



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI 1003752-7 A2**

(22) Data de Depósito: 10/09/2010
(43) Data da Publicação: 16/04/2013
(RPI 2206)



(51) *Int.Cl.:*
A01H 1/00
C12N 15/09

(54) Título: MÉTODO PARA AUMENTAR A PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE PLANTA E/OU SEMENTES E MÉTODO PARA PRODUZIR PLANTA CAPAZ DE PRODUZIR QUANTIDADE AUMENTADA DE BIOMASSA E/OU SEMENTES

(30) Prioridade Unionista: 11/09/2009 JP 2009-210621

(73) Titular(es): Toyota Jidosha Kabushiki Kaisha

(72) Inventor(es): Chikara Ohto, Kenichi Ogawa, Satoshi Kondo

(57) Resumo: MÉTODO PARA AUMENTAR A PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE PLANTA E/OU SEMENTES E MÉTODO PARA PRODUZIR PLANTA CAPAZ DE PRODUZIR QUANTIDADE AUMENTADA DE BIOMASSA E/OU SEMENTES. A presente invenção refere-se à produção de biomassa e/ou sementes que é adicionalmente aumentada. A produção de biomassa e/ou sementes por uma planta pode ser aumentada adicionalmente através do fornecimento de glutatona a uma planta na qual um gene que codifica uma proteína fosfatase 20 que tem sequências consenso características foi introduzido.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"MÉTODO PARA AUMENTAR A PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE PLANTA E/OU SEMENTES E MÉTODO PARA PRODUZIR PLANTA CAPAZ DE PRODUZIR QUANTIDADE AUMENTADA DE BIOMASSA E/OU SEMENTES"**.

Antecedentes da Invenção

Campo da Invenção

A presente invenção refere-se a um método para aumentar adicionalmente a produção de biomassa e/ou sementes por uma planta que produz uma quantidade aumentada de biomassa e/ou sementes como um resultado da introdução de um dado gene na planta; e um método para produzir esta planta capaz de produzir uma quantidade aumentada de biomassa e/ou sementes.

Antecedentes da Técnica

O termo "biomassa" geralmente refere-se à quantidade total de organismos que habitam ou existem em uma determinada área. Quando este termo é usado com relação a plantas, em particular, ele refere-se ao peso a seco por unidade de área. As unidades de biomassa são quantificadas em termos de massa ou energia. A expressão "biomassa" é sinônimo de "Seibutsutairyo" ou "Seibutsuryo". No caso de biomassa de planta, o termo organismos por área" é ocasionalmente usado para "biomassa". Como a biomassa de planta é gerada pela fixação de dióxido de carbono atmosférico com o uso de energia solar, ela pode ser considerada como a chamada "energia neutra de carbono". Consequentemente, um aumento da biomassa de plantas é eficaz para a preservação ambiental global, para a prevenção do aquecimento global, e mitigação de emissões de gases estufa. Desta forma, as tecnologias para aumentar a produção de biomassa de planta têm sido significativas industrialmente.

As plantas são cultivadas com o propósito de usar alguns de seus tecidos (por exemplo, sementes, raízes, folhas, ou hastes) ou com o propósito de produzir vários materiais, tais como gorduras e óleos. Exemplos de gorduras e óleos produzidos a partir de plantas que são conhecidos até o

momento incluem óleo de soja, óleo de gergelim, óleo de oliva, óleo de coco, óleo de arroz, óleo de caroço de algodão, óleo de girassol, óleo de milho, óleo de açafrão, óleo de babaçu, e óleo de semente de colza. Estas gorduras e óleos são muito usados para aplicações domésticas e industriais. Ainda, as gorduras e óleos produzidos a partir de plantas são usados como matérias-primas para combustível biodiesel ou bioplástico, e a sua aplicabilidade está aumentando para energia alternativa ao petróleo.

Em particular, um cultivo para geração de energia, tal como cana-de-açúcar, pode ser usado como uma matéria-prima para biocombustível. Então, espera-se a produção aumentada da massa total de uma planta em si (a quantidade de biomassa de planta). Sob estas circunstâncias, o aprimoramento na produtividade por unidade de área de cultivo é necessária de modo a aumentar a produção da quantidade de biomassa de planta. Descobriu-se que se o número de plantas cultivadas for considerado constante por unidade de área de cultivo, um aprimoramento na quantidade de biomassa por planta seria necessário.

Entretanto, acredita-se que já que muitos genes estão envolvidos na quantidade de biomassa de planta (um chamado "tipo de característica quantitativa"), a introdução de um gene individual ou modificação genética individual pode não levar a um aumento eficaz na produção. Entretanto, muitas dificuldades estão associadas à introdução de muitos genes em um estado desejado em uma planta. Esta introdução gênica também é problemática porque se ocorrer uma introdução bem-sucedida, as características desejáveis podem nem sempre ser adquiridas.

Várias técnicas para introdução de genes são conhecidas como técnicas para aumentar a produção de biomassa de planta, conforme apresentado nos documentos de patente 1 a 7, por exemplo. Entretanto, nenhuma destas técnicas pode ser considerada como exercendo efeito suficiente de aumento da produção de biomassa.

Documentos de Patente

Documento de patente 1: Publicação de Patente JP (Kohyo) Nº 2001-505410 A



Documento de patente 2: Publicação de Patente JP (Kohyo) Nº
2001-519659 A

Documento de patente 3: Publicação de Patente JP (Kohyo) Nº
2007-530063 A

5 Documento de patente 4: Publicação de Patente JP (Kokai) Nº
2005-130770 A

Documento de patente 5: Publicação de Patente JP (Kohyo) Nº
2000-515020 A

10 Documento de patente 6: Publicação de Patente JP (Kohyo) Nº
9-503389 A

Documento de patente 7: Publicação de Patente JP (Kokai) Nº
2005-52114 A

Sumário da Invenção

Os presentes inventores buscaram genes que possuem novas
15 funções de melhorar drasticamente a quantidade de biomassa de planta e
identificaram genes capazes de aumentar drasticamente a produção de bio-
massa de planta (PCT/JP2009/054983). Os presentes inventores examina-
ram ainda plantas nas quais estes genes foram introduzidos. Como um re-
sultado, um objetivo da presente invenção é fornecer uma técnica para au-
20 mentar adicionalmente a produção de biomassa e/ou sementes.

Como um resultado de estudos intensivos para se obter o objeto
acima, os presentes inventores fizeram o novo achado de que a produção de
biomassa e/ou sementes pode ser aumentada adicionalmente através do
fornecimento de glutatona a uma planta na qual um gene que codifica uma
25 proteína fosfatase 2C que tem sequências consenso características foi intro-
duzido. Desta forma, eles completaram a presente invenção.

Especificamente, o método para aumentar a produção de bio-
massa e/ou sementes de acordo com a presente invenção compreende uma
etapa de fornecer glutatona a uma planta na qual foi introduzido um gene
30 que codifica proteína fosfatase 2C que tem 3 sequências consenso que
compreendem as sequências de aminoácido mostradas nas SEQ ID Nºs: 1 a
3 nesta ordem a partir da porção terminal N.

Adicionalmente, o método para produzir uma planta de acordo com a presente invenção compreende uma etapa de fornecer glutathione a uma planta na qual foi introduzido um gene que codifica a proteína fosfatase 2C que tem 3 sequências consenso que compreendem as sequências de aminoácido mostradas em SEQ ID N^{os}: 1 a 3 nesta ordem a partir da porção terminal N.

Na presente invenção, o gene acima que codifica a proteína fosfatase 2C pode ser pelo menos um tipo de gene selecionado do grupo que consiste em At1g03590-AtPP2C6-6, At1g16220, At1g79630, At5g01700, At3g02750, At5g36250, At5g26010, At4g32950, At3g16800, At3g05640, At5g27930-AtPP2C6-7, At2g20050, e At3g06270, ou um gene funcionalmente equivalente a estes.

Na presente invenção, o gene acima que codifica a proteína fosfatase 2C codifica, de preferência, qualquer uma das seguintes proteínas (a) a (c):

(a) uma proteína que compreende a sequência de aminoácidos mostrada em SEQ ID N^o: 5;

(b) uma proteína que compreende uma sequência de aminoácido que tem uma deleção, uma substituição, uma adição, ou uma inserção de um ou de uma pluralidade de aminoácidos com relação à sequência de aminoácido mostrada em SEQ ID N^o: 5 e tem atividade de proteína fosfatase 2C; e

(c) uma proteína que é codificada por um polinucleotídeo que hibridiza sob condições estridentes a um polinucleotídeo que compreende uma sequência de nucleotídeos complementar à sequência de nucleotídeo mostrada em SEQ ID N^o: 4 e tem atividade de proteína fosfatase 2C.

Adicionalmente, na presente invenção, um exemplo do gene funcionalmente equivalente acima é um gene de proteína fosfatase 2C de um organismo diferente de *Arabidopsis thaliana*. Outro exemplo de um organismo diferente de *Arabidopsis thaliana* é um organismo selecionado do grupo que consiste em arroz (*Oryza sativa*), choupo-do-Canadá preto (*Populus trichocarpa*), uva europeia (*Vitis vinifera*), *Medicago truncatula* (*Medicago truncatula*), alfafa (*Medicago sativa*), *Physcomitrella patens* (*Physcomitrella*

patens), barrilha (*Mesembryanthemum crystallinum*), *Chlamydomonas reinhardtii* (*Chlamydomonas reinhardtii*), milho (*Zea mays*), colza (*Brassica rapa*), tomate (*Solanum lycopersicum*), mimulus (*Mimulus guttatus*), e alga vermelha monocelular (*Cyanidioschyzon merolae*).

5 Exemplos de plantas a ser submetidas à presente invenção incluem dicotiledôneas tais como plantas da família Brassicaceae. Exemplos de plantas da família Brassicaceae incluem *Arabidopsis thaliana* e colza. Outros exemplos de plantas a ser submetidas à presente invenção incluem monocotiledôneas, tais como plantas da família Gramineae. Exemplos de
10 plantas da família Gramineae incluem arroz e cana-de-açúcar.

De acordo com o método para aumentar a produção de biomassa e/ou sementes de acordo com a presente invenção, a produção adicionalmente aumentada de biomassa e/ou sementes se torna possível através de tratamento muito conveniente e de baixo custo de uma planta que produz
15 uma quantidade aumentada de biomassa e/ou sementes como um resultado da introdução de um determinado gene na planta.

Ainda, de acordo com o método para produzir uma planta de acordo com a presente invenção, uma planta capaz de produzir uma quantidade adicionalmente aumentada de biomassa e/ou sementes pode ser obtida através de tratamento muito conveniente e de baixo custo da planta que produz uma quantidade aumentada de biomassa e/ou sementes como um
20 resultado da introdução de um determinado gene na planta.

Breve Descrição dos Desenhos

A figura 1-1 é um diagrama característico mostrando os resultados da análise por alinhamento com o uso de um programa de alinhamento de múltiplas sequências CLUSTAL W (1.83) para as sequências de aminoácido codificadas por At1g03590-AtPP2C6-6, At1g16220, At1g79630, At5g01700, At3g02750, At5g36250, At5g26010, At4g32950, At3g16800, At3g05640, At5g27930-AtPP2C6-7, At2g20050, e At3g06270.
25

30 A figura 1-2 é um diagrama característico mostrando os resultados da análise por alinhamento com o uso de um programa de alinhamento de múltiplas sequências CLUSTAL W (1.83) para as sequências de aminoá-



cido codificada por At1g03590-AtPP2C6-6, At1g16220, At1g79630, At5g01700, At3g02750, At5g36250, At5g26010, At4g32950, At3g16800, At3g05640, At5g27930-AtPP2C6-7, At2g20050, e At3g06270.

5 A figura 1-3 é um diagrama característico mostrando os resultados da análise por alinhamento com o uso de um programa de alinhamento de múltiplas sequências CLUSTAL W (1.83) para as sequências de aminoácido codificadas por At1g03590-AtPP2C6-6, At1g16220, At1g79630, At5g01700, At3g02750, At5g36250, At5g26010, At4g32950, At3g16800, At3g05640, At5g27930-AtPP2C6-7, At2g20050, e At3g06270.

10 A figura 2-1 é um diagrama característico mostrando os resultados da análise por alinhamento com o uso de um programa de alinhamento de múltiplas sequências CLUSTAL W (1.83) para as sequências de aminoácido codificadas por At1g03590-AtPP2C6-6, At1g16220, At1g79630, At5g01700, At3g02750, At5g36250, At5g26010, At4g32950, At3g16800, At3g05640, e At5g27930-AtPP2C6-7.

15 A figura 2-2 é um diagrama característico mostrando os resultados da análise por alinhamento com o uso de um programa de alinhamento de múltiplas sequências CLUSTAL W (1.83) para as sequências de aminoácido codificadas por At1g03590-AtPP2C6-6, At1g16220, At1g79630, At5g01700, At3g02750, At5g36250, At5g26010, At4g32950, At3g16800, At3g05640, e At5g27930-AtPP2C6-7.

20 A figura 2-3 é um diagrama característico mostrando os resultados da análise por alinhamento com o uso de um programa de alinhamento de múltiplas sequências CLUSTAL W (1.83) para as sequências de aminoácido codificadas por At1g03590-AtPP2C6-6, At1g16220, At1g79630, At5g01700, At3g02750, At5g36250, At5g26010, At4g32950, At3g16800, At3g05640, e At5g27930-AtPP2C6-7.

25 A figura 3 é uma foto mostrando as partes aéreas de plantas do tipo selvagem e plantas transformadas nas quais foi introduzido um fragmento contendo ORF do gene PP2C (proteína fosfatase 2C) (At3g05640).

30 A figura 4 é um diagrama característico mostrando os resultados da medição das quantidades de biomassa das partes aéreas de plantas do

tipo selvagem e plantas transformadas nas quais foi introduzido um fragmento contendo ORF do gene PP2C (proteína fosfatase 2C) (At3g05640). O resultado para as plantas do tipo selvagem é o valor médio para 12 plantas do tipo selvagem individuais e cada resultado para a planta transformada é o valor médio para 5 plantas transformadas individuais.

A figura 5 é um diagrama característico mostrando os resultados da medição das quantidades de sementes de plantas do tipo selvagem e plantas transformadas nas quais foi introduzido um fragmento contendo ORF do gene PP2C (proteína fosfatase 2C) (At3g05640). O resultado para as plantas do tipo selvagem é o valor médio para 12 plantas do tipo selvagem individuais e cada resultado para a planta transformada é o valor médio para 5 plantas transformadas individuais.

A figura 6 é uma foto mostrando as partes aéreas de plantas do tipo selvagem, plantas transformadas nas quais foi introduzido um gene PP2C, e plantas transformadas nas quais foi introduzido um gene FBA1, que foram tratadas com glutathione e, então, cultivadas.

A figura 7 é um diagrama característico mostrando os resultados da medição das quantidades de biomassa das partes aéreas de: plantas transformadas nas quais foi introduzido um gene PP2C e plantas transformadas nas quais foi introduzido um gene FBA1, que foram tratadas com glutathione e, então, cultivadas; e as mesmas plantas transformadas que servem como plantas de controle, que foram tratadas com água.

A figura 8 é um diagrama característico mostrando os resultados da medição das quantidades de sementes de: plantas transformadas nas quais foi introduzido um gene PP2C e plantas transformadas nas quais foi introduzido um gene FBA1, que foram tratadas com glutathione e, então, cultivadas; e as mesmas plantas transformadas que servem como plantas de controle, que foram tratadas com água.

Descrição das Modalidades Preferenciais

A presente invenção será descrita em detalhe da seguinte forma.

O método de acordo com a presente invenção compreende fornecer glutathione a uma planta na qual um determinado gene foi introduzido.

Aqui, o termo "fornecer glutathione" refere-se a cultivar uma planta na presença de glutathione durante pelo menos um dos períodos de todos os estágios de crescimento após a semeadura. Exemplos de um método para fornecer glutathione incluem um método que envolve a aspersão de uma solução de glutathione sobre a superfície do solo no qual as sementes da planta são semeadas e um método que envolve a mistura de solo com um veículo (por exemplo, bentonita, argila, talco, ou vermiculita) contendo glutathione.

Como a glutathione a ser usada na presente invenção, podem ser usadas glutathione reduzida ou glutathione oxidada, ou ambas. Devido aos efeitos do aumento da produção de biomassa e/ou sementes, glutathione oxidada é, de preferência, usada. A quantidade definida acima de glutathione a ser fornecida pode ser fornecida em um único suprimento ou em suprimentos divididos.

Uma planta à qual o método de acordo com a presente invenção é aplicado é produzida pela introdução de um gene que codifica a proteína fosfatase 2C que tem sequências consenso características. As plantas assim produzidas produzem uma quantidade significativamente aprimorada (aumentada) de biomassa em comparação a plantas do tipo selvagem. Esta planta pode ser produzida pela introdução do gene da proteína fosfatase 2C para expressão em todos os tecidos de planta ou introdução do mesmo para expressão em pelo menos alguns dos tecidos da planta. Aqui, o termo "tecido(s) de planta" refere-se a órgão(s) da planta, tal como, folhas, hastes, sementes, raízes, e flores. O termo "introduzir um gene" é usado aqui em relação a uma situação na qual o nível de expressão de um gene-alvo é determinado para aumentar significativamente em comparação ao nível de expressão em um organismo do tipo selvagem. Portanto, o termo "introdução de um gene" para uso na presente invenção, refere-se a uma forma através da qual um gene-alvo é introduzido de fora e uma forma através da qual o nível de expressão é aprimorado pela alteração de uma região de controle da expressão de um gene endógeno.

Gene da Proteína Fosfatase 2C

O gene da proteína fosfatase 2C a ser introduzido em uma plan-



ta codifica a proteína fosfatase 2C que tem 3 sequências consenso que compreendem as sequências de aminoácido mostradas nas SEQ ID N^{os}: 1 a 3 nesta ordem a partir da porção terminal N. Além disso, um grupo de genes classificado como grupo E conforme a figura 1 do cladograma topográfico (na página 237 da referência: TRENDS in Plant Science Vol. 9 N^o 5 de maio de 2004 páginas 236-243) codifica a proteína fosfatase 2C que tem 3 sequências consenso que compreendem as sequências de aminoácido mostradas nas SEQ ID N^{os}: 1 a 3 nesta ordem a partir da porção terminal N. Além disso, a referência prevê a presença de 76 genes da proteína fosfatase 2C em *Arabidopsis thaliana* e apresenta os resultados da produção de uma árvore filogenética destes genes com o uso do programa T-Coffee (referência; Notredame, C. *et al.* 2000 T-Coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. J. Mol. Biol. 302, 205-247) conforme a figura 1. Nesta árvore filogenética, os genes da proteína fosfatase 2C classificados como membros do grupo E codificam uma proteína fosfatase 2C que tem 3 sequências consenso que compreendem as sequências de aminoácido mostradas nas SEQ ID N^{os}: 1 a 3 nesta ordem a partir da porção terminal N. As 3 sequências consenso que compreendem as sequências de aminoácido mostradas nas SEQ ID N^{os}: 1 a 3 são sequências características no grupo E na classificação acima mencionada e servem como uma base para uma clara diferenciação dos outros grupos.

O grupo E na classificação acima inclui genes da proteína fosfatase 2C especificados por At1g03590-AtPP2C6-6, At1g16220, At1g79630, At5g01700, At3g02750, At5g36250, At5g26010, At4g32950, At3g16800, At3g05640, At5g27930-AtPP2C6-7, At2g20050, e At3g06270 derivados de *Arabidopsis thaliana*. A figura 1 mostra os resultados da análise por alinhamento com o uso de um programa de alinhamento de múltiplas sequências CLUSTAL W (1.83) (que pode ser usado junto ao DDBJ do National Institute of Genetics (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>)) para as sequências de aminoácido codificadas por estes genes da proteína fosfatase 2C derivados de *Arabidopsis thaliana*, At1g03590-AtPP2C6-6, At1g16220, At1g79630, At5g01700, At3g02750, At5g36250, At5g26010, At4g32950, At3g16800,



At3g05640, At5g27930-AtPP2C6-7, At2g20050, e At3g06270 (com a matriz de substituição (da sequência) de aminoácido) usada aqui sendo uma matriz padrão conhecida como BLOSUM (Blocos da matriz da substituição do aminoácido)). Conforme mostrado na figura 1, estes genes da proteína fosfatase 2C classificados como membros do grupo E têm sequências consenso características nas regiões chamadas de I a III. Estas regiões chamadas I a III são submetidas, com um gene da proteína fosfatase 2C derivados de arroz (descritos posteriormente), a uma análise por alinhamento, para que as 3 sequências consenso que compreendem as sequências de aminoácido mostradas nas SEQ ID N^{os}: 1 a 3 possam ser definidas.

Aqui, na sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID N^o: 1, um resíduo de aminoácido chamado "Xaa," pode ser qualquer aminoácido, e não é limitado a nenhum aminoácido particular. Entretanto, o 1^o resíduo de aminoácido da porção terminal N na sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID N^o: 1 é, de preferência, leucina (código de três caracteres: Leu e código de um caractere: L; o mesmo se aplica aos seguintes) ou fenilalanina (Phe, F). O 4^o resíduo de aminoácido da porção terminal N na sequência de aminoácido mostrada em SEQ ID N^o: 1 é, de preferência, valina (Val, V), isoleucina (Ile, I), ou metionina (Met, M). O 16^o resíduo de aminoácido da porção terminal N na sequência de aminoácido mostrada em SEQ ID N^o: 1 é, de preferência, serina (Ser, S) ou alanina (Ala, A). O 17^o resíduo de aminoácido da porção terminal N na sequência de aminoácido mostrada em SEQ ID N^o: 1 é, de preferência, lisina (Lys, K), arginina (Arg, R), glutamina (Gln, Q), ou asparagina (Asn, N). Isto é, uma sequência consenso que compreende a sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID N^o: 1 é, de preferência, (L/F)XG(V/I/M)FDGHGXXGXXX(S/A)(K/R/Q/N)XV. Nesta sequência de aminoácido, vários aminoácidos entre parênteses representam as possíveis variações dos resíduos de aminoácido nas posições relevantes. Ainda, nas sequências de aminoácido, "X" significa que qualquer resíduo de aminoácido pode estar presente na posição relevante.

Ainda, tal sequência consenso pode ser uma sequência que contém os seguintes 3 resíduos de aminoácido na porção terminal N da Re-

gião I na figura 1. (D/E/N)XX.

Aqui, na sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID Nº: 2, um resíduo de aminoácido chamado "Xaa," pode ser qualquer aminoácido, e não é limitado a nenhum aminoácido particular. Entretanto, o 5º resíduo de aminoácido da porção terminal N na sequência de aminoácido mostrada em SEQ ID Nº: 2 é, de preferência, glicina (Gly, G), alanina (Ala, A), ou serina (Ser, S). O 6º resíduo de aminoácido da porção terminal N na sequência de aminoácido mostrada em SEQ ID Nº: 2 é, de preferência, valina (Val, V), leucina (Leu, L), ou isoleucina (Ile, I). O 9º resíduo de aminoácido da porção terminal N na sequência de aminoácido mostrada em SEQ ID Nº: 2 é, de preferência, isoleucina (Ile, I), valina (Val, V), fenilalanina (Phe, F), metionina (Met, M), ou leucina (Leu, L). O 12º resíduo de aminoácido da porção terminal N na sequência de aminoácido mostrada em SEQ ID Nº: 2 é, de preferência, glicina (Gly, G) ou alanina (Ala, A). O 15º resíduo de aminoácido da porção terminal N na sequência de aminoácido mostrada em SEQ ID Nº: 2 é, de preferência, leucina (Leu, L), valina (Val, V), ou isoleucina (Ile, I). O 17º resíduo de aminoácido da porção terminal N na sequência de aminoácido mostrada em SEQ ID Nº: 2 é, de preferência, isoleucina (Ile, I), valina (Val, V), ou metionina (Met, M). O 18º resíduo de aminoácido da porção terminal N na sequência de aminoácido mostrada em SEQ ID Nº: 2 é, de preferência, glicina (Gly, G) ou alanina (Ala, A). O 22º resíduo de aminoácido da porção terminal N na sequência de aminoácido mostrada em SEQ ID Nº: 2 é, de preferência, ácido aspártico (Asp, D) ou histidina (His, H). O 26º resíduo de aminoácido da porção terminal N na sequência de aminoácido mostrada em SEQ ID Nº: 2 é, de preferência, valina (Val, V) ou isoleucina (Ile, I). O 27º resíduo de aminoácido da porção terminal N na sequência de aminoácido mostrada em SEQ ID Nº: 2 é, de preferência, leucina (Leu, L), metionina (Met, M) ou isoleucina (Ile, I). Isto é, uma sequência consenso que compreende a sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID Nº: 2 é, de preferência,

SGXT(G/A/S)(V/L/I)XX(I/V/F/M/L)XX(G/A)XX(L/V/I)X(I/V/M)(A/G)NXG(D/H)S
RA(V/I)(L/M/I). Nesta sequência de aminoácido, vários aminoácidos entre

parênteses representam as possíveis variações dos resíduos de aminoácido nas posições relevantes. Ainda, nas sequências de aminoácido, "X" significa que qualquer resíduo de aminoácido pode estar presente na posição relevante.

- 5 Aqui, na sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID Nº: 3, um resíduo de aminoácido chamado "Xaa," pode ser qualquer aminoácido, e não é limitado a nenhum aminoácido particular. Entretanto, o 4º resíduo de aminoácido da porção terminal N na sequência de aminoácido mostrada em SEQ ID Nº: 3 é, de preferência, metionina (Met, M), valina (Val, V), ou fenilalanina (Phe, F). O 5º resíduo de aminoácido da porção terminal N na sequência de aminoácido mostrada em SEQ ID Nº: 3 é, de preferência, serina (Ser, S), alanina (Ala, A), ou treonina (Thr, T). O 7º resíduo de aminoácido da porção terminal N na sequência de aminoácido mostrada em SEQ ID Nº: 3 é, de preferência, alanina (Ala, A) ou serina (Ser, S). O 8º resíduo de aminoácido da porção terminal N na sequência de aminoácido mostrada em SEQ ID Nº: 3 é, de preferência, fenilalanina (Phe, F), isoleucina (Ile, I), ou valina (Val, V). O 14º resíduo de aminoácido da porção terminal N na sequência de aminoácido mostrada em SEQ ID Nº: 3 é, de preferência, lisina (Lys, K) ou ácido glutâmico (Glu, E). O 18º resíduo de aminoácido da porção terminal N na sequência de aminoácido mostrada em SEQ ID Nº: 3 é, de preferência, valina (Val, V) ou leucina (Leu, L). O 19º resíduo de aminoácido da porção terminal N na sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID Nº: 3 é, de preferência, isoleucina (Ile, I) ou valina (Val, V). O 23º resíduo de aminoácido da porção terminal N na sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID Nº: 3 é, de preferência, ácido glutâmico (Glu, E), glutamina (Gln, Q), ou ácido aspártico (Asp, D). O 24º resíduo de aminoácido da porção terminal N na sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID Nº: 3 é, de preferência, isoleucina (Ile, I), valina (Val, V), ou fenilalanina (Phe, F). O 29º resíduo de aminoácido da porção terminal N na sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID Nº: 3 é, de preferência, isoleucina (Ile, I), leucina (Leu, L), ou valina (Val, V). O 30º resíduo de aminoácido da porção terminal N na sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID Nº: 3 é, de preferência, serina (Ser, S), tre-

onina (Thr, T), ou asparagina (Asn, N). O 33º resíduo de aminoácido da porção terminal N na sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID Nº: 3 é, de preferência, ácido aspártico (Asp, D), asparagina (Asn, N), ou histidina (His, H). O 35º resíduo de aminoácido da porção terminal N na sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID Nº: 3 é, de preferência, fenilalanina (Phe, F) ou tirosina (Tyr, Y). O 36º resíduo de aminoácido da porção terminal N na sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID Nº: 3 é, de preferência, leucina (Leu, L), isoleucina (Ile, I), valina (Val, V), fenilalanina (Phe, F), ou metionina (Met, M). O 37º resíduo de aminoácido da porção terminal N na sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID Nº: 3 é, de preferência, valina (Val, V), leucina (Leu, L), ou isoleucina (Ile, I). O 38º resíduo de aminoácido da porção terminal N na sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID Nº: 3 é, de preferência, leucina (Leu, L) ou valina (Val, V). O 40º resíduo de aminoácido da porção terminal N na sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID Nº: 3 é, de preferência, treonina (Thr, T) ou serina (Ser, S). O 43º resíduo de aminoácido da porção terminal N na sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID Nº: 3 é, de preferência, valina (Val, V), isoleucina (Ile, I), ou metionina (Met, M). O 44º resíduo de aminoácido da porção terminal N na sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID Nº: 3 é, de preferência, triptofano (Trp, W) ou fenilalanina (Phe, F). O 45º resíduo de aminoácido da porção terminal N na sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID Nº: 3 é, de preferência, ácido aspártico (Asp, D) ou ácido glutâmico (Glu, E). O 47º resíduo de aminoácido da porção terminal N na sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID Nº: 3 é, de preferência, leucina (Leu, L), isoleucina (Ile, I), ou metionina (Met, M). O 48º resíduo de aminoácido da porção terminal N na sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID Nº: 3 é, de preferência, serina (Ser, S), treonina (Thr, T), ou prolina (Pro, P). O 49º resíduo de aminoácido da porção terminal N na sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID Nº: 3 é, de preferência, asparagina (Asn, N) ou serina (Ser, S). O 52º resíduo de aminoácido da porção terminal N na sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID Nº: 3 é, de preferência, valina (Val, V) ou alanina (Ala, A). O 55º resíduo de aminoácido da porção N-terminal na sequência de aminoácido

mostrada na SEQ ID Nº: 3 é, de preferência, leucina (Leu, L), valina (Val, V), isoleucina (Ile, I), ou metionina (Met, M). O 56º resíduo de aminoácido da porção terminal N na sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID Nº: 3 é, de preferência, isoleucina (Ile, I) ou valina (Val, V). Isto é, uma sequência

5 consenso que compreende a sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID Nº: 3 é, mais especificamente, GX(A(M/V/F)(S/A/T)R(A/S)(F/I/V)GDXXX(K/E)XXG(V/L)(I/V)XXP(E/Q/D)(I/V/F)XXXX(I/L/V)(T/S)XX(D/N/H)X(F/Y)(L/I/V/F)(V/L/I)(L/V)A(T/S)DG(V/I/M)(W/F)(D/E)X(L/I/M)(S/T/P)(N/S)XX(V/A)XX(L/V/I/M)(I/V). Nesta sequência de aminoácido, vários aminoácidos entre parênteses representam as possíveis variações dos resíduos de aminoácido nas posições relevantes. Ainda, nas

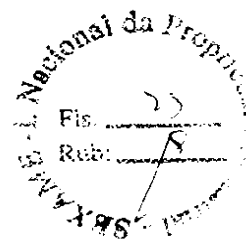
10 sequências de aminoácido, "X" significa que qualquer resíduo de aminoácido pode estar presente na posição relevante.

Aqui, o 20º resíduo de aminoácido da porção terminal N na sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID Nº: 3 é, com mais preferência, alanina (Ala, A), serina (Ser, S), ou cisteína (Cys, C). Ainda, o 50º resíduo de aminoácido da porção terminal N na sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID Nº: 3 é, com mais preferência, ácido aspártico (Asp, D), ácido glutâmico (Glu, E), lisina (Lys, K), glutamina (Gln, Q), ou asparagina (Asn, N).

20 Variações dos resíduos de aminoácido que podem estar presentes em determinadas posições são determinadas com base nas seguintes razões. Conforme descrito na referência (1) ("McKee Biochemistry," 3ª ed., Capítulo 5 Amino Acid×Peptide×Protein 5.1 Amino Acid; supervisor editorial: Atsushi Ichikawa; supervisor de tradução: Shinichi Fukuoka; editora: Ryosuke Sone; escritório de edição: Kagaku-Dojin Publishing Company, INC, ISBN4-7598-0944-9), é bem-conhecido que os aminoácidos são classificados com base nas cadeias laterais que tem propriedades similares (por exemplo, propriedades químicas e tamanhos físicos). Também é bem-conhecido que ocorre substituição evolucionária molecular frequentemente

25 dentre resíduos de aminoácido classificados em um determinado grupo, embora a atividade da proteína seja mantida. Com base nestes conceitos, uma matriz de pontuação de substituição (mutação) (BLOSUM: Blocos da matriz

30



da substituição do aminoácido) para os resíduos de aminoácido é proposta na figura 2 da referência (2): Henikoff S., Henikoff J. G., Amino-acid substitution matrices from protein blocks, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 89, 10915-10919 (1992) e é amplamente usada. A referência (2) é baseada em um achado de que as substituições de aminoácido que ocorrem entre aminoácidos com cadeias laterais que tem propriedades químicas similares resultam em menos alterações estruturais ou funcionais na proteína completa. De acordo com as referências (1) e (2) acima, os grupos das cadeias laterais de aminoácido a serem usados no alinhamento múltiplo podem ser considerados com base em índices, tais como as propriedades químicas e tamanhos físicos. Eles são mostrados como grupos de aminoácido com uma pontuação de 0 ou mais e, de preferência, como grupos de aminoácido com uma pontuação de 1 ou mais através do uso da matriz de pontuações (BLOSUM) apresentada na referência (2). Os grupos típicos são os seguintes 8 grupos. Adicionalmente, grupos de aminoácido precisamente agrupados podem ser grupos de aminoácido com uma pontuação de 0 ou mais, de preferência, uma pontuação de 1 ou mais, e adicionalmente, de preferência uma pontuação de 2 ou mais.

1) Grupo de aminoácido hidrofóbico alifático (grupo ILMV)

Este grupo é um grupo de aminoácidos que tem cadeias laterais hidrofóbicas alifáticas, dentre os aminoácidos não polares neutros apresentados na referência (1) acima, e que é composto por V (Val, valina), L (Leu, leucina), I (Ile, isoleucina), e M (Met, metionina). Dentre os aminoácidos classificados como aminoácidos não polares neutros de acordo com a referência (1), FGACWP não está incluído neste "grupo de aminoácido hidrofóbico alifático" por causa das seguintes razões: G (Gly, glicina) e A (Ala, alanina) tem o mesmo tamanho que, ou são menores que, um grupo metila e possuem efeitos não polares fracos; C (Cys, cisteína) pode desempenhar um importante papel nas ligações S-S e tem uma propriedade de formação de uma ponte de hidrogênio com um átomo de oxigênio ou um átomo de nitrogênio; F (Phe, fenilalanina) e W (Trp, triptofano) possuem cadeias laterais com pesos moleculares significativamente maiores e possuem fortes

efeitos aromáticos; P (Pro, prolina) tem fortes efeitos de iminoácido, de modo a fixar o ângulo da cadeia principal do polipeptídeo.

2) Grupo contendo grupo hidroximetileno (grupo ST)

5 Este grupo é um grupo de aminoácidos (dentre aminoácidos polares neutros) que tem grupos hidroximetileno nas cadeias laterais, que é composto por S (Ser, serina) e T (Thr, treonina). Os grupos hidróxi que existem nas cadeias laterais de S e T constituem sítios de ligação de açúcar, então estes sítios são frequentemente importantes para um polipeptídeo (proteína) ter uma atividade específica.

10 3) Aminoácido ácido (grupo DE)

Este grupo é um grupo de aminoácidos que tem grupo carboxila ácidos nas cadeias laterais, e que é composto por D (Asp, ácido aspártico) e E (Glu, ácido glutâmico).

15 4) Aminoácido básico (grupo KR)

Este grupo é um grupo de aminoácidos básicos, que é composto por K (Lys, lisina) e R (Arg, arginina). Estes K e R são carregados positivamente dentro de uma ampla faixa de pH e possuem propriedades básicas. Por outro lado, a H (His, histidina) classificada como aminoácido básico quase nunca está ionizada em pH 7, então a H não está classificada neste grupo.

20

1) Grupo metileno = grupo polar (grupo DHN)

Este grupo é caracterizado pelo fato de que: em todos os casos, um grupo metileno como uma cadeia lateral se liga a um elemento de carbono- além do qual está presente um grupo polar; e os tamanhos físicos dos grupos metileno (grupos não polares) são muito parecidos entre si. Este grupo é composto de N (Asn, asparagina; o grupo polar é um grupo amida), D (Asp, ácido aspártico; os grupos polares são grupos carboxila), e H (His, histidina; os grupos polares são grupos imidazol).

25

2) Grupo dimetileno = grupo polar (grupo EKQR)

30

Este grupo é caracterizado pelo fato de que: em todos os casos, um hidrocarboneto linear que tem um comprimento maior que o de um grupo dimetileno se liga como uma cadeia lateral a um elemento de carbono- α ,

além do qual está presente um grupo polar; e os tamanhos físicos dos grupos dimetileno que são grupos não polares, são muito semelhantes entre si. Este grupo é composto de E (Glu, ácido glutâmico, o grupo polar é um grupo carboxila), K (Lys, lisina; os grupos polares são grupos amino), Q (Gln, glutamina; os grupos polares são grupos amida), e R (Arg, arginina; os grupos polares são grupos imino e grupos amino).

3) Série aromática (grupo FYW)

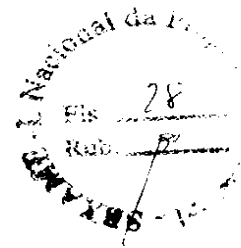
Este grupo é um grupo de aminoácidos aromáticos que tem núcleos de benzeno nas cadeias laterais e é caracterizado por ter propriedades químicas exclusivas nas séries aromáticas. Este grupo é composto de F (Phe, fenilalanina), Y (Tyr, tirosina), e W (Trp, triptofano).

4) Anel & polar (grupo HY)

Este grupo é um grupo de aminoácidos que tem tanto estruturas de anel nas cadeias laterais como polaridade, e é composto por H (H, histidina; ambas as estruturas de anel e grupos polares são grupos imidazol), e Y (Tyr, tirosina; as estruturas de anel são núcleos de benzeno e os grupos polares são grupos hidróxi).

Conforme descrito acima, entende-se que: nas determinadas sequências de aminoácido mostradas nas SEQ ID N^{os}: 1 a 3, um resíduo de aminoácido chamado de Xaa pode ser qualquer aminoácido; ou resíduos de aminoácido chamados de Xaa podem ser substituídos uns com os outros dentro dos grupos acima 1) a 8). Então, na presente invenção, o gene da proteína fosfatase 2C a ser introduzido em uma planta pode ser um gene da proteína fosfatase 2C de qualquer planta, contanto que ele tenha 3 sequências consenso que compreendem as sequências de aminoácido mostradas nas SEQ ID N^{os}: 1 a 3 nesta ordem a partir da porção terminal N.

Mais especificamente, os exemplos de um gene que codifica a proteína fosfatase 2C de *Arabidopsis thaliana* que tem as 3 sequências consenso (que compreendem as sequências de aminoácido mostradas nas SEQ ID N^{os}: 1 a 3) nesta ordem a partir da porção terminal N incluem At1g03590-AtPP2C6-6, At1g16220, At1g79630, At5g01700, At3g02750, At5g36250, At5g26010, At4g32950, At3g16800, At3g05640, At5g27930-



AtPP2C6-7, At2g20050, e At3g06270. Na presente invenção, pelo menos um tipo de gene selecionado a partir do grupo do gene é introduzido. Particularmente, na presente invenção, é preferível introduzir pelo menos um tipo de gene selecionado dentre At1g03590-AtPP2C6-6, At1g16220, At1g79630, At5g01700, At3g02750, At5g36250, At5g26010, At4g32950, At3g16800, At3g05640, e At5g27930-AtPP2C6-7. Particularmente, na presente invenção, é mais preferível introduzir pelo menos um tipo de gene selecionado dentre At3g16800, At3g05640, e At5g27930-AtPP2C6-7 e é o mais preferível introduzir um gene especificado por At3g05640.

Além disso, a figura 2 mostra os resultados da análise por alinhamento com o uso de um programa de alinhamento de múltiplas sequências CLUSTAL W (1.83) (que pode ser usado junto ao DDBJ do National Institute of Genetics (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>)) para sequências de aminoácido codificadas por At1g03590-AtPP2C6-6, At1g16220, At1g79630, At5g01700, At3g02750, At5g36250, At5g26010, At4g32950, At3g16800, At3g05640, e At5g27930-AtPP2C6-7 (a matriz de substituição (da sequência) de aminoácido usada aqui é a matriz padrão, BLOSUM (Blocos da matriz da substituição do aminoácido)).

Isto é, a figura 2 mostra as 3 sequências consenso na proteína fosfatase 2C codificadas por At1g03590-AtPP2C6-6, At1g16220, At1g79630, At5g01700, At3g02750, At5g36250, At5g26010, At4g32950, At3g16800, At3g05640, e At5g27930-AtPP2C6-7. As regiões chamadas I a III na figura 2 são submetidas, junto com um ortólogo de um gene da proteína fosfatase 2C derivado de arroz (descrito posteriormente) a uma análise por alinhamento, para que as 3 sequências consenso que compreendem as sequências de aminoácido mostradas nas SEQ ID N^{os}: 1 a 3 acima possam ser definidas como as 3 sequências consenso que compreendem as sequências de aminoácido mostradas em SEQ ID N^{os}: 31, 32, e 33, respectivamente.

A sequência consenso mostrada na SEQ ID N^o: 31 é, mais especificamente, (L/F)CG(V/I/M)FDGHGXXGXX(V/I)(S/A)(K/R)XV. A sequência consenso mostrada na SEQ ID N^o: 32 é, mais especificamente, SGXT(G/A/S)(V/L)XX(I/V/F/L)XX(G/A)XX(L/V/I)X(I/V/M)(A/G)NXG(D/H)SRA(

V/I)(L/M/I). A sequência consenso mostrada na SEQ ID N°: 33 é, mais especificamente,

GLA(M/V)(S/A)R(A/S)(F/L)GDXX(L/I/V)KX(Y/F/H)G(V/L)(I/V)XXP(E/Q/D)(I/V/
F)XXXX(I/L/V)(T/S)XXDX(F/Y)(L/I/V/M)(V/L/I)LA(T/S)DG(V/I/M)WDX(L/I/M/V)
5 (S/T)NX(E/D)(V/A)XX(L/V/I)(I/V).

Além disso, nestas sequências de aminoácido, vários aminoácidos entre parênteses representam as possíveis variações dos resíduos de aminoácido nas posições relevantes. Ainda, nestas sequências de aminoácido, "X" significa que qualquer resíduo de aminoácido pode estar presente na posição relevante.

Aqui, o 9° resíduo de aminoácido da porção terminal N na sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID N°: 32 é, com mais preferência, isoleucina (Ile, I), valina (Val, V), ou fenilalanina (Phe, F). Ainda o 11° resíduo de aminoácido da porção terminal N na sequência de aminoácido mostrada em SEQ ID N°: 32 é, com mais preferência, glutamina (Gln, Q) ou histidina (His, H). Além disso, o 13° resíduo de aminoácido da porção terminal N na sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID N°: 32 é, com mais preferência, lisina (Lys, K), ácido glutâmico (Glu, E), serina (Ser, S), glutamina (Gln, Q), ácido aspártico (Asp, D), ou asparagina (Asn, N).

Aqui, o 7° resíduo de aminoácido da porção terminal N na sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID N°: 33 é, com mais preferência, alanina (Ala, A). Ainda, o 8° resíduo de aminoácido da porção terminal N na sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID N°: 33 é, com mais preferência, fenilalanina (Phe, F). Além do mais, o 11° resíduo de aminoácido da porção terminal N na sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID N°: 33 é, com mais preferência, fenilalanina (Phe, F) ou tirosina (Tyr, Y). Adicionalmente, o 13° resíduo de aminoácido da porção terminal N na sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID N°: 33 é, com mais preferência, leucina (Leu, L) ou isoleucina (Ile, I). Além disso, o 15° resíduo de aminoácido da porção terminal N na sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID N°: 33 é, com mais preferência, ácido aspártico (Asp, D), serina (Ser, S), ou ácido glutâmico (Glu, E). Além disso, o 20° resíduo de aminoácido da porção ter-

32

5 minal N na sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID N°: 33 é, com mais preferência, serina (Ser, S), alanina (Ala, A), ou cisteína (Cys, C). Adicionalmente, o 27° resíduo de aminoácido da porção terminal N na sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID N°: 33 é, com mais preferência, histidina (His, H) ou arginina (Arg, R). Além disso, o 34° resíduo de aminoácido da porção terminal N na sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID N°: 33 é, com mais preferência, glutamina (Gln, Q), ácido glutâmico (Glu, E), ou histidina (His, H). Além disso, o 36° resíduo de aminoácido da porção terminal N na sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID N°: 33 é, com mais preferência, leucina (Leu, L), isoleucina (Ile, I), ou valina (Val, V). Além disso, o 47° resíduo de aminoácido da porção terminal N na sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID N°: 33 é, com mais preferência, leucina (Leu, L), isoleucina (Ile, I), ou valina (Val, V). Além disso, o 50° resíduo de aminoácido da porção terminal N na sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID N°: 15 33 é, com mais preferência, lisina (Lys, K), ácido glutâmico (Glu, E), glutamina (Gln, Q), ácido aspártico (Asp, D), ou asparagina (Asn, N).

Como exemplos, a sequência de nucleotídeos da região codificante no gene especificado por At3g05640 é mostrada na SEQ ID N°: 4 e a sequência de aminoácidos da proteína fosfatase 2C codificada pelo gene especificado por At3g05640 é mostrada na SEQ ID N°: 5. Ainda, a sequência de nucleotídeos da região codificante no gene especificado por At5g27930 é mostrada na SEQ ID N°: 34 e a sequência de aminoácidos da proteína fosfatase 2C codificada pelo gene especificado por At5g27930 é mostrada na SEQ ID N°: 35. Além disso, a sequência de nucleotídeos da região codificante no gene especificado por At3g02750 é mostrada na SEQ ID N°: 36 e a sequência de aminoácidos da proteína fosfatase 2C codificada pelo gene especificado por At3g02750 é mostrada na SEQ ID N°: 37. Além disso, a sequência de nucleotídeos da região codificante no gene especificado por At3g16800 é mostrada na SEQ ID N°: 38 e a sequência de aminoácidos da proteína fosfatase 2C codificada pelo gene especificado por At3g16800 é mostrada na SEQ ID N°: 39.

Adicionalmente, na presente invenção, genes funcionalmente



equivalentes aos genes mencionados acima podem, também, ser introduzidos. Aqui, o termo "gene funcionalmente equivalente" refere-se a, por exemplo, um gene (de um organismo diferente de *Arabidopsis thaliana*) que: tem as 3 sequências consenso (de preferência, as 3 sequências consenso compreendendo as sequências de aminoácido mostradas nas SEQ ID N^{os}: 31 a 33. O mesmo se aplica aos seguintes) que compreendem as sequências de aminoácido mostradas nas SEQ ID N^{os}: 1 a 3 nesta ordem a partir da porção terminal N; e codifica a proteína fosfatase 2C. Ainda, o termo "gene funcionalmente equivalente" refere-se a um gene que codifica uma proteína que tem atividade de proteína fosfatase 2C. O termo "atividade de proteína fosfatase 2C" refere-se à atividade de serina/treonina fosfatase (Ser/Thr fosfatase) dependente de Mg^{2+} ou Mn^{2+} . Portanto, pode-se confirmar se um gene codifica ou não uma proteína que tem atividade de proteína fosfatase 2C pelo exame de se o produto gênico tem ou não atividade de serina/treonina fosfatase na presença de Mg^{2+} ou Mn^{2+} . Técnicas convencionalmente conhecidas podem ser empregadas de forma apropriada para determinar a atividade de serina/treonina fosfatase. Por exemplo, um kit de determinação de atividade comercialmente disponível ProFluor[®] Ser/Thr Phosphatase Assay (Prômege) pode ser usado.

Aqui, os exemplos de organismos diferentes de *Arabidopsis thaliana* não são particularmente limitados, mas incluem arroz (*Oryza sativa*). Especificamente, um exemplo de um gene funcionalmente equivalente é um gene Os05g0358500 de arroz. A sequência de nucleotídeo de uma região codificante do gene Os05g0358500 é mostrada na SEQ ID N^o: 6 e a sequência de aminoácido da proteína codificada pelo gene é mostrada na SEQ ID N^o: 7. Ainda, exemplos do gene funcionalmente equivalente derivado de arroz acima mencionado incluem Os11g0109000 (a sequência de nucleotídeos e a sequência de aminoácidos são mostradas nas SEQ ID N^{os}: 8 e 9, respectivamente), Os12g0108600 (a sequência de nucleotídeos e a sequência de aminoácidos são mostradas nas SEQ ID N^{os}: 10 e 11, respectivamente), Os02g0471500 (a sequência de nucleotídeos e a sequência de aminoácidos são mostradas nas SEQ ID N^{os}: 12 e 13, respectivamente),

Os04g0321800 (a sequência de nucleotídeos e a sequência de aminoácidos são mostradas nas SEQ ID N^{os}: 14 e 15, respectivamente), Os11g0417400 (a sequência de nucleotídeos e a sequência de aminoácidos são mostradas nas SEQ ID N^{os}: 16 e 17, respectivamente), Os07g0566200 (a sequência de nucleotídeos e a sequência de aminoácidos são mostradas nas SEQ ID N^{os}: 18 e 19, respectivamente), Os08g0500300 (a sequência de nucleotídeos e a sequência de aminoácidos são mostradas nas SEQ ID N^{os}: 20 e 21, respectivamente), Os02g0224100 (a sequência de nucleotídeos e a sequência de aminoácidos são mostradas nas SEQ ID N^{os}: 22 e 23, respectivamente), e Os02g0281000 (a sequência de nucleotídeos e a sequência de aminoácidos são mostradas nas SEQ ID N^{os}: 40 e 41, respectivamente).

Além disso, exemplos dos genes funcionalmente equivalentes acima mencionados de plantas diferentes de *Arabidopsis thaliana* e de arroz incluem os genes (N^o de acesso na base de dados UniProt A9P973, A9PFS0, e A9P7U4) de Choupo-do-Canadá preto (*Populus trichocarpa*), os genes (N^o de acesso na base de dados UniProt A7PRZ8, A7Q8H4, A7PV59, A5C3B0, A5BF43, A7QFG6, A7P4H7, A5C0C9, A5AP53, A7QQF9, e A5BDP5) da uva europeia (*Vitis vinifera*), genes (N^o de acesso na base de dados UniProt Q2HW33 e Q4L0F8) de *Medicago truncatula* (*Medicago truncatula*), um gene (N^o de acesso da base de dados do GenBank AY651248) de alfafa (*Medicago sativa*), genes (N^{os} de acesso na base de dados UniProt A9SE70, A9SE69, e A9RFU1) de *Physcomitrella patens* (*Physcomitrella patens*), um gene (N^o de acesso na base de dados UniProt 2511453C) de barreira (*Mesembryanthemum crystallinum*), um gene (N^o de acesso na base de dados UniProt A8HQG8) de *Chlamydomonas reinhardtii* (*Chlamydomonas reinhardtii*), os genes (N^o de acesso na base de dados do GenBank BT024031, BT017414, e BT024134) de milho (*Zea mays*), genes (N^o de acesso na base de dados do GenBank AC189312 e AC189579) de colza (*Brassica rapa*), os genes (N^o de acesso na base de dados do GenBank AP009550, AP009302, e AP009278) de tomate (*Solanum lycopersicum*), um gene (N^o de acesso na base de dados do GenBank AC182571) de mimulus (*Mimulus guttatus*), e um gene (N^o de acesso na base de dados do GenBank

AP006489) de alga vermelha monocelular (*Cyanidioschyzon merolae*).

Nestas plantas diferentes de *Arabidopsis thaliana*, que são representadas pelos exemplos acima, um gene que codifica a proteína fosfatase 2C que tem as 3 sequências consenso que compreendem as sequências de aminoácido mostradas nas SEQ ID N^{os}: 1 a 3 nesta ordem a partir da porção terminal N podem ser facilmente buscadas e/ou identificadas a partir de uma bases de dados conhecida, tal como GenBank, com base na sequência de nucleotídeos listada acima do gene da proteína fosfatase 2C derivado de *Arabidopsis thaliana* ou na sequência de aminoácidos da proteína fosfatase 2C.

Além disso, um gene da proteína fosfatase 2C a ser introduzido na presente invenção não é limitando aos genes da proteína fosfatase 2C descritos acima que compreendem as sequências de nucleotídeo e as sequências de aminoácido mostradas nas SEQ ID N^{os}: 4 a 23 e 34 a 39. Então, o gene da proteína fosfatase 2C pode ser um gene que contém uma sequência de aminoácido que tem uma deleção, uma substituição, uma adição ou uma inserção de um ou uma variedade de aminoácidos com relação às sequências de aminoácido mostradas nos números ímpares das SEQ ID N^{os}: 4 a 23 e 34 a 39, e, que tem atividade de proteína fosfatase 2C. Aqui, o termo "uma variedade de aminoácidos" refere-se a 1 a 20, de preferência, 1 a 10, com mais preferência, 1 a 7, ainda de preferência, 1 a 5, e particularmente de preferência 1 a 3 aminoácidos, por exemplo. Além disso, a deleção, substituição, ou adição de aminoácidos pode ser realizada pela alteração de uma sequência de nucleotídeos que codifica o gene da proteína fosfatase 2C acima por uma técnica conhecida na técnica. Uma mutação pode ser introduzida em uma sequência de nucleotídeo por uma técnica conhecida, tal como o método de Kunkel ou o método de "Gapped duplex" ou um método baseado nos mesmos. Por exemplo, uma mutação é introduzida com um kit de mutagênese com o uso de mutagênese sítio-dirigida (por exemplo, Mutant-K ou Mutant-G (ambos são nomes comerciais da TAKARA Bio)) ou similares, ou um LA PCR *in vitro* Mutagenesis series kit (nome comercial, TAKARA Bio). Adicionalmente, um método de mutagênese pode

ser: um método que usa um agente de mutação química representado pelo EMS (metanossulfonato de etila), 5-bromouracila, 2-aminopurina, hidroxilamina, N-metil-N'-nitro-N nitrosoguanidina, ou outros compostos carcinogênicos; ou um método que envolve tratamento com radiação ou tratamento com ultravioleta [UV] tipicamente com o uso de raios X, raios alfa, raios beta, raios gama, um feixe de íons, ou similares.

Ainda, os genes da proteína fosfatase 2C a serem introduzidos na presente invenção podem ser genes homólogos aos genes da proteína fosfatase 2C que compreendem as sequências de nucleotídeo e as sequências de aminoácido mostradas nas SEQ ID N^{os}: 4 a 23. Aqui, o termo "gene homólogo" geralmente refere-se a um gene que se ramificou evolutivamente a partir de um gene ancestral comum, incluindo um gene homólogo (ortólogo) de 2 tipos de espécies e um gene homólogo (parálogo) gerado por ramificação por sobreposição que ocorre dentro da mesma espécie. Em outras palavras, o termo acima "gene funcionalmente equivalente" refere-se a um gene homólogo, tal como, um ortólogo ou um parálogo. Além disso, o termo acima "gene funcionalmente equivalente" pode, também referir-se a um gene que não evolui a partir de um gene em comum, mas apenas tem funções análogas.

Exemplos de genes análogos aos genes da proteína fosfatase 2C que compreendem as sequências de nucleotídeo e as sequências de aminoácido mostradas nas SEQ ID N^{os}: 4 a 23 e 34 a 39 incluem genes que codificam proteínas que têm: sequências de aminoácido que possuem 70% ou mais, de preferência, 80% ou mais, com mais preferência 90% ou mais, e, com a máxima preferência, 95% ou mais similaridade a estas sequências de aminoácido; as 3 sequências consenso que compreendem as sequências de aminoácido mostradas nas SEQ ID N^{os}: 1 a 3 nesta ordem a partir da porção terminal N; e atividade de proteína fosfatase 2C. Aqui, o valor de similaridade refere-se a um valor que pode ser encontrado com base nos ajustes padrão com o uso de um computador equipado com um programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) e uma base de dados contendo informações sobre a sequência do gene.

Adicionalmente, genes análogos aos genes da proteína fosfatase 2C que compreendem as sequências de nucleotídeo e as sequências de aminoácido mostradas nas SEQ ID N^{os}.4 a 23 e 34 a 39 podem ser identificados, quando as informações sobre o genoma da planta permanecer não esclarecido, através da extração do genoma a partir de uma planta-alvo, ou construção de uma biblioteca de cDNA para uma planta-alvo e, então, isolamento de uma região genômica ou cDNA que hibridiza sob condições estridentes a pelo menos uma porção dos genes da proteína fosfatase 2C que compreendem as sequências de nucleotídeo mostradas nos números pares das SEQ ID N^{os}. 4 a 23 e 34 a 39. Aqui, o termo "condições estridentes" refere-se às condições sob as quais um híbrido específico é formado, mas um híbrido inespecífico nunca é formado. Por exemplo, estas condições compreendem hibridização a 45°C com 6X SSC (cloreto de sódio/citrato de sódio), seguido de lavagem a 50°C até 65°C com 0,2 a 1X SSC e 0,1% de SDS. Alternativamente, estas condições compreendem hibridização a 65°C a 70°C com 1X SSC, seguido de lavagem a 65°C até 70°C com 0,3X SSC. A hibridização pode ser realizada por um método convencionalmente conhecido, tal como um método descrito em J. Sambrook *et al.* Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2^a Ed., Cold Spring Harbor Laboratory (1989).

Quando a presente invenção é aplicada a uma planta, a planta terá uma quantidade significativamente aprimorada de biomassa e/ou sementes em comparação com as plantas do tipo selvagem, como um resultado da introdução de um gene da proteína fosfatase 2C que tem 3 sequências consenso descritas acima, que compreendem as sequências de aminoácido mostradas nas SEQ ID N^{os}.1 a 3 a partir da porção terminal N nesta ordem. Exemplos de uma técnica para a introdução deste gene da proteína fosfatase 2C incluem uma técnica para modificação de um promotor de um gene da proteína fosfatase 2C endógeno em uma planta-alvo, uma técnica para introduzir um vetor de expressão no qual um gene da proteína fosfatase 2C exógeno é disposto sob o controle de um promotor que permite expressão constitutiva, e uma técnica pela qual as duas técnicas acima são realizadas simultaneamente.

Um exemplo preferencial é uma técnica para introduzir um vetor de expressão no qual o gene da proteína fosfatase 2C acima é disposto sob o controle de um promotor que permite expressão constitutiva em uma planta-alvo.

5 Vetor de Expressão

Um vetor de expressão é construído para conter um promotor que permite expressão dentro de uma planta e o gene da proteína fosfatase 2C descrito acima. Como um vetor que serve como um corpo mãe para um vetor de expressão, vários vetores convencionalmente conhecidos podem ser usados. Por exemplo, plasmídios, fagos, cosmídios ou similares, podem ser usados e este vetor pode ser adequadamente selecionado dependendo das células de planta nas quais ele é introduzido e dos métodos de introdução. Exemplos específicos deste vetor incluem os vetores pBR322, pBR325, pUC19, pUC119, pBluescript, pBluescriptSK, e pBI. Particularmente, quando um método para a introdução de um vetor em uma planta usa *Agrobacterium*, um vetor binário pBI é, de preferência, usado. Exemplos específicos deste vetor binário pBI incluem pBIG, pBIN19, pBI101, pBI121, e pBI221.

Um promotor a ser usado aqui não é particularmente limitado, contanto que ele permita a expressão de um gene da proteína fosfatase 2C em uma planta. Qualquer promotor conhecido pode ser apropriadamente usado. Exemplos deste promotor incluem um promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV35S), vários promotores do gene da actina, vários promotores do gene de ubiquitina, um promotor do gene de nopalina sintase, um promotor do gene PR1a de tabaco, um promotor do gene da subunidade pequena de ribulose 1,5-bifosfato carboxilase-oxidase de tomate, um promotor do gene de napina e um promotor do gene de oleosina. Destes, um promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor, um promotor do gene da actina, ou um promotor do gene de ubiquitina podem ser usados com mais preferência. O uso de cada um dos promotores acima permite forte expressão de qualquer gene quando ele é introduzido nas células de planta.

Adicionalmente, um promotor que tem funções de causar expressão sítio-específica em uma planta pode também ser usado na presente

invenção. Qualquer promotor convencionalmente conhecido pode ser usado como este promotor. Quando o gene da proteína fosfatase 2C descrito acima é introduzido de forma sítio-específica com o uso deste promotor, um órgão da planta no qual o gene é introduzido pode ser mais aumentado do que os órgãos das plantas do tipo selvagem.

Além disso, um vetor de expressão pode, ainda, conter outros segmentos de DNA em adição ao promotor e ao gene da proteína fosfatase 2C acima. Estes outros segmentos de DNA não são particularmente limitados e exemplos destes incluem um terminador, um marcador de seleção, um intensificador, e uma sequência de nucleotídeo para acentuar a eficiência da tradução. Além disso, o vetor de expressão recombinante acima pode, ainda, ter uma região de T-DNA. Uma região de T-DNA pode acentuar a eficiência da introdução do gene particularmente quando o vetor de expressão recombinante acima é introduzido em uma planta com o uso de *Agrobacterium*.

Um terminador de transcrição não é particularmente limitado, contanto que ele tenha funções como um sítio de término de transcrição e possa ser qualquer terminador de transcrição conhecido. Por exemplo, especificamente, uma região de terminação de transcrição de um gene de nopalina sintase (terminador Nos), uma região de terminação de transcrição de vírus do mosaico da couve-flor 35S (terminador de CaMV35S), ou similares podem ser preferivelmente usados. Destes, o terminador Nos pode ser usado com mais preferência. No caso do vetor recombinante acima, um fenômeno, tal como um transcrito desnecessariamente comprido ser sintetizado e um promotor forte diminuir os números de cópias de um plasmídeo após a introdução em células de planta, pode ser evitado por colocar um terminador de transcrição em uma posição adequada.

Como um marcador de seleção transformante, um gene de resistência a medicamentos pode ser usado, por exemplo. Exemplos específicos deste gene de resistência a medicamentos incluem genes de resistência a medicamentos contra higromicina, bleomicina, canamicina, gentamicina, cloranfenicol, e similares. As plantas transformadas podem ser facilmente

selecionadas através da seleção de plantas que podem crescer em meio contendo os antibióticos acima.

Um exemplo de uma sequência de nucleotídeo para aumentar a eficiência da tradução é uma sequência ômega do vírus do mosaico do tabaco. Esta sequência ômega é disposta em uma região não traduzida (5'UTR) de um promotor, para que a eficiência de tradução do gene de fusão possa ser aumentada. Como tal, o vetor de expressão recombinante pode conter vários segmentos de DNA dependendo das finalidades.

Um método para construir um vetor de expressão recombinante não é particularmente limitado. A um vetor adequadamente selecionado que serve como um corpo mãe, o promotor acima e o gene da proteína fosfatase 2C acima, e se necessário, os outros segmentos de DNA acima podem ser introduzidos em uma ordem predeterminada. Por exemplo, o gene da proteína fosfatase 2C acima e um promotor (e, se necessário, um terminador de transcrição ou similares) são ligados para construir um cassete de expressão e, então, o cassete pode ser introduzido em um vetor. Na construção de um cassete de expressão, por exemplo, sítios de clivagem de segmentos de DNA são preparados para ter extremidades protuberantes complementares entre si e, então, uma reação é realizada com uma enzima de ligação, tornando possível especificar a ordem dos segmentos de DNA. Além disso, quando um cassete de expressão contém um terminador, os segmentos de DNA podem ser dispostos na seguinte ordem a partir da região à montante: um promotor, o gene da proteína fosfatase 2C acima, e um terminador. Ainda, reagentes para a construção de um vetor de expressão (isto é, tipos de enzimas de restrição, enzimas de ligação, e similares) também não são particularmente limitados. Então, reagentes comercialmente disponíveis podem ser adequadamente selecionados e usados.

Ainda, um método para replicação (um método para produção) do vetor de expressão acima não é particularmente limitado e métodos de replicação convencionalmente conhecidos podem ser usados na presente invenção. Em geral, este vetor de expressão pode ser replicado dentro de *Escherichia coli* como um hospedeiro. Neste momento, tipos preferenciais de

Escherichia coli podem ser selecionados dependendo dos tipos de vetor.

Transformação

O vetor de expressão descrito acima é introduzido em uma planta-alvo por um método de transformação geral. Um método para introduzir um vetor de expressão em células de planta (método de transformação) não é particularmente limitado. Métodos de introdução apropriados convencionalmente conhecidos podem ser usados dependendo das células de planta. Especificamente, um método que usa *Agrobacterium* ou um método que envolve a introdução direta nas células de planta pode ser usado, por exemplo. Como um método que usa *Agrobacterium*, um método descrito em Bechtold, E., Ellis, J. e Pelletier, G. (1993) In *Planta Agrobacterium-mediated gene transfer by infiltration of adult Arabidopsis plants*. C.R. Acad. Sci. Paris Sci. Vie, 316, 1194-1199., ou um método descrito em Zyprian E, Kado CI, *Agrobacterium-mediated plant transformation by novel mini-T vectors in conjunction with a high-copy vir region helper plasmid*. Plant Molecular Biology, 1990, 15(2), 245-256, podem ser empregados, por exemplo.

Como um método para introduzir diretamente um vetor de expressão em células de planta, microinjeção, eletroporação, um método com polietileno glicol, um método com arma de partículas, fusão de protoplasto, um método com fosfato de cálcio, ou similares, podem ser empregados.

Ainda, quando um método para introduzir diretamente DNA nas células de planta é empregado, o DNA que pode ser usado aqui contém unidades transcricionais necessárias para a expressão de um gene-alvo, tal como, um promotor e um terminador de transcrição, e um gene-alvo. As funções do vetor não são essenciais neste caso. Além disso, um DNA que contém somente uma região codificante de proteína de um gene-alvo e não tem unidade transcricional, pode ser usado aqui, contanto que ele seja integrado em uma unidade transcricional do hospedeiro e, então, o gene-alvo pode ser expresso.

Exemplos de células de planta nas quais o vetor de expressão acima ou um cassete de expressão que não contém um vetor de expressão, mas sim um gene-alvo, é introduzido incluem células de cada tecido de ór-



gãos de planta, tais como flores, folhas, e raízes, calos, e células cultivadas em suspensão. Neste momento, um vetor de expressão adequado pode ser construído de acordo com os tipos de planta a ser produzidas ou um vetor de expressão versátil pode ser construído antecipadamente e, então, introduzido nas células de planta.

As plantas nas quais um vetor de expressão é introduzido ou, em outras palavras, as plantas necessárias para aumentar a produção de biomassa não são particularmente limitadas. Especificamente, através da introdução do gene da proteína fosfatase 2C descrito acima, os efeitos de aumentar a produção de biomassa podem ser esperados para todas as plantas. Exemplos de plantas-alvo incluem, mas não se limitam a, dicotiledôneas e monocotiledôneas, tais como plantas que pertencem às famílias Brassicaceae, Gramineae, Solanaceae, Leguminosae, Salicaceae, e similares (vide abaixo).

Família Brassicaceae: *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis thaliana*), colza (*Brassica rapa*, *Brassica napus*, *Brassica campestris*), repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata*), repolho chinês (*Brassica rapa* var. *pekinensis*), ging-geng-cai (*Brassica rapa* var. *chinensis*), nabo (*Brassica rapa* var. *rapa*), nabo (*Brassica rapa* var. *hakabura*), erva mostarda (*Brassica rapa* var. *lancinifolia*), Komatsuna (*Brassica rapa* var. *peruviridis*), pak choi (*Brassica rapa* var. *chinensis*), rabanete (*Raphanus sativus*), raiz-forte (*Wasabia japonica*), e similares.

Família Solanaceae: tabaco (*Nicotiana tabacum*), berinjela (*Solanum melongena*), batata (*Solaneum tuberosum*), tomate (*Lycopersicon lycopersicum*), pimentão (*Capsicum annuum*), petunia, e similares.

Família Leguminosae: soja (*Glycine max*), ervilha (*Pisum sativum*), fava (*Vicia faba*), glicínia (*Wisteria floribunda*), amendoim (*Arachis hypogaea*), cornichão (*Lotus corniculatus* var. *japonicus*), feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), feijão azuki (*Vigna angularis*), acácia, e similares.

Família Asteraceae: crisântemo (*Chrysanthemum morifolium*), girassol (*Helianthus annuus*), e similares.

Família Arecaceae: palmeira de óleo (*Elaeis guineensis*, *Elaeis*

oleífera), coco (*Cocos nucifera*), tamareira (*Phoenix dactylifera*), copernicia, e similares.

5 Família Anacardiaceae: árvore de cera (*Rhus succedanea*), castanha de caju (*Anacardium occidentale*), árvore da laca (*Toxicodendron vernicifluum*), manga (*Mangifera indica*), pistache (*Pistacia vera*), e similares.

Família Cucurbitaceae: abóbora (*Cucurbita maxima*, *Cucurbita moschata*, *Cucurbita pepo*), pepino (*Cucumis sativus*), abóbora serpente (*Trichosanthes cucumeroides*), abóbora (*Lagenaria siceraria* var. *gourda*), e similares.

10 Família Rosaceae: amêndoa (*Amygdalus communis*), rosa (*Rosa*), morango (*Fragaria*), cereja (*Prunus*), maçã (*Malus pumila* var. *domestica*), e similares.

Família Caryophyllaceae: cravo (*Dianthus caryophyllus*) e similares.

15 Família Salicaceae: choupo (*Populus trichocarpa*, *Populus nigra*, ou *Populus tremula*) e similares.

Família Gramineae: milho (*Zea mays*), arroz (*Oryza sativa*), cevada (*Hordeum vulgare*), trigo (*Triticum aestivum*), bambu (*Phyllostachys*), cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), capim-napiê (*Pennisetum purpureum*), erianthus (*Erianthus ravenae*), miscanthus (Japanese silver grass) (*Miscanthus virgatum*), sorgo (*Sorghum*) e gramínea do tipo switch grass (*Panicum*), e similares.

20

Família Liliaceae: tulipa (*Tulipa*), lírio (*Lilium*), e similares.

Destes exemplos, cultivos para geração de energia, tais como cana-de-açúcar, milho, colza, e girassol, que podem servir como matérias-primas para biocombustíveis, podem ser alvos preferíveis. Isto é porque os custos para o biocombustíveis, tal como, bioetanol, biodiesel, biometanol, bioDME, bioGTL (BTL), e biobutanol podem ser reduzidos mediante o aumento da produção de biomassa com o uso de cultivos para geração de energia.

25

30

Ainda, conforme descrito acima, os genes da proteína fosfatase 2C que podem ser usados na presente invenção podem ser isolados de vá-

rias plantas e usados. Estes genes da proteína fosfatase 2C podem ser adequadamente selecionados e usados, dependendo dos tipos de planta alvo necessárias para aumentar a produção de biomassa. Especificamente, quando uma planta que se deseja aumentar a produção de biomassa é uma monocotiledônea, um gene da proteína fosfatase 2C que é isolado de uma monocotiledônea é, de preferência, introduzido. Em particular, quando uma planta que se deseja aumentar a produção de biomassa é arroz, o gene da proteína fosfatase 2C derivado de arroz (SEQ ID N°: 6) é, de preferência, introduzido.

Além disso, na presente invenção, mesmo quando uma planta que se deseja aumentar a produção de biomassa é uma monocotiledônea, um gene da proteína fosfatase 2C derivado de dicotiledônea pode ser introduzido. Especificamente, por exemplo, o gene da proteína fosfatase 2C derivado de *Arabidopsis thaliana* (SEQ ID N°: 4) pode ser introduzido não apenas em dicotiledôneas, mas também em uma variedade de plantas que são classificadas como monocotiledôneas.

Outras etapas e métodos

Após a transformação acima, uma etapa de seleção dos transformantes apropriados a partir das plantas pode ser realizada por um método convencionalmente conhecido. Este método de seleção não é particularmente limitado. Por exemplo, a seleção pode ser feita com base em resistência a medicamentos, tal como, resistência à higromicina. Alternativamente, após o crescimento dos transformantes, as plantas são pesadas diretamente ou qualquer um dos seus órgãos ou tecidos são pesados, e os pesos são comparados com os das plantas do tipo selvagem, e, então, as plantas com pesos significativamente aumentados podem ser selecionadas.

Ainda, plantas de progênie podem ser obtidas a partir das plantas transformadas obtidas pela transformação de acordo com um método convencional. As plantas de progênie que retêm uma característica, tal que o nível de expressão do gene da proteína fosfatase 2C acima é significativamente aprimorado em comparação com as plantas do tipo selvagem, são selecionadas com base na quantidade de biomassa. Portanto, uma linhagem

de planta estável capaz de produzir uma quantidade aumentada de biomassa por ter a característica acima pode ser produzida. Ainda, as células de planta ou materiais reprodutivos, tais como, sementes, frutas, estoques, calos, tubérculos, espigas cortadas, ou agregados, podem ser obtidos a partir de uma planta transformada ou uma planta descendente da mesma. Uma linhagem de planta estável capaz de produzir uma quantidade aumentada de biomassa por ter a característica acima pode ser produzida em massa com base nestes materiais.

Conforme explicado acima, de acordo com a presente invenção, a produção da biomassa e/ou sementes de plantas (já capazes de exercer produção de biomassa e/ou sementes por planta significativamente aumentada) pode ser aumentada ainda mais em comparação às plantas do tipo selvagem através da introdução do gene da proteína fosfatase 2C descrito acima. Especificamente, quando a glutathione é fornecida a uma planta na qual o gene da proteína fosfatase 2C acima foi introduzido, a produção de biomassa e/ou sementes por planta é significativamente aumentada, em comparação a um caso no qual a glutathione não foi fornecida à planta. Aqui, o termo "produção de biomassa significativamente aumentada" refere-se a uma situação na qual o peso total de cada planta é estatisticamente significativamente aumentado quando a glutathione é suprida à planta na qual o gene da proteína fosfatase 2C acima foi introduzido. Nesse caso, mesmo quando alguns tecidos de planta se tornam especificamente grandes e os tamanhos dos outros tecidos são equivalentes aos das plantas às quais não foi fornecida glutathione, conclui-se que a quantidade de biomassa é aumentada caso o peso total da planta inteira seja maior. Ainda, o termo "produção de sementes significativamente aumentada" refere-se a uma situação na qual a quantidade total e/ou o número total de sementes colhidas de uma planta é estatisticamente significativamente maior em comparação às plantas às quais não foi fornecida glutathione. Isto é, o termo "produção de sementes significativamente aumentada" pode se referir a qualquer dentre: um caso no qual o tamanho de cada semente é aumentado; um caso onde o tamanho por semente é equivalente, mas o número de sementes é aumen-

tado; ou um caso no qual o tamanho por semente é aumentado e os números de sementes também é aumentado.

De acordo com a presente invenção, a produção de biomassa e/ou sementes pelas plantas é aumentada. Então, o aprimoramento na produtividade pode ser obtido nos seguintes casos: um caso no qual um objetivo é produzir a planta inteira; e um caso no qual um objetivo é produzir alguns tecidos da planta (por exemplo, sementes) ou componentes contidos nas plantas. Por exemplo, quando um objetivo é produzir gorduras e óleos contidos em sementes de plantas, as quantidades de gorduras e óleos que podem ser coletadas por área sob cultivo podem ser muito melhoradas. Aqui, exemplos de gorduras e óleos incluem, mas não são particularmente limitados a, gorduras e óleos derivados de plantas, tais como óleo de soja, óleo de gergelim, óleo de oliva, óleo de coco, óleo de arroz, óleo de caroço de algodão, óleo de girassol, óleo de milho, óleo de açafrão, e óleo de semente de colza. Adicionalmente, as gorduras e óleos assim produzidos podem ser amplamente usados para usos domésticos ou usos industriais e podem ser usados adicionalmente como matérias-primas para combustível biodiesel. Portanto, de acordo com a presente invenção, as gorduras e óleos acima para usos domésticos ou usos industriais, combustível biodiesel, e similares podem ser produzidas em baixo custo por fornecer glutathione às plantas que expressam o gene da proteína fosfatase 2C acima.

Exemplos

A presente invenção será especificamente descrita nos seguintes exemplos de referência e exemplos. Entretanto, os exemplos não se destinam a limitar o escopo técnico da presente invenção.

Exemplo de referência 1

Preparação de transformantes (*Arabidopsis thaliana*) através da introdução do gene de PP2C (proteína fosfatase 2C) (At3g05640)

1. Materiais e Métodos

1-1. Materiais experimentais

Como materiais experimentais, sementes de mutantes de *Arabidopsis thaliana* (linhagens de T-DNA com marcador de ativação: linhagens

Weigel T-DNS, Total de 200/2 linhagens) foram usadas. Além disso, as sementes foram compradas junto à Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC). Com relação às sementes usadas como materiais experimentais, pode ser feita referência a Weigel, D. *et al.*, 2000, *Plant Physiol.* 122, 1003-1013.

1-2. Métodos

1-2-1. Seleção de mutantes resistentes a sal

Sementes das linhagens de T-DNA Weigel foram cultivadas asépticamente em meio de ágar (1%) MS modificado contendo 125 mM ou 150 mM de NaCl [vitaminas em meio B5, 10 g/l de sacarose, e 8 g/L de ágar (para meio bacteriano; Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)] e, então, cultivadas a 22°C sob 30 a 100 mmols/m²/seg de iluminação (um ciclo de 16 horas na luz/8 horas no escuro). Duas a 4 semanas após a semeadura, candidatos mutantes resistentes a sal foram selecionados. Além disso, com relação ao meio MS, vide Murashige, T. *et al.*, 1962, *Physiol. Plant.* 15, 473-497. Ainda, com relação ao meio B5, vide Gamborg, O. L. *et al.*, 1968, *Experimental Cell Research* 50, 151-158.

1-2-2. Preparação de DNA

Um local para inserção de T-DNA no genoma da linhagem de *Arabidopsis thaliana* resistente a sal assim selecionada foi determinada por um método de TAIL-PCR. Primeiro, folhas jovens foram coletadas a partir das plantas de *Arabidopsis thaliana* cultivadas e, então, esmagadas sob congelamento com nitrogênio líquido. O DNA foi preparado com o uso de um kit de preparação de DNA (DNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN) de acordo com os protocolos padrão incluídos com o kit.

1-2-3. Método de TAIL-PCR e previsão do sítio de inserção de T-DNA

Foi determinado que três (3) tipos de iniciadores específicos, TL1, TL2, e TL3, estariam localizados próximo da sequência de T-DNA esquerda (borda esquerda de T-DNA) de um vetor de marcação de ativação (pSKI015: nº de Acesso no Genbank AF187951) usado nas linhagens de T-DNA de Weigel. Com o uso de um iniciador arbitrário P1 e das seguintes soluções de reação de PCR e condições de reação, o TAIL-PCR (superviso-



res, Isao Shimamoto e Takuji Sasaki, Nova Edição, Plant PCR Experimental Protocols, 2000, pp. 83-89, Shujunsha, Tóquio, Japão; Liu, Y.G. e Whittier, R. F., 1995, Genomics 25, 674-681; Liu, Y.G. *et al.*, Plant J., 8, 457-463, 1995) foi realizada, para que o DNA genômico adjacente ao T-DNA fosse amplificado.

As sequências específicas dos iniciadores TL1, TL2, TL3, e P1 são as seguintes.

TL1: 5'-TGC TTT CGC CAT TAA ATA GCG ACG G-3'(SEQ ID N°: 24)

TL2: 5'-CGC TGC GGA CAT CTA CAT TTT TG-3'(SEQ ID N°: 25)

TL3: 5'-TCC CGG ACA TGA AGC CAT TTA C-3'(SEQ ID N°: 26)

P1: 5'-NGT CGA SWG ANA WGA A-3' (SEQ ID N°: 27)

Além disso, na SEQ ID N°: 25, "n" representa "a," "g," "c," ou "t" (locais: 1 e 11), "s" representa "g" ou "c" (local: 7), e "w" representa "a" ou "t" (local: 8 e 13).

A composição da solução e condições de reação da 1ª reação de PCR são mostradas na tabela 1 e na tabela 2, respectivamente.

Tabela 1

Molde (DNA genômico)	: 10 ng
tampão de PCR 10X (Takara Bio)	: 2 µl
2,5 mM de dNTPs (Takara Bio)	: 1,6 µl
1º iniciador específico (TL1: SEQ ID N°: 24)	: 0,5 pmol
Iniciador arbitrário 1 (SEQ ID N°: 27)	: 100 pmols
TaKaRa Ex Taq (Takara Bio)	: 1,0 unidade
TOTAL	20 µl

Tabela 2

Nº 1:	94°C (30 segundos)/95°C (30 segundos)
Nº 2:	5 ciclos de 94°C (30 segundos)/65°C (30 segundos)/72°C (1 minuto)
Nº 3:	1 ciclo de 94°C (30 segundos)/25°C (1 minuto) → aumentado para 72°C dentro de 3 minutos/72°C (3 minutos)
Nº 4:	94°C (15 segundos)/65°C (30 segundos)/72°C (1 minuto), 94°C (15 segundos)/68°C (30 segundos)/72°C (1 minuto), e 15 ciclos de 94°C (15 segundos)/44°C (30 segundos)/72°C (1 minuto)
Nº 5:	72°C (3 minutos)

A composição da solução de reação e as condições de reação da 2ª reação de PCR são mostradas na tabela 3 e tabela 4, respectivamente.

5 Tabela 3

Molde (diluição de 50 vezes do 1º produto de PCR)	: 1 µl
Tampão de PCR 10X (Takara Bio)	: 2 µl
2,5 mM de dNTPs (Takara Bio)	: 1,5 µl
2º iniciador específico (TL2: SEQ ID Nº: 25)	: 5 pmols
Iniciador arbitrário 1 (SEQ ID Nº: 27)	: 100 pmols
TaKaRa Ex Taq (Takara Bio)	: 0,8 unidade
TOTAL	20 µl

Tabela 4

Nº 6:	94°C (15 segundos)/64°C (30 segundos)/72°C (1 minuto), 94°C (15 segundos)/64°C (30 segundos)/72°C (1 minuto), e 12 ciclos de 94°C (15 segundos)/44°C (30 segundos)/72°C (1 minuto)
Nº 5:	72°C (5 minutos)

A composição da solução e as condições da reação da 3ª reação de PCR são mostradas na tabela 5 e na tabela 6, respectivamente.

Tabela 5

Molde (diluição 50 vezes do 2º produto de PCR)	: 1 µl
tampão de PCR 10X (Takara Bio)	: 5 µl
2,5 mM de dNTPs (Takara Bio)	: 0,5 µl
3º iniciador específico (TL3: SEQ ID Nº: 26)	: 10 pmols
Iniciador arbitrário 1 (SEQ ID Nº: 27)	: 100 pmols
TaKaRa Ex Taq (Takara Bio)	: 1,5 unidade
TOTAL	50 µl

Tabela 6

Nº 7:	20 ciclos de 94°C (30 segundos)/44°C (30 segundos)/72°C (1 minuto)
Nº 5:	72°C (3 minutos)

Subsequentemente, o 2º e o 3º produtos de reação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose e, então, a presença ou a ausência de amplificação e a especificidade dos produtos de reação foram confirmadas. Ainda, os 3º produtos de amplificação foram submetidos a uma reação de sequenciamento usando diretamente um kit BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit Ver. 3.1 (Applied Biosystems) e o iniciador específico TL3. Desta forma, uma sequência de nucleotídeo foi determinada com o uso de um ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Como um resultado, informações sobre a sequência de 498 bp foram obtidas (SEQ ID Nº: 28).

O Arabidopsis Information Resource (TAIR: <http://www.arabidopsis.org/>) foi submetido a uma pesquisa BLAST para a sequência assim obtida. Desta forma, o sítio de inserção foi observado ser o gene de [AGI (código de gene Arabidopsis Genome Initiative) código: At3g05630] do cromossomo 3 de *Arabidopsis thaliana*.

1-2-4. Previsão dos genes ativados

Os genes ativados foram previstos a partir da sequência de gene de fase aberta de leitura (ORF) presumida existente dentro de uma faixa de 10-Kb próxima do sítio de inserção de T-DNA (At3g05630) revelado em 1-2-3.



1-2-5. Obtenção dos genes previstos

Para amplificação de um fragmento contendo a região da ORF do gene PP2C (proteína fosfatase 2C) (At3g05640) que é previsto estar ativado em 1-2-4, os iniciadores de PCR 5640PF1 e 5640PR1 foram desenhados e sintetizados com base na informação de sequência apresentada em TAIR (<http://www.arabidopsis.org/home.html>). Além disso, estes iniciadores foram desenhados para que um sítio de enzima de restrição (*Bsr*G I ou *Sal* I) necessário para a introdução nos vetores de expressão fosse adicionado à terminação de cada iniciador.

5640PF1 (SEQ ID Nº: 29):

5'-ACG CGT CGA CAT GGG ACA TTT CTC TTC CAT GTT CAA CGG-3'

5640PR1 (SEQ ID Nº: 30):

5'-TGT ACA TGT ACA CTA TAG AGA TGG CGA CGA CGA TGA AGA ATG G-3'

De acordo com o método descrito em 1-2-2, um DNA molde foi preparado a partir de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0 selvagem. A DNA polimerase de alta fidelidade Phusion (New England BioLabs: NEB) foi usada como uma enzima e os 5640PF1 e 5640PR1 acima foram usados como iniciadores. A composição da solução e condições de reação da reação de PCR relevante são mostradas na tabela 7 e na tabela 8, respectivamente.

20 Tabela 7

Molde (DNA genômico)	: 60 ng
Tampão HF 10X (NEB)	: 5 µl
10 mM de dNTPs (NEB)	: 1,0 µl
Cada iniciador	: 20 pmol
DNA polimerase de alta fidelidade Phusion	: 1,0 unidade
TOTAL	50 µl

Tabela 8

Nº 1:	98°C (30 segundos)
Nº 2:	15 ciclos de 98°C (10 segundos)/55°C (30 segundos)/72°C (30 segundos)
Nº 5:	72°C (10 minutos)

Os produtos da amplificação por PCR foram submetidos a eletroforese com gel de agarose a 2% (tampão TAE) e, então, os fragmentos foram corados com brometo de etídio. Um gel contendo fragmentos-alvo foi cortado com o uso de um bisturi. Os fragmentos de DNA-alvo foram eluídos e purificados com o uso de um kit de purificação de banda de gel (Amersham) e de DNA de PCR GFX. Adenina foi adicionada ao fragmento de DNA assim obtido com o uso de um kit de A-Addition Kit (QIAGEN). O DNA amplificado ao qual a adenina foi adicionada foi ligado a um vetor de clonagem TA pCR2.1 com o uso de um kit de clonagem TOPO TA Cloning kit (Invitrogen) e, então, transformado em células competentes (*E. coli* TOP 10) incluídas com o kit. Após a transformação, as células foram cultivadas em meio LB suplementado com 50 µl/ml de canamicina e, então, os transformantes foram selecionados. As colônias que apareceram foram submetidas à cultura líquida em meio LB suplementado com 50 µl/ml de canamicina. O DNA do plasmídeo foi preparado a partir dos micro-organismos assim obtidos com o uso de um kit Plasmid Mini Kit (QIAGEN). O fragmento assim obtido contendo ORF do gene de PP2C (proteína fosfatase 2C) (At3g05640) foi clonado em um vetor, seguido da determinação das sequências de nucleotídeo e análise de sequências.

20 1-2-6. Construção de vetor de expressão de planta

Um fragmento contendo a ORF do gene de PP2C (proteína fosfatase 2C) (At3g05640) foi inserido em um vetor de expressão de planta pBI121 contendo uma sequência ômega de vírus do mosaico do tabaco. Desta forma, um construto foi preparado.

25 Primeiro, o vetor pCR2.1, no qual um fragmento contendo ORF do gene de PP2C (proteína fosfatase 2C) (At3g05640) havia sido clonado em 1-2-5, foi tratado com as enzimas de restrição *Sal* I e *Bsr* G I.

A seguir, pBI121 similares contendo uma sequência ômega foi tratado com as enzimas de restrição *Sal* I e *Bsr* G I. Os produtos digeridos com estas enzimas de restrição foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 0,8%. Um fragmento de cerca de 1600 bp contendo a ORF do gene de PP2C (proteína fosfatase 2C) (At3g05640) e pBI121 contendo a

sequência ômega foi tracionada e purificada do gel com o uso de um kit de purificação de banda de gel (Amersham) e de DNA de PCR GFX.

Para a introdução de um fragmento contendo a ORF do gene de PP2C (proteína fosfatase 2C) (At3g05640) com o uso de um fragmento de pBI121 contendo a sequência ômega como um vetor, o vetor e o inserto foram misturados a uma razão de 1 : 10, seguido de uma reação de ligação de um dia para o outro a 16°C com o uso de uma quantidade equivalente de um kit TaKaRa Ligation kit ver. 2 (Takara Bio Inc.).

A quantidade total da solução de reação foi adicionado a 100 µl de células competentes (cepa DH5α de *E. coli*, TOYOBO), para que a transformação fosse realizada de acordo com os protocolos incluídos no kit. As células foram aplicadas a meio ágar LB contendo 50 µg/ml de canamicina e, então, cultivadas de um dia para o outro. As colônias que apareceram foram submetidas a cultura líquida em meio LB suplementado com 50 µg/ml de canamicina. O DNA do plasmídeo foi preparado a partir dos microorganismos assim obtidos com o uso de um kit Plasmid Mini Kit (QIAGEN).

O fragmento assim obtido contendo a ORF do gene de PP2C (proteína fosfatase 2C) (At3g05640) foi subclonado em um vetor de expressão, seguido da determinação da sequências de nucleotídeo e análise de sequências.

1-2-7. Introdução de gene em *Arabidopsis thaliana* com o uso de método de *Agrobacterium*

O vetor de expressão de planta construído em 1-2-6 foi introduzido na cepa C58C1 de *Agrobacterium tumefaciens* por eletroporação (Plant Molecular Biology Manual, Segunda Edição, B. G. Stanton e A. S. Robbert, Kluwer Academic Publishers 1994). Subsequentemente, o *Agrobacterium tumefaciens* no qual o vetor de expressão de planta foi introduzido em *Arabidopsis thaliana* Col-0 tipo eco selvagem por um método de infiltração descrito por Clough *et al.* (Steven J. Clough e Andrew F. Bent, 1998, The Plant Journal 16, 735-743).

Os transformantes foram selecionados com o uso de meio contendo canamicina. Plantas da geração T1 foram produzidas por autopolini-



zação a partir dos transformantes, para que sementes T2 fossem obtidas.

1-2-8. Confirmação do fenótipo do transformante

As sementes T2 produzidas em 1-2-7 foram semeadas assepticamente e, então, as plantas resultantes foram transplantadas para vasos (cada um com um diâmetro de 50 mm) contendo solo misturado com vermiculita. Como plantas de controle para comparação, plantas de *Arabidopsis thaliana* que não haviam sido submetidas a recombinação foram transplantadas. Elas foram cultivadas sob condições de 22°C e 16 horas na luz/8 horas no escuro, e com uma intensidade de luz na faixa de cerca de 30 a 45 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{seg}$, por um total de 11 semanas após o transplante. Após o cultivo, as partes aéreas das plantas foram colocadas em bolsas de papel e secas sob condições de 22°C e umidade de 60% por duas semanas. As quantidades totais de biomassa e sementes foram pesadas com o uso de uma balança eletrônica.

1-3. Resultados

Com relação aos resultados de 1-2-8, a figura 3 mostra uma foto das partes aéreas de plantas do tipo selvagem e de plantas transformadas nas quais um fragmento contendo ORF do gene de PP2C (proteína fosfatase 2C) (At3g05640) foi introduzido. Ainda, a figura 4 e a figura 5 mostram os resultados da medição das quantidades totais de biomassa e sementes das partes aéreas das plantas.

Conforme mostrado nas figuras 3, 4, e 5, foi revelado que no caso de plantas transformadas nas quais o fragmento contendo ORF do gene de PP2C (proteína fosfatase 2C) (At3g05640) havia sido introduzido, as quantidades totais de biomassa das partes aéreas foram muito maiores (cerca de 1,9 a 2,1 vezes) do que as quantidades do mesmo nos casos de plantas do tipo selvagem. Além disso, as quantidades de sementes foram muito maiores (em cerca de 1,7 a 1,8 vez) do que as mesmas nos casos de plantas do tipo selvagem.

Exemplo de referência 2

Neste exemplo de referência, as plantas transformadas foram preparadas por introduzir um gene de frutose-1,6-bifosfato aldolase do tipo

plastídio de ligação à glutatona (daqui em diante, gene FBA1). Além disso, pode ser feita referência aos exemplos de WO 2007-091634 A1.

2. Materiais e Métodos

2-1. Materiais experimentais

5 Um material experimental usado aqui foi *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0 selvagem. As sementes de *Arabidopsis* foram semeadas em vasos de plástico quadrados (6,5 x 6,5 x 5 cm) contendo solo das três seguintes camadas: vermiculita (Asahi Kogyo); solo de cultura KUREHA (KUREHA solo para horticultura, KUREHA CORPORATION; e vermiculita; a partir do fundo, em uma proporção de 2 : 2 : 1. As plantas foram então, cultiva-

10 das sob condições de uma temperatura de crescimento de 22°C e um dia longo (um ciclo de 16 horas na luz/8 horas no escuro).

2-2. Métodos

2-2-1. Obtenção do gene de FBA1 (At2g01140)

15 O RNA total foi isolado de *Arabidopsis thaliana* Columbia (Col-0) selvagem de 4 semanas de idade. RT-PCR (quantidade de RNA molde: 5,0 µg) foi realizada com o uso de um kit Prost arfirststrand RT-PCR kit (Stratagene), para que o cDNA fosse preparado.

Dois fragmentos de cDNA de extensão completa foram amplificados por PCR com o uso dos seguintes iniciadores específico que haviam sido desenhados com base na sequência de cDNA (SEQ ID N°: 42) do gene de FBA1 (At2g01140). Cada fragmento foi clonado por TA em um vetor pGEM-T (Prômega).

20

25 1F-1: 5'-GGATCCTATGGCGTCTGCTAG-3'(SEQ ID N°: 43)
1R-1: 5'-ATCTGCAACGGTCTCGGGAGA-3'(SEQ ID N°: 44)
1F-2: 5'-GTGTGGTCCGAGGTGTTCTTCT-3'(SEQ ID N°: 45)
1R-2: 5'-GAGCTCGAGTAGGTGTAACCCTTG-3'(SEQ ID N°: 46)

Os 2 fragmentos foram fundidos no sítio de *Bst*p I e, então, um vetor (pGEM-FBA1) contendo o cDNA de extensão completa foi construído.

30 Para a produção das plantas transformadas, pGEM-FBA1 foi tratado com as enzimas de restrição *Bam*H I e *Sac* I e, então, o fragmento foi introduzido em um vetor pBI121.

2-2-2. Construção do vetor de expressão de planta

Um construto foi preparado pela inserção do fragmento contendo o gene de FBA1 (At2g01140) (obtido em 2-2-1) em um vetor de expressão de planta pMAT137-HM (Matsuoka K. e Nakamura K., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88, 834-838).

Primeiro, o fragmento contendo o gene de FBA1 e um terminador N^{os} que haviam sido incorporados no vetor pBI121, foi cortado com *Xba* I e *EcoR* I. O resultante foi incorporado em um vetor pBluscriptII (SK+) (Stratagene) tratado com *Xba* I e *EcoR* I. Subsequentemente, o fragmento contendo o gene de FBA1 e o terminador de NOS foi cortado com *Xba* I e *Kpn* I e, então, incorporado em um vetor pMAT137-Hm que havia sido tratado com *Xba* I e *Kpn* I.

2-2-3. Introdução do gene em *Arabidopsis thaliana* com o uso do método de *Agrobacterium*

O vetor de expressão de planta pMAT137-Hm construído em 2-2-2 foi introduzido por eletroporação (Plant Molecular Biology Manual, Segunda Edição, B. G. Stanton e A. S. Robbert, Kluwer Academic Publishers 1994) em uma cepa C58C1 de *Agrobacterium tumefaciens*. A seguir, o *Agrobacterium tumefaciens* no qual o vetor de expressão de planta havia sido introduzido foi introduzido pelo método de infiltração descrito por Clough *et al.*, (Steven J. Clough e Andrew F. Bent, 1998, The Plant Journal 16, 735-743) em *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0 selvagem.

A seleção foi repetida com o uso de meio de ágar (meio Murashige-Skoog com uma concentração de 1/2) contendo canamicina como um marcador de seleção. Na dosagem a qual todas as sementes podem crescer em meio contendo canamicina (em uma geração que retém as características de maneira estável), os níveis de expressão do transgene foram confirmados por análise de RT-PCR, para que a produção das plantas transformadas fosse confirmada.

Exemplo 1

No exemplo 1, os efeitos do tratamento com glutathiona oxidada (GSSG) foram examinados para as plantas transformadas (mais adiante



neste documento, plantas transformadas com PP2C) preparadas no exemplo de referência 1 pela introdução de um fragmento contendo ORF do gene de PP2C (proteína fosfatase 2C) (At3g05640); as plantas transformadas (mais adiante neste documento, plantas transformadas com FBA1) preparadas no exemplo de referência 2 pela introdução de um gene de frutose-1,6-bifosfato aldolase do tipo plastídio de ligação à glutathiona; e *Arabidopsis thaliana* selvagem.

3. Materiais e Métodos

3-1. Materiais experimentais

Os materiais experimentais usados aqui foram sementes da geração T3 e as seguintes gerações das plantas transformadas com PP2C preparadas em 1-2-7, sementes das plantas transformadas com FBA1 preparadas em 2-2-3, e sementes de *Arabidopsis thaliana* selvagem (ecotipo Col-0).

As sementes de cada planta foram semeadas em vasos de plástico quadrados (6,5 x 6,5 x 5 cm) contendo solo das três seguintes camadas: vermiculita (Asahi Kogyo); solo de cultura KUREHA (KUREHA solo para horticultura, KUREHA CORPORATION); e vermiculita; a partir do fundo, em uma proporção de 2 : 2 : 1. As plantas foram então, cultivadas sob condições de 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{seg}$ de intensidade de luz, uma temperatura de crescimento de 22°C e um dia longo (um ciclo de 16 horas na luz/8 horas no escuro).

3-2. Métodos

Efeitos da glutathiona oxidada (GSSG) sobre o crescimento de cada planta

Cada planta (3 plantas por vaso) foi tratada 5 vezes no total com água apenas (controle) ou com uma solução de 1 mM de GSSG em intervalos de 1 semana desde a 1ª semana após o plantio. O estado de crescimento de cada planta foi observado. O tratamento foi realizado por colocar 4 vasos (6,5 x 6,5 x 5 cm) em um prato de pesagem e adicionar uma solução de tratamento (25 ml/vaso/tratamento) a isso. As plantas foram cultivadas por 15 semanas após a semeadura. Após o cultivo, as partes aéreas das plantas foram colocadas em sacos de papel e secas sob condições de 22°C e umidade de 60% por duas semanas. As quantidades totais de biomassa e sementes foram pesadas com o uso de uma balança eletrônica.



3-3. Resultados

A figura 6 mostra os resultados de 3-2 acima. Especificamente , a figura 6 mostra uma foto tirada 3 semanas após a semeadura, mostrando as partes aéreas das plantas transformadas com PP2C, as plantas transformadas com FBA1, e *Arabidopsis thaliana* selvagem, as quais foram tratadas com uma solução de 1 mM de GSSG. Conforme mostrado na figura 6, foi revelado que no caso de plantas transformadas com PP2C, o crescimento de folhas de roseta foi mais aprimorado em comparação às plantas transformadas com FBA1 e *Arabidopsis thaliana* selvagem.

Ainda, a figura 7 mostra os resultados da medição das quantidades totais de biomassa das partes aéreas das plantas e a figura 8 mostra os resultados da medição das quantidades de sementes. Além disso, as quantidades de biomassa e as quantidades de sementes mostradas nas figuras 7 e 8 foram ambos valores médios encontrados pela medição das quantidades de biomassa de 6 vasos (cada vaso contendo 3 plantas) e, então, cálculo do valor médio. Conforme mostrado na figura 7, foi revelado que no caso de plantas transformadas com PP2C tratadas com glutathione, a quantidade total de biomassa das partes aéreas foi aprimorada em cerca de 49% em comparação às mesmas nos casos envolvendo tratamento apenas com água (controle). Também foi revelado que no caso de plantas transformadas com FBA1 tratadas com glutathione, a quantidade total de biomassa das partes aéreas foi aprimorada em cerca de 17% a 27% em comparação às mesmas nos casos envolvendo tratamento apenas com água (controle).

Portanto, conforme mostrado na figura 8, foi revelado que no caso de plantas transformadas com PP2C tratadas com glutathione, a quantidade de sementes foi aprimorada em cerca de 54% a 69% em comparação às mesmas nos casos envolvendo tratamento apenas com água (controle). Ainda, foi revelado que no caso de plantas transformadas com FBA1 tratadas com glutathione, a quantidade de sementes foi aprimorada em cerca de 23% a 49% em comparação às mesmas nos casos envolvendo tratamento apenas com água (controle).

Conforme descrito acima, poderia ser confirmado que no caso

das plantas transformadas com PP2C, os efeitos do aumento da produção de biomassa e sementes pelo tratamento com glutathione foram ainda aumentados em comparação às plantas transformadas com FBA1.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para aumentar a produção de biomassa e/ou sementes de planta, que compreende uma etapa de fornecer glutathione a uma planta na qual foi introduzido um gene que codifica proteína fosfatase 2C que tem 3 sequências consenso que compreendem as sequências de aminoácido mostradas nas SEQ ID N^{os}: 1 a 3 nesta ordem a partir da porção terminal N.

2. Método para aumentar a produção, de acordo com a reivindicação 1, em que a glutathione é glutathione oxidada.

10 3. Método para aumentar a produção, de acordo com a reivindicação 1, pelo qual uma solução contendo a glutathione é fornecida ao solo no qual as sementes da planta foram semeadas.

4. Método para aumentar a produção, de acordo com a reivindicação 1, em que o gene que codifica a proteína fosfatase 2C é pelo menos um tipo de gene selecionado do grupo que consiste em At1g03590-AtPP2C6-6, At1g16220, At1g79630, At5g01700, At3g02750, At5g36250, At5g26010, At4g32950, At3g16800, At3g05640, At5g27930-AtPP2C6-7, At2g20050, e At3g06270, ou um gene funcionalmente equivalente a estes.

5. Método para aumentar a produção, de acordo com a reivindicação 1, em que o gene que codifica a proteína fosfatase 2C codifica qualquer uma das seguintes proteínas (a) a (c):

(a) uma proteína que compreende a sequência de aminoácidos mostrada em SEQ ID N^o: 5;

(b) uma proteína que compreende uma sequência de aminoácido que tem uma deleção, uma substituição, uma adição, ou uma inserção de um ou de uma pluralidade de aminoácidos com relação à sequência de aminoácido mostrada em SEQ ID N^o: 5 e tem atividade de proteína fosfatase 2C; e

(c) uma proteína que é codificada por um polinucleotídeo que hibridiza sob condições estridentes a um polinucleotídeo que compreende uma sequência de nucleotídeos complementar à sequência de nucleotídeo mostrada em SEQ ID N^o: 4 e tem atividade de proteína fosfatase 2C.

6. Método para aumentar a produção, de acordo com a reivindicação 4, em que o gene funcionalmente equivalente é um gene da proteína fosfatase 2C de um organismo diferente de *Arabidopsis thaliana*.

5 7. Método para aumentar a produção, de acordo com a reivindicação 6, em que um organismo diferente de *Arabidopsis thaliana* é pelo menos um tipo de organismo selecionado do grupo que consiste em arroz (*Oryza sativa*), Choupo-do-Canadá (*Populus trichocarpa*), uva europeia (*Vitis vinifera*), *Medicago truncatula* (*Medicago truncatula*), alfafa (*Medicago sativa*), *Physcomitrella patens* (*Physcomitrella patens*), barrilha (*Mesembryanthemum crystallinum*), *Chlamydomonas reinhardtii* (*Chlamydomonas reinhardtii*), milho (*Zea mays*), colza (*Brassica rapa*), tomate (*Solanum lycopersicum*), mimulus (*Mimulus guttatus*), e alga vermelha monocelular (*Cyanidioschyzon merolae*).

10

8. Método para produzir uma planta, que compreende uma etapa de fornecer glutathione a uma planta na qual foi introduzido um gene que codifica proteína fosfatase 2C que tem 3 sequências consenso que compreendem as sequências de aminoácido mostradas nas SEQ ID N^{os}:1 a 3 nesta ordem a partir da porção terminal N.

15

9. Método de produção, de acordo com a reivindicação 8, em que a glutathione é glutathione oxidada.

20

10. Método de produção, de acordo com a reivindicação 8, pelo qual uma solução contendo a glutathione é fornecida ao solo no qual as sementes da planta foram semeadas.

11. Método de produção, de acordo com a reivindicação 8, em que o gene que codifica a proteína fosfatase 2C é pelo menos um tipo de gene selecionado do grupo que consiste em At1g03590-AtPP2C6-6, At1g16220, At1g79630, At5g01700, At3g02750, At5g36250, At5g26010, At4g32950, At3g16800, At3g05640, At5g27930-AtPP2C6-7, At2g20050, e At3g06270, ou um gene funcionalmente equivalente a estes.

25

12. Método de produção, de acordo com a reivindicação 8, em que o gene que codifica a proteína fosfatase 2C codifica qualquer uma das seguintes proteínas (a) a (c):

30

(a) uma proteína que compreende a sequência de aminoácidos mostrada em SEQ ID N°: 5;

5 (b) uma proteína que compreende uma sequência de aminoácido que tem uma deleção, uma substituição, uma adição, ou uma inserção de um ou de uma pluralidade de aminoácidos com relação à sequência de aminoácido mostrada em SEQ ID N°: 5 e tem atividade de proteína fosfatase 2C; e

10 (c) uma proteína que é codificada por um polinucleotídeo que hibridiza sob condições estridentes a um polinucleotídeo que compreende uma sequência de nucleotídeos complementar à sequência de nucleotídeo mostrada em SEQ ID N°: 4 e tem atividade de proteína fosfatase 2C.

13. Método de produção, de acordo com a reivindicação 11, em que o gene funcionalmente equivalente é um gene da proteína fosfatase 2C de um organismo diferente de *Arabidopsis thaliana*.

15 14. Método de produção, de acordo com a reivindicação 13, em que um organismo diferente de *Arabidopsis thaliana* é pelo menos um tipo de organismo selecionado do grupo que consiste em arroz (*Oriza sativa*), choupo-do-Canadá (*Populus trichocarpa*), uva europeia (*Vitis vinifera*), *Medicago truncatula* (*Medicago truncatula*), alfafa (*Medicago sativa*), *Physcomitrella patens* (*Physcomitrella patens*), barrilha (*Mesembryanthemum crystallinum*), *Chlamydomonas reinhardtii* (*Chlamydomonas reinhardtii*), milho (*Zea mays*), colza (*Brassica rapa*), tomate (*Solanum lycopersicum*), mimulus (*Mimulus guttatus*), e alga vermelha monocelular (*Cyanidioschyzon merolae*).

20

Fig. 1-1

Clustal W (1.83) Alinhamento de múltiplas sequências

```

AT5G26010  MGHCFSLP-----SQSEIHEDNEHGDGNVVCYGEFGLDQDLVPH-----
AT4G32950  MGFCLSSG-----GSTDKSQIYEITDYQENAVLYSDHHVVPQN-----
AT1G16220  MGLCHSKIDKTRKETG-ATSTATT-TVERQS-SGRLRRPRDLYSGG-----
AT1G79630  MGLCYS-VDRTTGKEPGEASSTATTAEVTEERSGSGRWRPRDLKGG-----
At1g03590  -----MHRPCLGMGCCGS-KMGKRGFSDRMVSLHNLVS-----
AT3G02750  MGSCLSAE-----SRSPRPGSPCSPAFSVRKRNNSKKRPGSRNSSFDYR-----
AT5G36250  MGSCLSSSGGGSRSLHGSPHPGPGRRKR-PPRRPGSCSSSFDNT-----
AT5G01700  MGVCSS-----KGTGIIVEHGADDGNECGDGEAEVRDNDG-----
AT3G05640  MGHFSS-----MFNGIARSFSIKKAKNINSSKSYAKEATDEMAREAK-----
AT5G27930  MGHFSS-----MFNGLARSFSIKKVNNGN-CDAKEAADEMASEAK-----
AT3G16800  MVLLPA-----FLDGLARTVSTKKGKLSEDEDGGRKAKSMIKDSK-----
AT2G20050  MGCAYSKTCIGICATKENSIRQTHQAPSRGGTRATAAAAAVEEDNPVFNSSDAVDDV
AT3G06270  MGCVCQKCCS-----RYPSSSSDGDSDRGPLEANGVLK-----

```

```

AT5G26010  -----RLGSVCSIGQTKV-----
AT4G32950  -----LGSVSSLAGGKG-----
AT1G16220  -----EISEIQQVVGRVGNSSSEIACLYTQGGKKG-----
AT1G79630  -----DIEGIPQVLGRVYNSGSSKIACLYTQGGKKG-----
At1g03590  -----IPNRIGNGKSRSSCIFTQGRKG-----
AT3G02750  -----REEPLNQVPGRMFLNGSTEVACIYTQGGKKG-----
AT5G36250  -----EEPLLHRI PGRMFLNGSTDTVSLFSQGGKKG-----
AT5G01700  -----AVVTRTGSSKHVSMSIKQGGKKG-----
AT3G05640  -----KKELILRSSGGINADGSNNLASVFSRRGEKG-----
AT5G27930  -----KKELILKSSGYVNVQGSNNLASLFSKRGEKG-----
AT3G16800  -----KNSTLLGTSGFVSSESSKRFTSICSNRGEKG-----
AT2G20050  DNDEIHQLGLSRDQEWGITRLSRVSSQFLPPDGSRVVKVPSCNVELRCSFLSQRGYYPDA
AT3G06270  -----GKDQ-----KPLGS-----IHVPSPNFDMVSVLSQRGYYPDS

```

```

AT5G26010  -----LNQDHAVLYQGYGTR-DTELCGVFDGHHGKNGHVMVSKMVRNRLPSVLLALKEELNQES
AT4G32950  -----LNQDAAIHLHGYGTE-EGALCGVFDGHHGPRGAFVSKNVRNQLPSILLG-----HMNNHS
AT1G16220  -----TNQDAMLWENFCSRSDTVLCGVFDGHHGPFHGMVSKRVRDMLPFTLSTQLKTTSGTE
AT1G79630  -----TNQDAMLVFNFCRSDTVFCGVFDGHHGPFHGMVAKKVRDLPFTLLTQLKMTSESD
At1g03590  -----INQDAMIWVDFMSK-DVTFCGVFDGHHGPHGLVARKVRDLPVLLSLNSIK-SK
AT3G02750  -----PNQDAMVWENFGSRTDTIFCGVFDGHHGPGYGHMVAKRVRDNLPLKL SAYWEAKVPVE
AT5G36250  -----PNQDAMIWENFGSMEDTVFCGVFDGHHGPGYGHIVAKRVRDLPVLLSLNSIK-SK
AT5G01700  -----INQDAMTVWENFGGEEDTIFCGVFDGHHGPMGHKISRHVCENLPSRVHSKIRSSKSAG
AT3G05640  -----VNQDCAI VWEGYGCQEDMIFCGIFDGHGPGWGHFVSKQVRNSMPI SLLCNWKETLSQT
AT5G27930  -----VNQDCAI VWEGYGCQEDMIFCGIFDGHGPGWGHYVAKQVRNSMPI SLLCNWQKILAQA
AT3G16800  -----INQDRAI VWEGYGCQEDTIFCGMFDGHHGPGWGHVIAKRVKSFSSLLCQWQQLASL
AT2G20050  LDKANQDSFAIHTPFGSNDHFFGVFDGHHGFEAGQCSQFVKRRLCENLLRHGRFRVDP
AT3G06270  PDKENQDTCIKTELOGNPNVHFFGVFDGHHGLGTQGSNFVKERVVEMLSDEPTLLEDPE

```

*** : ***** *

```

AT5G26010  NVCEEEAS-----K
AT4G32950  -VTRDWKL-----I
AT1G16220  QSSSKNGLNSAPTCVDEE-----QWCELOLCEKDEKLFPEMYLP
AT1G79630  QSSLVGANGFIKCTEEEEVQTTSEQVQKTESVTTMDEQWCELNPNVNN-ELPEMYLP
At1g03590  QNGPIGTRASKSDSLEAE-----KEESTEED-----KLNFL
AT3G02750  GVLKAITDTYNNVTNINNPEDAAAAAFVTAE-----EPRTSADMEENETETOPELFT
AT5G36250  EVLKEISLNTDD-----RKISEDLVHISAN-----GESRVYN-----KDYVKDQ-DMIQM
AT5G01700  DENIENSSSQSE-----ELFRE
AT3G05640  TIA-----EPDKELQR-----FAI
AT5G27930  TLEPELDLEGSNNKISR-----FDI
AT3G16800  SSS-----PECSSP-----FDL
AT2G20050
AT3G06270

```

2/12

Fig. 1-2

AT5G26010
AT4G32950
AT1G16220
AT1G79630
At1g03590
AT3G02750
AT5G36250
AT5G01700
AT3G05640
AT5G27930
AT3G16800
AT2G20050
AT3G06270

WEKACFTAFRLIDRENL-QVFNCFSGSGTGVVAITQGDVLVIANLGDSRAVLGTMTEDG
CETSCLEMDKRIILKVK-KIHDCSASGTTAVLAVKHGQVMVANLGDSRAVMIGTSEDG
LKRALLKTCQQMDKELKMHPTINCFCSGTTSTVVIKQKDLVVGNI GDSRAVLATRDQDN
LKHAMLKSCQQIDKELKMHPTIDCFCSGTTSTVVIKQGEDLVVGNI GDSRAVLATRDQDN
WEEAFLKSFNAMDKELRSHPNLECFCSGCTAVTIKQGSNLYMGNI GDSRAILGSKDSND
LKESFLKAFKVMRELKFHGSVDFCSGTTAVTLKQGGYLVVGNVGDSRAVMGTRDSEN
LIGSIVKAYRFMDKELKMQVDVDFCSGTTAVTMVKQGGHLVIGNIGDSRAVLGVRNKDN
FEDILVTFFKQIDSELGLDSPYDSFCSGTTAVTVFKQADCLVIANLGHSRAVLGTR-SKN
WKYSFLKTCEAVDLELHHRKIDSFNSGTTALTIVRQGDVYIANVGDRAVLATVSDEG
WKQSYLKTCAVDQLEHHRKIDSYSGTTALTIVRQGEVYIVANVGDSRAVLAMESDEG
WKQACLKTFSIDLDLKISPSIDSYCSGCTALTAVLQGDHLVIANAGDSRAVIATTSDDG
-EACNSAFLTTNSQLH-ADLVDDSMSTTAITVMVRGRTIYVANAGDSRAVLAEKRDGD
-KAYKSAFLRVNEELH-DSEIDDSMSGTTAITVLVVGDKIYVANVGDSRAVLAVKDRNR

.

AT5G26010
AT4G32950
AT1G16220
AT1G79630
At1g03590
AT3G02750
AT5G36250
AT5G01700
AT3G05640
AT5G27930
AT3G16800
AT2G20050
AT3G06270

E-IKAVQLTSDLTPDVP-----SEAERI RM
E-TKVAQLTNDLKPSVP-----SEAERI RK
A-LVAVQLTIDLKPDLP-----SESARI HR
A-LLAVQLTIDLKPDLP-----GESARI QK
S-MIAVQLTVDLKPDLP-----REARI KQ
T-LVAVQLTVDLKPNLPGWII LCEGMMLSCGCMMDPLIMF IGFFFI PSIELAAEAERI RK
K-LVPFQLTEDLKPDVP-----AEAERI KR
S-FKAVQLTVDLKPCVQ-----REAERI VS
S-LVAVQLTVDFKPNLP-----QEERI IG
S-LVAVQLTLDKPNLP-----QEKERI IG
NGLVPVQLSVDFKPNIP-----EEARI KQ
L-VAVDLSIDQTPFRP-----DELERV KL
I-LAEDLSYDQTPFRK-----DECERV KA

||| * *

AT5G26010
AT4G32950
AT1G16220
AT1G79630
At1g03590
AT3G02750
AT5G36250
AT5G01700
AT3G05640
AT5G27930
AT3G16800
AT2G20050
AT3G06270

CKGRVFAMKTEPSSQ-----RVWLPNQNI PGLAMSRAFGDFRLKDYG
RNGRVLALASEPHIL-----RVWLP TENRPGLAMSRAFGDFLLKSYG
CKGRVFALQDEPEVA-----RVWLPNSDSPGLAMARAFGDFCLKDYG
CKGRVFALQDEPEVA-----RVWLPNSDSPGLAMARAFGDFCLKDYG
CKGRVFALQDEPEVS-----RVWLPFDNAPGLAMARAFGDFCLKDYG
CRGRVFALRDEPEVC-----RVWLPNC DSPGLAMARAFGDFCLKDFG
CRGRIFALRDEPGVA-----RLWLPNHNSPGLAMARAFGDFCLKDFG
CKGRVFAMEEPEPDVY-----RVWMPDDDCPGLAMSRAFGDFCLKDYG
CNGRVFCLQDEPGVH-----RVWQPVDES PGLAMSRAFGDYCI KDYG
CKGRVFCLDDEPGVH-----RVWQPD AETPGLAMSRAFGDYCI KEYG
SDGRFLCLDDEPGVY-----RVGMPNGGSLGLAVSRAFGDYCLKDFG
CGARVLTLDQIEGLKNPDVQCWGTEEDDDGDPRLWVPNGMYPGTAFTRSGDSIAETIG
CGARVLSVDQVEGLKDPNIQTWANESEGGDPRLWVQNGMYPGTAFTRSVGDFTAESIG

*

.

AT5G26010
AT4G32950
AT1G16220
AT1G79630
At1g03590
AT3G02750
AT5G36250
AT5G01700
AT3G05640
AT5G27930
AT3G16800
AT2G20050
AT3G06270

VIAVPEISQHRITSKDQFLVLTADGVWDMLSNDEVVSLIWSSGKKQASAAKMVAEAAEAA
VIA TPQVSTHQITSSDQFLLLASDGVWVLSNKEAVDVVVMKSAS-EAGAA NEVAEAAATNA
LISVPDINYHRLTERDQYIILATDGVWVLSNKEAVDIVASAPS-RDTAARAVVDTA VRA
LISVPDINYHRLTERDQYIILASDGVWVLSNKEAVDIVASAPS-RSTAARALVDTAVRS
VISIPEFSHRVLTDRDQYIILASDGVWVLSNKEAVDVVVMKSAS-RASAARLVDSAVRE
LISVPDVSFRQLTEKDEFIVLATDGIWVLSNEDVVAIVASAPS-RSSAARALVESAVRA
LISVPDVSFRQLTEKDEFVVLATDGIWVLSNEDVVKIVAKAPT-RSSAGRALVEAAVRN
LVCIPDVF CRKVSREDEFVVLATDGIWVLSNKEAVDVVVMKSAS-RSVAEMLVQRAART
LVSVPVETQRHISIRDQYIILATDGVWVLSNKEAVDIVSSTAE-RAKAAKRLVQQA VRA
LVSVPVETQRHISTKDHFIILASDGIWVLSNKEAVDIVSSTAE-RPKAAKRLVEQAVRA
LVSEPEVTRYKIDTDQYIILATDGMWDMVTNNEAVEIVRGVKE-RRKSAKRLVERAVTL
VVANPEIAVVELTPDNPFVVASDGVFEISSQTVVDMVAKHKD-PRDACAIAVESYRL
VIAEPEVSMVHLSPNHLFFVVASDGI FEFLPSQAVVDMVGRYAD-PRDGCAAAAESYKL

.

3/12

Fig. 1-3

AT5G26010
AT4G32950
AT1G16220
AT1G79630
At1g03590
AT3G02750
AT5G36250
AT5G01700
AT3G05640
AT5G27930
AT3G16800
AT2G20050
AT3G06270

WKKRLKYTKVDDITVLCFLQNKQPS-----
WIKKFPTVKIDDISVVCLSLNKKHNPQOI-----
WRLKYPTSKNDDCAVCLFLEDTSAGGTVEVSETVNHSHHEESTESVTITSSKADAKKEEA
WRIKYPTSKNDDCTVVCLFLQDSSVAMEVSTNVKKDSPKEESIESVTNSTSKEED-----
WKLKYPTSKMDDCAVCLFLDG---RMDSETSDNEEQCFSSATNAVESDESQGAEP-----
WRYKYPTSKVDDCAAVCLYLDSSTNAISTASSISKLEDGEEEEELKATTEDDDASG-----
WRWKFPSTKVDDCAVCLFLDS-EPNRLSTAS-----
WRTKFPASKADDCAVVLYLNHRPYPREGNVS-----
WNRKRRGIAMDDISAVCLFFHSSSSSPSL-----
WKKKRRGYSMDDMSVCLFLHSSSSS-SLSQHHHMTILK-----
WRRKRRSIAMDDISVLCFFRPS-----
WLQY-ETRTDDITIIVVHIDGLKDDAPRQLSSTGTQLQPPIPQVVELTGSESPSTFGWN
WLEH-ENRTDDITIIVQIKKLSNE-----
* ** : : : :

AT5G26010
AT4G32950
AT1G16220
AT1G79630
At1g03590
AT3G02750
AT5G36250
AT5G01700
AT3G05640
AT5G27930
AT3G16800
AT2G20050
AT3G06270

STETNETVPVWEIKEEKTPEscriESKKT--TLAECISVK-DDEEWSALEGLTRVNSLLS
-----EIVP--VKDEKIPESCGIESKMMTMLAECISVAQDDEEWSALEGLTRVNSLLS
--CLQRNVTYRSLSTDQENNSYGKVI AEA--DNAEKEKTREGEQNWSGLEGVTRVNSLVQ
-PSGLGRSSTYRSGKEIALDESETEKL IK--EADNLDSEPGTEYSALEGVARVNTLLN
-----FSKEKHINNGVTEPEPD--TASSSTPDSTGSPELNGVNRIDTLVN
-----RAISTISWRSNKS-----NNECYGAAPLSPLGLSQRVS-----

SKNQRVRHDLRSRARI RAIENSLENGHAWPPSPAHRKTWEEEVRLVCFVFAQPI RNASS

AT5G26010
AT4G32950
AT1G16220
AT1G79630
At1g03590
AT3G02750
AT5G36250
AT5G01700
AT3G05640
AT5G27930
AT3G16800
AT2G20050
AT3G06270

IPRFFSGELRSSSWRKWL
IPRFLSGELRSTSWRKWL
LPRFPGEEPKT-----
LPRFVPGK-----
LPVYVPTKE-----

HSYIRRLNAGFSRAGTH-----



4/12

Fig. 2-1

Clustal W (1.83) Alinhamento de múltiplas seqüências

```
AT1G16220      MGLCHSKIDKTRKETG-ATSTATT-TVERQS-SGRLRRPRDLYSGGEISEIQQVVGR
AT1G79630      MGLCYS-VDRTTGKEPGEASSTATTAEVEERSGSGRWRPRDLKGGGDEGIPQVLGRL
At1g03590      -----MHRPCLGMGCCGS-KMGKRGFSDRMVSLHNLVS-----IPNR
AT3G02750      MGSCLSAE-SRSPRPGSPCPAFSVRKRKNSKKRPGSRNSSFDYRREEPLNQVPRM
AT5G36250      MGSCLSSSGGGGSRSLHGSPHVPGPGRKRKRP-PKRRPGSCSSSFNTEEP LHRIPGRM
AT5G26010      MGHCFSLPS-SQSEIHEDNEHGDG-NVVCYGEFGLDQDLVH-----
AT4G32950      MGFCLSSGGSTDKSQIYEITDYGGE-NAVLYSDHHVVPQN-----
AT5G01700      MGVCCSKGTG-IIVEHGADDGNECGDGEAEVRDNDGAVVTRTGSS-----
AT3G05640      MGHFSSMFNGIARSFSIKKAKNINSSKSYAKEATDEMAREAKKELILR-----SSGC
AT5G27930      MGHFSSMFNGLARSFSIKKVKNVNGN-CDAKEADEMASEAKKELILK-----SSGYV
AT3G16800      MVLLPAFLDGLARTYSTKKGKLSDEDDGGREIAKSMIKDSKKNSTLLG-----TSGFV
```

```
AT1G16220      VGNGSSEIACLYTQGGKKGNTQDAMLVWENFCRSRSDTVLCGVFDGHGPF GHMVSKRVDRM
AT1G79630      VSNSSK IACLYTQGGKKGNTQDAMLVFNFCRSDTVFCGVFDGHGPF GHMVAKKVRDT
At1g03590      I GNGKSRSSCIFTQGRKGIQNDAMIVWEDFMSK-DVTF CGVFDGHGPHGLVARKVRDS
AT3G02750      FLNGSTEVACIYTQGGKKGPNQDAMVWENFGSRTDTIFCGVFDGHGPGYGHVAKRVDRD
AT5G36250      FLNGSTDTVSLFSQGGKKGPNQDAMIVWENFGSMEDTVFCGVFDGHGPGYGHVAKRVDRD
AT5G26010      -----RLGSVCSIGTKVLNQDHAVLYQGYG-TRDTL CGVFDGHGKNGHVMVSKMVRNR
AT4G32950      -----LGSVSSLAGGKGLNQDAAILHLGYG-TEEGALCGVFDGHGPRGAFVSKNVRNQ
AT5G01700      -----KHVSMSIKGGKKG I QNDAMTVWENFGGEEDTIFCGVFDGHGPMGHKISRHCEN
AT3G05640      NADGSNNLASVFSRRGEKGVNQDCAI VWEGYGCQEDMIFCGIFDGHGPGWGHFVSKQVRNS
AT5G27930      NVQGSNNLASLFSKRGEKGVNQDCALVWEGFGCQEDMIFCGIFDGHGPGWGHYVAKQVRNS
AT3G16800      SSESSKRFTSICSNRGEKGINQDRAI VWEGFGCQEDITFCGMFDGHGPGWGHVIAKRVKKS
```

.. ** *** : : : : ***** * : : *

```
AT1G16220      LPFTLSTQLKTTSGTEQSSSKNGLNSAPTQVDEE-----QWCEL
AT1G79630      LPFTLLTQLKMTSESQSSLVGANGFQIKCTEEEEVTTESEQVOKTESVTMDEQWCEL
At1g03590      LPVKLLSLLNSIK-SKQNGPIGTRASKSDSLEAE-----K
AT3G02750      LPLKLSAYWEAKVPVEGLKAITTDTVNNVTNINNPEDAAAAAAFTAEPEPTSADMEE
AT5G36250      LPLKLGSHLESYVSPEEVLKEISLNTDD-----RKISEDLVHISANGESRVYN-K
AT5G26010      LPSVLLALK-----EELNQESNVCE-----
AT4G32950      LPSILLG-----HMNNHS-VTR-----
AT5G01700      LPSRVHSKIRSSKSAGDENIENSSQSGE-----
AT3G05640      MPISLLCNWK-----ETLSQTTIA-----
AT5G27930      MPLSLLCNWQ-----KILAQATLEPE-----
AT3G16800      FPSLLCOWQ-----QTLASLSS-----
```

: *

||

```
AT1G16220      QLCEKDEKLFPEMYLPLKRALLKTCQQMDKELKMHPTINCFCSGTTSVTVIKQGD LVVG
AT1G79630      NPNVNND-ELPEMYLPLKHAMLKSCQQIDKELKMHPTIDCFCSGTTSVTLIKQGEDLVVG
At1g03590      EESTEED-KLNFLWEEAFLKSFNAMDKELRSHPNLECFCSGCTAVTIKQGSNLYMG
AT3G02750      ENTETQP-ELFQTLKESFLKAFKVMRELKFGHSVDCFCSGTTAVTLIKQGQYLVVG
AT5G36250      DYVKDQ-DMIQMLIGSVKAYRFMDKELKMQVDVDCFCSGTTAVTMVKQGQHLVIG
AT5G26010      -----EEASKWEKACFTAFRLIDRELNL-QVFNCFSFGSTGVVAITQGGDLVIA
AT4G32950      -----DWKLICETSCLEMDKRLKVK-KIHDCSASGTTAVLAVKHGNQVMVA
AT5G01700      -----ELFREFEDILVTFKQIDSELGLDSPYDSFCSGTTAVTVFKQADCLVIA
AT3G05640      -----EPDKELQRFAIWKYSFLKTCFAVDLELEHHRKIDSFNSGTTALTIVRQGDVYIA
AT5G27930      -LDLEGSNKKISRFDIWKQSYLKTCAVDQLEHHRKIDSYSGTTALTIVRQGEVYVA
AT3G16800      -----PECSSPFDLWKQACLKTFSDLDLKI SPSIDSYCSGCTALTAVLQGDHLVIA
```

.. ** * : : : : *

5/12

Fig. 2-2

AT1G16220	NIGDSRAVLATRDQDNA-LVAVQLTIDLKPDLP
AT1G79630	NIGDSRAVLATRDQDNA-LLAVQLTIDLKPDLP
At1g03590	NIGDSRAVLGSKDSNDS-MIAVQLTVDLKPDLP
AT3G02750	NVGDSRAVMGTRDSENT-LVAVQLTVDLKPNLPGWII LCECMMLSCGCMMDPLIMF IGFF
AT5G36250	NIGDSRAVLGVRNKDNK-LVPFQLTEDLKPDVP
AT5G26010	NLGDSRAVLGTMTEDGE-IKAVQLTSDLTPDVP
AT4G32950	NLGDSRAVMIGTSEDGE-TKVAQLTNDLKPSVP
AT5G01700	NLGHSRAVLGTRSKNS-FKAVQLTVDLKPCVQ
AT3G05640	NVGDSRAVLATVSDEGS-LVAVQLTVDFKPNLP
AT5G27930	NVGDSRAVLAMESDEGS-LVAVQLTDFKPNLP
AT3G16800	NAGDSRAVIAATSDGNGLVVPVQLSVDFKPNIP

* * *** : : : ** : * : * : |||

AT1G16220	-----SESARIHRCCKGRVFALQDEPEVARVWLPNSDSPGLAMARAFGDFCLKDYGLI
AT1G79630	-----GESARIQKCKGRVFALQDEPEVARVWLPNSDSPGLAMARAFGDFCLKDYGLI
At1g03590	-----REAERIQKCKGRVFALQDEPEVSRVWLPFONAPGLAMARAFGDFCLKDYGLI
AT3G02750	FIPSI ELAAEAERIRKCRGRVFALRDEPEVCRVWLPNC DSPGLAMARAFGDFCLKDFGLI
AT5G36250	-----AEAERIKRCRGRIFALRDEPGVARLWLPNHNSPGLAMARAFGDFCLKDFGLI
AT5G26010	-----SEAERIRMCKGRVFAMKTEPSSORVWLPNQNIPGLAMSRAFGDFRLKDHGVI
AT4G32950	-----SEAERIRKRNGRVLALESEPHILRVWLPNTENRPGAMSRAFGDFLLKSYGVI
AT5G01700	-----REAERIVSCKGRVFAMEEEDPVYRVWMPDDDCPGLAMSRAFGDFCLKDYGLV
AT3G05640	-----QEEERIIGCNGRVFCLQDEPGVHRVWQPVDES PGLAMSRAFGDYCIKDYGLV
AT5G27930	-----QEKERIIGCKGRVFCLDDEPGVHRVWQPD AETPGLAMSRAFGDYCIKEYGLV
AT3G16800	-----EEAERIKQSDGRVCLDDEPGVYRVGMPNGGSLGLAVSRAFGDYCLKDFGLV

* ** *** : : : ** : * : * : *** : ***** : : * : *

AT1G16220	SVPDINYHRLTERDQYIILATDGVWVDVLSNKEAVDIVASAPS-RDTAARAVVDTAVRAWR
AT1G79630	SVPDINYRRLTERDQFIILASDGVWVDVLSNKEAVDIVASAPS-RSTAARALVDTAVRSWR
At1g03590	SIPFESHRLTDRDQFIIVLASDGVWVDVLSNEEVVEVVASATS-RASAARLVVDSAVREWK
AT3G02750	SVPDVSFRQLTEKDEFIVLATDGIWDVLSNEDVVAIVASAPS-RSSAARALVESAVRAWR
AT5G36250	SVPDVSYRRLTEKDEFVVLATDGIWDALTNEEVVKIVAKAPT-RSSAGRALVEAAVRNWR
AT5G26010	AVPEISQHRITSKDQFLVLATDGVWMDLSNDEVVSLIWSSGKKQASAAKMVAEAAEAAWK
AT4G32950	ATPOVSTHQITSSDQFLLLASDGVWVDVLSNEEVATVVMKSAS-EAGAANEVAAEATNAWI
AT5G01700	CIPDVFCRKVSREDEFVVLATDGIWDVLSNEEVVKVVGSCKD-RSVAAEMLVORAARTWR
AT3G05640	SVPEVTQRHISIRDQFIILATDGVWVDVLSNQEAIIVSSTAE-RAKAAKRLVQQAVRAWN
AT5G27930	SVPEVTQRHISTKDFIILASDGIWDVLSNQEAIIVSSTAE-RPKAAKRLVEQAVRAWK
AT3G16800	SEPEVTYRKITDKDQFLIILATDGMWDMVTNNEAVEIVRGVKE-RRKSAKRLVERAVTLWR

* : : : * : : *** : * : * : : : : * *

AT1G16220	LKYPTSKNDDCAVVCLFLEDTSAGGTVEVSETVNHSHSEESTESVTITSSKDADKKEEAST
AT1G79630	IKYPTSKNDDCTVVCLFLQDSSVAMEVSTNVKKDSPKEESIESVTNSTSKEED
At1g03590	LKYPTSKMDDCAVVCLFLDG---RMDSETSDNEEQCFSSATNAVESDESQGAEP
AT3G02750	YKYPTSKVDDCAAVCLYLDSSNTNAISTASSISKLEDGEEELKATTEDDDASG---P
AT5G36250	WKFPYSKVDDCAVVCLFLDS-EPNRLSTAS
AT5G26010	KRLKYTKVDDITVICLFLQN
AT4G32950	QKFPTVKIDDISVVCLSLNK
AT5G01700	TKFPASKADDCAVVVLYLNH
AT3G05640	RKRRGIAMDDISAVCLFFHSSSSSPSL
AT5G27930	KKRRGYSMDMSVVCLFLHSSSSS-SLSQHHAHTILK
AT3G16800	RKRRSIAMDDISVLCFFRPS

: ** : : * :

6/12

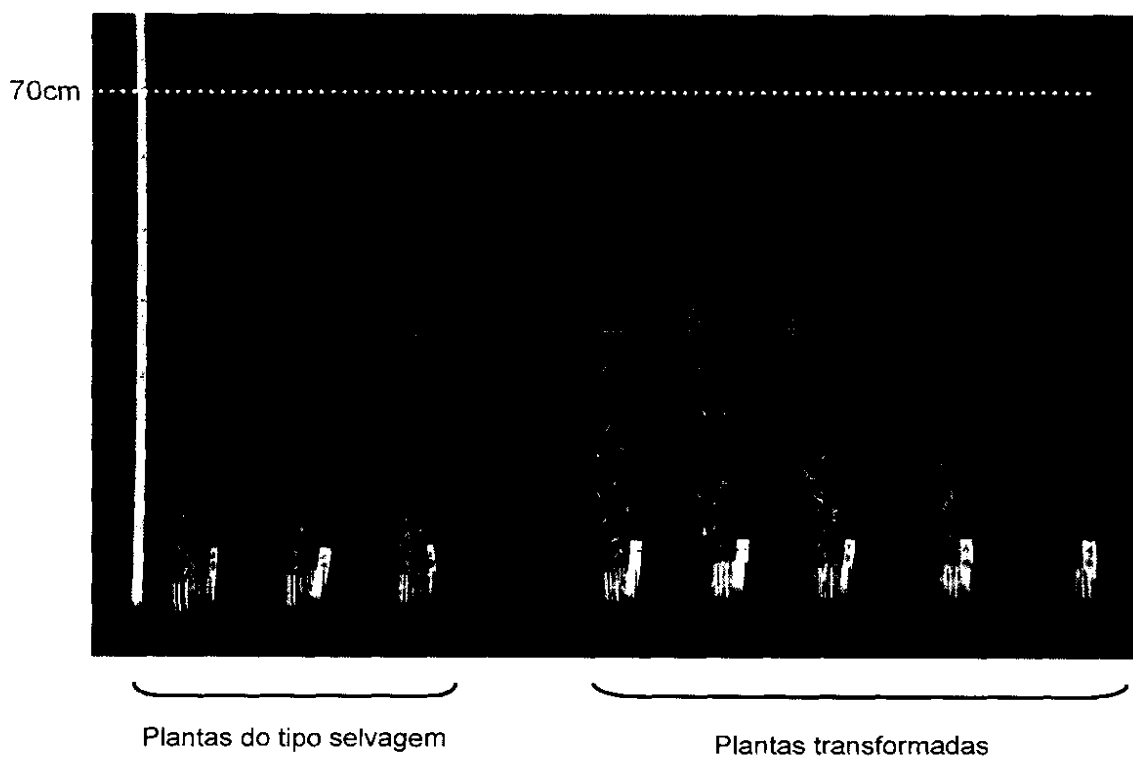
Fig. 2-3

AT1G16220 ETNETVPVWEIKKEKTPESCRIESKKT---TLAECISVK--DDEEWSALEGLTRVNSLLSIP
AT1G79630 ---EIVP---VKDEKIPESCGIESKMMTMTLAECISVAQDDDEEWSALEGLTRVNSLLSIP
At1g03590 CLQRNVTVRSLSTDQENNSYGKVI AEA--DNAEKEKTREGEQNWSGLEGVTRVNSLVQLP
AT3G02750 SGLGRSSTVRSKGEIALDESETEKLIK---EADNLDSEPGTEYSALEGVARVNTLLNLP
AT5G36250 -----FSKEKHINNGVTEPEPD-----TASSSTPDSGTGSPELNGVNRIDTLVNLP
AT5G26010 -----KEQPS-----
AT4G32950 -----KHNPQPQI-----
AT5G01700 -----RPYPREGNVSRAIS-----TISWRSNKSNNECYGAAPLSPLGLSQ
AT3G05640 -----
AT5G27930 -----
AT3G16800 -----

AT1G16220 RFFSGELRSSSWRKWL
AT1G79630 RFLSGELRSTSWRKWL
At1g03590 RFPGEPPK-----
AT3G02750 RFVPGK-----
AT5G36250 VYVPTKE-----
AT5G26010 -----
AT4G32950 -----
AT5G01700 RVS-----
AT3G05640 -----
AT5G27930 -----
AT3G16800 -----

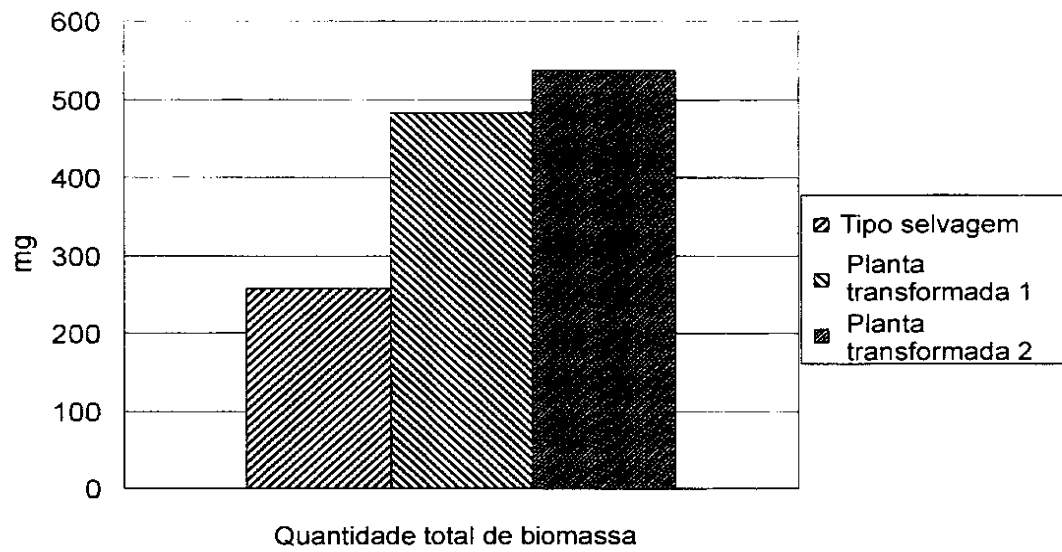
7/12

Fig. 3



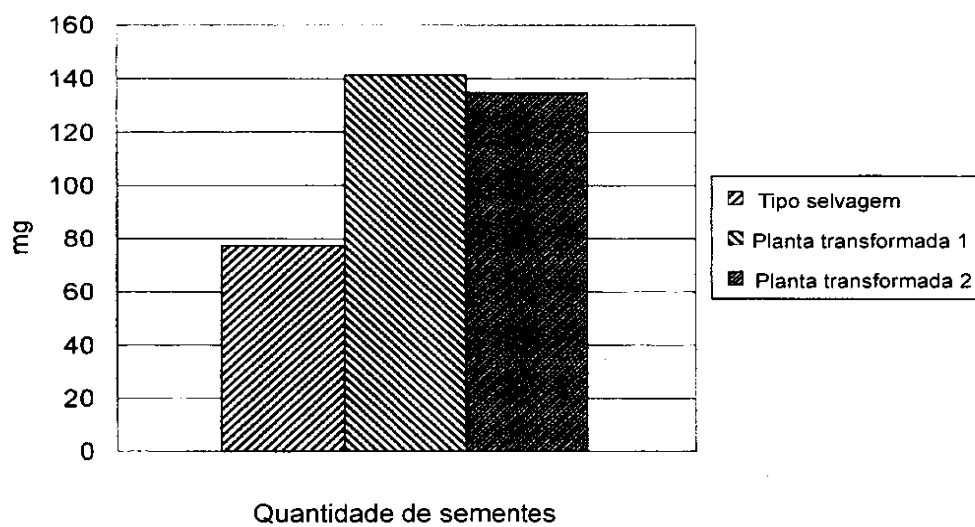
8/12

Fig. 4



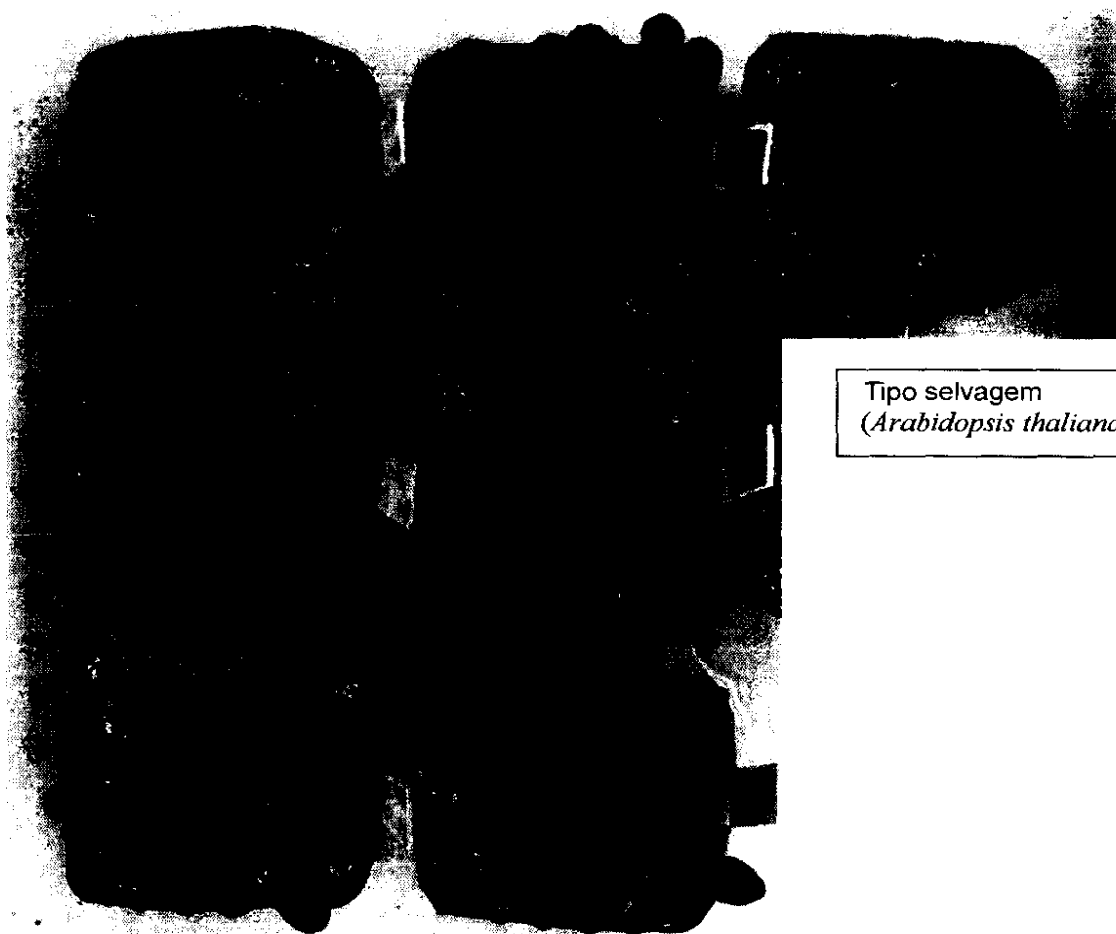
9/12

Fig. 5



10/12

Fig. 6



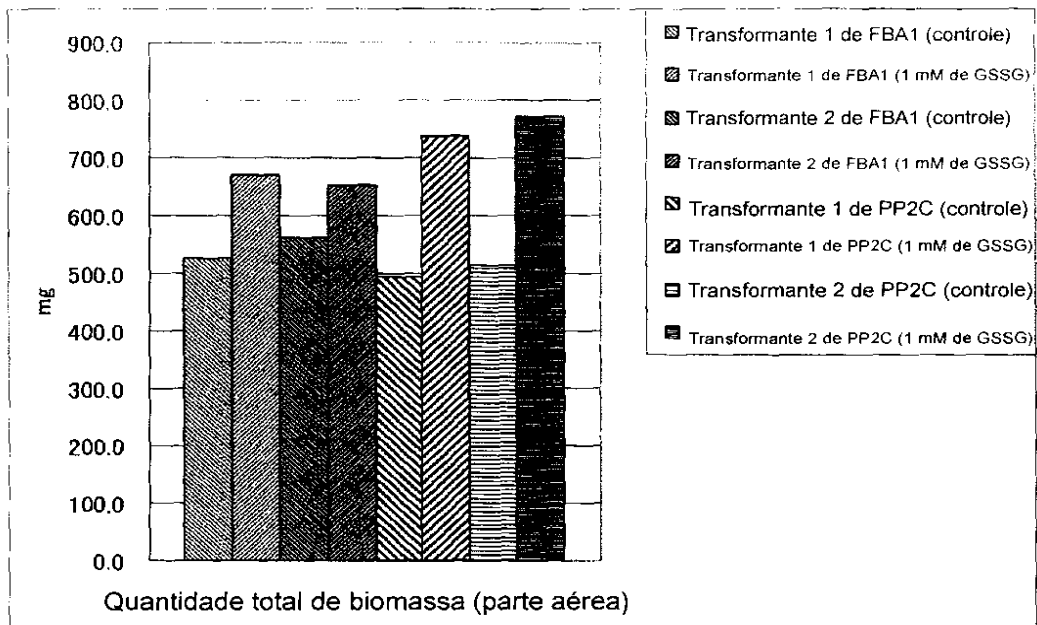
Plantas FBA1 transformadas

Plantas PP2C transformadas

Tipo selvagem
(*Arabidopsis thaliana*)

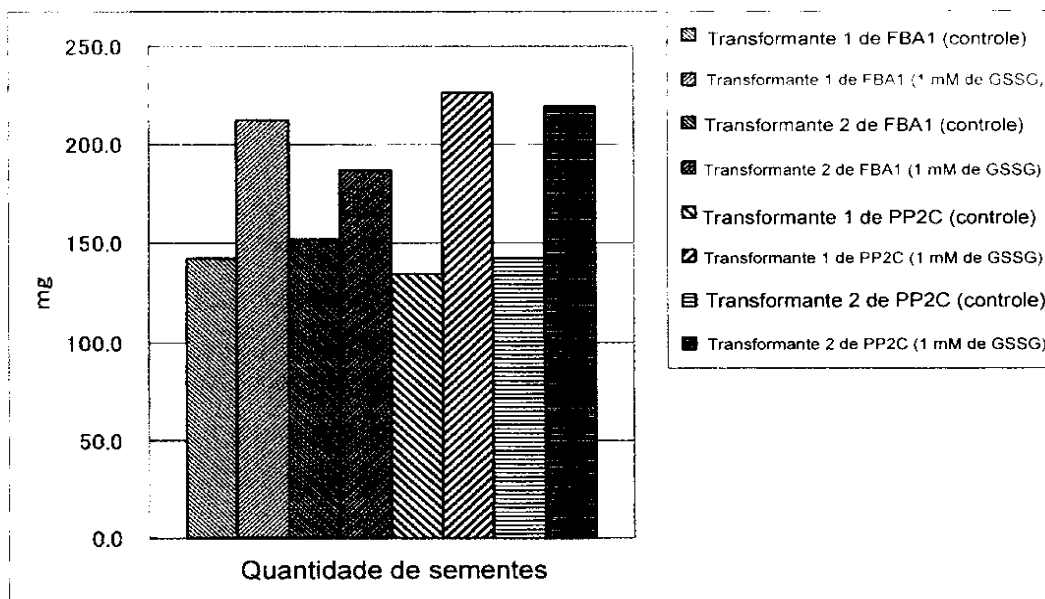
11/12

Fig. 7



12/12

Fig. 8





RESUMO

Patente de Invenção: **"MÉTODO PARA AUMENTAR A PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE PLANTA E/OU SEMENTES E MÉTODO PARA PRODUZIR PLANTA CAPAZ DE PRODUZIR QUANTIDADE AUMENTADA DE BIOMASSA E/OU SEMENTES"**.

A presente invenção refere-se à produção de biomassa e/ou sementes que é adicionalmente aumentada. A produção de biomassa e/ou sementes por uma planta pode ser aumentada adicionalmente através do fornecimento de glutathione a uma planta na qual um gene que codifica uma proteína fosfatase 2C que tem sequências consenso características foi introduzido.