency is established in soybean. 3-2 At least five (5) constructs of useful genes and promoters are introduced in soybean. 3-3 T1 seeds of at least three (3) lines are collected.	3-1. Records of the Project 3-2. Records of the Project 3-3. Records of the Project	Data review
4. Transgenic soybean lines with environmental stress tolerance are selected.		4-1 At least two (2) drought-inducible genes are identified and at least two (2) transgenic lines are selected for each construct based on gene analysis. 4-2 At least two (2) heat-inducible genes are identified and at least two (2) transgenic lines are selected for each construct are selected based on gene analysis. 4-3 Gene expression of at least two (2) independent lines derived from at least two (2) constructs is analyzed. 4-4 Evaluation methods of stress tolerance of soybean in greenhouse and field are established. 4-5 Stress tolerance of at least two (2) independent lines derived from at least two (2) constructs is evaluated in greenhouse. 4-6 Stress tolerance of at least two (2) independent lines derived from at least two (2) constructs is evaluated in field.	4-1. Records of the Project 4-2. Records of the Project 4-3. Records of the Project 4-4. Records of the Project 4-5. Records of the Project 4-6. Records of the Project	Data review	

Embrapa 本部の織図、Embrapa ダイズ研究所組織図、Embrapa 研究ユニット一覧

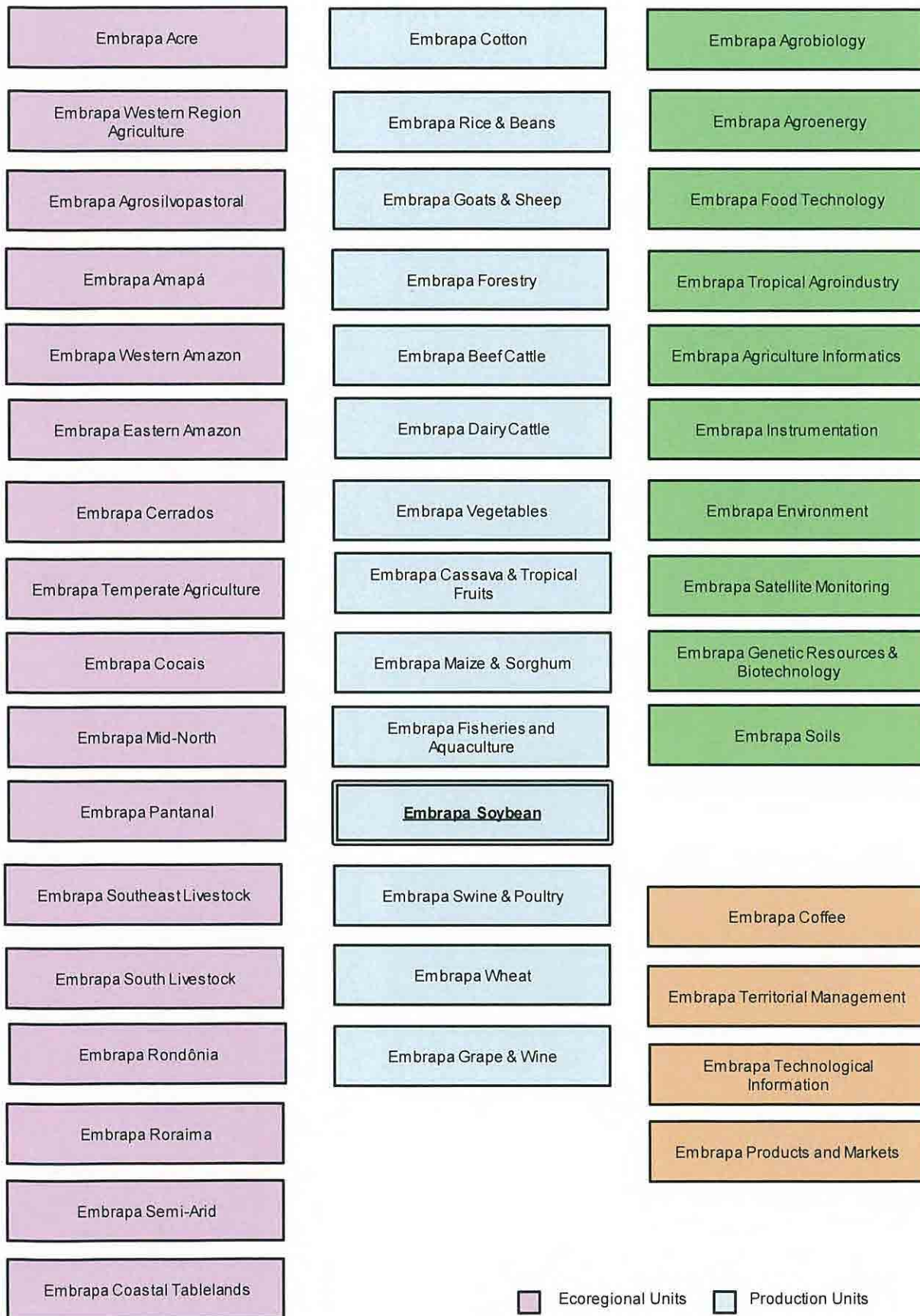
(1) Embrapa 本部の組織図 (終了時評価時点)



(2) Embrapa ダイズ研究所組織図



(3) Embrapa 研究ユニット一覧



Ecoregional Units
  Production Units  
 Basis themes Units
  Service Units

