



11 Genômica aplicada às mudanças climáticas: biotecnologia para a agricultura digital

Juliana Erika de Carvalho Teixeira Yassitepe
Ricardo Augusto Dante
Isabel Rodrigues Gerhardt
Fernanda Rausch Fernandes
Rafael Soares Correa de Souza
Jaderson Silveira Leite Armanhi
Viviane Cristina Heinzen da Silva
Ana Paula Ribeiro
Márcio José da Silva
Paulo Arruda

1 Introdução

Mudanças climáticas, causadas principalmente pelo aumento crescente na temperatura atmosférica global, têm sido observadas frequentemente em várias regiões do mundo. Os cenários climáticos projetados para as próximas décadas evidenciam aumentos na frequência e na intensidade de eventos extremos, como longos períodos de calor e seca, precipitações pesadas, inundações, entre outros (Mbow et al., 2019). A produção de alimentos nas regiões tropicais, subtropicais e semiáridas, como as que ocorrem na América do Sul, na Ásia e na África, está particularmente em risco. Entre 1981 e 2010, reduções na produtividade média mundial de milho, trigo e soja de 4,1, 1,8 e 4,5%, respectivamente, foram atribuídas às mudanças no clima especialmente nessas regiões (Iizumi; Ramankutty, 2016). Impactos na produção de frutas, verduras e animais também estão previstos para esses mesmos ambientes.

As variações no clima colocam em risco a segurança alimentar mundial não apenas por reduzir a produção e a disponibilidade de alimentos. O clima afeta vários processos biológicos importantes para o crescimento e o desenvolvimento de plantas e animais, e mudanças nesses mecanismos podem alterar taxas de crescimento e reprodução, além da qualidade e do teor de nutrientes (Damatta et al., 2010; Lara; Rostagno, 2013). Reduções na oferta e na qualidade de alimentos podem impactar os consumidores globalmente, mas impactará especialmente os de menor renda – até cerca de 183 milhões de pessoas poderão passar fome nos cenários de mudanças climáticas projetados (Mbow et al., 2019).

A resposta aos cenários atuais e futuros de mudanças no clima requer duas abordagens possíveis e necessárias, mitigação e adaptação. A aplicação de melhores práticas agrícolas e o desenvolvimento de variedades mais adaptadas e tolerantes a essa nova realidade no clima são estratégias de adaptação imprescindíveis e urgentes para o aumento sustentável da produção agrícola nas próximas décadas. Tolerância aumentada às altas temperaturas e aos longos períodos de restrição hídrica, especialmente nas fases mais sensíveis do ciclo de desenvolvimento da cultura, são critérios de seleção que devem ser aplicados nos programas de melhoramento para o desenvolvimento das novas cultivares. Ferramentas de biotecnologia, como marcadores moleculares, edição gênica, transgenia e microbioma, e técnicas de fenotipagem mais precisas e em larga escala podem e devem ser empregadas visando acelerar a disponibilização de genótipos adaptados às condições regionais específicas modificadas pelas alterações recentes no clima.

A redução no financiamento público de programas de melhoramento tem sido observada em todo o mundo em relação às empresas do setor privado, apesar da importância incontestável do papel da pesquisa pública na produção agrícola e na segurança alimentar, principalmente em cenários de médio e longo prazo (Alson et al., 2009). Esse declínio vem acompanhado de práticas de proteção da Propriedade Intelectual (PI) e do aumento em investimentos privados, principalmente por empresas do setor de sementes, que após uma série de aquisições e fusões, resultaram em maior concentração de participação no mercado mundial e no domínio tecnológico (Ray et al., 2015; Gutiérrez et al., 2014; Concentration..., 2018). Até meados da década de 1990, a participação das empresas nacionais, incluindo a Embrapa, nos mercados brasileiros de sementes de soja e milho foi de 70% e 30% (Silva et al., 2015). Com a criação das Leis de Patentes (1996) e de Proteção de Cultivares (1997), as multinacionais de biotecnologia introduziram maciçamente sementes proprietárias com características biotecnológicas no mercado brasileiro (Castro et al., 2006). Por não realizarem investimento em desenvolvimento tecnológico na mesma escala, a participação das empresas públicas no mercado de sementes foi reduzida a menos de 10% (Silva et al., 2015).

Com altos investimentos e capacidade de inovação, essas grandes empresas multinacionais conseguem desenvolver, continuamente, através de *pipelines* de pesquisa e desenvolvimento que integram melhoramento e biotecnologia, novas cultivares com modificações genéticas específicas, que incorporam caracteres como resistência a herbicidas e pragas e, mais recentemente, tolerância a seca (Eisenstein, 2013; Rippey, 2015). *Pipeline* é o processo sequencial de fases de pesquisa e desenvolvimento em que tecnologias transitam, em linhas gerais, desde a descoberta, passando pela validação, otimização e, por fim, o lançamento comercial. Como *pipelines* funcionam em fluxo contínuo, em qualquer dado momento, diferentes tecnologias encontram-se em fases diversas de maturação tecnológica ao longo de seu desenvolvimento. Muitos desses caracteres biotecnológicos são também combinados em uma mesma cultivar, ou mesmo licenciados para empresas concorrentes. No entanto, por desenvolverem quase que exclusivamente as novas características biotecnológicas nos países de origem, onde estão localizados seus centros de pesquisa e desenvolvimento, o máximo desempenho dessas tecnologias não é conseguido nos mercados consumidores globais, onde as novas descobertas são incorporadas ou adaptadas aos programas locais de pesquisa e desenvolvimento. É estratégico para o setor agrícola brasileiro, responsável por um quarto do Produto Interno Bruto (PIB), que instituições públicas e privadas nacionais fortaleçam sua produção científica e tecnológica para contribuir com o desenvolvimento nacional de tecnologias e variedades apropriadas às nossas demandas.

Reconhecida por seu notável histórico de melhoramento de culturas agrícolas, ampla rede de locais de testes e recursos humanos qualificados e multidisciplinares, atualmente a operação de um *pipeline* de biotecnologia pela Embrapa está apenas emergindo como resposta às demandas para propiciar novas pesquisas em biotecnologia visando desenvolver variedades adaptadas às novas e complexas condições impostas pelas mudanças climáticas. Essa iniciativa requer financiamento de longo prazo, abordagens e parcerias interdisciplinares altamente coordenadas, muitas vezes entre empresas públicas e privadas. Parcerias público-privadas têm sido bem-sucedidas na descoberta, no desenvolvimento e na comercialização de características biotecnológicas. As multinacionais Bayer, BASF, Corteva e Syngenta e seus respectivos parceiros públicos e privados têm desenvolvido cultivares incorporando caracteres biotecnológicos cada vez mais avançados. Em dois casos, genes introduzidos por engenharia genética foram capazes de aumentar os rendimentos de grãos de milho em entre 15% e 120% sob forte estresse hídrico em uma ampla gama de locais testados (Castiglioni et al., 2008; Nuccio et al., 2015). Cultivares de culturas economicamente importantes, geradas por edição gênica, já estão entrando no mercado americano de sementes. No início de 2019, cultivares de soja com alto teor de ácido oleico, geradas pelo sistema TALEN (*Transcription activator-like effector nucleases*), foram liberadas para uso comercial. Também

em 2019, híbridos de milho com alto teor de amilopectina, gerada através de CRISPR-Cas9, estavam na fase de pré-lançamento, com perspectivas de estarem disponíveis em 2020 (Kim; Kim, 2019; Gao et al., 2020). Do mesmo modo, é esperada a melhoria de caracteres de resistência à seca através de CRISPR-Cas9 (Shi et al., 2016). No Brasil, iniciativas similares para implementar *pipelines* de biotecnologia agrícola são incipientes, tanto no setor público como no privado, principalmente as que englobam a fase inicial de descoberta de novos genes de importância biotecnológica.

No fim de 2017, uma parceria entre a Embrapa, a Unicamp e a Fapesp criou o Centro de Pesquisa em Genômica Aplicada às Mudanças Climáticas (*Genomics for Climate Change Research Center - GCCRC*), unindo competências das duas primeiras instituições em biotecnologia agrícola. O Centro tem como missão desenvolver, ao longo de 10 anos, ativos biotecnológicos que aumentem a tolerância de plantas à seca e ao calor, além de transferir as tecnologias desenvolvidas ao setor produtivo. Os ativos biotecnológicos em desenvolvimento podem se encaixar em diferentes estratégias de proteção intelectual, que equilibram a captura de valor e o acesso à tecnologia. Estes incluem (mas não estão limitados a) genes, alelos e construções gênicas – os quais podem ser adequadamente desenvolvidos em caracteres por terceiros –, inoculantes microbianos, comunidades sintéticas de microrganismos, novas tecnologias de suporte como métodos e elementos reguladores de expressão gênica, além de know-how regulatório e patentário.

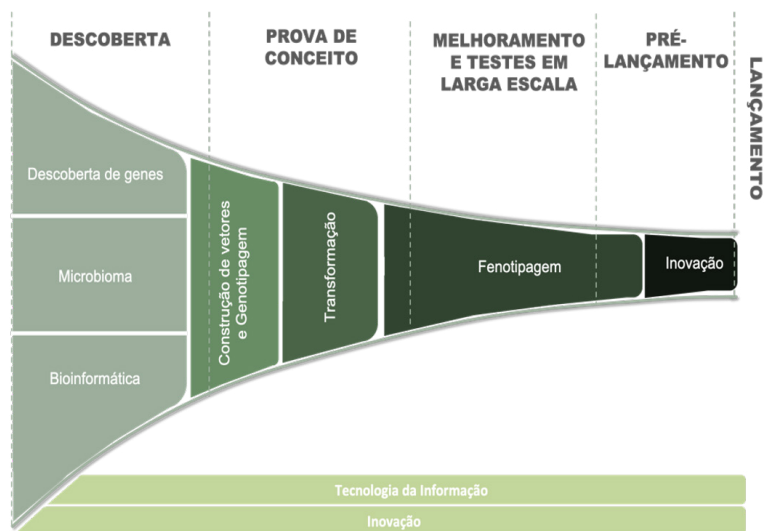
O GCCRC é a consolidação e a expansão da Unidade Mista de Pesquisa em Genômica Aplicada às Mudanças Climáticas (UMiP GenClima), acordo de cooperação técnica-científica entre a Embrapa e a Unicamp celebrado no final de 2012. O GCCRC é composto por pesquisadores e analistas de ambas as instituições, e as atividades são organizadas em processos, na forma de um *pipeline* comparável e em menor escala que o das grandes empresas de biotecnologia. Parceiros nacionais e internacionais, públicos e privados, contribuem com a equipe do GCCRC para atingir sua missão.

No cenário da transformação digital, o uso de biotecnologia integrada com as tecnologias da informação e da comunicação, por meio do uso de ferramentas computacionais em seu *pipeline* de pesquisa, sensores e câmeras para monitoramento e captura de dados, além de modelos matemáticos e análises estatísticas para estudo do grande volume de dados gerado pelas ciências “ômicas”, vão propiciar o avanço da pesquisa no melhoramento genético de plantas. O GCCRC contribui com a implantação da agricultura digital no Brasil por meio de suas pesquisas em biotecnologia e biologia molecular que, na fase de pré-produção, permitirão o desenvolvimento de novos ativos biotecnológicos para o agronegócio. Neste capítulo será apresentado o *pipeline* de pesquisa do GCCRC, mostrando as etapas envolvidas na geração desses ativos biotecnológicos e ilustrando como as tecnologias digitais auxiliam na obtenção dos resultados das pesquisas.

2 O *pipeline* de pesquisa do GCCRC

As atividades principais de pesquisa do GCCRC são executadas através de um *pipeline* de pesquisa e desenvolvimento em biotecnologia que abrange desde a fase de descoberta até a fase de prova de conceito em condições de campo (Figura 1). A espécie escolhida como alvo dos trabalhos de pesquisa foi o milho, uma das mais importantes culturas agrícolas no Brasil e no mundo e que possui ampla disponibilidade de recursos genéticos e genômicos.

Figura 1.
Etapas do *pipeline*
de pesquisa
do GCCRC.¹



O *pipeline* de pesquisa possui cinco fases, das quais as três primeiras concentram a maior parte dos esforços da equipe exclusivamente dedicada ao Centro:

- 1) Descoberta: quando novos genes e microrganismos são identificados e, após análise da propriedade intelectual e de biossegurança, indicados para introdução no *pipeline*.
- 2) Prova de conceito: construções gênicas e inoculantes são elaborados, plantas transgênicas e editadas são geradas, e os primeiros testes, em condições de ambiente controlado (câmaras de crescimento e casa de vegetação) e em pequena escala no campo, são realizados para observação inicial de eficácia das estratégias.

¹ Elaborada por Paula Malloy Mota Diniz.

As fases subsequentes são realizadas em parceria com outras organizações via colaboração e/ou licenciamentos, a saber:

- 3) Melhoria e Testes em larga escala: transgenes, alelos editados e/ou inoculantes descobertos e selecionados na etapa anterior são testados em experimentos de campo de maior escala, em vários locais e diferentes épocas. Eventos promissores são introgrididos em linhagens elites de milho.
- 4) Pré-lançamento: cultivares comerciais contendo as tecnologias são desenvolvidas.
- 5) Lançamento: as tecnologias desenvolvidas pelo centro são lançadas no mercado agrícola.

Para que a operação do *pipeline* de pesquisa seja realizada de forma efetiva, uma infraestrutura dedicada às suas atividades foi construída. A estrutura física é composta por um laboratório de biologia molecular (Figura 2), um laboratório de transformação genética de plantas (Figura 3), um laboratório de fenotipagem em condições de ambiente controlado (em construção) e uma moderna casa de vegetação (Figura 4). O laboratório de biologia molecular abriga todas as atividades da etapa de descoberta e grande parte do time de pesquisa (Figura 2). O laboratório de transformação genética de plantas é equipado com uma infraestrutura completa para transformação de milho, incluindo duas câmaras de crescimento desenhadas para regeneração e aclimação de plantas transformadas (Figura 3). Uma moderna casa de vegetação foi construída para cultivo de milho para produção de embriões (explantes usados na transformação genética), cultivo de eventos transgênicos e editados gerados no *pipeline*, avanço de gerações, introgressões em material elite, testes de inoculantes e experimentos iniciais de triagem em ambientes controlados. Essa estrutura possui cinco ambientes com controle de temperatura e suplementação de luz com lâmpadas LED e um viveiro telado para acomodar outras espécies em estudo. Todos os ambientes possuem acesso à internet, e as condições ambientais são monitoradas constantemente (Figura 4).



Fotos: Ana Paula Ribeiro

Figura 2. Laboratório de Biologia Molecular. Entrada do laboratório (A); Sala de reuniões (B); Vista interna das bancadas de trabalho e escritório (C) e (D).

Figura 3.

Laboratório de Transformação Genética de Plantas. Vista externa do laboratório (A); Vista interna do laboratório (B) e (C); Sala de regeneração de plantas (D); Sala de aclimação de plantas (E).



Fotos: Ana Paula Ribeiro

Figura 4.

Casa de Vegetação. Vista frontal da casa de vegetação (A); Plantas crescendo na casa de vegetação (B) e (C); Plantas crescendo com suplementação de iluminação LED (D); Vista noturna externa da casa de vegetação (E).



Fotos: Juliana Erika de Carvalho Teixeira Yassitepe

Todas as rotinas e os processos da *pipeline* são registrados em um sistema de gerenciamento integrado de laboratório (*Laboratory Integrated Management System – LIMS*), garantindo que as informações sejam armazenadas, gerenciadas e rastreadas corretamente, principalmente para fins de propriedade intelectual, biossegurança e integridade de dados e procedimentos (registro de atividades, rotinas, protocolos, relatórios, documentos relacionados, etc).

2.1 Descoberta de genes e microrganismos

A fase de descoberta é fundamentada em duas frentes focadas na identificação e na caracterização de novos (i.e., pouco ou nada estudados) genes candidatos e microrganismos com potencial biotecnológico para promoção de aumento de tolerância a estresses. Ambas as frentes são estruturadas, em grande medida, em abordagens multidisciplinares para exploração de diversidade de espécies vegetais agrícolas e selvagens, com especial foco naquelas adaptadas a condições ambientais limitantes caracterizadas pela incidência de um ou vários estresses. Essas abordagens demandam uso intensivo de ferramentas bioinformáticas e computacionais, em decorrência da análise de grandes volumes de dados produzidos pelas tecnologias de ciências genômicas e relacionadas (transcritômica, metabolômica e metagenômica) utilizadas.

As mudanças climáticas globais, em associação aos crescimentos populacional e de concorrência por terras, farão a produção de alimentos e bioenergia ser deslocada crescentemente para ambientes marginais (Backlund et al., 2008; Ornella et al., 2012). Esses ambientes são caracterizados por um ou mais estresses abióticos, como níveis subótimos de temperatura (calor ou frio) e de disponibilidade hídrica (seca ou inundação), propriedades físicas desfavoráveis do solo e disponibilidade muito baixa de nutrientes, que impõem limitações à produtividade (Belaid; Morris, 1991). Portanto, o desafio imposto pelas mudanças climáticas globais requer o desenvolvimento de novos genótipos agrícolas adaptados e mais produtivos em ambientes propensos a estresses, os quais naturalmente limitam o crescimento vegetal. Assim, a compreensão da adaptação de espécies vegetais a ambientes limitantes, utilizando uma série de mudanças morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares em resposta a estresses que afetam negativamente o crescimento e a produtividade, pode contribuir para moldar a produção alimentar e bioenergética global nas próximas décadas. Investigar espécies selvagens (não só aquelas evolutivamente próximas, mas também as distantes das espécies cultivadas) proporciona conhecimento para guiar o desenvolvimento de novos genótipos capazes de prosperar em ambientes marginais (McCouch et al., 2013). Entre essas espécies estão as extremófilas e as tolerantes à dessecação.

Organismos extremófilos habitam ambientes severamente limitantes, como aqueles caracterizados por extremos térmicos, de disponibilidade de água ou de nutrientes e alta salinidade, estresses que ocorrem isolada ou simultaneamente (Oh et al., 2012). Por sua vez, as espécies tolerantes à dessecação podem sobreviver a períodos longos e/ou severos de seca, suportando níveis dramaticamente baixos de teor relativo de água nos tecidos vegetativos (Bartels; Hussain, 2011). Conjuntos de dados derivados de abordagens “ômicas” dessas espécies são um recurso crescente para a descoberta de novas características genéticas, cujo emprego biotecnológico pode contribuir para a adaptação a estresses abióticos. Muitas dessas características são exclusivas

de espécies individuais (ou um pequeno grupo de espécies relacionadas) ou pertencem a famílias de genes presentes em muitas espécies de plantas que se diversificaram funcionalmente através de duplicação e seleção adaptativa (Gollery et al., 2006; Horan et al., 2008). Particularmente, os genes de função ora desconhecida representam 20-40% dos genes de cada novo genoma sequenciado, constituindo a maioria das diferenças espécie-específicas (Gollery et al., 2006, 2007), e, potencialmente, são associados a mecanismos adaptativos, incluindo tolerância a estresses (Mittler; Blumwald, 2010).

A família Velloziaceae de angiospermas é a que contém mais espécies tolerantes à dessecação (aproximadamente 200 de suas 270 espécies). Mais de 80% das espécies de Velloziaceae ocorrem na América do Sul, onde é encontrada também a maior diversidade morfológica. O maior gênero, *Vellozia*, compreende espécies tanto tolerantes quanto sensíveis à dessecação, oferecendo um excelente modelo para estudar a evolução dos caracteres de tolerância à dessecação e à seca. *V. nivea* e *V. intermedia*, espécies respectivamente tolerantes e sensíveis à dessecação, são ambas tolerantes à seca, endêmicas dos campos rupestres brasileiros e altamente adaptadas às suas condições extremas. Esses ambientes são caracterizados por uma estação seca prolongada, tipicamente entre o final do outono e o início da primavera, alta radiação solar e solos rochosos, pouco profundos e pobres em nutrientes, particularmente fósforo. Ao contrário da maioria das espécies-modelo de plantas, as quais se originam de ambientes onde nitrogênio é o principal nutriente limitante, o gênero *Vellozia* evoluiu em um ambiente onde fósforo é o nutriente mais limitante, tornando-se um modelo valioso para culturas cultivadas em solos tropicais, nos quais a baixíssima disponibilidade desse mineral impera. O grupo vem explorando genomas, transcritomas e metabolomas de *V. nivea* e *V. intermedia*, além de outras espécies de Velloziaceae. O conhecimento decorrente ajudará na identificação de genes e vias subjacentes à adaptação dessas espécies aos seus ambientes limitantes, auxiliando na geração de futuros genótipos agrícolas com capacidade aumentada de produção em ambientes marginais.

A sobrevivência das plantas a condições estressantes envolve uma combinação de mecanismos adaptativos que vão além da contribuição exclusiva de seus genomas (Rodriguez et al., 2008; Lau; Lennon, 2012). Microrganismos associados aos tecidos vegetais cumprem papel na adaptação das plantas a estresses bióticos e abióticos e desempenham um papel fundamental na plasticidade fenotípica vegetal (Woodward et al., 2012; Coleman-Derr; Tringe, 2014). Além disso, avanços recentes têm mostrado a existência de uma comunidade microbiana inexplorada com impacto significativo nos seus hospedeiros (Bulgarelli et al., 2013; Souza et al., 2016). Esses achados tornam a pesquisa de microbiomas uma importante fonte de recursos genéticos e

biológicos para uso biotecnológico na melhoria da adaptação de plantas a condições estressantes.

Tradicionalmente, a pesquisa em microrganismos associados às plantas é fundamentada em técnicas dependentes de cultivo, que se baseiam no isolamento e no cultivo de microrganismos. Porém, o uso restrito dessas metodologias de cultivo pode enviesar a amostragem da microbiota, uma vez que apenas os microrganismos capazes de crescer nos meios de cultivo são amostrados. Além disso, essas metodologias não trazem informações a respeito da real abundância ou da contribuição funcional real do isolado em seu habitat de origem. Mais recentemente, ferramentas de sequenciamento em larga escala permitiram o acesso à diversidade microbiana de forma independente de cultivo, possibilitando o mapeamento mais preciso do perfil filogenético e funcional da microbiota associada às plantas. Porém, apesar das técnicas de sequenciamento elucidarem questões vitais do microbioma associado às plantas, o isolamento de microrganismos ainda é necessário para aplicações biotecnológicas. No entanto, mesmo que sejam complementares, ambas as estratégias raramente são utilizadas em conjunto.

Diferentemente das abordagens tradicionais, o *pipeline* de investigação em microbioma faz uso das técnicas dependentes e independentes de cultivo de forma concomitante. O uso das ferramentas de investigação genômica traz informações a respeito de diversidade, padrões de colonização e funções desempenhadas pela microbiota em associação com a planta. Esses dados permitem identificar os microrganismos mais eficientes na associação com plantas e na promoção do crescimento vegetal. Com base nessas informações, são desenhadas comunidades microbianas sintéticas utilizando a coleção de microrganismos isolados (Armanhi et al., 2018). As comunidades sintéticas são validadas em experimentos de inoculação para avaliação da capacidade de aumentar a tolerância a estresses e manter a produtividade das plantas mesmo em condições desfavoráveis.

De maneira complementar e sinérgica à exploração de espécies vegetais dos campos rupestres, essa abordagem vem sendo aplicada no *pipeline* para investigar as estratégias pelas quais os microrganismos contribuem para a sobrevivência vegetal nas condições estressantes desses habitats. Isso se baseia no pressuposto de que as comunidades microbianas associadas a espécies vegetais que evoluíram em ambientes historicamente expostos à seca e à escassez nutricional são mais propensas a promover tolerância a esses estresses na planta do que os microrganismos originados em ambientes onde esses recursos não são limitantes (Rodriguez et al., 2008; Redman et al., 2011; Lau; Lennon, 2012). Esses estudos estão em andamento e vêm permitindo o mapeamento da composição, da abundância e da diversidade de comunidades bacterianas e fúngicas associadas com plantas nativas adaptadas a ambientes limitantes; criação de uma coleção abrangente de microrganismos associados

a essas espécies; a investigação das interações de plantas e microrganismos relacionados ao crescimento de plantas sob condições estressantes; e a análise ampla dos genomas dos microbiomas (metagenomas, produzidos a partir de DNA recuperado diretamente das amostras) em busca de funções gênicas relacionadas à tolerância a estresses.

Os microbiomas associados a Velloziaceae e outras espécies dos campos rupestres não haviam sido caracterizados até recentemente. Um primeiro estudo realizado pelo GCCRC, o *Joint Genome Institute* (JGI, EUA) e outros parceiros descreve a identificação de grande diversidade e novidade bacteriana e fúngica nos microbiomas de duas Velloziaceae endêmicas que habitam solo e rocha em campos rupestres na Serra do Cipó (MG) (Camargo et al., 2019). A diversidade e a abundância microbianas nos compartimentos epifíticos (externo) e endofíticos (interno) de raízes, caules, folhas e substratos foram avaliadas por sequenciamento de marcadores moleculares. Também se sequenciaram os metagenomas de raízes e substratos de cada espécie. Os resultados compõem os primeiros bancos de dados de microbiomas associados a espécies de Velloziaceae endêmicas dos campos rupestres. Esses achados subsidiarão significativamente a descoberta de novos microrganismos e, conseqüentemente, a potencial obtenção de novos inoculantes.

2.2 Prova de conceito

A etapa de prova de conceito envolve desde o desenho das construções gênicas que serão inseridas nas plantas de milho para desenvolvimento de eventos transgênicos ou editados e o preparo de inoculantes microbianos até o teste das tecnologias desenvolvidas em ambientes controlados e, em pequena escala, no campo.

Após a definição das construções gênicas contendo genes candidatos e sequências reguladoras, as equipes de Construção de vetores e Genotipagem, conforme mostrado na Figura 1, constroem os vetores e iniciam a fase de validação das moléculas de DNA recombinante, usando sequenciamento e outras ferramentas de biologia molecular. Uma vez disponibilizadas as construções gênicas validadas, a equipe de Transformação é acionada para realizar a transformação genética da espécie-alvo, o milho. A equipe de Transformação realiza transformação de milho usando protocolos otimizados localmente e genótipos de milho adequados. A plataforma de transformação foi projetada para transformar rotineiramente embriões imaturos, usando semanalmente as construções de genes fornecidas pelas equipes de Construção de vetores e Genotipagem. A equipe de Transformação está constantemente aperfeiçoando os protocolos de transformação de milho por meio de parcerias estabelecidas com parceiros nacionais e internacionais. Alternativamente, para estratégias baseadas em genes candidatos (ou seus genes relacionados) que são identificados em milho, métodos de edição gênica estão sendo utilizados

para realizar modificações específicas. Essa abordagem tem sido utilizada paralelamente, visando à obtenção de ativos biotecnológicos. As plantas regeneradas são avaliadas quanto ao número de cópias e ao nível de expressão, e as plantas editadas são avaliadas quanto à presença do alelo editado por meio de sequenciamento. Uma vez confirmada a transformação ou edição gênica, as plantas são consideradas eventos de transgênicos e editados, respectivamente, e são posteriormente transferidas à casa de vegetação para cruzamento (ou autofecundação) e fenotipagem pela equipe de Fenotipagem.

Microrganismos com potencial função na tolerância de plantas a estresses abióticos descobertos pela equipe de Descoberta são organizados em comunidades microbianas sintéticas. Inoculantes compreendendo diferentes combinações de microrganismos e/ou comunidades microbianas são preparados e utilizados nos experimentos para validação de sua eficácia, realizada pela equipe de Fenotipagem a partir da avaliação de sua capacidade em promover tolerância de plantas às condições abióticas.

A avaliação fenotípica das plantas é uma das fases mais importantes em qualquer programa de desenvolvimento de cultivares, pois definirá quais genótipos serão eliminados e quais prosseguirão para as etapas seguintes. Em *pipelines* de biotecnologia, essa fase é ainda mais importante, principalmente para caracteres de tolerância a estresses abióticos, como estresse hídrico e calor. Essas são características complexas, e muitas vezes o efeito do transgene, do alelo editado e/ou do inoculante conferindo tolerância poderá ser significativo, mas difícil de ser separado do efeito do *background* genético da planta. Em um *pipeline* em que centenas de transgenes, alelos editados e/ou inoculantes e milhares de plantas devem ser avaliadas, um procedimento de seleção rápido e confiável é necessário para eliminar descobertas pouco promissoras. Os instrumentos convencionalmente usados na rotina dos laboratórios para avaliar a condição fisiológica das plantas são confiáveis, mas muitas vezes requerem amostragens destrutivas, além de permitirem apenas avaliações pontuais. Instrumentos adequados para uma avaliação fenotípica contínua e em tempo real permitem avaliar mais detalhadamente a resposta fisiológica das plantas às variáveis ambientais e aos tratamentos sendo aplicados e podem fornecer informações adicionais com potencial de melhorar o entendimento da resposta fenotípica. Várias tecnologias não invasivas e não destrutivas emergiram no âmbito da fenotipagem de plantas nos últimos anos, entre elas a espectroscopia, a fluorescência, a termografia e a captura de imagem digital. Essas novas tecnologias estão sendo empregadas para incrementar a quantidade, a qualidade e a pluralidade dos caracteres medidos e permitir, com o apoio de análises estatísticas modernas, a distinção de efeitos fenotípicos.

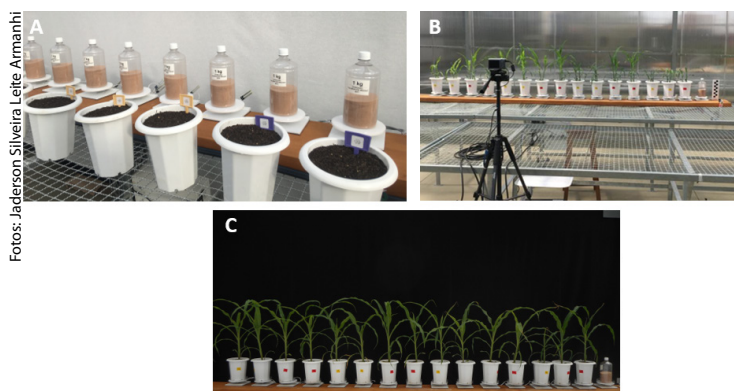
Na maioria dos *pipelines* de biotecnologia, a avaliação de eventos transgênicos, editados e/ou inoculantes microbianos é realizada em três etapas: 1) Triagem inicial, realizada em câmara de crescimento e/ou casa de vegetação;

2) Caracterização detalhada, em casa de vegetação; e 3) Fenotipagem, realizada em experimentação no campo. Os ambientes controlados, como câmaras de crescimento e casa de vegetação, contam com plataforma de fenômica de baixo custo, que utiliza sensores e câmaras para monitorar os ambientes e as respostas das plantas aos tratamentos aplicados. Na fase de triagem inicial, as plantas são avaliadas quanto à sua resistência a estresses a ciclos curtos de calor e seca, durante o estágio vegetativo. Os caracteres são medidos em partes aéreas e raízes de plântulas, de acordo com o efeito esperado do evento ou do inoculante testado. Na fase de caracterização detalhada, as plantas são avaliadas durante todo o ciclo de desenvolvimento, incluindo estágio reprodutivo e produção de grãos. Várias avaliações biométricas e fisiológicas são realizadas em diferentes momentos do desenvolvimento, e os eventos promissores são avaliados quanto ao número de cópias, os níveis de expressão, os perfis proteicos e metabólicos, entre outros, para caracterizar e compreender o efeito do gene/construção e dos microrganismos aplicados à planta.

A plataforma de fenômica de baixo custo desenvolvida no Centro conta com sensores e câmeras fotográficas que acompanham, continuamente e em tempo real, a resposta fenotípica das plantas (Armanhi, 2018). Microcontroladores *Raspberry Pi* e *Arduino* controlam automaticamente as leituras dos sensores que monitoram o ambiente (intensidade luminosa, umidade relativa do ar e temperatura) e a resposta individual das plantas (temperatura foliar, umidade do substrato e perda de água do sistema vaso-planta). Além dos parâmetros registrados, outros podem ser obtidos de forma indireta, como o déficit de pressão de vapor (*vapor-pressure deficit*, *VPD*), parâmetro que indica a propensão da planta a perder água para o ambiente, e a evapotranspiração, através da perda de água do sistema vaso-planta. Os dados registrados são estatisticamente tratados, armazenados e enviados para um servidor local. Um *website* desenvolvido internamente possibilita a visualização gráfica de todos os parâmetros mencionados em tempo real.

Os microcomputadores também controlam automaticamente câmeras fotográficas, que registram as plantas em diferentes ângulos, na frequência desejada, e enviam as imagens para o servidor local. Toda a série temporal de imagens é acessada remotamente, sendo utilizada para avaliações biométricas das plantas através de *softwares* disponíveis para análise de imagens. As imagens também podem ser utilizadas para construção de vídeos *time-lapse*, úteis na visualização da resposta contínua ao longo do tempo, além de permitir a observação de pequenas variações ao longo do dia, como o movimento de expansão e enrolamento das folhas em resposta às variações na intensidade luminosa e na temperatura do ambiente, por exemplo.

A Figura 5 ilustra alguns aspectos da plataforma de fenômica instalada na casa de vegetação. Balanças são utilizadas para monitorar o peso do vaso ao longo do experimento (Figura 5A). Antes do início de cada experimento,

**Figura 5.**

Alguns aspectos da plataforma de fenômica instalada na casa de vegetação. Balanças e sensores instalados para o monitoramento contínuo do peso do sistema vaso-planta e da umidade do solo/substrato (A); Câmera fotográfica instalada para registrar continuamente o crescimento das plantas (B); Plantas de milho monitoradas continuamente em experimentos realizados (C).

uma calibração das balanças é realizada para verificar seu funcionamento e a qualidade das medidas. Uma câmera fotográfica é instalada para registrar o crescimento das plantas em tempo real (Figura 5B). Câmeras e sensores instalados nas plantas, no vaso e no ambiente monitoram constantemente o peso do sistema vaso-planta, a umidade do solo/substrato, a temperatura foliar, além da temperatura, a umidade relativa e a intensidade luminosa do ambiente (Figura 5C).

Após as fases de avaliações em ambientes controlados, eventos e inoculantes promissores são selecionados com base no aumento da resistência aos estresses de seca e calor (por exemplo, maior taxa de crescimento, menor temperatura foliar, menor perda de água, maior eficiência fotossintética, entre outros) em comparação com plantas controle, e passam para a fase de avaliação no campo.

Na fase de fenotipagem em campo, os eventos testados são avaliados em experimentos com restrição hídrica, na fase reprodutiva, em ao menos três ambientes e duas épocas diferentes. Características agrônômicas e produção de grãos são avaliadas. Eventos que demonstrarem superioridade em relação aos controles, em mais de um local e época, são selecionados e seguem para as próximas etapas do *pipeline*, em que otimizações de construções, introgressão em germoplasma elite e testes em larga escala são realizados.

2.3 Melhoramento, testes em larga escala, pré-lançamento e lançamento

As etapas do *pipeline* de pesquisa posteriores à prova de conceito são realizadas em parceria com instituições públicas e privadas que mostrarem interesse em avançar no desenvolvimento das tecnologias geradas para posterior comercialização.

Após a fase de prova de conceito, um transgene, alelo editado e/ou inoculante microbiano que mostrou efeito superior em campo, na tolerância a seca e calor, quando comparado aos tratamentos controles, poderá ser explorado

em *pipelines* de desenvolvimento de produtos. Genes e alelos editados podem ser incorporados em programas de melhoramento como fonte adicional de variabilidade para tolerância a estresses abióticos. Testes em larga escala, em vários locais e anos, devem ser realizados como parte da rotina de seleção de genótipos superiores nos programas de melhoramento, podendo indicar o potencial de ganhos que a introdução do gene ou alelo editado poderá gerar em novas cultivares. A equipe trabalha conjuntamente com parceiros para garantir uma ótima avaliação dos eventos desenvolvidos pelo centro, seguindo todas as normas de biossegurança exigidas.

Do mesmo modo, inoculantes microbianos que apresentarem performance superior em testes de campo em prova de conceito devem ser investigados em testes ampliados, principalmente para avaliar os efeitos da interação genótipo x inoculante e o desempenho em diferentes locais e épocas. Além de eficácia agronômica, o processo de desenvolvimento de um inoculante comercial envolve uma série de testes visando identificar a melhor formulação, a dose a ser aplicada, as condições de aplicação e armazenamento, entre outros, seguindo as recomendações do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

A equipe de inovação desenvolverá ações para: (i) colaboração e prospecção de parcerias; (ii) avaliação de tecnologias; (iii) mapeamento e monitoramento dos mercados potenciais de nossas tecnologias. Todas essas atividades são incorporadas ao Plano Estratégico, que funciona como uma diretriz para o *pipeline* e compõe a vitrine de tecnologias. Nesse ponto, o estabelecimento de parcerias com empresas privadas pode fornecer informações e demandas para orientar o desenvolvimento de soluções tecnológicas aplicáveis, em alinhamento com as demandas do mercado, e facilitar a transferência em futuros negócios.

A transferência de tecnologia deve considerar a concepção de novos modelos comerciais, que justifiquem a exploração do mercado das tecnologias em novas variedades e/ou híbridos de diversas culturas. Alguns desses modelos podem considerar licenças e benefícios de exploração comercial que contemplem investimentos feitos pelo licenciado em processos de regulamentação e administração e desenvolvimento de produtos, uma vez que o objetivo é o avanço das tecnologias à fase de prova de conceito.

3 Considerações Finais

O GCCRC tem como alvo de pesquisa a cultura do milho, mas as tecnologias desenvolvidas poderão potencialmente ser transferidas para demais culturas agrícolas. O GCCRC construiu uma infraestrutura moderna para atender às demandas do *pipeline*, com novas casas de vegetação e

laboratórios de transformação de plantas, biologia molecular, bioinformática e fenotipagem. Esse último, em particular, possui tecnologia que incorpora diversos sensores de baixo custo e alta precisão e sistemas de informação, desenvolvida localmente para a coleta de grande número de dados fenotípicos em tempo real. Os primeiros resultados científicos e tecnológicos já estão sendo alcançados. Genes inexplorados e ora de função desconhecida, associados a respostas a estresses abióticos, foram descobertos, e os primeiros estão em fase de prova de conceito em milho e em testes de campo em cana-de-açúcar. A equipe já domina a tecnologia de edição gênica em milho, e plantas editadas estão sendo geradas de forma contínua. Comunidades microbianas sintéticas compostas por microrganismos benéficos, que aumentam o rendimento de milho em condições estressantes, foram descobertas e testadas em condições controladas e no campo. Recentes esforços no sequenciamento e na montagem dos genomas e microbiomas de plantas dos campos rupestres abrem um caminho novo a ser explorado, em busca de novos genes e microrganismos adaptados a ambientes hídrica e nutricionalmente limitantes. Seguindo o racional de *pipeline*, novos genes e microrganismos estão continuamente sendo descobertos e testados.

As pesquisas desenvolvidas no âmbito do GCCRC vão promover a implantação da agricultura digital, uma vez que propiciarão o desenvolvimento de novas cultivares, com modificações genéticas que incorporam características de tolerância a seca e outros estresses, contribuindo para que o país seja capaz de aumentar sua produtividade de forma sustentável, com economia de recursos naturais.

4 Referências

ALSON J. M.; BEDDOW, J. M.; PARDEY, P. G. Agricultural research, productivity, and food prices in the long run. **Science**, v. 325, n. 5945, p. 1209-1210, Sept. 2009. DOI: [10.1126/science.1170451](https://doi.org/10.1126/science.1170451).

ARMANHI, J. S. L. **Construção de uma comunidade sintética bacteriana promotora do crescimento vegetal oriunda do microbioma de cana-de-açúcar**. 2018. 148 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas.

ARMANHI, J. S. L.; SOUZA, R. S. C.; DAMASCENO, N. B.; ARAÚJO, L. M.; IMPERIAL, J.; ARRUDA, P. A. Community-based culture collection for targeting novel plant growth-promoting bacteria from the sugarcane microbiome. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, article 2191, 2018. DOI: [10.3389/fpls.2017.02191](https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02191).

BACKLUND, P.; JANETOS, A.; SCHIMEL, D. **The effects of climate change on agriculture, land resources, water resources, and biodiversity in the United States**: synthesis and assessment product: report by the U.S. Climate Change Science Program and the Subcommittee on Global Change Research. Washington, DC: Environmental Protection Agency, Climate Change Science Program, 2008. 240 p. and the Subcommittee on Global Change Research.

BARTELS, D.; HUSSAIN, S. Resurrection plants: physiology and molecular biology. In: LÜTTGE, U.; BECK, E.; BARTELS, D. (ed.). **Plant desiccation tolerance**. Berlin: Springer, 2011. p. 339-364. (Ecological studies. Analysis and synthesis, v. 215). DOI: [10.1007/978-3-642-19106-0_16](https://doi.org/10.1007/978-3-642-19106-0_16).

BELAID, A.; MORRIS, M. L. **Wheat and barley production in rainfed marginal environments of West Asia and North Africa**: problems and prospects. Mexico, D.F.: CIMMYT, 1991. (CIMMYT economics working paper 91/02).

BULGARELLI, D.; SCHLAEPPI, K.; SPAEPEN, S.; VAN THEMAAT E. V. L.; SCHULZE-LEFERT, P. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. **Annual Review in Plant Biology**, v. 64, p. 807-838, 2013. DOI: [10.1146/annurev-arplant-050312-120106](https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120106).

CAMARGO, A. P.; SOUZA, R. S. C.; DE BRITTO COSTA, P.; GERHARDT, I. R.; DANTE, R. A.; TEODORO, G. S.; ABRAHAO, A.; LAMBERS, H.; CARAZZOLLE, M. F.; HUNTEMANN, M.; CLUM, A.; FOSTER, B.; FOSTER, B.; ROUX, S.; PALANIAPPAN, K.; VARGHESE, N.; MUKHERJEE, S.; REDDY, T. B. K.; DAUM, C.; COPELAND, A.; CHEN, I. A.; IVANOVA, N. N.; KYRPIDES, N. C.; PENNACCHIO, C.; ELOE-FADROSH, E. A.; ARRUDA, P.; OLIVEIRA, R. S. Microbiomes of Velloziaceae from phosphorus-impooverished soils of the campos rupestres, a biodiversity hotspot. **Scientific Data**, v. 6, article number 140, p. 1-11, 2019. DOI: [10.1038/s41597-019-0141-3](https://doi.org/10.1038/s41597-019-0141-3).

CASTIGLIONI, P.; WARNER, D.; BENSEN, R.J.; ANSTROM, D. C.; HARRISON, J.; STOECKER, M.; ABAD, M.; KUMAR, G.; SLAVADOR, S.; D'ORDINE, R.; NAVARRO, S.; BACK, S.; FERNANDES, M.; TARGOLLI, J.; DASGUPTA, S.; BONIN, C.; LUETHY, M. H.; HEARD, J. E. Bacterial RNA chaperones confer abiotic stress tolerance in plants and improved grain yield in maize under water-limited conditions. **Plant Physiology**, v. 147, p. 446-455, 2008. DOI: [10.1104/pp.108.118828](https://doi.org/10.1104/pp.108.118828).

CASTRO, A. M. G. de; LIMA, S. M. V.; LOPES, M. A.; MACHADO, M. dos S.; MARTINS, M. A. G. **O futuro do melhoramento genético vegetal no Brasil**: impactos da biotecnologia e dos direitos de proteção do conhecimento. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica: Embrapa-Secretaria de Pesquisa e Desenvolvimento, 2006. 506 p.

COLEMAN-DERR, D.; TRINGE, S. G. Building the crops of tomorrow: advantages of symbiont-based approaches to improving abiotic stress tolerance. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, article 283, 2014. DOI: [10.3389/fmicb.2014.00283](https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00283).

CONCENTRATION in seed markets: potential effects and policy responses. Paris: OECD Publishing, 2018. 236 p. DOI: [10.1787/9789264308367-en](https://doi.org/10.1787/9789264308367-en).

DAMATTA, F. M.; GRANDIS, A.; ARENQUE, C. C.; BUCKERIDGE, M. S. Impacts of climate changes on crop physiology and food quality. **Food Research International**, v. 43, n. 7, p. 1814-1823, Aug 2010. DOI: [10.1016/j.foodres.2009.11.001](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.11.001).

EISENSTEIN, M. Discovery in a dry spell. **Nature**, v. 501, p. S7-S9, Sept 2013. DOI: [10.1038/50157a](https://doi.org/10.1038/50157a).

GAO, H.; GADLLAGE, M. J.; LATIFFE, H. R.; LENDERTS, B.; YANG, M.; SCHRODER, M.; FARRELL, H.; SNOPEK, K.; PETERSON, D.; FEIGENBUTZ, L.; JONES, S.; CLAIR, G. S.; RAHE, M.; SANYOUR-DOYEL, N.; PENG, C.; WANG, L.; YOUNG, J. K.; BEATTY, M.; DAHLKE, B.; HAZEBROEK, J.; GREENE, T. W.; CIGAN, A. M.; CHILCOAT, N. D.; MEELEY, R. B. Superior field performance of waxy corn engineered using CRISPR-Cas9. **Nature Biotechnology**, v. 38, p. 579-581, 2020. DOI: [10.1038/s41587-020-0444-0](https://doi.org/10.1038/s41587-020-0444-0).

GOLLERY, M.; HARPER, J.; CUSHMAN, J.; MITTLER, T.; GIRKE, T.; ZHU, J. K.; BAILEY-SERRES, J.; MITTLER, R. What makes species unique? The contribution of proteins with obscure features. **Genome Biology**, v. 7, article R57, 2006. DOI: [10.1186/gb-2006-7-7-r57](https://doi.org/10.1186/gb-2006-7-7-r57).

GOLLERY, M.; HARPER, J.; CUSHMAN, J.; MITTLER, T.; MITTLER, R. POFs: what we don't know can hurt us. **Trends in Plant Science**, v. 12, n. 11, p. 492-496, Nov 2007. DOI: [10.1016/j.tplants.2007.08.018](https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.08.018).

GUTIÉRREZ, A. P.; ENGLE, N. E.; DE NYS, E.; MOLEJÓN, C.; MARTINS, E. S. Drought preparedness in Brazil. **Weather and Climate Extremes**, v. 3, p. 95-106, June 2014. DOI: [10.1016/j.wace.2013.12.001](https://doi.org/10.1016/j.wace.2013.12.001).

HORAN, K.; JANG, C.; BAILEY-SERRES, J.; MITTLER, R.; SHELTON, C.; HARPER, J.F.; ZHU, J. K.; CUSHMAN, J. C.; GOLLERY, M.; GIRKE, T. Annotating genes of known and unknown function by large-scale coexpression analysis. **Plant Physiology**, v. 147, p. 41-57, 2008. DOI: [10.1104/pp.108.117366](https://doi.org/10.1104/pp.108.117366).

IIZUMI, T.; RAMANKUTTY, N. Changes in yield variability of major crops for 1981–2010 explained by climate change. **Environmental Research Letters**, v. 11, n. 3, article 034003, 2016. DOI: [10.1088/1748-9326/11/3/034003](https://doi.org/10.1088/1748-9326/11/3/034003).

KIM, J.; KIM, J. New era of precision plant breeding using genome editing. **Plant Biotechnology Reports**, v. 13, p. 419-421, 2019. DOI: [10.1007/s11816-019-00581-w](https://doi.org/10.1007/s11816-019-00581-w).

LARA, L.; ROSTAGNO, M. Impact of heat stress on poultry production. **Animals**, v. 3, p. 356-369, 2013. DOI: [10.3390/ani3020356](https://doi.org/10.3390/ani3020356).

LAU, J. A.; LENNON, J. T. Rapid responses of soil microorganisms improve plant fitness in novel environments. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 109, p. 14058-14062, 2012. DOI: [10.1073/pnas.1202319109](https://doi.org/10.1073/pnas.1202319109).

MBOW, C. C.; ROSENZWEIG, L. G.; BARIONI, T. G.; BENTON, M.; HERRERO, M.; KRISHNAPILLAI, E.; LIWENGA, P.; PRADHAN, M. G.; RIVERA-FERRE, T.; SAPKOTA, F. N.; TUBIELLO, Y. XU. Food security. In: SHUKLA, P. R.; SKEA, J.; BUENDIA, E. C.; MASSON-DELMOTTE, V.; PÖRTNER, H. O.; ROBERTS, D. C.; ZHAI, P.; SLADE, R.; CONNORS, S.; VAN DIEMEN, R.; FERRAT, M.; HAUGHEY, E.; LUZ, S.; NEOGI, S.; PATHAK, M.; PETZOLD, J.; PEREIRA, J. P.; VYAS, P.; HUNTLEY, E.; KISSICK, K.; BELKACEMI, M.; MALLEY, J. (ed.). **Climate Change and Land: an IPCC special report on climate change, desertification, land degradation, sustainable land management, food security, and greenhouse gas fluxes in terrestrial ecosystems**. [S.l.]: Intergovernmental Panel on Climate Change, 2019. p. 437-550. In press.

MCCOUCH, S.; BAUTE, G. J.; BRADEEN, J.; BRAMEL, P.; BRETTING, P. K.; BUCKLER, E.; BURKE, J. M.; CHAREST, D. C.; CLOUTIER, S.; COLE, G.; DEMPEWOLF, H.; DINGKUHN, M.; FEUILLET, C.; GEPTS, P.; GRATTAPAGLIA, D.; GUARINO, L.; JACKSON, S.; KNAPP, S.; LANGRIDGE, P.; LAWTON-RAUH, A.; LIJUA, Q.; LUSTY, C.; MICHAEL, T.; MYLES, S.; NAITO, K.; NELSON, R. L.; PONTAROLLO, R.; RICHARDS, C. M.; RIESEBERG, L.; ROSS-IBARRA, J.; ROUNSLEY, S.; HAMILTON, R. S.; SCHURR, U.; STEIN, N.; TOMOOKA, N.; KNAAP, E. VAN DER; TASSEL, D. VAN; TOLL, J.; VALLS, J.; VARSHNEY, R. K.; WARD, J.; WAUGH, R.; WENZL, P.; ZAMIR, D. Feeding the future. **Nature**, v. 499, p. 23-24, July 2013. DOI: [10.1038/499023a](https://doi.org/10.1038/499023a).

MITTLER, R.; BLUMWALD, E. Genetic engineering for modern agriculture: challenges and perspectives. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, p. 443-462, 2010. DOI: [10.1146/annurev-arplant-042809-112116](https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112116).

NUCCIO, M. L.; WU, J.; MOWERS, R.; ZHOU, H. P.; MEGHJI, M.; PRIMAVESI, L. F.; PAUL, M. J.; CHEN, X.; GAO, Y.; HAQUE, E.; BASUL, S. S.; LAGRIMINI, L. M. Expression of trehalose-6-phosphate phosphatase in maize ears improves yield in well-watered and drought conditions. **Nature Biotechnology**, v. 33, p. 862-869, 2015. DOI: [10.1038/nbt.3277](https://doi.org/10.1038/nbt.3277).

OH, D.-H.; DASSANAYAKE, M.; BOHNERT, H. J.; CHEESEMAN, J. M. Life at the extreme: lessons from the genome. **Genome Biology**, v. 13, article number 2747, 2012. DOI: [10.1186/gb4003](https://doi.org/10.1186/gb4003).

ORNELLA, L.; CERVIGNI, G.; TAPIA, E. Applications of machine learning for maize breeding for stress. In: VENKATESWARLU, B.; SHANKER, A. K.; SHANKER, C.; MAHESWARI, M. (ed.). **Crop stress and its management: perspectives and strategies**. Netherlands: Springer Netherlands, 2012. p. 163-192. DOI: [10.1007/978-94-007-2220-0_5](https://doi.org/10.1007/978-94-007-2220-0_5).

RAY, D. K.; GERBER, J. S.; MACDONALD, G. K.; WEST, P.C. Climate variation explains a third of global crop yield variability. **Nature Communication**, v. 6, article number 5989, p. 1-9, 2015. DOI: [10.1038/ncomms6989](https://doi.org/10.1038/ncomms6989).

REDMAN, R. S.; KIM, Y. O.; WOODWARD, C. J. D.; GREER, C.; ESPINO, L.; DOTY, S. L.; RODRIGUEZ, R. J. Increased fitness of rice plants to abiotic stress via habitat adapted symbiosis: a strategy for mitigating impacts of climate change. **PLoS One**, v. 6, issue 7, e14823, 2011. DOI: [10.1371/journal.pone.0014823](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014823).

RIPPEY, B. R. The U.S. drought of 2012. **Weather and Climate Extremes**, v. 10, part A, p. 57-64, Dec 2015. DOI: [10.1016/j.wace.2015.10.004](https://doi.org/10.1016/j.wace.2015.10.004).

RODRIGUEZ, R. J.; HENSON, J.; VAN VOLKENBURGH, E.; HOY, M.; WRIGHT, L.; BECKWITH, F.; KIM, Y.-O.; REDMAN, R. S. Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis. **The ISME Journal**, v. 2, p. 404-416, 2008. DOI: [10.1038/ismej.2007.106](https://doi.org/10.1038/ismej.2007.106).

SHI, J.; GAO, H.; WANG, H.; LAFITTE, W. H.; ARCHIBALD, R. L.; YANG, M.; HAKIMI, S. M.; MO, H.; HABBEN, J. E. ARGOS8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions. **Plant Biotechnology Journal**, v. 15, p. 207-216, July 2016. DOI: [10.1111/pbi.12603](https://doi.org/10.1111/pbi.12603).

SILVA, F. F.; BRAGA, M. J.; GARCIA, J. C. Concentração nos mercados de sementes de milho, soja e algodão: uma abordagem ECD. **Agroalimentaria**, v. 21, p. 133-150, 2015.

SOUZA, R. S. C.; OKURA, V. K.; ARMANHI, J. S. L.; JORRÍN, B.; LOZANO, N.; DA SILVA, M. J.; GONZÁLEZ-GUERRERO, M.; ARAÚJO, L. M.; VERZA, N. C.; BAGHERI, H. C.; IMPERIAL, J.; ARRUDA, P. Unlocking the bacterial and fungal communities assemblages of sugarcane microbiome. **Scientific Reports**, v. 6, article number 28774, June 2016. DOI: [10.1038/srep28774](https://doi.org/10.1038/srep28774).

WOODWARD, C.; HANSEN, L.; BECKWITH, F.; REDMAN, R. S.; RODRIGUEZ, R. J. Symbiogenics: an epigenetic approach to mitigating impacts of climate change on plants. **HortScience**, v. 47, n. 6, p. 699-703, June 2012. DOI: [10.21273/HORTSCI.47.6.699](https://doi.org/10.21273/HORTSCI.47.6.699).